



Molekularne podstawy syntezy aldosteronu i kortyzolu w prawidłowych nadnerczach i w gruczolakach kory nadnerczy

Molecular basics of aldosterone and cortisol synthesis in normal adrenals and adrenocortical adenomas

Jacek Ziaja¹, Krzysztof Cholewa², Urszula Mazurek³, Lech Cierpka¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej i Transplantacyjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

²Katedra i Zakład Biochemii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

³Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było przedstawienie genów kodujących białka enzymatyczne szlaku syntezy aldosteronu i kortyzolu, metod oceny ich aktywności transkrypcyjnej, jak również ekspresji ich mRNA w obrębie kory prawidłowych nadnerczy, w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym z zespołami Conna i Cushinga oraz w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym, u których nie wykazano nadczynności hormonalnej guza.

Z przedstawionych doniesień wynika, że najlepiej poznano ekspresję mRNA omawianych genów w tkance uzyskanej z guzów nadnerczy usuniętych chorym z zespołem Conna. Natomiast aktywność transkrypcyjną tych genów w obrębie pozostałych gruczolaków kory nadnerczy udokumentowano w mniejszym stopniu. Dotyczy to szczególnie analiz materiału tkankowego uzyskanego od pacjentów, u których aktywności hormonalnej guzów nadnerczy nie udało się wykazać za pomocą badań biochemicznych. Warto podkreślić również fakt, że układem odniesienia większości analiz molekularnych tkanki guzów kory nadnerczy był materiał uzyskany z niewielkiej liczby prawidłowych nadnerczy, co w pewnym stopniu zmniejsza wiarygodność uzyskanych wyników. Powyższe uwagi stanowią podstawę do prowadzenia dalszych badań na podstawie większego materiału, uzyskanego zarówno z prawidłowych nadnerczy, jak i z gruczolaków wywodzących się z kory tego narządu. (*Endokrynol Pol* 2008; 59 (4): 330–339)

Słowa kluczowe: kora nadnerczy, gruczolak kory nadnerczy, aldosteron, kortyzol, zespół Conna, zespół Cushinga, ekspresja, mRNA, gen

Abstract

The aim of the study is to present genes encoding enzymatic proteins of aldosterone and cortisol synthesis pathway, methods of their transcriptional activity measurement, mRNA expression of the genes in normal adrenal cortex, in adrenocortical adenomas excised from patients with Conn and Cushing syndromes, as well as in adrenocortical adenomas excised from patients, in which hormonal activity of the tumour was not confirmed.

According to presented papers mRNA expression of analyzed genes is best known in tissue obtained from tumours excised from patients with Conn syndrome. On the other hand transcriptional activity of the genes within the other adrenocortical adenomas is documented in lesser degree. It concerns particularly analyses of tissue material obtained from patients, in which hormonal activity of adrenal tumours was not confirmed with biochemical tests.

It should be also considered, that the frame of reference for the majority of molecular analyses of adrenocortical tumour tissues was material obtained from little number of normal adrenals, what decreases in some degree credibility of obtained results. Mentioned above remarks may be the basis for conduction of further investigations based on larger material, obtained both from normal adrenals and adrenocortical adenomas. (*Pol J Endocrinol* 2008; 59 (4): 330–339)

Key words: adrenal cortex, adrenocortical adenoma, aldosterone, cortisol, Conn syndrome, Cushing syndrome, expression, mRNA, gene

Wstęp

Wytwarzany w obrębie warstwy kłębkowatej kory nadnerczy aldosteron jest jednym z najważniejszych hormonów regulujących ciśnienie tętnicze [1, 2]. Syntetyzowany w warstwie pasmowatej kory nadnerczy kor-

tyzol poprzez swoje wielokierunkowe działanie wpływa również na wartości ciśnienia tętniczego [1, 3]. Nadmierna produkcja aldosteronu w obrębie gruczolaków kory nadnerczy stanowi najczęstszą przyczynę nadciśnienia hormonalnego [4]. Natomiast zwiększona



Dr med. Jacek Ziaja, Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej i Transplantacyjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Francuska 20–24, 40–027 Katowice, tel.: 603 680 860, faks: 032 255 50 52, e-mail: ziacek@mp.pl

produkcja kortyzolu objawia się nadciśnieniem tętniczym w 74–90% przypadków [5, 6].

W obu omawianych zespołach jedynie chirurgiczne usunięcie guza stwarza szansę na wyleczenie nadciśnienia tętniczego i uwolnienie chorego od objawów klinicznych towarzyszących nadciśnieniu [7–16]. Z drugiej strony u części pacjentów, mimo usunięcia czynnego hormonalnie gruczolaka nadnercza, utrzymują się podwyższone wartości ciśnienia tętniczego [7, 8, 13–15, 17–20].

Osobnym problemem klinicznym są wykrywane przypadkowo guzy nadnercza — *incidentaloma* [21–24]. U chorych z takimi guzami najczęściej rozpoznawanym zaburzeniem jest subkliniczny zespół Cushinga, jednak u części z nich nawet wnikliwa diagnostyka biochemiczna nie wykazuje nadmiernej aktywności hormonalnej uwidocznionego guza [21–25]. Szczególnie trudnym problemem klinicznym jest sytuacja, w której z brakiem potwierdzenia nadczynności hormonalnej przypadkowo wykrytego guza nadnercza mamy do czynienia u chorych z nadciśnieniem tętniczym, zaburzoną tolerancją glukozy lub insulinoopornością [25–28]. Na uwagę zasługuje fakt, że konsekwencją chirurgicznego usunięcia guza typu *incidentaloma* u pewnego odsetka chorych jest poprawa kontroli ciśnienia tętniczego i cukrzycy [14, 25, 26, 29, 30].

Utrzymującego się po adrenalektomii nadciśnienia tętniczego u chorych z pierwotnym hiperaldosteronizmem i hiperkortyzolemią, jak również ustąpienia lub poprawy kontroli ciśnienia tętniczego po usunięciu guza typu *incidentaloma* nie można wyjaśnić jedynie na podstawie badań biochemicznych i hormonalnych.

Analiza podstaw molekularnych syntezy aldosteronu i kortyzolu w obrębie omawianych guzów stanowi jedną z potencjalnych możliwości wyjaśnienia przyczyn powyższych obserwacji klinicznych.

Celem niniejszej pracy było przedstawienie genów kodujących białka enzymatyczne odpowiedzialne za syntezę aldosteronu i kortyzolu, metod oceny ich aktywności transkrypcyjnej, jak również ekspresji ich mRNA w obrębie kory prawidłowych nadnerczy, w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym z potwierdzonymi za pomocą badań biochemicznych zespołami Conna i Cushinga oraz w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym, u których nie wykazano nadczynności hormonalnej guza.

Metody oceny aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka enzymatyczne syntezy aldosteronu i kortyzolu

W badaniach mających na celu ocenę aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka enzymatyczne steroidogenezy w obrębie nadnerczy wykorzystuje się

półilościową technikę detekcji RNA metodą hybrydyzacji *northern blot* [31–34]. Aby określić lokalizację ekspresji odpowiedniego mRNA, hybrydyzację można wykonać *in situ* w zamrożonych lub utrwalonych w formalinie skrawkach badanego materiału [33, 35, 36].

W przypadku genów, których ekspresja mRNA jest niewielka, analiza ilościowa przeprowadzana metodą hybrydyzacji *northern* może być za mało czuła. W tej sytuacji konieczne jest namnożenie mRNA przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RT-PCR, *reverse transcriptase and polymerase chain reaction*), której pierwszym etapem jest przepisanie RNA na cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy, a kolejnym — amplifikacja wybranego fragmentu flankowanego przez pary specyficznych oligonukleotydów startowych (primerów) [31, 36, 37].

Ograniczeniem metody PCR jest czasochłonny etap detekcji produktu reakcji i jego ilości. Używa się w tym celu technik, takich jak elektroforeza w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym, Southern blot czy ELISA, które umożliwiają analizę zarówno jakościową, jak i ilościową.

Metodą PCR pozwalającą na bardzo szybką analizę ilości produktu w każdym cyklu reakcji PCR jest łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (*real time PCR, real-time polymerase chain reaction*). W tej technice obok pary specyficznych primerów występuje wyznakowana fluorescencyjnie sonda komplementarna do ściśle określonego miejsca pomiędzy primerami. Wzrost poziomu fluorescencji spowodowany wbudowaniem sondy w amplifikowany fragment cDNA mierzy się po każdym cyklu reakcji. W badaniach mających na celu wykazanie ekspresji mRNA zastosowanie znajduje łańcuchowa reakcja polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (RT *real-time PCR, reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction*), gdzie na pierwszym etapie konieczne jest również przepisanie RNA na cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy [38, 39].

W celu wykazania ekspresji mRNA genów oraz w celach przesiewowych coraz częściej stosuje się mikromacierze genowe [33, 39–41], chociaż dla analizy ilościowej RT *real-time PCR* pozostaje metodą bardziej czułą.

Aby potwierdzić obecność białek enzymatycznych kodowanych przez określone geny, wykorzystuje się również analizę stężeń produktów katalizowanych przez nie reakcji (czyli hormonów steroidowych) w tkance nadnerczowej lub w izolowanych komórkach nadnerczowych przy użyciu technik radioimmunologicznych [32].

Badania mające na celu określenie ekspresji omawianych genów w prawidłowych nadnerczach wyko-

Tabela I. Enzymy biorące udział w biosyntezie kortyzolu i aldosteronu [48]

Table I. Enzymes involved in the biosynthesis of cortisol and aldosterone [48]

Nazwa enzymu	Symbol białka enzymatycznego	Aktywność enzymu	Symbol genu kodującego enzym
Enzym rozszczepiający łańcuch boczny cholesterolu zawierający cytochrom P-450	P450scc	22-hydroksylaza, 20-hydroksylaza, 20,22-liaza	CYP 11A1
Hydroksylaza 17 α -steroidowa	P450c17	hydroksylaza 17 α -steroidowa, 17,20-liaza	CYP 17A1
Hydroksylaza 21-steroidowa	P450c21	hydroksylaza 21-steroidowa	CYP 21A2
Hydroksylaza 11 β -steroidowa	P450c11 β	hydroksylaza 11 β -steroidowa	CYP 11B1
Syntetaza aldosteronowa	P450c11AS	11-hydroksylaza, 18-hydroksylaza, 18-hydroksydehydrogenaza	CYP 11B2
Dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa; Δ 5,4-izomeraza	3 β -HSD II	dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa; Δ 5,4-izomeraza	HSD 3B2

Tabela II. Lokalizacja enzymów biorących udział w biosyntezie aldosteronu i kortyzolu w obrębie komórki i poszczególnych warstw kory nadnerczy [48]

Table II. Location of enzymes involved in the biosynthesis of cortisol and aldosterone within the cell and adrenal cortex zones [48]

Symbol białka enzymatycznego	Lokalizacja komórkowa	Lokalizacja w obrębie warstwy kory nadnerczy	Udział w syntezie hormonu
P450scc	Mitochondrium	Wszystkie	Aldosteron lub kortyzol
P450c17	Siateczka śródplazmatyczna	Pasmowata Siatkowata	Kortyzol
P450c21	Siateczka śródplazmatyczna	Wszystkie	Aldosteron lub kortyzol
P450c11 β	Mitochondrium	Pasmowata Siatkowata	Kortyzol
P450c11AS	Mitochondrium	Kłębkowata	Aldosteron
3 β -HSD II	Siateczka śródplazmatyczna; mitochondrium	Kłębkowata Pasmowata > Siatkowata	Aldosteron lub kortyzol

nuje się najczęściej w tkance nadnerczowej uzyskanej od zmarłych dawców narządów, po pobraniu nerek do przeszczepu [31, 42–45]. Niektórzy badacze oceniają ekspresję genów steroidogenezy w nadnerczach usuniętych wraz z nerką i tkanką okołonerkową u chorych poddanych nefrektomii z powodu raka nerki, po wykluczeniu przerzutów do nadnercza [32, 38, 46]. W niektórych pracach układem odniesienia jest dodatkowo tkanka nadnerczowa z niezmienionej guzowato części nadnercza [47].

Białka enzymatyczne syntezy aldosteronu i kortyzolu i ekspresja mRNA genów je kodujących w korze prawidłowych nadnerczy

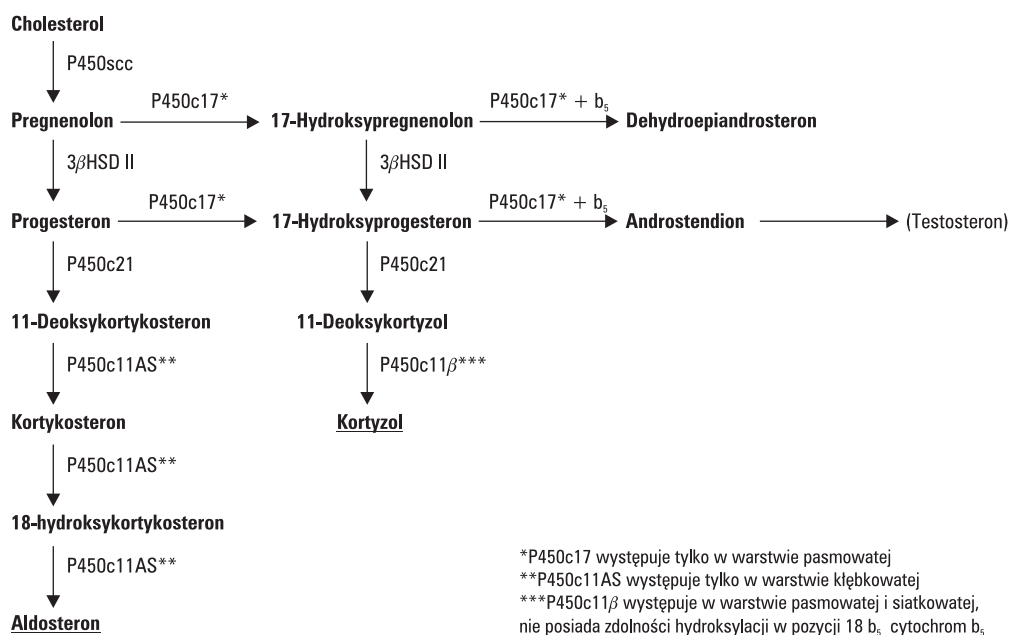
W biosyntezie aldosteronu i kortyzolu kluczową rolę odgrywa sześć enzymów, których nazwy, symbole

i aktywność enzymatyczną oraz nazwy genów kodujących wspomniane białka enzymatyczne przedstawiono w tabeli I.

Zróznicowaną lokalizację poszczególnych enzymów, zarówno w obrębie komórki, jak i w poszczególnych warstwach kory nadnerczy oraz udział w syntezie aldosteronu i kortyzolu przedstawiono w tabeli II oraz na rycinie 1.

Enzym rozszczepiający łańcuch boczny cholesterolu zawierający cytochrom P-450

Szlak syntezy steroidów nadnerczowych rozpoczyna enzym rozszczepiający łańcuch boczny cholesterolu zawierający cytochrom P-450 (P450scc) [EC 1.14.15.67]. Białko enzymatyczne P450scc o masie 60 180 daltonów zbudowane jest z 521 aminokwasów [50]. Katalizowana przez ten enzym reakcja składa się z 3 etapów: hydroksylacji cholesterolu przy węglu w pozycji 22,



Rycina 1. Schemat szlaku biosyntezy aldosteronu i kortyzolu [49]

Figure 1. Biosynthesis pathway of aldosterone and cortisol [49]

hydroksylacji 22-hydroksycholesterolu przy węglu w pozycji 20 i odszczepienia 6-węglowego łańcucha od 20,22-dihydroksycholesterolu [48].

Ludzki gen *CYP 11A1*, kodujący białko enzymatyczne P450scc, jest zlokalizowany na chromosomie 15 w pozycji q23–q24 i zbudowany z 29 977 par zasad [40, 48, 50, 51]. Ekspresja mRNA genu kodującego białko P450scc jest indukowana w warstwie pasmowatej i siatkowatej przez cAMP [52, 53], a w warstwie kłębkowej przez wewnątrzkomórkową kinazę proteinową C [54]. Racz i wsp. [32] wykazali za pomocą metody hybrydyzacji *northern blot* obecność mRNA genu kodującego białko P450scc w obrębie kory nadnerczy uzyskanych z tkanki okołonerkowej chorych poddanych nefrektomii z powodu raka nerki. Podobnie ekspresję mRNA genu *CYP 11A1* przy użyciu techniki RT-PCR i hybrydyzacji typu *northern blot* wykazali Zenker i wsp. [31]. Bassett i wsp. [39] potwierdzili ekspresję genu *CYP 11A1* na poziomie RNA, stosując RT *real-time* PCR. Analizując strukturę prawidłowych nadnerczy uzyskanych od zmarłych dawców narządów, Reincke i wsp. wykazali, przy użyciu hybrydyzacji *in situ*, porównywalną ekspresję mRNA genu kodującego białko P450scc we wszystkich warstwach kory nadnerczy [35]. Suwa i wsp. potwierdzili, stosując metodę hybrydyzacji *northern blot* w homogenacie tkanki nadnerczowej, transkrypcję genu *CYP 11A1* łącznie w warstwie kłębkowatej i pasmowatej, jak również w warstwie siatkowatej, z niewielką przewagą ekspresji w tej ostatniej [33]. Transkrypcja genu kodującego białko P450scc w obrębie kory

nadnerczy stanowi kontrolę dla wielu doświadczeń dotyczących ekspresji genów kodujących białka enzymatyczne steroidogenezy w obrębie guzów kory nadnerczy [31, 35, 42, 44].

Hydroksylaza 17 α -steroidowa

Hydroksylaza 17 α -steroidowa (P40c17) [EC 1.14.99.9] jest kluczowym enzymem szlaku syntezy kortyzolu [55]. Białko enzymatyczne P450c17 składa się z 508 aminokwasów o masie 57 371 daltonów [50]. Odpowiada ono za dwie reakcje enzymatyczne: hydroksylację pregnenolonu lub progesteronu w pozycji 17 (17 α -hydroksylaza) oraz odszczepienie łańcucha bocznego (17,20-liaza) [55–57]. 17 α -hydroksylaza działa na pregnenolon lub rzadziej na progesteron. Jeśli reakcja przy węglu 21 poprzedzi reakcję przy węglu 17, to następuje zahamowanie aktywności 17 α -hydroksylazy, a w konsekwencji aktywacja szlaku syntezy kortykosteronu i aldosteronu [58]. Aktywność lityczna P450c17 ulega wzmocnieniu w obecności cytochromu b₅ [59, 60] oraz przy zmniejszonej ilości dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej; Δ 5,4-izomerazy (3 β -HSD II) w warstwie siatkowatej kory nadnerczy [59, 61–63].

U człowieka za syntezę P450c17 odpowiada gen *CYP 17A1*, zlokalizowany na chromosomie 10 w pozycji q24.3 i zbudowany z 7002 par zasad [40, 50, 55–57]. Racz i wsp. wykazali, stosując metodę hybrydyzacji *northern blot*, ekspresję mRNA genu kodującego białko P450c17 w obrębie kory nadnerczy uzyskanych z tkanki okołonerkowej chorych poddanych nefrektomii z powodu

raka nerki [32]. Obecność mRNA genu *CYP 17A1* potwierdzili niezależnie Curnow i wsp. przy użyciu techniki RT-PCR [37], jak również Bassett i wsp. [39] oraz Fallo i wsp. [38] oznaczający ilość kopii genu kodującego białko P450c17 techniką RT *real time* PCR. Analizując strukturę prawidłowych nadnerczy uzyskanych od zmarłych dawców narządów, Reincke i wsp. wykazali, przy użyciu hybrydyzacji *in situ*, wysoką aktywność transkrypcyjną genu kodującego białko P450c17 w warstwie pasmowatej i siatkowatej oraz jej brak w warstwie kłębkowej [35].

Hydroksylaza 21-steroidowa

Hydroksylaza 21-steroidowa (P450c21) [E.C. 1.14.99.10] jest enzymem uczestniczącym w syntezie zarówno mineralo-, jak i glukokortykoidów. Białko P450c21 jest kodowane przez gen *CYP 21A2* (inaczej *CYP 21B*), zlokalizowany na chromosomie 6 w pozycji p21.1, składający się z 3365 par zasad [40, 50, 64]. Ludzkie białko P450c21 występuje tylko w nadnerczach [48]. Jest ono zbudowane z 494 aminokwasów i posiada masę 55 887 daltonów [50]. Omawiany enzym katalizuje hydroksylację progesteronu i 17-hydroksyprogesteronu w pozycji 21.

Gen *CYP 21A2* leży w pobliżu pseudogenu *CYP 21A1*, w środku *locus* HLA, które jest bardzo zmienne. Powstające tam mutacje powodują często zmniejszoną ekspresję białka enzymatycznego P450c21, którego niedobór należy do najczęstszych autosomalnych chorób recesywnych [48]. Racz i wsp. wykazali, stosując metodę hybrydyzacji *northern blot*, ekspresję mRNA genu kodującego białko P450c21 w obrębie kory nadnerczy uzyskanych z tkanki okołonerkowej chorych poddanych nefrektomii z powodu raka nerki [32]. Wynik ten potwierdzili przy użyciu metody ilościowej Bassett i wsp. [39]. Również ekspresja genu kodującego białko P450c21 na poziomie mRNA w obrębie kory prawidłowych nadnerczy może stanowić układ odniesienia dla analizy ekspresji genów w obrębie guzów kory nadnerczy [42].

Hydroksylaza 11 β -steroidowa

Hydroksylaza 11 β -steroidowa (P450c11 β) [E.C. 1.14.15.4] składa się z 503 aminokwasów i posiada masę 57 529 daltonów [50]. Obecność białka enzymatycznego P450c11 β potwierdzono immunohistochemicznie w warstwie pasmowatej i siatkowatej [65]. Białko enzymatyczne P450c11 β posiada jedynie aktywność 11 β -hydroksylazy, niezbędnej do syntezy kortyzolu, natomiast nie jest w stanie przekształcić kortykosteronu w aldosteron [49]. Regulacja syntezy P450c11 β odbywa się przy udziale cAMP w odpowiedzi na podwyższone stężenie adrenokortykotropiny (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*) [37, 52].

U człowieka białko P450c11 β jest kodowane przez gen *CYP 11B1*, zlokalizowany na chromosomie 8 w pozycji q21 [34, 40, 50, 66, 67]. Gen *CYP 11B1* zawiera

7463 par zasad [50, 67]. Obecność transkryptu genu *CYP 11B1* w obrębie ludzkich nadnerczy potwierdzili niezależnie Pascoe i wsp. [36] oraz Mornet i wsp. [34], stosując metodę hybrydyzacji *northern blot*, Curnow i wsp. przy użyciu metody RT-PCR [37], jak również Fallo i wsp. [38] oraz Bassett i wsp. [39] z zastosowaniem RT-PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym. Hybrydyzacja *in situ* ludzkich nadnerczy wykazała obecność mRNA genu *CYP 11B1* w warstwie pasmowatej i siatkowatej, chociaż była ona również widoczna w warstwie kłębkowatej [36].

Syntetaza aldosteronowa

Podobnie jak białko enzymatyczne P450c11 β , syntetaza aldosteronowa (P450c11AS) [E.C. 1.14.15.4 i E.C. 1.14.15.5] posiada aktywność 11 β -hydroksylazy, ale dodatkowo dokonuje dwóch oksygenacji niezbędnych do syntezy aldosteronu [49]. Aktywność białka enzymatycznego P450c11AS jest ograniczona do warstwy kłębkowatej kory nadnerczy [48]. Czynnikiem sprzyjającym aktywności 18-hydroksylazy i 18-hydroksydehydrogenazy w warstwie kłębkowatej jest mała aktywność 17-hydroksylazy, ograniczającej ilość steroidów, które mogą być poddane wspomnianym reakcjom [48].

U człowieka syntetaza aldosteronowa jest kodowana przez odrębny gen *CYP 11B2*, znajdujący się na chromosomie 8 w pozycji q21–q22 [34, 50, 67, 68]. Gen *CYP 11B2* zawiera 7284 par zasad i w obrębie sekwencji kodującej wykazuje 95-procentową homologię do genu *CYP 11B1* [67]. Kodowane przez gen *CYP 11B2* białko enzymatyczne zbudowane jest z 503 aminokwasów i ma masę 57 560 daltonów [50]. Transkrypcja genu kodującego białko P450c11AS zachodzi poprzez aktywację kinazy białkowej C pod wpływem angiotensyny II [37, 69]. W badaniach Mornet i wsp. przy użyciu techniki hybrydyzacji *northern blot* nie udało się wykryć mRNA, będącego transkryptem genu *CYP 11B2* w obrębie ludzkiej tkanki nadnerczowej [34]. Może to wynikać z faktu, że produkcja aldosteronu jest 1000-krotnie niższa niż kortyzolu i ekspresja genu kodującego enzym o aktywności 18-oksydazy jedynie w warstwie kłębkowatej może być niewykrywalna metodą hybrydyzacji *northern blot* w materiale uzyskanym ze wszystkich warstw kory nadnercza [34]. Obecność transkryptu genu *CYP 11B2* w obrębie kory nadnerczy udało się wykazać dopiero Curnow i wsp. metodą RT-PCR [37]. W analizie RT *real-time* PCR Bassett i wsp. [39], jak również Fallo i wsp. [38] wykazali ekspresję mRNA genu *CYP 11B2* w obrębie tkanki nadnerczowej na bardzo niskim poziomie. Pascoe i wsp. potwierdzili metodą hybrydyzacji *in situ* silną ekspresję genu *CYP 11B2* na poziomie mRNA w warstwie kłębkowatej ludzkich nadnerczy i prawie jej brak w dwóch pozostałych warstwach [36].

Tabela III. Ekspresja genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w biosyntezie aldosteronu (wyszczególnione pogrubioną czcionką) i kortyzolu w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym z potwierdzonym za pomocą badań biochemicznych zespołem Conna

Table III. Expression of genes encoding enzyme proteins involved in the biosynthesis of aldosterone (bold) and cortisol in adrenal cortical adenomas resected from patients with biochemically confirmed Conn's syndrome

Autor	Rok	Liczba guzów	CYP 11A1	CYP 17A1	CYP 21A2	CYP 11B1	CYP 11B2	HSD 3B2
Racz i wsp. [32]	1993	9	49%	118%	104%			
Wu i wsp. [47]	1995	6		40%		23%	1967%	
Reincke i wsp. [44]	1997	9	100%					
Reincke i wsp. [35]	1998	3	86	77%				
Beuschlein i wsp. [42]	1998	6	83%	108%	84%			
Fallo i wsp. [38]	2002	12		76%		11%	772%	
Bassett i wsp. [39]	2005	12*	131%	53%	247%	122%	1555%	367%

*19 guzów dla CYP 11B1 i CYP 11B2

Dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa; Δ 5,4-izomeraza

Ludzkie białko enzymatyczne dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa; Δ 5,4-izomeraza (3 β -HSD) [E.C. 1.1.1.145 (dehydrogenaza) i E.C. 5.3.3.1 (izomeraza)] zbudowane jest z 372 aminokwasów, a jego masa wynosi 42 052 daltonów [50]. Katalizuje ono dwuetapowo konwersję steroidów z Δ 5 w Δ 4, niezbędną do syntezy zarówno mineralo-, jak i glukokortykoidów [70]. 3 β -HSD zlokalizowana jest zarówno w siateczce śródplazmatycznej, jak i w mitochondrium — i w obu tych organellach ma jednakową aktywność [71, 72].

U człowieka zidentyfikowano 2 geny odpowiedzialne za syntezę 3 β -HSD, zlokalizowane na chromosomie 1 w pozycji p13.1 [50, 70], z których gen *HSD 3B2* odpowiada za syntezę 3 β -HSD typu II w obrębie kory nadnerczy, a przede wszystkim w obrębie warstwy kłębkowej i pasmowatej [48, 61, 73]. Gen *HSD 3B2* zawiera 7950 par zasad [50, 70].

Obecność mRNA genu *HSD 3B2* w obrębie prawidłowych nadnerczy potwierdzili w badaniu RT *real-time* PCR Bassett i wsp. [39]. Ponadto Suwa i wsp. wykazali za pomocą metody hybrydyzacji *northern blot*, że ekspresja genu *HSD 3B2* na poziomie mRNA jest znacznie wyższa w łącznie badanej warstwie pasmowatej i kłębkowej w porównaniu z warstwą siatkową kory nadnerczy [33].

Ekspresja genów kodujących białka enzymatyczne syntezy aldosteronu i kortyzolu w gruczolakach kory nadnerczy

Gruczolaki kory nadnerczy produkujące aldosteron

Aktywność transkrypcyjną genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w biosyntezie aldosteronu i kortyzolu w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych

chorym z potwierdzonym za pomocą badań biochemicznych zespołem Conna przedstawiono w tabeli III.

W prezentowanych pracach zwraca uwagę 15–20-krotnie większa aktywność transkrypcyjna genu *CYP 11B2* w porównaniu z wartościami mierzonymi w prawidłowych nadnerczach [39, 47]. Wynika to po części z faktu, że w homogenacie tkanki prawidłowych nadnerczy służących jako kontrola ilość komórek warstwy kłębkowatej jest znikoma w porównaniu z dwoma pozostałymi warstwami i w konsekwencji aktywność transkrypcyjna genu *CYP 11B2* jest bardzo mała [39, 47].

Ekspresja genów kodujących białka enzymatyczne wspólnie dla szlaku syntezy aldosteronu i kortyzolu w badaniach większości autorów w gruczolakach produkujących aldosteron jest porównywalna lub wyższa od ich aktywności transkrypcyjnej w prawidłowych nadnerczach [32, 35, 39, 42, 44]. Znaczne wahania w aktywności transkrypcyjnej omawianych genów w wielu pracach można po części tłumaczyć zróżnicowaniem ekspresji genów w różnych obszarach guzów, co potwierdzono między innymi w przypadku genu kodującego białko enzymatyczne P450_{scc} metodą hybrydyzacji *in situ*, przeprowadzonej w guzach produkujących aldosteron [35].

Potwierdzeniem wzmożonej ekspresji aktywności transkrypcyjnej genów szlaku syntezy aldosteronu jest podwyższona zawartość aldosteronu i 18-hydroksykortykosteronu w omawianych guzach [32].

Mimo faktu, że białka enzymatyczne P450_{c17} i P450_{c11 β} nie są niezbędne do syntezy aldosteronu, kilku autorów stwierdziło ich wysoką ekspresję w obrębie gruczolaków kory nadnerczy produkujących aldosteron [32, 38, 39, 42]. Obserwacje te potwierdzono w badaniach, stosując technikę hybrydyzacji *in situ*, w których wykazano obecność mRNA genu kodującego białko P450_{c17} w gruczolakach produkujących aldosteron [35].

Tabela IV. Ekspresja genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w biosyntezie aldosteronu i kortyzolu (wyszczególnione pogrubioną czcionką) w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym z potwierdzonym za pomocą badań biochemicznych ACTH-niezależnym zespołem Cushinga

Table IV. Expression of genes encoding enzyme proteins involved in the biosynthesis of aldosterone and cortisol (bold) in adrenal cortical adenomas resected from patients with biochemically confirmed ACTH-independent Cushing's syndrome

Autor	Rok	Liczba guzów	CYP 11A1	CYP 17A1	CYP 21A2	CYP 11B1	CYP 11B2	HSD 3B2
Reincke i wsp. [44]	1997	5	82%					
Beuschlein i wsp. [42]	1998	7	96%	144%	101%			
Reincke i wsp. [35]	1998	2	142%	116%				
Bassett i wsp. [39]	2005	12*	167%	183%	157%	235%	38%	384%

*14 guzów dla CYP 11B1 i CYP11B2

Obecność mRNA genów szlaku syntezy kortyzolu obserwowanych w gruczolakach produkujących aldosteron może wynikać ze znacznej liczby komórek podobnych do komórek warstwy pasmowatej [38]. Guzy produkujące aldosteron są w przeważającym stopniu zbudowane z komórek zbliżonych do komórek warstwy pasmowatej i jedynie w niewielkim stopniu widoczne są w nich komórki, które posiadają cechy komórek warstwy kłębkowatej [32, 38, 74]. Wu i wsp. wykazali, że im więcej jest komórek warstwy pasmowatej w badanym guzie, tym większa jest aktywność transkrypcyjna genów kodujących białka P45011 β i P450AS [47].

Dodatkowym czynnikiem, wpływającym na produkcję aldosteronu w obrębie omawianych gruczolaków jest obecność receptorów ACTH. Reincke i wsp. wykazali wysoką korelację ekspresji mRNA genu CYP 11B2 z ekspresją mRNA genu kodującego białko receptora ACTH w obrębie łagodnych guzów kory nadnerczy produkujących aldosteron [44]. Ponadto Pilon i wsp. wykazali nadprodukcję aldosteronu w omawianych guzach pod wpływem stymulacji ACTH [75].

Wu i wsp. przeprowadzili dodatkowo analizę ekspresji wybranych genów w tkance nadnercza otaczającego guz [47]. W tkance nadnerczy otaczającej gruczolaka produkującego aldosteron transkrypcja genu kodującego białko P450c17 była porównywalna z ekspresją w prawidłowych nadnerczach (82%), natomiast genów kodujących białka enzymatyczne P45011 β i P450AS — znacznie niższa — odpowiednio 43,0% i 33,5% [47].

Gruczolaki kory nadnerczy produkujące kortyzol

Aktywność transkrypcyjną genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w biosyntezie aldosteronu i kortyzolu w gruczolakach kory nadnerczy, usuniętych chorym z potwierdzonym za pomocą badań biochemicznych ACTH-niezależnym zespołem Cushinga przedstawiono w tabeli IV.

W gruczolakach kory nadnerczy produkujących kortyzol praktycznie nie stwierdzono obecności transkryptu genu CYP 11B2 [39]. Natomiast aktywność transkrypcyjna genów kodujących białka enzymatyczne szlaku syntezy kortyzolu była porównywalna lub znacznie przekraczała wartości mierzone w prawidłowej tkance nadnerczowej [35, 39, 42, 44]. Szczególnie wysoką ekspresję obserwowali Bassett i wsp. dla genu HSD 3B2 [39]. Hybrydyzacja *in situ* potwierdziła obecność transkryptu genu kodującego białko P450sc oraz P450c17 w gruczolakach produkujących kortyzol, chociaż, podobnie jak w przypadku gruczolaków wydzielających aldosteron, poziom ekspresji tych genów był różny w różnych miejscach guzów [35].

Na uwagę zasługuje fakt, że w przypadku gruczolaków produkujących kortyzol u chorych z subklinicznym zespołem Cushinga aktywność transkrypcyjna genu CYP 11A1 była obniżona [44].

Podobnie jak w przypadku gruczolaków produkujących aldosteron aktywność transkrypcyjna genu kodującego P450sc w gruczolakach kory nadnercza produkujących kortyzol korelowała z aktywnością transkrypcyjną genu kodującego receptor ACTH [42, 44].

Nieczynne hormonalnie gruczolaki kory nadnerczy

Aktywność transkrypcyjną genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w biosyntezie aldosteronu i kortyzolu w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym, u których w badaniach biochemicznych nie wykazano nadmiernej produkcji tych hormonów przedstawiono w tabeli V.

Z przedstawionych powyżej analiz wynika, że ekspresja genów syntezy hormonów steroidowych w obrębie nieczynnych hormonalnie guzów nadnerczy jest wyraźna, choć obniżona [32, 35, 42, 44]. Dlatego nie można wykluczyć, że nie są one całkowicie pozbawione zdolności syntezy steroidów [32]. Za faktem tym przemawia ponadto odpowiedź komórek guzów na

Tabela V. Ekspresja genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w biosyntezie aldosteronu i kortyzolu w gruczolakach kory nadnerczy usuniętych chorym, u których nie wykazano nadmiernej produkcji tych hormonów w badaniach biochemicznych

Table V. Expression of genes encoding enzyme proteins involved in the biosynthesis of aldosterone and cortisol in adrenal cortical adenomas resected from patients without biochemical evidences of increased hormone production

Autor	Rok	Liczba guzów	CYP 11A1	CYP 17A1	CYP 21A2	CYP 11B1	CYP 11B2	HSD 3B2
Racz i wsp. [32]	1993	6	37%	43%	32%			
Reincke i wsp. [44]	1997	4	41%					
Beuschlein i wsp. [42]	1998	2	52%	2%	10%			
Reincke i wsp. [35]	1998	1	30%	8%				

stymulację ACTH, która wywołuje zwiększoną produkcję kortyzolu w nieczynnych klinicznie guzach kory nadnerczy (podobnie jak w gruczolakach kory produkujących aldosteron), większą niż komórki prawidłowych nadnerczy [32].

Sporna pozostaje kwestia, czy obniżona aktywność jednego, konkretnego enzymu odpowiada za zahamowanie produkcji kortyzolu w obrębie guzów nieczynnych hormonalnie. Według Racza i wsp. niewydolność białka enzymatycznego P450c21 w obrębie guzów nieczynnych hormonalnie jest przyczyną zwiększonego w ich obrębie stężenia 17-hydroksyprogesteronu [32]. Natomiast zdaniem Reincke i wsp. w obrębie nieczynnych hormonalnie gruczolaków nie mamy do czynienia z niedoborem 21-hydroksylazy, ponieważ podanie chorym ACTH powoduje wyższe stężenie osoczowe nie tylko 17-hydroksyprogesteronu, ale również 11-deoksykortyzolu i 11-deoksykortykosteronu, do syntezy których niezbędna jest białko enzymatyczne P450c21 [76]. Według autorów tego zespołu podwyższony współczynnik 11-deoksykortyzol/kortyzol oraz 11-deoksykortykosteron/kortykosteron sugerują łagodny niedobór 11 β -hydroksylazy w omawianych guzach [76].

Podsumowanie

Z przedstawionego piśmiennictwa wynika, że dotychczas w znacznym stopniu poznano strukturę i lokalizację genów kodujących białka enzymatyczne szlaku syntezy aldosteronu i kortyzolu. Poza tym, współczesne metody badawcze pozwalają na dokładny pomiar aktywności transkrypcyjnej omawianych genów na poziomie mRNA w tkance uzyskanej z nadnerczy.

Cytowane doniesienia dowodzą, że najlepiej poznano ekspresję mRNA genów kodujących białka enzymatyczne szlaku syntezy aldosteronu i kortyzolu w tkance uzyskanej z guzów nadnerczy usuniętych chorym z zespołem Conna. Natomiast aktywność transkrypcyjną omawianych genów w obrębie pozostałych gruczolaków kory nadnerczy udokumentowano w mniej-

szym stopniu. Dotyczy to szczególnie analiz materiału tkankowego uzyskanego od chorych, u których aktywności hormonalnej guzów nadnerczy nie udało się wykazać za pomocą badań biochemicznych. Na uwagę zasługuje również fakt, że układem odniesienia większości analiz molekularnych tkanki guzów kory nadnerczy był materiał uzyskany z niewielkiej liczby (2–6) prawidłowych nadnerczy, co do pewnego stopnia zmniejsza wiarygodność uzyskanych wyników [32, 35, 38, 47]. Powyższe uwagi stanowią podstawę do prowadzenia dalszych badań z zastosowaniem nowoczesnych technik badawczych i na podstawie większego materiału, uzyskanego zarówno z prawidłowych nadnerczy, jak i z gruczolaków wywodzących się z kory tego narządu. Powiązanie uzyskanych wyników z obserwacją kliniczną stworzy szansę lepszego zrozumienia przyczyn przetrwałego nadciśnienia tętniczego po adrenalectomii u chorych z zespołami Conna i Cushinga oraz jego ustąpienia po usunięciu zmian typu *incidentaloma*.

Piśmiennictwo

1. Szczepańska-Sadowska E. Patofizjologia nadciśnienia hormonalnego. W: Januszewicz W, Sznajderman M, Januszewicz A (red.). Nadciśnienie hormonalne. PWN, Warszawa 1997; 11–68.
2. Mortensen RM. Aldosterone Action. W: De Groot LJ, Jameson JL (red.). Endocrinology. W.B. Saunders Company 2001; 3: 1783–1789.
3. Munck A. Glucocorticoid action: physiology. W: De Groot LJ, Jameson JL (red.). Endocrinology. W.B. Saunders Company 2001; 2: 1632–1646.
4. Edwards CRW. Primary mineralocorticoid excess syndromes. W: De Groot LJ, Jameson JL (red.). Endocrinology. W.B. Saunders Company 2001; 3: 1820–1844.
5. Nieman LK. Cushing's syndrome. W: Groot LJ, Jameson JL (red.). Endocrinology. W.B. Saunders Company 2001; 2: 1691–1715.
6. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB i wsp. Cushing's syndrome. The Lancet 2006; 367: 1605–1617.
7. Ziaja J, Chudek J, Król R i wsp. Rare normalisation of blood pressure after adrenalectomy in patients with Conn syndrome. Langenbecks Arch Surg 2007; 392: 431–435.
8. Sapienza P, Cavallaro A. Persistent hypertension after removal of adrenal tumours. Eur J Surg 1999; 165: 187–192.
9. Favia G, Lumachi F, Scarpa V i wsp. Adrenalectomy in primary aldosteronism: A Long-Term Follow-Up Study in 52 Patients. World J Surg 1992; 16: 680–684.
10. Puccini M, Iacconi P, Bernini G i wsp. Conn syndrome: 14 Year's experience from two european centres. Eur J Surg 1998; 164: 811–817.
11. Siren J, Valimaki M, Huikuri K i wsp. Adrenalectomy for Primary Aldosteronism: long-term Follow-up Study in 29 Patients. World J Surg 1998; 22: 418–422.

12. Rutherford JC, Taylor WL, Stowasser M i wsp. Success of surgery for primary aldosteronism judged by residual autonomous aldosterone production. *World J Surg* 1998; 22: 1243–1245.
13. Simon D, Goretzki PE, Lollert A i wsp. Persistent hypertension after successful adrenal operation. *Surgery* 1993; 114: 1189–1195.
14. Ziaja J, Cierpka L, Król R i wsp. Wpływ adrenalectomii na leczenie nadciśnienia tętniczego u chorych z łagodnymi guzami rdzenia i kory nadnerczy. *Wiad Lek* 2003; 56: 545–551.
15. Ziaja J, Chudek J, Król R i wsp. Odległe następstwa chirurgicznego usunięcia gruczolaka kory nadnercza produkującego kortyzol. *Pol J Endocrinol* 2007; 58: 207–212.
16. Emral R, Uysal AR, Asik M i wsp. Prevalence of subclinical Cushing's syndrome in 70 patients with adrenal incidentaloma: clinical, biochemical and surgical outcomes. *Endocr J* 2003; 50: 399–408.
17. Weigel RJ, Wells SA, Gunnells JC i wsp. Surgical treatment of primary hyperaldosteronism. *Ann Surg* 1994; 219: 347–352.
18. Feltyński T, Wocial B, Chodakowska J i wsp. Ciśnienie tętnicze u chorych po jednostronnej adrenalectomii z powodu gruczolaka kory nadnerczy wytwarzającego aldosteron. *Pol Tyg Lek* 1991; 35–36: 649–651.
19. Obara T, Ito Y, Okamoto T i wsp. Risk factors associated with postoperative persistent hypertension in patients with primary aldosteronism. *Surgery* 1992; 112: 987–993.
20. Suzuki T, Shibata H, Ando T i wsp. Risk factors associated with persistent postoperative hypertension in Cushing's syndrome. *Endocr Res* 2000; 26: 791–795.
21. Bastounis AE, Karayiannakis AJ, Anapliotou MLG i wsp. Incidentalomas of the adrenal gland: diagnostic and therapeutic implications. *Am Surg* 1997; 63: 356–360.
22. Kasperlik-Zaluska AA, Roslonowska E, Słowińska-Srzednicka J i wsp. Incidentally discovered adrenal mass (incidentaloma): investigation and management of 208 patients. *Clin Endocrinol* 1997; 46: 29–37.
23. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G i wsp. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 637–644.
24. Rotkegel S, Więcek A, Nieszporek T i wsp. Charakterystyka kliniczna, biochemiczna i hormonalna 84 chorych z przypadkowo wykrytym guzem nadnerczy (incidentaloma). *Pol Arch Med Wewn* 2004; 112: 1451–1457.
25. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A i wsp. Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1440–1448.
26. Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S i wsp. Analysis of cortisol secretion in hormonally inactive adrenocortical incidentalomas: study of in vitro steroid secretion and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes. *Endocr J* 2001; 48: 167–174.
27. Terzolo M, Pia A, Ali A i wsp. Adrenal incidentaloma: a new cause of the metabolic syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 998–1003.
28. Mathonnet M. Conduite a tenir face a un incidentalome surrenalien associe a une hypertension arterielle. *Annales de chirurgie* 2005; 130: 303–308.
29. Filipponi S, Guerrieri M, Arnaldi G i wsp. Laparoscopic adrenalectomy: a report on 50 operations. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 548–553.
30. Ziaja J, Chudek J, Król R i wsp. Obniżenie ciśnienia tętniczego po adrenalectomii u chorych z nadciśnieniem tętniczym i guzem nadnercza bez potwierdzonej nadczynności hormonalnej. *Pol Przegl Chir* 2007; 79: 492–503.
31. Zenkert S, Schubert B, Fassnacht M i wsp. Steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in adrenal tumours. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 294–299.
32. Racz K, Pinet F, Marton T i wsp. Expression of steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids and corticosteroid production in aldosterone-producing and "nonfunctioning" adrenal adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 677–682.
33. Suwa T, Chen M, Hawks CL i wsp. Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. *J Endocrinol* 2003; 178: 149–158.
34. Mornet E, Dupont J, Vitek A i wsp. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem* 1989; 264: 20961–20967.
35. Reincke M, Beuschlein F, Menig G i wsp. Localisation and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. *J Endocrinol* 1998; 156: 415–423.
36. Pascoe L, Jeunemaitre X, Lebrethon MC i wsp. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single french pedigree. *J Clin Invest* 1995; 96: 2236–2246.
37. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L i wsp. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1513–1522.
38. Fallo F, Pezzi V, Barzon L i wsp. Quantitative assessment of CYP11B1 and CYP11B2 expression in aldosterone-producing adenomas. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 795–802.
39. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K i wsp. Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5446–5455.
40. Fraipoint F, Atifi M, Cherradi N i wsp. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1819–1829.
41. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R i wsp. Distinct Transcriptional Profiles of Adrenocortical Tumours Uncovered by DNA Microarray Analysis. *Am J Pathol* 2003; 162: 521–531.
42. Beuschlein F, Shulze E, Mora P i wsp. Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2585–2588.
43. Zwermann O, Beuschlein F, Mora P i wsp. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene expression is normal in sporadic adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 689–695.
44. Reincke M, Beuschlein F, Latronico A-C i wsp. Expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in human adrenocortical neoplasms: correlation with p450scc expression. *Clin Endocrinol* 1997; 46: 619–626.
45. Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F i wsp. Angiotensin II type receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol* 2001; 54: 627–632.
46. Albertin G, Tortorella C, Malendowicz LK i wsp. Human adrenal cortex and aldosterone secreting adenomas express both 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 genes. *Int J Mol Med* 2002; 9: 495–498.
47. Wu KD, Chen YM, Chu JS i wsp. Zona fasciculata-like cells determine the response of plasma aldosterone to metoclopramide and aldosterone synthase messenger ribonucleic acid level in aldosterone-producing adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 783–789.
48. Auchus RJ. The principles, pathways, and enzymes of human steroidogenesis. W: De Groot LJ, Jameson JL (red.). *Endocrinology*. W.B. Saunders Company 2001; 2: 1616–1631.
49. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isoenzymes. *Endocrine Reviews* 1994; 15: 421–438.
50. <http://www.genecards.org/index>.
51. Chung B, Matteson KJ, Voutilainen R i wsp. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme P450scc: cDNA cloning and assignment of the gene to chromosome 15, and expression in placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8962–8966.
52. John ME, John MC, Boggaram V i wsp. Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4715–4719.
53. Mellon SH, Vaisse C. cAMP regulates P450scc gene expression by a cycloheximide-insensitive mechanism in cultured mouse Leydig MA-10 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7775–7779.
54. Barret PQ, Bollag WB, Isaacs CM i wsp. The role of calcium in angiotensin II mediated aldosterone secretion. *Endocr Rev* 1989; 10: 496–518.
55. Chung B, Picado-Leonard J, Haniu M i wsp. Cytochrome P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 407–411.
56. Nakajin S, Shively JE, Yuan JE i wsp. Microsomal cytochrome P450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 α -hydroxylase and C17,20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry* 1981; 20: 4037–4042.
57. Nakajin S, Hall PF. Microsomal Cytochrome P-450 from Neonatal Pig Testis: Purification and Properties of a C21 steroid Side Chain Cleavage System. *J Biol Chem* 1981; 25: 3871–3876.
58. Granner DK. Hormony kory nadnerczy. W: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (red.). *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 1995: 629–644.
59. Yanase T, Sasano H, Yubisui T i wsp. Immunohistochemical study of cytochrome b5 in human adrenal gland and in adrenocortical adenomas from patients with Cushing's syndrome. *Endocr J* 1998; 45: 89–95.
60. Katagiri M, Kagawa N, Waterman MR. The role of cytochrome b₅ in the biosynthesis of androgens by human P450c17. *Arch Biochem Biophys* 1995; 10: 343–347.
61. Gell JS, Carr BR, Sasano H i wsp. Adrenarche results from development of a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-deficient adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3695–3701.
62. Lee-Robichaud P, Wright JN, Akhtar ME i wsp. Modulation of the activity of human 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) by cytochrome b5: endocrinological and mechanistic implications. *Biochem J* 1995; 15: 901–908.
63. Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem* 1998; 273: 3158–3165.
64. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5111–5115.
65. Sasano H, Okamoto M, Sasano N. Immunohistochemical study of cytochrome P-450 11 beta-hydroxylase in human adrenal cortex with mineralo- and glukocorticoid excess. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1998; 413: 313–318.
66. Kawamoto T, Mitsuchi Y, Toda K i wsp. Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-45011 beta. *FEBS Lett* 1990; 269: 345–349.

67. Chua SC, Szabo P, Vitek A i wsp. Cloning of cDNA encoding steroid 11 β -hydroxylase (P450c11). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7193–7197.
68. Kawamoto T, Mitsuchi Y, Ohnishi T i wsp. Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome p-450aldo as related to primary aldosteronism. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 309–316.
69. Quinn SJ, Willams GH. Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 1988, 50: 409–426.
70. Lachance Y, Luu-The V, Labrie C i wsp. Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 20469–20475.
71. Simard J, Ricketts ML, Gingras S i wsp. Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene family. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 525–582.
72. Thomas JL, Myers RP, Strickler RC. Human placental 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5-4-ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzymes. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 209–217.
73. Rheaume E, Lachance Y, Zhao HF i wsp. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1147–1157.
74. Lack E. Pathology of the adrenal cortex. W: Lechago J, Gould V (red.). *Bloodworth's endocrine pathology*. Willams and Wilkins 1997: 355–415.
75. Pilon C, Mulatero P, Barzon L i wsp. Mutations in CYP11B1 gene converting 11 β -hydroxylase into an aldosterone-producing enzyme are not present in aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4228–4231.
76. Reincke M, Peter M, Sippell WG i wsp. Impairment of 11 β -hydroxylase but not 21-hydroxylase in adrenal 'incidentalomas'. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 196–200.