

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sanja I. Ognjanović

**GLUKOKORTIKOIDNA SENZITIVNOST, FUNKCIONALNI POLIMORFIZMI
GENA ZA GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR I EKSPRESIJA
GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA U TUMORSKOM TKIVU KOD
PACIJENATA SA SLUČAJNO OTKRIVENIM TUMORIMA KORE
NADBUBREŽNE ŽLEZDE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016 god.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**

Sanja I. Ognjanović

**GLUCOCORTICOID SENSITIVITY, FUNCTIONAL POLYMORPHISM IN
GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE AND GLUCOCORTICOID RECEPTOR
EXPRESSION IN TUMOROUS TISSUE OF PATIENTS WITH INCIDENTALLY
DISCOVERED ADRENOCORTICAL ADENOMAS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016 god.

Mentor

Prof dr Svetozar Damjanović

Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma

Klinički Centar Srbije, Beograd

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

1. Prof dr Miloš Žarković

Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Svetislav Tatić

Institut za patohistologiju

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

3. Prof. dr Božo Trbojević, član komisije u penziji

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2016. godine

*„...kud god pogledam, svuda vidim lepotu Velikoga u malom...
...duhom Tvojim svetim nadahnjuješ misao umetnika, pesnika, naučnika...
...oni proročki ulaze u tajne zakona Tvojih
i otkrivaju nam dubinu Božije premudrosti...“*

Zahvaljujem se:

Mentoru Prof. dr Svetozaru Damjanoviću na nesebično prenesenom znanju i iskustvu, na neprocenjivim stručnim savetima i idejama pri izboru teme doktorske disertacije i u svim fazama njene izrade.

Svim lekarima Odeljenja za neuroendokrine tumore i nasledne kancerske sindrome u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma: Prof dr Milanu Petakovu, Prof dr Đuri Macutu, dr Valentini Kovačević Elezović, dr Dušanu Iliću, Ass.dr Ivani Božić Antić, dr Tatjani Isailović, dr Bojani Popović, dr Tamari Bogavac, na svesrdnoj pomoći pri prikupljanju podataka, svim koleginicama iz Laboratorije za genetičko ispitivanje, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, a posebno Jadranki Antić doktoru bioloških nauka koja je analizirala prisustvo polimorfizama gena za glukortikoidni receptor, Prof dr Tatjani Pekmezović na statističkoj obradi podataka i nesebičnoj pomoći, Ass dr Milini Tančić na iskrenoj i bezrezervnoj podršci u svakom momentu, svim medicinskim sestrama Odeljenja za neuroendokrine tumore i nasledne kancerske sindrome, medicinskom osoblju biohemijske i RIA laboratorije na pomoći pri izvođenju tehničkih delova rada, mojim prijateljima i porodici na nesebičnoj žrtvi i podršci.

*Sa neizmernom ljubavlju disertaciju posvećujem
Mariji i Iliji*

GLUKOKORTIKOIDNA SENZITIVNOST, FUNKCIONALNI POLIMORFIZMI GENA ZA GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR I EKSPRESIJA GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA U TUMORSKOM TKIVU KOD PACIJENATA SA SLUČAJNO OTKRIVENIM TUMORIMA KORE NADBUBREŽNE ŽLEZDE

Sanja Ognjanović

Rezime

Uvod: Adrenalni incidentalomi su tumori otkriveni različitim vizualizacionim metodama učinjenim bez sumnje na adrenalnu patologiju. Većina ovih tumora su nefunkcijski adrenokortikalni adenomi. Izvestan broj AI se prezentuje subkliničkim hiperkorticizmom (SH), stanjem biohemijskog kortizolskog ekscesa, u odsustvu klasičnih znakova i simptoma hiperkorticizma. Prevalencija SH kod pacijenata sa AI se procenjuje između 5 i 24%. Polimorfizam gena za glukokortikoidni receptor (GR) menja glukokortikoidnu (GC) senzitivnost, što dovodi do promena u metaboličkom profilu.

Cilj studije: je bio da se ispita prevalenca subkliničkog hiperkorticizma (SH) i pridruženih bolesti kod pacijenata sa unilateralnim (UAI) i bilateralnim AI (BAI). Ispitali smo učestalost četiri polimorfizma gena za GR (BclI, ER22/23EK, N363S i 9β) i predispoziciju za nastanak AI. Analizirali smo ekspresiju GR u tumorskom, peritumorskom i normalnom adrenalnom tkivu.

Materijal i metode: Ispitivanje je obuhvatilo 152 pacijenta, 105 (69.1%) sa UAI i 47 (30.9%) sa BAI. SH je definisan na osnovu serumskog kortizola >50nmol/L nakon prekonocnog deksametazon supresivnog testa (DST) sa 1mg ili nakon dvodnevnog niskodoznog DST (LDDST) sa 2mg deksametazona, uz još jedan navedeni parametar (ponoćni serumski kortizol >208nmol/L, 24-h urinarni slobodni kortizol >245nmol/L ili ACTH<10ng/L). Telesni sastav i koštana gustina su mereni *dual-energy X-ray absorptiometry* metodom na nivou lumbalnog dela kičme, vrata femura i celog skeleta. DNK je dobijena iz leukocita periferne krvi. Prisustvo polimorfizama je detektovano metodama PCR, RFLP i sekvenciranjem DNK. Uzorci tkiva su analizirani *Western blot* metodom.

Rezultati: Pacijenti sa BAI se nisu razlikovali u odnosu na pacijente sa UAI po starosti, BMI, obimu struka, učestalosti dijabetesa, hipertenzije i dislipidemije. Prevalencija SH u celoj grupi iznosila je 20.5% (prekonocni DST), odnosno 20.0% (LDDST) i bila je značajno veća kod pacijenata sa BAI u odnosu na pacijente sa UAI (31.1% vs 15.2%, $p=0.026$). Nezavisni prediktor SH je bila veličina adrenalnog adenoma (odds ratio [OR]=1.055, 95% confidence interval [CI] 1.017-1.094, $p=0.004$), nakon korekcije za godine, obim struka, indeks telesne mase i prisustvo BAI. Kostna gustina na nivou kičme je bila značajno niža kod pacijenata sa BAI u odnosu na UAI (0.96 ± 0.14 vs 0.87 ± 0.15 , $p=0.002$). Nije nađena razlika u kostnoj gustini na nivou vrata femura. Prevalencija

osteoporozе je bila značajno veća kod pacijenata sa BAI u odnosu na UAI (37.1% vs 15.9%, $p=0.011$). Prisustvo dužeg C alela *BclI* polimorfizma (OR=1.9; 95% CI 1.04–3.62; $p=0.025$) i kraćeg 9 β alela (OR 3.98; 95% CI 1.97–8.10; $p < 0.001$) su bili nezavisni prediktori unilateralnih adrenalnih incidentaloma. Žene nosioci dužeg alela *BclI* su imale značajno manje suprimovan nivo kortizola nakon 0.5mg dexametazona (126.4 ± 111.4 vs 80.9 ± 75.7 nmol/l, $p=0.026$), manju prevalenciju tipa 2 šećerne bolesti (9.1% vs 26%, $p=0.034$) i trend redukovane skeletne mišićne mase (44.1 ± 5.7 vs 41.7 ± 6.4 kg, $p=0.080$), što ukazuje na relativnu GC rezistenciju. Isti polimorfizam je bio povezan sa povećanim rizikom za nastanak osteoporozе kičme i kuka (26.5% vs 7.7%, $p=0.031$), što ukazuje na povećanu GC senzitivnost. Nosioci minor alela A3669G su imali manju učestalost osteoporozе (12.8 vs 29.9%, $p=0.046$), što upućuje na relativnu GC rezistenciju. Muškarci nosioci istog alela su imali značajno nižu ukupnu skeletnu mišićnu masu (52.1 ± 5.2 vs 59.7 ± 7.6 , $p=0.004$), trend višeg HOMAIR (5.0 ± 2.7 vs 3.4 ± 1.4 , $p=0.051$) i značajno viši holesterol niske gustine (4.0 ± 0.8 vs 3.1 ± 0.9 , $p=0.005$), što pokazuje GC hipersenzitivnost. *Western blot* analiza izoformi GR je pokazala da je GR-D jedina izoforma u tumorskom tkivu sa posleđičnom smanjenom ekspresijom *heat shock* proteina.

Zaključak: Pacijenti sa BAI imaju značajno veću prevalencu SH, nezavisno od primenjenih kriterijuma za supresibilnost kortizola. Iako su imali sličnu prevalenciju dijabetesa, hipertenzije, dislipidemije i abdominalne gojaznosti, pacijenti sa BAI su imali veću prevalenciju osteoporozе, što ukazuje na veći nivo autonomne produkcije kortizola ili različitu intraindividualnu tkivno-specifičnu osetljivost na GC, što pokazuju naši rezultati. Veličina tumorske mase utiče na nivo produkcije kortizola. Prisustvo dužeg C alela *BclI* polimorfizma i kraćeg 9 β alela je povezano sa nastankom UAI. Stečena intratumorska GC rezistencija može uzrokovati disregulaciju sinteze kortizola i istovremeno promovisati tumorski rast.

Ključne reči: adrenalni incidentalomi; osteoporozа; subklinički hiperkorticizam, glukokortikoidni receptor, polimorfizam; glukokortikoidna senzitivnost.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Interna medicina-endokrinologija

GLUCOCORTICOID SENSITIVITY, FUNCTIONAL POLYMORPHISM IN GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE AND GLUCOCORTICOID RECEPTOR EXPRESSION IN TUMOROUS TISSUE OF PATIENTS WITH INCIDENTALLY DISCOVERED ADRENOCORTICAL ADENOMAS

Sanja Ognjanović

Summary

Background: Adrenal incidentalomas (AIs) are clinically silent adrenal masses that are detected incidentally during imaging procedures performed for unrelated diseases. The vast majority of these lesions are non-hypersecreting cortical adenoma. However, some of them present with subclinical hypercortisolism (SH), the condition of biochemical cortisol excess without the classical signs or symptoms of overt hypercortisolism. The prevalence of SH in patients with AIs varies between 5 and 24%. Glucocorticoid receptor (GR) polymorphisms alter glucocorticoid (GC) sensitivity and have been associated with altered metabolic profiles.

Objective: The aim of this study was to investigate the prevalence of SH and associated co-morbidities in patients with unilateral AIs (UAIs) and bilateral AIs (BAIs). We also evaluated the prevalence of the four GR polymorphism genes (BclI, ER22/23EK, N363S and 9β) and investigated whether they influence susceptibility for AIs. We analyzed GR expression in tumorous, peritumorous and normal adrenocortical tissue samples.

Material and Methods: We enrolled 152 patients, 105 (69.1%) with UAIs and 47 (30.9%) with BAIs. SH was diagnosed in the presence of serum cortisol levels after 1mg dexamethasone suppression test (DST) or after 2-day low-dose DST (LDDST) >50nmol/l with at least one of the following parameter (midnight serum cortisol >208nmol/L, 24-h urinary free cortisol >245nmol/24h, or ACTH <10ng/L). Body composition and bone mineral density (BMD) were measured with dual-energy X-ray absorptiometry at lumbar spine (LS), femoral neck (FN), and total skeleton. DNA was obtained from peripheral blood leucocytes. The polymorphisms were detected using PCR, RFLP and DNA sequencing. Tissue samples were studied by Western blot.

Results: Age, body mass index (BMI), and waist circumference (WC) were comparable, and diabetes, hypertension and dyslipidemia occurred with a similar frequency in BAI and UAI patients. The overall prevalence of SH was 20.5% based on post-1mg DST, and 20.0% based on post-LDDST cortisol levels, and was more prevalent in BAIs than UAIs patients (31.1% vs 15.2%, respectively, $p=0.026$). Factor related to SH was adrenal mass size (odds ratio [OR]=1.055, 95% confidence interval [CI] 1.017-1.094, $p=0.004$), after adjustment for age, WC, BMI, and presence of BAIs. LS BMD was lower in BAI than in UAIs patients (0.96 ± 0.14 vs 0.87 ± 0.15 , $p=0.002$). There were no differences in FN BMD. The prevalence

of osteoporosis was higher in BAIs compare to UAIs patients (37.1% vs 15.9%, respectively, $p=0.011$). GR gene variants, larger allele of BclI (OR 1.9; 95% CI 1.04–3.62; $p=0.025$) and minor allele of 9 β (OR 3.98; 95% CI 1.97–8.10; $p < 0.001$) were independent predictors of UAIs. Female carriers of the C allele of *BclI* had significantly less suppression of cortisol levels after 0.5mg dexametasone (126.4 ± 111.4 vs 80.9 ± 75.7 nmol/l, $p=0.026$), less prevalent diabetes mellitus type 2 (9.1% vs 26%, $p=0.034$), and trend to have reduced skeletal muscle mass (44.1 ± 5.7 vs 41.7 ± 6.4 kg, $p=0.080$), suggesting relative GC resistance. The same polymorphism has been associated with increased risk to develop osteoporosis at LS and FN (26.5% vs 7.7%, $p=0.031$) suggesting increased GC sensitivity. Carriers of minor allele of A3669G had reduced frequency of osteoporosis (12.8 vs 29.9%, $p=0.046$) indicating relative GC resistance. Male carriers of the same allele had significantly lower total lean body mass (52.1 ± 5.2 vs 59.7 ± 7.6 , $p=0.004$), trend for higher HOMAIR (5.0 ± 2.7 vs 3.4 ± 1.4 , $p=0.051$), and significantly higher low-density lipoprotein-cholesterol (4.0 ± 0.8 vs 3.1 ± 0.9 , $p= 0.005$), demonstrating increased GC sensitivity. Western blot analysis of GR isoforms revealed that GR-D is the only isoform that can be seen in tumor samples, as underexpression of heat shock proteins.

Conclusion: Patients with BAIs had higher prevalence of SH, than patients with UAIs, irrespective of the different criteria for cortisol suppression. In spite of a similar frequency of diabetes, hypertension and dyslipidemia, patients with BAIs had reduced BMD, suggesting higher degree of autonomous cortisol secretion or different organ sensitivity to glucocorticoids. Our result showed different intraindividual tissue-specific sensitivity to glucocorticoids. Tumor mass could be of importance for the amount of cortisol production in these patients. GR gene variants, larger C allele of BclI and minor 3669G allele are associated with UAIs. The acquired tumorous GC resistance probably promote dysregulated cortisol production and tumor growth.

Keywords: adrenal incidentaloma; osteoporosis; subclinical hypercortisolism, glucocorticoid receptor, polymorphisms, glucocorticoid sensitivity.

Scientific field: Medicine

Major in: Internal medicine - endocrinology

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	Incidentalno otkriveni adrenalni tumori (incidentalomi)	2
1.2	Glukokortikoidni hormoni	4
1.2.1	Regulacija sekrecije glukokortikoida.....	4
1.2.2	Biosinteza kortizola i adrenalnih androgena.....	5
1.2.3	Cirkulacija kortizola i adrenalnih androgena.....	6
1.2.4	Metabolizam kortizola i adrenalnih androgena.....	6
1.2.5.	Efekti glukokortikoida na metabolizam glukoze, lipida i proteina.....	7
1.2.6.	Efekti glukokortikoida na kosti.....	9
1.2.6.1.	Efekti glukokortikoida na celularnom nivou u kostima.....	10
1.2.6.2.	Prevalencija i prediktori fraktura kod pacijenata sa GIO.....	12
1.2.6.3.	Povezanost koncentracije kortizola i markera koštanog prometa.....	13
1.3.	Glukokortikoidni receptor	14
1.3.1	Gen za glukokortikoidni receptor	14
1.3.2	Struktura glukokortikoidnog receptora	20
1.3.3	Nuklearna translokacija i regulacija transkripcije.....	21
1.3.4	Polimorfizmi u genu za humani glukokortikoidni receptor	24
1.3.4.1	BclI polimorfizam u genu za GR	24
1.3.4.2	N363S polimorfizam u genu za GR.....	25
1.3.4.3	ER22/23EK polimorfizam u genu za GR	26
1.3.4.4	A3669G polimorfizam u genu za GR	26
1.4.	Metabolički sindrom	27
1.4.1.	Definicija i klasifikacija metaboličkog sindroma	27
1.4.2.	Etiopatogeneza metaboličkog sindroma	29
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
3.	MATERIJAL I METODE	35
3.1.	Tip studije, mesto i vreme istraživanja	35
3.2.	Ispitanici	35
3.3.	Protokol ispitivanja	35
3.3.1.	Antropometrijski parametri	35
3.3.2.	Procena visine krvnog pritiska, metabolizma glukoze i lipidnog statusa	36
3.3.3.	Hormonske analize.....	36
3.3.4.	Biohemijske analize	37
3.3.5.	Procena koštane gustine	38
3.3.6	Izolovanje DNK iz uzoraka.....	38
3.3.7	Analiza adrenalnog tkiva	39
3.4.	Statistička analiza	40
4.	REZULTATI	42
4.1.	Karakteristike pacijenata sa unilateralnim i bilateralnim incidentalomima	42

4.1.1.	Demografske, kliničke i meataboličke karakteristike pacijenata sa UAI i BAI .	42
4.1.2.	Hormonske karakteristike pacijenata sa UAI i BAI.....	43
4.1.3.	Korelacija veličine adrenalnog incidentaloma i parametara HHA osovine	44
4.1.4.	Korelacija antropometrijskih, metaboličkih parametara, insulinske rezistencije i komorbiditeta u celoj grupi.....	45
4.1.5.	Korelacija parametara HHA osovine, parametara MetS i HOMAIR u celoj grupi	47
4.1.6.	Korelacija telesnog sastava i parametara MetS u celoj grupi	49
4.1.7.	Korelacija telesnog sastava i parametara HHA osovine u celoj grupi.....	51
4.2.	Učestalost funkcionalnih polimorfizama GR	53
4.2.1.	Učestalost funkcionalnih polimorfizama GR u odnosu na zdravu populaciju	53
4.2.2.	Karakteristike pacijenata u odnosu na BclI polimorfizam u celoj grupi	56
4.3.	Analiza antropometrijskih parametara, telesnog sastava, MetS, komorbiditeta, učestalosti polimorfizama GR i parametara HHA osovine u odnosu na pol	57
4.3.1	Analiza antropometrijskih parametara, telesnog sastava, MetS, komorbiditeta, učestalosti polimorfizama GR i parametara HHA osovine kod žena	57
4.3.1.1.	Analize u odnosu na prisustvo BclI polimorfizma GR	57
4.3.1.2.	Analize u odnosu na prisustvo N363S polimorfizma GR.....	59
4.3.1.3.	Analize u odnosu na prisustvo ER22/23EK polimorfizma GR	61
4.3.1.4.	Analize u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma kod žena	62
4.3.1.5.	Karakteristike žena u odnosu na prisustvo SH.....	62
4.3.2.	Analiza antropometrijskih parametara, telesnog sastava, MetS, Komorbiditeta, učestalosti polimorfizama GR i parametara HHA osovine kod muškaraca.....	65
4.3.2.1.	Analiza u odnosu na prisustvo BclI polimorfizma GR kod muškaraca.....	66
4.3.2.2.	Analiza u odnosu na prisustvo Er22/23EK polimorfizma GR kod muškaraca...	67
4.3.2.3.	U odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma GR kod muškaraca.....	67
4.4.	Parametri koštane gustine	67
4.4.1.	Cela grupa - korelacija parametara koštane gustine i parametara HHA osovine	68
4.4.2.	Poređenje koštane gustine između pacijenata sa UAI i BAI	70
4.4.3.	Uticaj polimorfizama GR na koštanu gustinu kod pacijenata sa UAI i BAI	72
4.4.4.	Parametri koštane gustine kod BAI i UAI pacijenata u zavisnosti od prisustva SH	75
4.4.5.	Parametri koštane gustine kod svih pacijenata u zavisnosti od pola.....	76
4.4.5.1.	Korelacije BMD, starosti, menopauze, SH i veličine nadbubrega kod žena	76
4.4.5.2.	Korelacije BMD, starosti, SH i veličine nadbubrega kod muškaraca	83
4.5.	Western Blot analiza GR i Heat Shock proteina	86
5.	DISKUSIJA	89
5.1.	Subklinički hiperkorticizam kod pacijenata sa adrenalnim incidetalomom	89
5.2.	Funkcionalni polimorfizmi GR i adenalni tumori.....	94
5.3.	Adrenalni incidentalomi i pridružene bolesti.....	96
5.4.	Funkcionalni polimorfizami GR, HHA osovina, telesni sastav i MetS	99

5.5	Adrenalni incidentalomi i koštana gustina.....	107
6.	ZAKLJUČCI	116
7.	LITERATURA	121

1. UVOD

Glukokortikoidi (GC) su steroidni hormoni porekla adrenalnog korteksa, koji se sintetišu pod kontrolom hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine (HHA) i regulišu esencijalne biološke procese uključujući rast, razvoj, ponašanje, metaboličke, inflamatorne procese, imajući važnu ulogu u održavanju homeostaze u bazalnim i uslovima stresa. Sintetski glukokortikoidi su među najpropisivanijim lekovima zbog antiinflamatornog, imunosupresivnog i apoptotskog dejstva i koriste se za lečenje brojnih inflamatornih i autoimunih bolesti poput astme, alergije, sepse, reumatoidnog artritisa, ulceroznog kolitisa, multiple skleroze, prevenciji odbacivanja transplantata i u terapiji hematoloških maligniteta kao što su leukemije, limfomi i mijelomi. Međutim, značajan broj pacijenata ne pokazuje adekvatan terapijski odgovor ili razvija tkivno specifičnu rezistenciju pri hroničnoj upotrebi GC, uz istovremeno prisustvo ozbiljnih neželjenih efekata kao što su dijabetes, abdominalna gojaznost, glaukom, atrofija kože, osteoporoza, hipertenzija, zaostajanje u rastu kod dece. Ovo je posledica individualnih razlika u osetljivosti na GC. Istraživanja sprovedena poslednjih godina rasvetljavaju duboku složenost glukokortikoidne signalizacije, a razumevanje ovih molekularnih mehanizama omogućava ne samo predikciju terapijskog odgovora, već i razvijanje novih terapijskih mogućnosti koje će poboljšati odnos koristi i neželjenih efekata.

Na celularnom nivou GC preko glukokortikoidnog receptora (GR) koji pripada porodici nuklearnih receptora pozitivno ili negativno regulišu ekspresiju ciljnih gena koji čine čak 10 do 20% humanog genoma. Pored genomskog GC ostvaruju i negenomsko dejstvo. Istraživanja su pokazala različitu interindividualnu senzitivnost na GC, razliku u tkivnoj i ćelijskoj glukokortikoidnoj senzitivnosti iste osobe i čak razliku u GC senzitivnosti iste ćelije u različitim fazama ćelijskog ciklusa [1, 2]. Ćelijski odgovor na GC zavisi od brojnih faktora kao što su bioraspoloživost hormona, koncentracija receptora u ćeliji, nivo ekspresije GR, izoformi GR, ekspresije kofaktora, mutacija ili polimorfizama u GR genu. Dosadašnja ispitivanja su pokazala prisustvo velikog broja polimorfizama GR koji mogu uticati na izmenjenu osetljivost na GC što se manifestuje različitim stepenom glukokortikoidne rezistencije ili hipersenzitivnosti .

1.1 Incidentalno otkriveni adrenalni tumori (incidentalomi)

Adrenalni incidentalomi (AI) su tumori slučajno otkriveni različitim vizualizacionim metodama koje su učinjene bez sumnje na adrenalnu patologiju [3]. Radiološke studije pokazuju prevalenciju AI od 3 do 10% sa porastom preko 50-te godine života. Rezultati autopsijskih studija ukazuju na prevalenciju oko 2% (1.0-8.7) [4, 5]. Većina AI su benigni adrenokortikalni adenomi. Standardne radiološke procedure kao što su kompjuterizovana tomografija (CT) i magnetna rezonanca (MR) mogu na osnovu tipičnih morfoloških pre i post-kontrastnih karakteristika razlikovati benigne od malignih lezija. Činjenica da se otkrivaju bez sumnje na adrenalnu patologiju upućuje da je većina AI afunkcionalna, dok manji broj pokazuje subkliničku funkcionalnu aktivnost u smislu hiperkorticizma, primarnog hiperaldosteronizma, hiperandrogenizma i kateholaminskog ekscesa odnosno feohromocitoma. Etiologija i učestalost različitih tumora prikazana je na Tabeli 1.

Tabela 1 Učestalost različitih tipova adrenalnih incidentaloma

Etiologija adrenalnih incidentaloma	Mediana (%)	Opseg (%)
Podaci kliničkih studija		
Adenom	80	33-96
Nefunkcionalni	75	71-84
Autonomna sekrecija kortizola	12	1.0-29
Primarni hiperaldosteronizam	2.5	1.6-3.3
Feohromocitom	7.0	1.5-14
Adrenokortikalni karcinom	8.0	1.2-11
Metastaze	5.0	0-18
Podaci hirurških studija		
Adenom	55	49-69
Nefunkcionalni	69	52-75
Autonomna sekrecija kortizola	10	1.0-15
Primarni hiperaldosteronizam	6.0	2.0-7.0
Feohromocitom	10	11-23
Adrenokortikalni karcinom	11	1.2-12
Mijelolipom	8.0	7.0-15
Ciste	5.0	4.0-22
Ganglioneurinom	4.0	0-8.0
Metastaze	7.0	0-21

Preuzeto iz ESE and ENSAT guidelines on adrenal incidentaloma v.21.12.2015

Najčešća subklinička funkcionalna aktivnost je subklinički hiperkorticizam (SH). Ovaj termin se odnosi na pacijente sa biohemijskim parametrima povećane autonomne

produkcije kortizola, koja je nedovoljna za pojavu kliničkih elemenata hiperkorticizma. U zavisnosti od kriterijuma za postavljanje dijagnoze, prevalencija sukliničkog hiperkorticizma kod pacijenata sa AI se procenjuje na 10-20%, a po nekim autorima čak 63% [6]. Od 9 do 15% AI su bilateralni. Obostrana pojava adrenalnih adenoma odnosno makro i mikronodularnih hiperplazija upućuje na različite patofiziološke mehanizme bilateralnih u odnosu na unilateralne incidentalome [7]. Ovo se posebno odnosi na ACTH nezavisni subklinički i manifestni Kušingov sy. Ispitivanja sprovedena poslednjih godina su značajno unapredila saznanja o genetici i patofiziologiji bilateralnog ACTH nezavisnog Cushingovog sy. za koji se inicijalno smatralo da je sporadična bolest. Prepoznato je nekoliko autozomno dominantnih familijarnih formi u kojima su identifikovane germinativne mutacije gena uključenih u steroidogenezu u adrenalnim nodulima [8]. To su MEN1 sy. (*menin gen*), familijarna adenomatozna polipoza (inaktivirajuća mutacija u APC genu), hereditarni leiomiomatosa i RCC sy. (gen za fumarat hidratazu) i McCune-Albright sy. (aktivirajuća mutacija MCR2 gena, GNAS1 mutacija). Identifikovana je inaktivirajuća germinativna mutacija u genu za enzim fosfodiesterazu 11A (*PDE11A*) [9, 10]. U pojedinim slučajevima steroidogeneza može biti regulisana hormonima i peptidima koji aktiviraju aberantno, eutopično ili ektopično eksprimirane G-protein zavisne receptore u adrenokortikalnom tkivu, kao što su ektopični receptori za glukozo zavisni insulinotropni peptid (GIP) ili eutopično eksprimirani receptori za vazopresin, kateholamine, LH/HCG, serotonin, angiotensin II, leptin, β receptor, IL1, PGE1 ili TSH [11]. Nedavno je identifikovana germinativna inaktivirajuća mutacija *armadillo repeat containing 5* (*ARMC5*) gena, lokalizovanog na 16p11.2, kod oko polovine pacijenata sa ACTH nezavisnim hiperkorticizmom i makronodularnom adrenalnom hiperplazijom. Klinička ekspresija je spora i najčešće se prezentuje bilateralnim incidentalomima i subkliničkim hiperkorticizmom koji se razvija godinama, te ovi pacijenti nemaju tipična stigmata, već kao efekat kontinuirane ili periodične autonomne sekrecije kortizola imaju gojaznost, hipertenziju, intoleranciju glukoze ili šećernu bolest, dislipidemiju odnosno metabolički sy. i osteoporozu [12, 13]

1.2 Glukokortikoidni hormoni

1.2.1 Regulacija sekrecije glukokortikoida

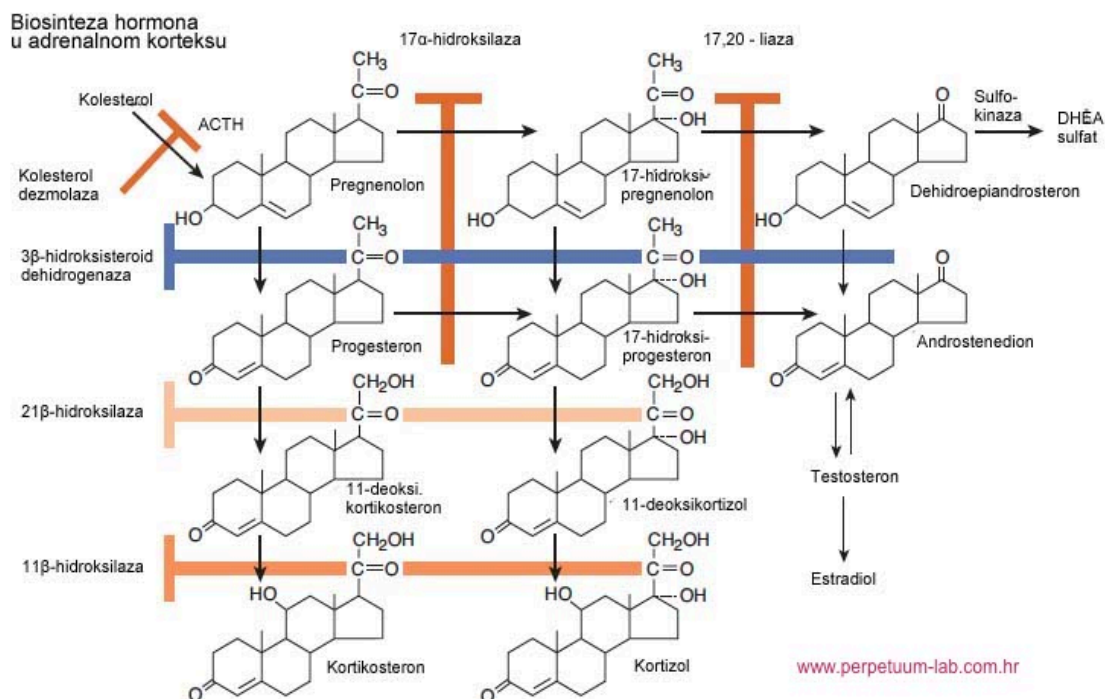
Sinteza i sekrecija kortizola, adrenalnih androgena i delom mineralokortikoida se odvija u nadbubregu pod kontrolom adrenokortikotropnog hormona (ACTH) hipofize i *corticotropin-releasing* hormona (CRH) hipotalamusa, koji čine integrativnu hipotalamo-hipofizno-adrenalnu (HHA) osovину. Brojni neurotransmiteri direktnim uticajem na CRH neurone regulišu aktivnost HHA osovine. Neuroendokrina kontrola sekrecije ACTH i CRH uključuje tri mehanizma: epizodičnu (ultradijalnu) sekreciju i cirkadijalni (diurnalni) ritam, odgovor HHA osovine na stres i negativnu povratnu spregu kortizolom. Diurnalni ritam je superponiran na ultradijalnu pulsatilnu aktivnost (epizodičnu sekreciju), uzrokujući maksimalnu sintezu kortizola pre buđenja, što je praćeno postepenim padom sekrecije tokom dana i dostiže najniže vrednosti oko ponoći. Epizodična sekrecija ACTH je nezavisna od nivoa cirkulišućeg kortizola i perzistira i kod pacijenata sa primarnom adrenalnom insuficijencijom. Odgovor HHA osovine na stimulaciju fizičkim i psihičkim stresom se superponira na normalan diurnalni ritam [14]. Porast ACTH tokom stresa je posredovan vazopresinom i CRH. Za razliku od fizioloških koncentracija kortizola, egzogeni GC suprimuju odgovor ACTH na stres. Negativna povratna sprega endogenih i egzogenih GC odvija se na nivou hipotalamusa i na nivou hipofize na dva načina. Brza negativna povratna sprega (unutar par minuta) je osetljiva na brzinu promene nivoa kortizola i posredovana je membranskim glukokortikoidnim receptorom koji stimuliše brzu sintezu i oslobađanje endokanabinoida čime suprimuje sinaptičku aktivaciju, dok je spora povratna sprega osetljiva na apsolutni nivo kortizola i posredovana je nuklearnim glukokortikoidnim receptorom i mehanizam je preko koga deksametazon ostvaruje supresivan efekat [15]. ACTH takođe inhibira sopstvenu sekreciju kratkom povratnom spregom.

GC ostvaruju negativan uticaj preko dva različita receptora, glukokortikoidnog receptora (GR) i mineralokortikoidnog receptora (MR) [16]. Osetljivost HHA osovine na supresivno dejstvo GC zavisi od osetljivosti GR koji u odnosu na MR ima visok afinitet za deksametazon, a manji za endogene GC, zbog čega se smatra da je GR važan za regulaciju odgovora HHA osovine kada je nivo endogenih GC visok (stres, cirkadijalni peak), a da

MR imaju važnu ulogu u moduliranju GR zavisne regulacije [17]. Poremećena regulacija HHA osovine dovodi se u vezu sa metaboličkim i kardiovaskularnim poremećajima. Pokazano je da je više psihijatrijskih poremećaja vezano za poremećaj aktivnosti HHA osovine i osetljivost GR na limbičko hipokampalnom nivou. Hronični stres je takođe povezan sa povećanom aktivnosti HHA osovine i povećanom osetljivošću GR [18].

1.2.2 Biosinteza kortizola

Sinteza kortizola i adrenalnih androgena se odvija u zoni retikularis i zoni fascikulati, a aldosterona u zoni glomerulozi adrenalnog korteksa, pod uticajem enzima steroidogeneze koji pripadaju porodici citohrom p450 oksigenaza (Slika 1). ACTH se vezuje visokim afinitetom za membranske receptore, aktivira adenilat ciklazu, povećava ciklični adenzin monofosfat koji aktivira intracelularne fosfoprotein kinaze uključujući i StAR. To rezultuje porastom slobodnog holesterola usled povećane aktivnosti holesterol esteraze i smanjenja holesterol estar sintetaze. Ova konverzija holesterola porekla plazma lipoproteina u pregnenolon je *rate-limiting* korak u steroidogenezi koji se odvija u mitohondrijama i glavno je mesto dejstva ACTH.



Slika 1. Biosinteza hormona u zoni fascikulati i retikularis adrenalnog korteksa. Preuzeto iz Ty.B.Carroll et al. in *Glucocorticoids and Adrenal Androgens*, in Greenspan's Basic and Clinical endocrinology, 9th edition, 2011

Pregnenolon se potom transportuje u endoplazmatski retikulum gde pod uticajem CYP17 nastaje 17 α -hidroksipregnenolon koji se dalje pod uticajem enzima 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaze / δ^5 oxosteroid izomeraze konvertuje u 17 α -hidroksiprogesteron. Naredni korak uključuje 21 hidroksilaciju enzimom CYP21A2 i nastanak 11-deoksikortizola, koji se dalje hidroksiluje u mitohondrijama pod uticajem enzima 11 β -hidroksilaze (CYP11B1) pri čemu nastaje kortizol. Zona retikularis i fascikulata takođe sintetišu 11-deoksikortikosteron, 18-hidroksideoxikortikosteron i kortikosteron. Ove dve zone se razlikuju u odnosu na zonu glomerulozu po enzimskim kapacitetima, odnosno ne ekspimiraju gen za CYP11B2 (kodira enzim aldosteron sintetazu) i različitoj regulaciji sekrecije, odnosno primarno su regulisane putem ACTH. Zona glomeruloza nema enzim 17 α -hidrolazu i ne može sintetisati 17 α -hidroksipregnenolon i 17 α -hidroksiprogesteron, odnosno prekursore kortizola i androgena, a sinteza aldosterona je primarno regulisana sistemom renin-angiotenzin i koncentracijom serumskog kalijuma. Dnevna sekrecija kortizola u bazalnim uslovima iznosi 8-25 mg/dan, prosečno 9.2 mg/dan [19].

1.2.3 Cirkulacija kortizola

Kortizol i adrenalni androgeni se sekretuju slobodni i pri ulasku u cirkulaciju vezuju se za plazma proteine. U bazalnim uslovima 75% kortizola je vezano za globuline (*corticosteroid-binding globulin-CBG*, transcortin), dok je 10% slobodno, a 15% je vezano za albumine. Jedino je slobodni kortizol biološki aktivan. S obzirom da u pljuvački nema vezujućih proteina, salivarni kortizol reflektuje nivo slobodnog kortizola i pogodan je za procenu metabolizma endogenih GC. CBG se sintetiše u jetri i ima kapacitet vezivanja kortizola oko 25 mcg/dl. Kada nivo ukupnog kortizola prevaziđe ovaj nivo, slobodna koncentracija kortizola se značajno povećava. Sintetski glukokortikoidi sa izuzetkom prednizolona se ne vezuju značajno za CBG, već za albumine [20].

1.2.4 Metabolizam kortizola

Kortizol i kortizon se metabolišu u jetri putem inaktivacije pod dejstvom reduktaze i 3-hidroksisteroid dehidrogenaze kada nastaju finalni metaboliti 5 α i 5 β tetrahidrokortizol i 5 β tetrahidrokortizon koji se eliminišu urinarnom ekskrecijom i često se koriste kao

biomarkeri metabolizma GC, dok se manje od 1% sekretovanog kortizola nalazi nepromenjeno u urinu [21]. Postoje dva izoenzima 11- β hidroksisteroid dehidrogenaze (11 β -HSD), tip 1 i tip 2 sa suprotnim dejstvom, koji su produkt dva različita gena, imaju različitu tkivnu distribuciju i odgovorni su za tkivno specifičnu interkonverziju kortizola i kortizona u endoplazmatičnom retikulumu. 11 β -HSD1 je eksprimirana u jetri, masnom tkivu, bubregu i mozgu, dok je 11 β -HSD2 dominantno u bubregu i pljuvačnim žlezdama. 11 β -HSD1 konvertuje inaktivni kortizon u kortizol, dok 11 β -HSD2 katalizuje suprotnu reakciju, odnosno kortizol konvertuje u inaktivni kortizon. Ukupni urinarni tetrahydro-metaboliti se mogu koristiti kao indikator GC metabolizma, međutim, upotreba njihovog međusobnog odnosa radi predikcije interkonverzije kortizola u kortizon putem 11 β -HSD2 je pod znakom pitanja s obzirom da ovaj odnos predstavlja odraz ukupnog metabolizma u organizmu zbog različite tkivne distribucije izoenzima, a pored toga i aktivnosti drugih enzima uključenih u metabolizam kortizola [22].

Slobodni kortizol pasivno difunduje kroz membranu ciljnih ćelija i predstavlja ligand za aktivaciju GR. Lokalna koncentracija slobodnog kortizola u citoplazmi, odnosno njegova bioraspoloživost kontrolisana je CGB koji pored nosača ima ulogu u oslobađanju kortizola i putem aktivnosti enzima 11 β -HSD tip 1 ili 2. Promene u nivou i/ili aktivnosti 11 β -HSD-1 i -2 mogu uticati na različitu ćelijsku osetljivost na GC. Inhibitori 11 β -HSD1 su osmišljeni da ograniče negativne metaboličke efekte povišenih endogenih GC. Suprotno od kortizola, većina sintetskih GC osim što se ne vezuje za CBG, takođe se ne metaboliše putem enzima 11 β -HSD-2. U tkivima kao što su jetra i masno tkivo gde je 11 β -HSD-1 eksprimirana, lokalna koncentracija kortizola je odraz lokalne konverzije kortizona i kortizola difundovanog iz plazme. Povećana ekspresija i aktivacija enzima i CBG može dovesti do lokalne hiperkortizolemije i aktivacije GR u odsustvu biohemijski merljive hiperkortizolemije, što doprinosi nastanku abdominalne gojaznosti i insulinske rezistencije [23].

1.2.5 Efekat glukokortikoida na metabolizam glukoze, lipida i proteina

GC povećavaju hepatičku produkciju glukoze stimulacijom enzima glukoneogeneze fosfoenolpiruvat karboksikinaze i glukozo-6-fosfataze koji je *rate-limiting* enzim, a istovremeno potencira efekat glukagona [24]. Ovo rezultuje povećanim otpuštanjem

glukoze iz jetre. GC povećavaju hepatičnu sintezu i deponovanje glikogena stimulišući aktivnost glikogen sintetaze. Takođe povećavaju supstrat za glukoneogenezu iz perifernih tkiva. Stimulisanjem lipolize povećavaju glicerol i slobodne masne kiseline, a povećavaju i oslobađanje laktata iz mišića. U jetri GC povećavaju aktivnost enzima uključenih u sintezu masnih kiselina i sintezu lipoproteina [25]. Ovaj lipogeni efekat i akumulacija triglicerida u jetri dovodi do steatoze i steatohepatitisa i smanjene insulinske senzitivnosti na nivou jetre nezavisno od akumulacije visceralnog masnog tkiva [26].

U masnom tkivu povećavaju lipolizu direktno i indirektno putem povećavanja osetljivosti na lipolitičke hormone. Iako deluju lipolitički, paradoksalno, deponovanje masnog tkiva je klasična manifestacija GC ekscesa, što je posledica GC indukovane diferencijacije preadipocita u adipocite, povećanog apetita i lipogeneze uslovljene hiperinsulinemijom. Diferentovani adipociti postaju insulin rezistentni u prisustvu GC koji antagonizuju insulinom stimulisanu translokaciju glukoznih transportera ka ćelijskoj membrani dovodeći do smanjene utilizacije glukoze. Sličan mehanizam je odgovoran i za insulinsku rezistenciju u skeletnim mišićima. Uticaj na mišiće je katabolički, smanjuju utilizaciju aminokiselina i sintezu proteina, a povećavaju oslobađanje aminokiselina koje su supstrat za glukoneogenezu u jetri [27]. GC inhibiraju sekreciju insulina iz beta ćelije [28].

Hronični endogeni ili egzogeni GC ekscses je povezan sa nastankom hipertenzije. GC su agonisti za mineralokortikoidni receptor (MR). Aktivacija MR je tkivno specifično kontrolisana postojanjem izoformi 11β -HSD1 i 11β -HSD2. U bubregu 11β -HSD2 konvertuje kortizol u kortizon i štiti MR od glukokortikoidnog ekscesa. Sa značajnom hiperkortizolemijom, prevazilazi se kapacitet enzima za inaktivaciju kortizola i GC ostvaruju mineralokortikoidni efekat [29]. GC povećavaju udarni volumen i povećavaju perifernu vaskularnu rezistenciju usled dizbalansa vazodilatatora i vazokonstriktora (azot oksida, prostaciklina, endotelina-1, povećane osetljivosti adrenergičkih receptora na kateholamine i povećane osetljivosti receptora na angiotenzin II). Stimulišu aktivnost renin angiotenzin sistema, povećavanjem sinteze angiotenzinogena u jetri [30].

Dakle, u stanju hroničnog glukokortikoidnog ekscesa metabolički efekti dovode do insulinske rezistencije i hiperinsulinemije, abdominalne gojaznosti, dislipidemije hiperglikemije, hipertenzije, poremećaja koji su klaster metaboličkog sy. (Slika 2).

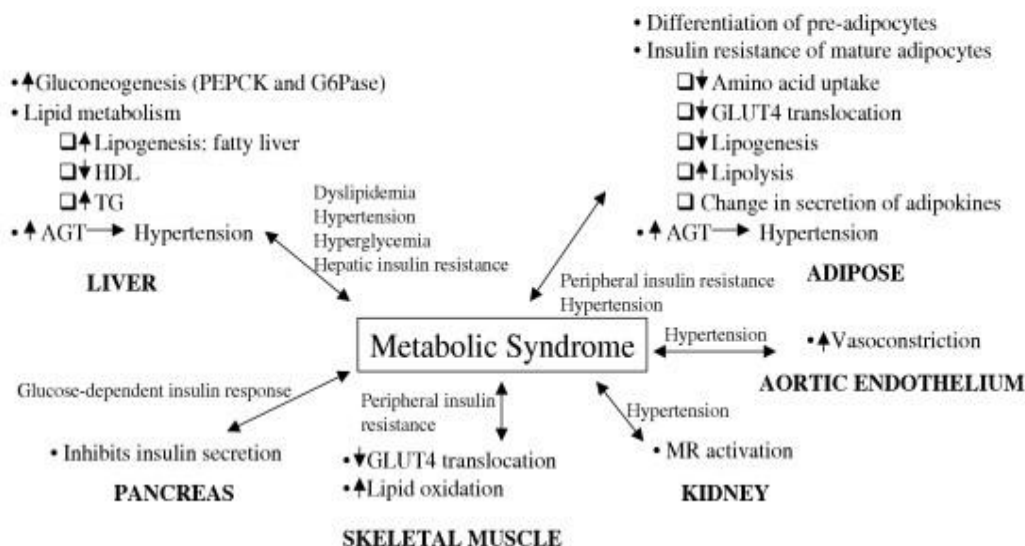


Fig. 2

Slika2. Povezanost metaboličkih efekata glukokortikoida i parametara metaboličkog sy. Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome Nutr Metab (Lond). 2005; 2: 3

1.2.6. Efekti glukokortikoida na kosti

Patogeneza glukokortikoidima indukovane osteoporoze (GIO) u CS je multifaktorijalna, obuhvata direktna i indirektna dejstva GC na kost koja dovode do strukturnih i funkcionalnih promena, odnosno gubitka mineralne gustine (*bone mineral density*, BMD), oštećenja mikroarhitekture, intenziteta remodeliranja kosti, što sve zajedno određuje koštanu jačinu. GC imaju uticaj na produkciju drugih hormona koji regulišu metabolizam Ca i kosti, kao što su gonadotropini, hormon rasta i *insulin-like growth factor-1* (IGF-I) [31]. Takođe smanjuju intestinalnu resorpciju Ca, mehanizmom nezavisnim od vitamina D, putem inhibicije renalne tubularne reapsorpcije kalcijuma i fosfora što stimuliše njegovu sintezu, pri čemu GC i direktno stimulišu 1- α hidrosilazu u bubregu i

hidroksilaciju vitD [31, 32]. Niže vrednosti Ca uzrokuju sekundarni hiperparatiroidizam, mada vrednosti PTH iznad opsega referentnih vrednosti nisu karakterističan nalaz za CS. Katabolički efekti GC na mišiće, dovode do gubitka stimulatornog efekta muskularne kontrakcije na formiranje kosti, doprinose nastanku mišićne slabosti, povećanoj incidenci pada i povećanom riziku od fraktura [31, 32].

1.2.6.1. Efekti glukokortikoida na celularnom nivou u kostima

Inicijalni događaj je stimulacija osteoblasta za sintezu *receptor activator of NF-kappaB-RANK-ligand* (RANKL) koji povećava osteoklastogenezu i redukuje produkciju osteoprotegerina (OPG), antagoniste RANKL [33]. GC povećavaju ekspresiju *macrophage-colony-stimulating factor* (M-CSF) u osteoblastu čime produžavaju životni vek osteoklasta. Time se objašnjava rana brza faza koštane resorpcije. Koncentracija cirkulišućeg RANKL i OPG ne reflektuje njihovu tkivnu ekspresiju. Nivo OPG je povećan kod pacijenata sa hroničnom hiperkortizolemijom [34] i čak perzistira nakon uspešnog hirurškog lečenja CS. Smatra se da su cirkulišuće vrednosti porekla vaskularnog endotela i koreliraju pre sa povećanim kardiovaskularnim rizikom nego sa koštanim metabolizmom [35].

Međutim, dominantni efekat GC na koštani metabolizam je supresija formiranja kosti, odnosno broja i funkcije osteoblasta, što uzrokuje smanjenje mase zamenjene kosti u svakom ciklusu koštanog remodeliranja [33]. GC putem inhibicije Wnt/beta-catenin puta smanjuju osteoblastnu proliferaciju, diferencijaciju i funkciju, a sekundarno i osteoklastnu funkciju i dovode do povećane ekspresije Notch receptora i aktivacijom caspase 3 dovode do povećane apoptoze i osteoblasta i osteocita [36]. Apoptoza osteocita je dodatni momenat koji doprinosi povećanoj fragilnosti kosti pre samog mineralnog gubitka s obzirom da osteociti funkcionišu kao mehanoreceptori, a prekid kanalikularne mreže formirane od osteocitnih dendrita rezultuje prekidom prenosa signala koji normalno stimulišu remodeliranje odnosno zamenu oštećene kosti [37]. Oštećenje osteoblastne diferencijacije stromalnih ćelija koštane srži praćeno je istovremenim preusmeravanjem maturacije multipotentnih stem ćelija ka drugim ćelijskim linijama, pre svega adipocitima usled smanjenja *bone morphogenetic protein-2*, povećanja *peroxisome proliferator-activated receptor-gama-2* i *CAAT enhancer-binding proteins* [36, 38]. GR i 11-β-HSD1, kao najvažniji prereceptorski regulator, su prisutni i u osteoblastima i osteoklastima. GRE su

prisutni u promotorskom regionu za osteokalcin, jedan od specifičnih produkata osteoblasta [39, 40]. Nedavna istraživanja su pokazala da GC dovode do povećane ekspresije transkripcionih faktora: glucocorticoid-*induced leucine zipper* – GILZ koji ima ključnu ulogu u maturaciji osteoblasta i koštanom prometu [41] i *thioredoxin interacting protein-1* – TXNIP [42]. Wang i sar. su pokazali u prvoj objavljenj proteomskoj studiji u GIO kod pacova, da HSP-60 štiti koštane ćelije od oštećenja usled glukokortikoidnog ekscesa [43].

Osteoblasti i osteoklasti takođe eksprimiraju MR koji vezuju GC i formiraju heterodimere i sa GR α i GR β i inhibiraju transkripcionu aktivnost [44]. Na autokrino-parakrini način citokini moduliraju koštanu osetljivost na GC. IL-6 u humanim osteoblastima autokrino povećava broj GR [45, 46]. Kortizol, čak i u fiziološkim koncentracijama, negativno modulira sekreciju IL-11, citokina koji smanjuje ekspresiju GR. [47].

Insulinu slični faktori rasta (*Insulin-like growth factors*, IGFs) imaju anabolički efekat na koštane ćelije koje poseduju IGF-I i IGF-II receptore. IGF-I i IGF-II povećavaju replikaciju osteoblasta, povećavaju sintezu kolagena tipI, a smanjuju ekspresiju kolagenaze-3 (metaloproteinaza-13) u osteoblastima [48, 49]. GC smanjuju sintezu IGF-I u osteoblastima putem povećane ekspresije CAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP) β and δ (transkripcioni faktori koji se vezuju za IGFI promoter) [50] i inhibiraju ekspresiju IGF-II receptora u osteoblastima, dok nemaju efekat na ekspresiju IGF-I receptora [51]. Pošto IGF-II receptor funkcioniše kao *IGF-binding protein* (IGFBP) njegova inhibicija glukokortikoidima rezultuje višim nivoom dostupnih faktora rasta, mada može dovesti i do brže degradacije IGF-II. Aktivnost IGF-I i II je regulisana sa bar šest IGFBP koji su eksprimirani u osteoblastima [52]. IGFBP u skeletnim ćelijama predstavljaju lokalne rezervoare i modulatore IGF. GC smanjuju ekspresiju IGFBP-3, -4 i -5 u osteoblastima [53]. IGFBP-5 stimuliše ćelijski rast (i povećava efekat IGF-I).

1.2.6.2. Prevalencija i prediktori fraktura kod pacijenata sa GIO

Rizik od fraktura procenjuje se 30-67% kod pacijenata sa manifestnim endogenim i egzogenim i subkliničkim Cushing-ovim sy. (CS) [54]. Frakture se najčešće dešavaju na torakalnim i lumbalnim pršljenovima, kuku, rebrima i karlici, spontano ili usled slabe traume i najčešće su asimptomatske. Rizik od fraktura u GIO uzrokovanoj endogenim ili egzogenim hiperkorticismom je sličan. Podaci dobijeni u najvećoj epidemiološkoj studiji koja je ispitivala osteoporozu usled egzogene administracije GC pokazuju da 0.9% opšte populacije kontinuirano prima GC više od 3 meseca. Najveći relativni rizik za frakture uočen je na nivou kičme (RR = 2.6), sa značajnim sniženjem na bazni nivo nakon prekida GC terapije [55]. Rizik od fraktura se vraća na nivo normalne populacije prosečno godinu dana po prekidu oralnih GC [56].

Uprkos opsežne literature o GIO usled endogenog CS, sistematsko istraživanje i podaci o frakturama su retki. Postoji samo jedna populaciona studija u kojoj je ispitivano 104 pacijenta sa CS koji su imali 42 frakture, od čega 27 pre postavljanja dijagnoze. Pokazano je da ovi pacijenti imaju 5 puta veći rizik od preloma usled slabe traume u odnosu na kontrolu. Rizik od fraktura je povećan 2 godine pre postavljanja dijagnoze šest puta, sa normalizovanjem nakon izlečenja [57]. U svojoj studiji, Futo i sar. su objavili nastanak 23 simptomatske vertebralne i 25 nevertebralne frakture kod 24 od 68 (35%) pacijenata unutar 5 godina pre dijagnostikovanja CS i ni jednu frakturu nakon izlečenja [58]. U jedinoj kliničkoj studiji koja je sistemski radiografski ispitivala pojavu vertebralnih fraktura, pokazano je da čak 76% pacijenata sa CS ima frakture od čega je 48% asimptomatsko [59]. Prediktori koštanih fraktura u GIO su starost, trajanje bolesti [58], BMD lumbalne kičme [59], BMD podlaktice [58] i prethodne frakture [57], ali ne i serumski kortizol i BMI [58, 59], genetski determinisana individualna osetljivost na GC. Logističkom regresijom, BMD lumbalne kičme se pokazao kao najznačajniji prediktor vertebralnih fraktura [59]. Kod pacijenata sa endogenim CS gubitak koštane gustine je najčešće na nivou osteopenije i odgovara 10-25% smanjenju u odnosu na peak koštane gustine. Umanjenje BMD je nezavisno od uzroka CS [58, 59, 60]. Kod manifestnog CS nije uočena korelacija BMD i gonadnog statusa, što ukazuje da negativan efekat hiperkortizolemije prevazilazi protektivni efekat estrogena [61]. Rezultati nedavnih studija pokazuju normalan ili lako snižen BMD perifernog skeleta [58, 62].

DXA celog skeleta je pokazala manju redukciju BMD na ekstremitetima u odnosu na lumbalnu kičmu, vrat femura ili grudni koš [63]. Dakle najznačajniji gubitak je trabekularne kosti, mada iznenađujuće, ultradistalni deo podlaktice koji je trabekularna kost pokazuje povećanje BMD [61]. Postoje jasni dokazi da pored BMD, oštećenje koštane mikroarhitekture značajno smanjuje kvalitet kosti i važan je faktor rizika od fraktura. Dve nove metode za procenu koštane mikroarhitekture u GIO su *spinal deformity index* i *trabecular bone score* [64]. Starost pozitivno korelira sa BMD Z skorom što ukazuje da u proseku mlađi pacijenti sa CS imaju veći deficit BMD [60].

1.2.6.3. Povezanost koncentracije kortizola i markera koštanog prometa

Biohemijski markeri formiranja i koštane razgradnje omogućavaju uvid u stanje koštanog remodeliranja sa izvesnim stepenom predikcije brzine koštanog gubitka, odnosno osobe sa nižim BMD i višim markerima imaju veći rizik od nastanka osteoporoze i fraktura u odnosu na one sa nižim vrednostima koštanih markera. U velikim prospektivnim studijama kod pre i postmenopauzalnih žena pokazano da se rizik za brži koštani gubitak povećava do dva puta kod žena sa višim u odnosu na niže vrednosti koštanih markera. Formiranje kosti se biohemijski može meriti serumskim osteokalcinom, koštanom alkalnom fosfatazom ili karboksi i aminoterminalnim propeptidima kolagena1, dok se koštana resorpcija može procenjivati putem karboksi i aminoterminalnim degradacionim produktima kolagena tip1. Brojne studije su u poslednje dve decenije ispitivale povezanost različitih biohemijskih parametara hiperkortizolemije i markera koštanog formiranja, odnosno resorpcije i neke su potvrdile [65] druge nisu ovu povezanost [61]. Efekat GC na koštano formiranje i resorpciju zavisi od nivoa i trajanja kortizolemije. Kao što je pomenuto najkonzistentniji efekat GC je supresija koštanog formiranja i ovaj efekat je nezavisan od akutnog ili hroničnog dejstva GC. Serumski osteokalcin se smanjuje čak i nakon DST 1mg [66] i on je najbolji marker za praćenje koštanog formiranja u endogenom CS, kada je suprimovan 60-80% u odnosu na zdrave kontrole. Rezultati vezani za resorpcione koštane markere su kontradiktorni što je posledica različitih eseja i različite etiologije CS. Dok akutno davanje visokih doza GC dovodi do porasta koštane resorpcije 2.5 puta nakon 5 dana, resorpcioni markeri su najčešće opisani kao normalni u endogenom CS [67].

1.3 Glukokortikoidni receptor

1.3.1. Gen za humani glukokortikoidni receptor

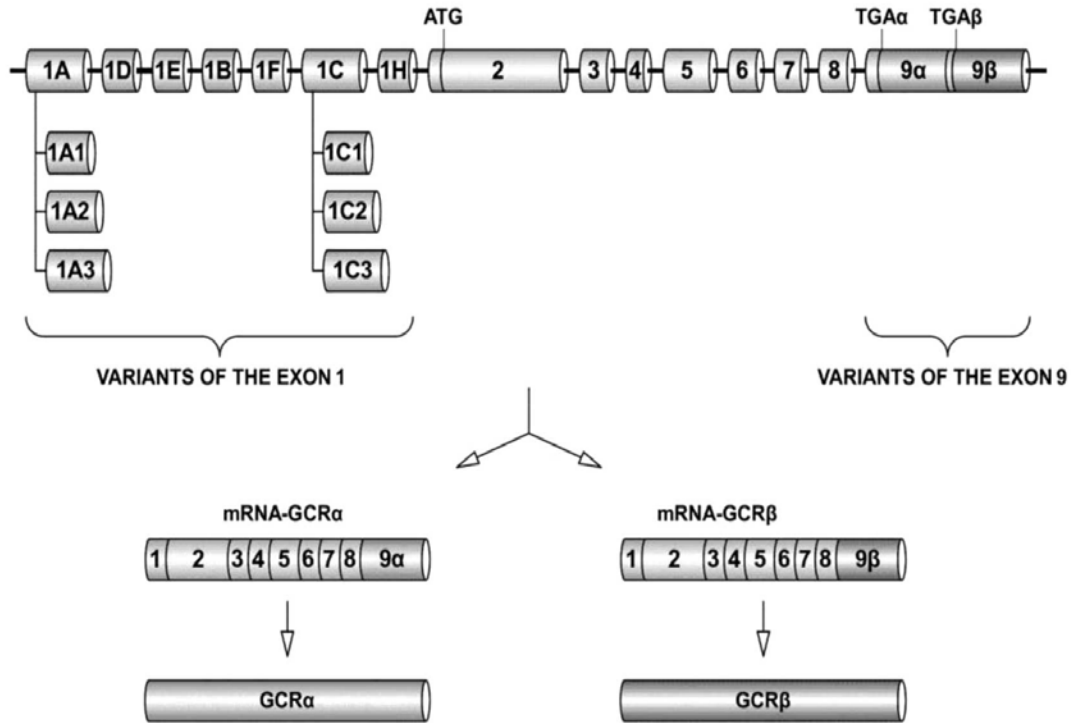
Struktura gena za humani glukokortikoidni receptor

Humani GR (hGR) je produkt gena lokalizovanog na dužem kraku hromozoma 5 u okviru lokusa 5q31-32. U hGR promotoru je pokazano odsustvo TATA i CCAAT boksova, umesto kojih su identifikovana vezujuća mesta za brojne transkripcione faktore kao što su AP 1, Sp1, AP 2 NF- κ B, CREB (*cAMP responsive element-binding protein*). hGR se sastoji od devet egzona. Egzon 1 predstavlja 5' region koji se ne prevodi (5' NTR), dok egzoni 2-9 kodiraju protein GR. Egzon 2 kodira N-terminalni domen GR uključujući i AF1 transaktivacioni domen. Egzoni 3 i 4 kodiraju centralnu DNK vezujuću domenu (DBD) odnosno dva cinkana prsta uključena u vezivanje DNK. Ostalih pet egzona 5-9 zajedno kodiraju ligand vezujuću domenu (LBD) i ligand zavisani AF2, kao i 3' region koji se ne prevodi (3' NTR). Ispitivanja promotorskog dela hGR gena utvrdila su postojanje bar tri različita regulatorna regiona, od kojih svaki kontroliše posebnu izoformu egzona 1 (1A, 1B, 1C) i igra važnu ulogu u tkivno specifičnoj regulaciji ekspresije hGR gena. Na egzonu 1A zasebno postoje tri alternativna splajs mesta, čime je omogućen nastanak tri 1A transkripta: 1A1, 1A2 i 1A3. Svih pet varijanti egzona 1 (1A1, 1A2, 1A3, 1B, 1C) mogu da se vežu za isto akceptorsko mesto na egzonu 2, dajući transkripte koji sadrže različite 5' NTR [68. 69].

Alternativno splajsovanje primarnog transkripta

Alternativnim splajsovanjem egzona 9 nastaju dva visoko homologna mRNK transkripta, što rezultuje nastankom dve izoforme GR, označene kao GR α i GR β . Obe izoforme sadrže egzone 1-8, ali imaju različite verzije 9 egzona, 9 α i 9 β [70]. Obe izoforme su identične do 727 amino kiseline. Izoforma GR α , klasični GR protein koji posreduje GC efekte, sadrži još dodatnih 50, a splajs izoforma β još 15 nehomologih amino kiselina. Ova razlika u poslednjim karboksi-terminalnim aminokiselinama čini bitnu funkcionalnu razliku između dve receptorske izoforme. GR β ne vezuje glukokortikoidne agoniste, nalazi se u nukleusu i transkripciono je neaktivan. Međutim, kada je ko-eksprimiran sa GR α , GR β funkcioniše kao dominantni inhibitor i antagonizuje aktivnost GR α na brojne ciljane gene putem kompeticije za vezivanje za GRE, kompeticije za transkripcione koregulatorne i

formiranjem transkripciono inaktivnog GR α /GR β heterodimera. Mogućnost GR β da inhibira aktivnost GR α ukazuje da visok nivo GR β može uzrokovati glukokortikoidnu rezistenciju [71]. GR β je prisutan u mnogim ćelijama i tkivima, ali u značajno manjem nivou u odnosu na GR α (slika 3). Proinflamatorni citokini mogu selektivno povećati ekspresiju GR β i dovesti do smanjene glukokortikoidne senzitivnosti. Povišen nivo GR β je povezan sa glukokortikoidnom rezistencijom u mnogim inflamatornim bolestima poput astme, reumatoidnog artritisa, ulceroznog kolitisa, sistemskog eritemskog lupusa, sepsi, akutnoj limfoblastnoj leukemiji i hroničnoj limfocitnoj leukemiji. Prirodna pojava polimorfizma jednog nukleotida A3669G na 3'NTR kraju egzona 9 β dovodi do povećane stabilnosti GR β mRNK i povećane ekspresije GR β . Prisustvo ovog polimorfizma je dovedeno u vezu sa autoimunim bolestima, infarktom miokarda, koronarnom bolesti i srčanom insuficijencijom, što ukazuje da porast GR β kod ovih osoba može umanjiti protektivnu imunosupresivnu i antiinflamatornu transkripcionu aktivnost GR α [72]. Pokazano je prisustvo još jedne izoforme hGR koja se od ostalih razlikuje po inserciji jedne amino kiseline (arginin) između egzona 3 i 4, koji kodiraju 2 Zn prsta DBD vezujućeg domena. Ova receptorska varijanta, nazvana GR γ vezuje GC i DNK na sličan način kao GR α ali ima različit transkripcioni profil. Ekspresija GR γ je povezana sa glukokortikoidnom rezistencijom kod sitnoćelijskog karcinoma pluća, kortikotrofnog adenoma, akutne limfoblastne leukemije dece [73, 74]. Takođe su nađene dve izoforme hGR sa nedostatkom velikog regiona LBD. To su izoforma GR-A kojoj nedostaju egzoni 5-7 koji kodiraju aminoterminalnu polovinu LBD i izoforma GR-P kojoj nedostaju egzoni 8 i 9 koji kodiraju karboksiterminalnu polovinu LBD, što za posledicu ima nemogućnost vezivanja glukokortikoida. Prisustvo GRP potvrđeno je u glukokortikoid rezistentnim malignim ćelijama.

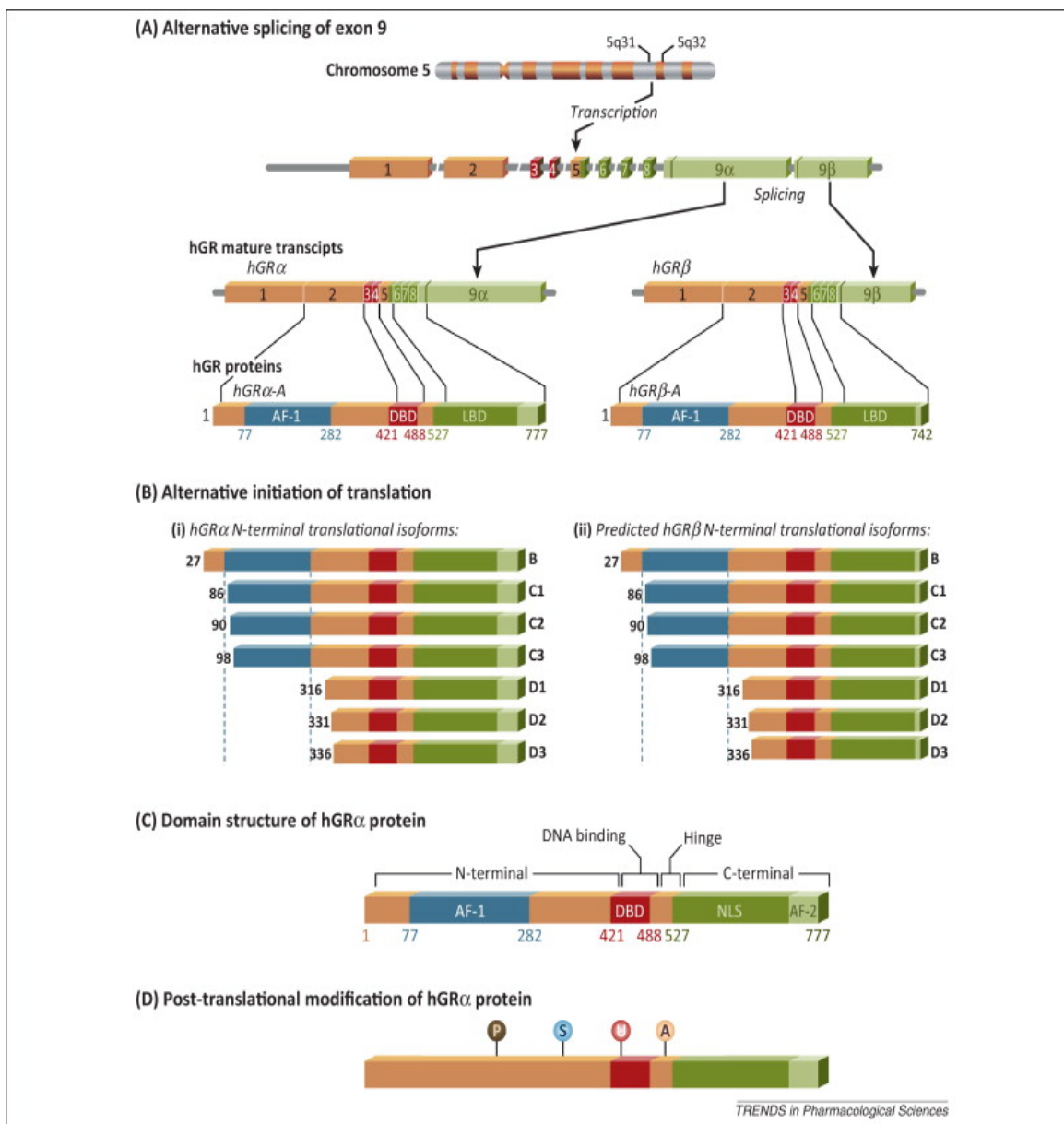


Slika 3. Organizacija i ekspresija NR3C1 gena. Detaljan opis u tekstu.

Alternativna inicijacija translacije mRNA glukokortikoidnog receptora

Translacija hGR mRNK može da počne na osam alternativnih start kodona smeštenih u egzonu 2 N-terminalnog dela receptora, što dovodi do nastanka osam podtipova GR α koje imaju identičan DBD i LBD, a različit postepeno sve kraći N-terminalni region (GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2, GR α -D3). GR α -A je peptid sa punom dužinom koji nastaje nakon prepoznavanja prvog inicijalnog mesta sa 5' kraja hGR mRNK. Nastanak ostalih skraćenih izoformi proteina je posledica šantovanja ribozoma sa alternativnih mesta za inicijaciju translacije. GR α translacione izoforme pokazuju sličan afinitet za GC i sličan kapacitet vezivanja za GRE nakon ligand zavisne aktivacije. Međutim, postoje značajne razlike između ovih translacionih izoformi. GR α -A, GR α -B i GR α -C su u odsustvu hormona lokalizovane u citoplazmi i nakon vezivanja GC translociraju se u nukleus, dok je GR α -D lokalizovana u nukleusu vezana za GRE specifičnih ciljnih gena i nezavisno od GC terapije. Svaka GR α izoforma poseduje različite regulatorne ciljne gene. Manje od 10% gena je zajednički regulisano svim translacionim izoformama, ukazujući da je većina gena selektivno

regulisana različitim GR α i da ćelijski odgovor na GC zavisi od eksprimiranih receptorskih izoformi. Ćelije koje eksprimiraju GR α -C3 pokazuju hipersenzitivnost, dok one sa GR α -D3 pokazuju najveću rezistenciju na GC. Nedavne studije su pokazale da polimorfizam ER22/23EK u GR genu i heterogenost u 5'NTR GR α mRNA mogu uticati na efikasnost inicijacije translacije sa pojedinog start kodona. Splajs varijante hGR (GR β , GR γ , GR-A, GR-P) takođe sadrže identičan set alternativnih start kodona, zbog čega nastaju slične translacione izoforme ovih GR [75].



Slika 4. Genomska lokalizacija i organizacija humanog GR. (A) GR podleže alternativnom procesovanju. (B) Alternativna inicijacija translacije GRa i nastanak osam izoformi GR. (C) struktura protein GR α (D) multiple post-translacione modifikacije proteina GR. Kadmiel M, Cidlowski AJ. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. Trends in Pharmacological Sciences. 2013

Post-translacione modifikacije izoformi hGR

Svaka individualna izoforma GR α nastala alternativnim procesovanjem gena za GR podleže nizu post-translacionih modifikacija čime se dalje proširuje opseg funkcija GR i obezbeđuje dodatna receptorska heterogenost koja modulira ćelijski odgovor na GC. Post-translacione modifikacije obuhvataju fosforilaciju, ubikvitinaciju, sumoilaciju, acetilaciju i metilaciju (slika 4).

Glavni efekat fosforilacije GR α je uticaj na transkripcionu aktivnost receptorskih izoformi [76]. GR prolazi kroz dinamičan proces fosforilacije i defosforilacije u zavisnosti od prisustva liganda i varijacije ćelijskog ciklusa. Humani GR α je fosforilisan na najmanje 7 serinskih rezidua (Ser-113, Ser-134, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226, Ser-404), lokalizovanih na NTD receptora. Većina fosforilacionih mesta pokazuje u bazalnim uslovima nizak nivo fosforilacije, a vezivanjem GC indukuje se hiperfosforilacija. Glavne kinaze odgovorne za fosforilaciju GR α su mitogen aktivirajuća proteinska kinaza (MAPK), ciklin zavisna kinaza (CDK), kazein kinaza II, kinaza-3 glikogen sintaze-beta (GSK-3 β) i N-terminalna kinaza c-Jun (JNK). Ser-134 je jedinstveno mesto po tome što se fosforilacija odvija putem stres aktivirajućeg stimulusa nezavisno od vezivanja GC. Fosforilacija Ser-211 korelira sa povećanom, a Ser-226 sa smanjenom transkripcionom aktivnosti GR α . Suprotno, smanjena fosforilacija Ser-211 doprinosi nastanku rezistencije na glukokortikoide u malignim limfoidnim ćelijama. Povećana fosforilacija Ser-226 doprinosi rezistenciji na GC u depresiji. Fosforilacija Ser-404 smanjuje sposobnost GR α i za transaktivaciju i za transrepresiju ciljnih gena. U skladu sa tim većina fosforilacionih mesta nalazi se u AF1 domenu, a različiti poremećaji u fosforilaciji serinskih rezidua mogu uticati na interakciju sa kofaktorima i transkripcionu aktivnost GR α . Distribucija GR u ćeliji takođe zavisi od receptorske fosforilacije. Kao posledica fosforilacije na reziduama Ser-203, Ser-226 ili Ser-404, GR α provodi kraće vreme u jedru usled dužeg zadržavanja u citoplazmi i/ili ubrzanog premeštanja iz nukleusa u citoplazmu, što dovodi do redukovanja transkripcione aktivnosti ciljnih gena. Fosfataze poput proteinskih fosfataza tip 1 (PP1), tip 2a (PP2a) i tip 5 (PP5) su takođe uključene u regulaciju nukleo-citoplazmatskog transporta [77]

Ubikvitinacija pretstavlja drugi važan proces post-translacione modifikacije GR. Ubikvitin je protein sastavljen od 76 amino kiselina koji kada se veže za specifične rezidue

lizina usmerava protein u proces proteozomalne degradacije. Pokazano je da ubikvitinacija GR α na konzervativnoj lizin rezidui (Lys-419) usmerava receptor u proteazom radi degradacije. Mutirani receptori postaju rezistentni na ligandom indukovanu degradaciju što dovodi do povećane transkripcione aktivnosti receptora. Pored toga, promene u ekspresiji E3 ubikvitin ligaze za GR α uzrokuju promene na receptorskom nivou i ćelijskoj senzitivnosti na GC [78]. Sumoilacija GR α je takođe post-translaciona modifikacija, proces u kome su SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) peptidi kovalentno vezani za specifične rezidue lizina (Lys-277, Lys-293, Lys-703) unutar receptora. Vezivanje SUMO peptida za receptor se odvija i u odsustvu liganda, ali vezivanje GC ga značajno povećava. U zavisnosti od mesta sumoilacije transkripciona aktivnost GR α može biti pojačana ili smanjena preko promena u interakciji ili aktivnosti specifičnih koregulatora. Mutacija sva tri lizina u arginine onemogućava sumoilaciju [79]. Acetilacija na lizinskim reziduama (Lys-494 i Lys-495) koje su lokalizovane unutar (region šarke) nakon vezivanja GC, može izmeniti aktivnost GR α . Deacetilacija GR putem histon deacetilaze 2 je neophodna da bi receptor efikasno vršio represiju aktivnosti transkripcionog faktora NF- κ B, što ukazuje da acetilacija GR sprečava inhibitorski uticaj NF- κ B na GC signalizaciju.

1.3.2. Struktura glukokortikoidnog receptora

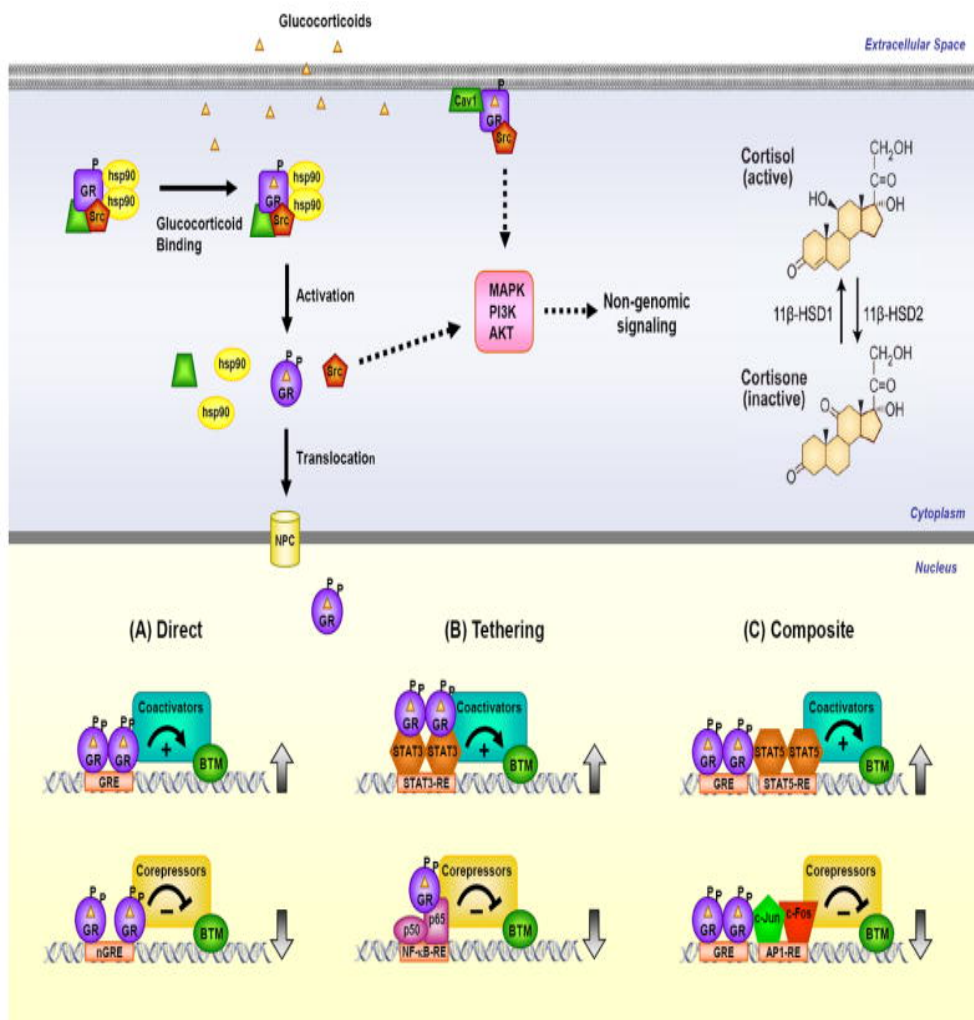
Fiziološka i farmakološka dejstva GC se ostvaruju preko glukokortikoidnog receptora (NR3C1) koji je ligand zavisni transkripcioni faktor lokalizovan u citoplazmi kao multiproteinski kompleks koji se aktivira vezivanjem GC. Molekularnu strukturu humanog GR čine tri funkcionalna domena: amino-terminalni transaktivacioni domen (*N-terminal transactivation domain-NTD*), centralni DNA vezujućii domen (*DNA-binding domain-DBD*) i karboksi-terminalni ligand vezujućii domen (*C-terminal ligand binding domain-LBD*). U okviru NTD nalazi se transaktivacioni subdomen (*transcriptional activation function, AF-1*) koji stupa u interakciju sa koregulatorima i bazalnom transkripcionom mašinerijom i primarno je mesto za post-translacione modifikacije. DBD sadrži dva cinkana prsta od kojih svaki sadrži četiri ostatka cisteina stabilizovana koordinativnim vezama sa jonima Zn. Preko ovih cinkanih prstiju GR stupa u interakciju sa specifičnim DNK sekvencama, glukokortikoid-responsivnim elementima (*glucocorticoid-responsive elementima, GRE*) u promotorskom regionu ciljnih gena regulišući gensku ekspresiju. DBD

takođe sadrži i dimerizacioni i prvi nukleusni lokalizacioni signal (NLS1). LBD je sačinjen od 12 α heliksa i 4 β ploče koji formiraju hidrofobni džep za vezivanje glukokortikoida. Takođe sadrži drugi transaktivacioni subdomen (*activation function*, AF2) koji stupa u interakciju sa koregulatorima na ligand zavisani način. U okviru LBD se nalazi i drugi nukleusni lokalizacioni signal (NLS2) i sekvence važne za vezivanje sa *heat shock* proteinima i drugim transkripcionim faktorima, translokaciju u nukleus i dimerizaciju receptora [80].

1.3.3. Nuklearna translokacija i regulacija transkripcije

U odsustvu glukokortikoida, GR se nalazi dominantno u citoplazmi u sklopu velikog multiproteinskog kompleksa koga čine šaperoni (hsp40, hsp70, hsp90, hsp56, p60), košaperoni (hsp70-interacting protein (Hip), hsp70/hsp90 organizing protein (Hop) i p23) i imunofilini FK506 porodice (FKBP51 i FKBP52) [81]. Ovi proteini održavaju receptor u transkripciono neaktivnoj strukturalnoj formi, sa visokim afinitetom za vezivanje liganda. Vezivanje GC za receptor dovodi do aktivacije i strukturalnih promena u multiproteinskom kompleksu GR, uzrokuje disocijaciju Hsp90/imunofilina i ekspaniranje dva NLS, fosforilacije na pet serinskih fosforilacionih mesta i translokacije GR u nukleus gde formira receptorski homodimer. Regioni DBD sa dva cinkana prsta omogućavaju receptorskim homodimerima da se vežu za kratke palindromske GRE sekvence GGAACAnnnTGTTCT, koje čine dva dela od po 6 bp. Za svaki od ova dva dela se vezuje po jedna receptorska subjedinica. Razmak od 3 nukleotida je neophodan da bi došlo do dimerizacije GR na ovom elementu. Nakon toga, receptor stupa u interakciju sa specifičnim sekvencama u okviru promotora ciljnih gena regulišući gensku ekspresiju direktnim putem. Vezivanje za GRE, koji mogu da budu pozitivni i negativni, ima za posledicu indukciju ili represiju transkripcije regulisanog gena, odnosno dovodi do transaktivacije ili transrepresije [82]. Transaktivacija je odgovorna za negativne efekte terapije glukokortikoidima. Nakon vezivanja za GRE, receptor trpi dodatne strukturalne promene koje dovode do regrutovanja koregulatora i remodelovanja hromatina koje omogućava pristup RNK polimerazi II ciljanim DNA sekvencama. Koaktivatori koji posreduju u aktivaciji transkripcije obuhvataju *steroid receptor coactivators* (SRC1-3), *histone acetyltransferases* CBP/p300 i *nuclear methylase coactivator-associated arginine methyltransferase* (CARM1), dok su NCoR i

SMRT ko-represori koji su regrutovani vezivanjem GR za negativne GRE [83]. Aktivirani GR može regulisati transkripciju i indirektno, putem interakcije sa drugim transkripcionim faktorima. Povezanost GR sa specifičnim članovima STAT porodice, sa ili bez vezivanja za GRE, povećava transkripciju ciljnih gena. Nasuprot, vezivanje za transkripcione faktore *adaptor protein complex 1* (AP1) i *nuclear factor κB* (NFκB), sprečava njihovo vezivanje za ciljne gene koji regulišu ekspresiju jednog broja komponenti imunskog sistema, odnosno dovodi do represije njihove transkripcione aktivnosti. Istraživanja su pokazala da je samo mali deo GRE zaista okupiran od strane receptora, i da senzitivnost i specifičnost GRE zavise od tkivno specifičnih razlika u hromatinskoj strukturi. Koncentracija GC pri kojoj se GR vezuje za GRE i reguliše gensku ekspresiju se razlikuje kroz genom [84]. Neki GRE su okupirani od strane GR i pri niskoj koncentraciji glukokortikoida (hipersenzitivnost), dok drugi zahtevaju velike doze liganda da bi došlo do vezivanja GR. Takođe, GR može regulisati gensku ekspresiju direktnim vezivanjem za DNK i delovanjem u sadejstvu sa susednim transkripcionim faktorima koji su već vezani za DNK. Treći mehanizam delovanja GR obuhvata ne-genomsku aktivaciju kojom se ostvaruju brzi efekti GC za nekoliko sekundi ili minuta koji nisu posledica promena u ekspresiji gena. Primer ne-genomske aktivacije je akcesorni protein tirozin kinaza c-Src koja se nakon vezivanja GC za receptor oslobađa iz kompleksa i aktivira multiple signalne puteve aktiviranja različitih kinaza kao što su PI3K, AKT i MAPK koje dovode do fosforilacije proteina anexina 1, inhibicije aktivnosti citozolne fosfolipaze A2 i smanjenog oslobađanja arahidonske kiseline. Istraživanja su pokazala da GR može biti lokalizovan i u ćelijskoj membrani u kalveolama putem interakcije sa kaveolinom 1 gde reguliše intercelularnu gap junction komunikaciju i proliferaciju neuralnih progenitornih ćelija putem mehanizma koji zahteva aktivnost c-Src i brzu MAPK-zavisnu fosforilaciju conexina-43. Postojanje genomskog i ne-genomskog signalnog puta pokazuje svu složenost i različitost bioloških efekata GC upućujući na potencijalne terapijske mogućnosti primene selektivnih modulatora GR zavisnog genomskog i ne-genomskog puta [85].



Slika 5. GR signalni putevi: Glukokortikoidima aktivirani GR reguliše ekspresiju gena na tri načina: direktnim vezivanjem za DNK (A), interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima (B), ili direktnim vezivanjem za DNK i stupanjem u sadejstvo sa susednim transkripcionim faktorima vezanim za DNK (C). Negenomski mehanizmi delovanja GR ogledaju se u izmeni aktivnosti različitih kinaza. BTM (eng. Basal Transcription Machinery); PI3K (eng. Phosphoinositide 3-Kinase); STAT (eng. Signal Transducer and Activator of Transcription. Oakley and Cidlowski, *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132(5): 1033-1044

Genska stimulacija ili represija posredovana aktivacijom GR reguliše mnogobrojne fiziološke procese kao što je hepaticna glukoneogeneza, adipocitna diferencijacija, kontrola sekrecije hormona [86].

1.3.4. Polimorfizmi u genu za humani glukokortikoidni receptor

Pojedinačni genski polimorfizmi (*single nucleotide polymorphism*) predstavljaju zajedničke varijacije u DNK, koje se javljaju u opštoj populaciji sa učestalošću većom od 1% i značajno se razlikuju u odnosu na etničku pripadnost. Za razliku od pojave germinativne mutacije u GR koja dovodi direktno do nastanka manifestne bolesti, efekat polimorfizma je suptilan, međutim zbog visoke frekvence u populaciji, može biti značajan. Uticaj funkcionalnog polimorfizma gena za hGR ogleda se u varijacijama u senzitivnosti GR na glukokortikoide, što se manifestuje različitom sklonošću za nastanak metaboličkih poremećaja, različitim individualnim terapijskim odgovorom i različitim stepenom neželjenih efekta egzogenih glukokortikoida kao što su jatrogeni Cushing-ov sy., osteoporoza, ulkusna bolest, sekundarna imunodeficijencija. Pokazane su značajne razlike u baznim i post-deksametazonskim koncentracijama serumskog kortizola kod zdravih osoba što ukazuje na različitu *feedback* senzitivnost HPA osovine uzrokovanu individualnom osetljivošću GR lokalizovanih u hipotalamusu i upućuje na mogućnost genetske kontrole regulacije HPA osovine [87]. Studije ukazuju da hiperaktivnost HPA osovine može biti uključena u patogenezu abdominalne gojaznosti i insulinske rezistencije, što je najverovatnije delimično genetski uslovljeno. Otkriven je veliki broj plimorfizama u okviru gena za hGR, ali je značajnija povezanost polimorfizma i glukokortikoidne senzitivnosti pokazana kod četiri polimorfizma (BclI, N363S, ER22/23EK I A3669G). Za razliku od primarne glukokortikoidne rezistencije gde je germinativna mutacija nađena u ligand zavisnoj domeni, funkcionalni polimorfizmi ER22/23EK, N363S i A3669G su lokalizovani u transaktivacionoj domeni (egzon2), a BclI u intronu 2 gena za hGR.

1.3.4.1 BclI polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

BclI polimorfizam (rs423247) je originalno detektovan Southern blot metodom, kada su identifikovani fragmenti od 4.5 kb i 2.3 kb [88]. Kasnije je postojanje BclI polimorfizma hGR potvrđeno korišćenjem restrikcionog enzima BclI i sekvenciranjem DNK, kada je u intronu 2 detektovana promena jednog nukleotida G u C, 647 bp od veze egzon 2/intron 2, s tim da su dužine restrikcionih fragmenata bile različite u odnosu na pomenute, odnosno 3.9 kb za duži i 2.2kb za kraći alel. [89]. Prisustvo BclI polimorfizma se povezuje sa

povećanom senzitivnosti na GC, sa abdominalnom gojaznosti, leptinom, insulinskom rezistencijom i povišenim sistolnim krvnim pritiskom [90]. Rezultati o povezanosti BclI polimorfizma, BMI i telesnog sastava su kontroverzni. U pomenutoj studiji Weaver i sar. nije uočena razlika u učestalosti BclI polimorfizma između gojaznih premenopauzalnih i žena sa normalnom telesnom težinom, ali su gojazne osobe koje su bile homozigoti za G alel (4.5kb) imale više nivoa insulina i viši HOMA-IR u poređenju sa osobama koje su homozigoti za kraći alel CC (2.3 kb) i heterozigoti CG (2.3/4.5kb) [91]. U studiji Panarelli i sar. nije pokazana povezanost G alela i BMI [87]. Studije sprovedene kod osoba srednjih godina su pokazale povezanost BclI polimorfizma i abdominalnog, ne i univerzalnog tipa gojaznosti što ukazuje da je efekat GC na nivou GR značajniji u visceralnog masnom tkivu [90, 92, 93,]. Međutim rezultati prospektivne studije koja je sprovedena kod adolesenata, nakon 12 godina praćenja, pokazuju da samo kod žena koje su heterozigoti za CG alel postoji porast samo subkutanog masnog tkiva u poređenju sa homozigotima CC i GG [94]. Pokazano je da u mladosti postoji povezanost BclI polimorfizma, BMI i procenta ukupne telesne masti, posebno abdominalnim masnim tkivom, dok sa starenjem nosioci polimorfizma imaju niži BMI, verovatno usled smanjenja ukupne mišićne mase. Moguće je da prisustvo BclI polimorfizma ima različit uticaj u zavisnosti od životnog doba i da hronična izloženost glukokortikoidnoj hipersenzitivnosti ima uticaj na telesni sastav u smislu kataboličkog dejstva na mišićnu masu [95]. U pomenutoj studiji nosioci BclI polimorfizma pokazuju značajniju supresiju kortizola i nakon 1mg DEX kao i nakon 0.25 mg DEX, što pokazuje veću osetljivost HPA osovine na GC [95].

1.3.4.2 N363S polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

Polimorfizam N363S (rs6195) u okviru egzona 2 gena za hGR, udaljen 1101 bp od veze intron 1/egzon 2, karakteriše zamena jednog nukleotida ATT u GTT u kodonu 363. Kao posledica ove zamene dolazi do promene aminokiseline asparagin u serin, u okviru modulatornog regiona glukokortikoidnog receptora. Učestalost N363S polimorfizma GR je procenjena na 2.3–7% u evropskoj populaciji gde nisu detektovani homozigoti. S obzirom da se radi o niskoj učestalosti ovog polimorfizma postoji diskrepanca u rezultatima vezanim za osetljivost na GC i povezanosti sa parametrima metaboličkog sindroma. Povećana senzitivnost na glukokortikoide, u pojedinim studijama, korelira sa većim BMI,

abdominalnom gojaznosti i višim nivoom insulina nakon 0.25mg dexametazona u opštoj populaciji i kod dijabetičara [96, 97, 98]. Opisan je i negativan uticaj na metabolički profil i pozitivna korelacija sa koronarnom bolesti [99]. Morbidno gojazne osobe imaju češće N363S alel u odnosu na osobe sa normalnom telesnom težinom. Međutim, druge studije nisu potvrdile povezanost N363S polimorfizma, BMI i gojaznosti u dijabetesu tip2 i koronarnoj bolesti i lipidnog profila [100, 101, 102].

Neke studije su pokazale povezanost N363S polimorfizma i telesnog sastava, odnosno da nosioci N363S među gojaznim osobama paradoksalno imaju niži procenat ukupne telesne masti i bolju insulinsku sensitivnost. Niži procenat ukupne telesne masti kod 363S nosioca, međutim nije povezan sa razlikom u odnosu ukupne i trunkalne masti [103, 104]

1.3.4.3 ER22/23EK polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

Polimorfizam ER22/23EK (rs6189 i rs6190) je lokalizovan u transaktivacionom domenu, u egzonu 2, gde su u dva susedna kodona (kodon 22 i 23) identifikovani polimorfizmi jednog nukleotida. Ova zamena za posledicu ima promenu aminokiseline lizina argininom na poziciji 23 (ER22/23EK: GAG AGG u GAA AAG). Učestalost ER22/23EK polimorfizma se procenjuje na 1.8–4.5% u evropskoj populaciji. Ovaj polimorfizam dovodi do redukcije ekspresije GR α translacione izoforme i pokazana je manja supresibilnost kortizola u DST 1mg, što ukazuje na relativnu glukokortikoidnu rezistenciju. Takođe je pokazano da nosioci ove varijante imaju niže vrednosti baznog insulina i povećanu insulinsku senzitivnost, niži ukupni i LDL holesterol. Isti pacijenti su praćeni tokom više godina i pokazano je da imaju manju tendenciju razvoja oštećene glikozne tolerancije, tipa 2 dijabetesa, kardiovaskularne bolesti, kao i da imaju duži životni vek i snižen rizik za demenciju [95].

1.3.4.4 A3669G polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

Polimorfizam jednog nukleotida A3669G (rs6198), u kome dolazi do zamene A u G (ATTTA u GTTTA) je lokalizovan na 3'NTR kraju egzona 9 β . Prisustvo ovog polimorfizma dovodi do povećane stabilnosti GR β mRNK i povećane ekspresije GR β proteina uzrokujući inhibiciju transkripcije GR α , što rezultuje glukokortikoidnom

rezistencijom. β polimorfizam značajno redukuje transrepresiju što uzrokuje proinflamatorno stanje i ovaj polimorfizam je doveden u vezu sa većom učestalosti reumatoidnog artritisa [105]. Prisustvo A3669G alela je povezano sa smanjenjem centralne gojaznosti kod žena i povoljnim lipidnim profilom kod muškaraca [106]. Druge studije nisu pokazale povezanost β polimorfizma sa BMI, abdominalnom gojaznosti, insulinskom senzitivnosti i lipidnim statusom, međutim osobe koje su homozigoti za β imaju povećan intima-media odnos i tri puta veći rizik za kardiovaskularne bolesti, najverovatnije zbog hroničnog proinflamatornog stanja [107]

1.4. Metabolički sindrom

1.4.1 Definicija i etiopatogeneza metaboličkog sy.

Metabolički sindrom (MetS) predstavlja skup metaboličkih poremećaja koji proizilaze iz insulinske rezistencije, a predstavljaju faktore rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti (KVB) i DM2. Klinički posmatrano, faktori rizika su abdominalna gojaznost, dislipidemija, glikozna intolerancija ili DM2 i hipertenzija. Osobe sa MetS imaju dva puta veći rizik za nastanak koronarne bolesti [108] i pet puta veći rizik za nastanak DM2 [109, 110]. Prisustvo i MetS i IR povećava rizik za nastanak DM2 6 do 7 puta [111]. Postoji više definicija MetS, koje su odraz menjanja istorijskih stavova vezanih za sam koncept sindroma (Tabela 2).

Tabela 2 Kriterijumi za dijagnozu MetS

WHO 1988	EGIR 1999	NCEP /ATP III 2001	AACE 2003	IDF 2005
IGT, IFG, DM2 ili smanjena insulinska senzitivnost + 2 kriterijuma	Plazma insulin > 75 percentila + 2 kriterijuma	3 faktora od ponuđenih 5	IGT ili IFG + 2 od ponuđenih	OS-etnički specifičan + 2 sledeća
Odnos struk/kuk M \geq 0.9 Ž \geq 0.85 i/ili ITM \geq 30 kg/m ²	OS M \geq 94 cm Ž \geq 80 cm ITM \geq 30 kg/m ²	OS M \geq 102 cm Ž \geq 88 cm	ITM \geq 25 kg/m ²	OS - M \geq 94cm Ž \geq 80cm
TG \geq 1.7mmol/l i/ili HDL: M < 0.9 mmol/l Ž < 1.0mmol/l	TG \geq 2.0 mmol/l i/ ili HDL: M < 1.0 mmol/l Ž < 1.0 mmol/l	TG \geq 1.7mmol/l HDL: M \leq 1.0 mmol/l Ž \leq 1.3 mmol/l	TG \geq 1.7mmol/l HDL: M \leq 1.0 mmol/l Ž \leq 1.3 mmol/l	Tg \geq 1.7mmol/l HDL: M < 1.0mmol/l Ž < 1.3mmol/l

$\geq 140/90$ mmHg Terapija HTA	$\geq 140/90$ mmHg Terapija HTA	$\geq 130/85$ mmHg Terapija HTA	$\geq 130/85$ mmHg Terapija HTA	$\geq 130/85$ mmHg Terapija HTA
Mikroalbuminurija > 20mcg/min	Glc > 6.1mmol/l Terapija DM2	Glc > 6.1mmol/l Terapija DM2	Glc \geq 5.6 mmol/l Terapija DM2	Glc \geq 5.6mmol/l Terapija DM2

WHO: World Health Organisation; EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance; NCEP/ATP III: National Cholesterol Education Programme-Adult; AACE: American Association of Clinical Endocrinology; IDF International Diabetes Federation; IGT: impaired glucose tolerance (oštećena glikozna tolerancija), IFG: impaired fasting glucose (oštećena glikozna tolerancija našte); DM2: dijabetes mellitus tip2; OS: obim struka, TG: trigliceridi, HDL:; glc: glikemija; HTA hipertenzija.

Aktuelni koncept definicije MetS je revidiran 2009 god. od strane *International Diabetes Federation* (IDF) i *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI) i *American Heart Association* (AHA) i dijagnoza MetS se postavlja kada pacijent ima najmanje 3 od 5 kriterijuma navedenih u tabeli [112].

Tabela 3 Kriterijumi za dijagnozu MetS (AHA/NHLBI)

Abdominalna gojaznost Obim struka prema etničkoj pripadnosti	Muškarci ≥ 94 cm*; Žene ≥ 80 cm*
Trigliceridi	≥ 1.7 mmol/l ili th hipolimecima
Snižen HDL holesterol	Muškarci < 1.0mmol/l; Žene < 1.3mmol/l
Hipertenzija	$\geq 130/85$ mmHg ili Th HTA
Glikemija	≥ 5.6 mmol/l ili Th DM2
* Etnički specifične vrednosti za evropsku populaciju	

Abdominalna gojaznost, predstavlja najznačajniju komponentu MetS i povezana je nezavisno sa IR i ostalim komponentama sindroma. Aterogena dislipidemija se odnosi na kombinaciju povišenih vrednosti triglicerida(TG), sniženu vrednost HDL uz povišene

vrednosti apolipoproteina B (ApoB), partikula male gustine LDL i HDL, pri čemu su sve ove komponente nezavisno aterogene i prisutne kod ljudi sa T2DM i MS. Snižena vrednost HDL-holesterola i povišena vrednost TG se često sreću kod osoba sa IR, sa ili bez T2DM, i predstavljaju faktore rizika za razvoj koronarne bolesti [113].

1.4.2. Etiopatogeneza metaboličkog sindroma

U osnovi kompleksnih patofizioloških mehanizama nastanka MetS nalaze se insulinska rezistencija (IR) i poremećaj funkcije masnog tkiva na terenu genetski predodređenog fenotipa [114]. Insulinska rezistencija postoji kada normalna koncentracija insulina proizvodi manji od normalnog biološkog odgovora [115]. Takođe, IR se definiše kao oštećeni biološki odgovor na delovanje egzogenog ili endogenog insulina [116]. IR nije vezana samo za metabolizam glikoze, već se može primeniti na bilo koje biološko delovanje insulina uključujući i delovanje na metabolizam lipida i proteina, funkciju vaskularnog endotela i ekspresiju gena.

Insulin ostvaruje dejstvo putem insulinskog receptora koji pripada grupi tirozin kinaznih receptora. Insulinski receptor je transmembranski glikoprotein, heterotetramer sastavljen od dve ekstracelularne alfa i dve transmembranske beta subjedinice. Insulin se vezuje za alfa subjedinicu, čime dovodi do autofosforilacije tirozin specifične kinaze beta subjedinice i njene aktivacije. Delovanje insulina obuhvata širok spektar različitih efekata u brojnim ciljnim tkivima kao što su 1) anabolički efekti: stimulacija sinteze glikogena, lipogeneza, sinteza proteina; 2) antikatabolički efekti: inhibicija lipolize, proteolize i glikogenolize; 3) stimulacija transportnih procesa kroz ćelijsku membranu (glukoza, aminokiseline, joni); 4) stimulacija rasta u određenim ciljnim tkivima putem stimulacije sinteze RNK i DNK i pomenutih anaboličkih efekata. Pomenuti različiti efekti insulina ostvaruju se njegovim vezivanjem za isti tip insulinskog receptora, dok se raznovrsnost insulinskog dejstva može objasniti postreceptorskom aktivacijom multiplih signalnih puteva (slika 6).

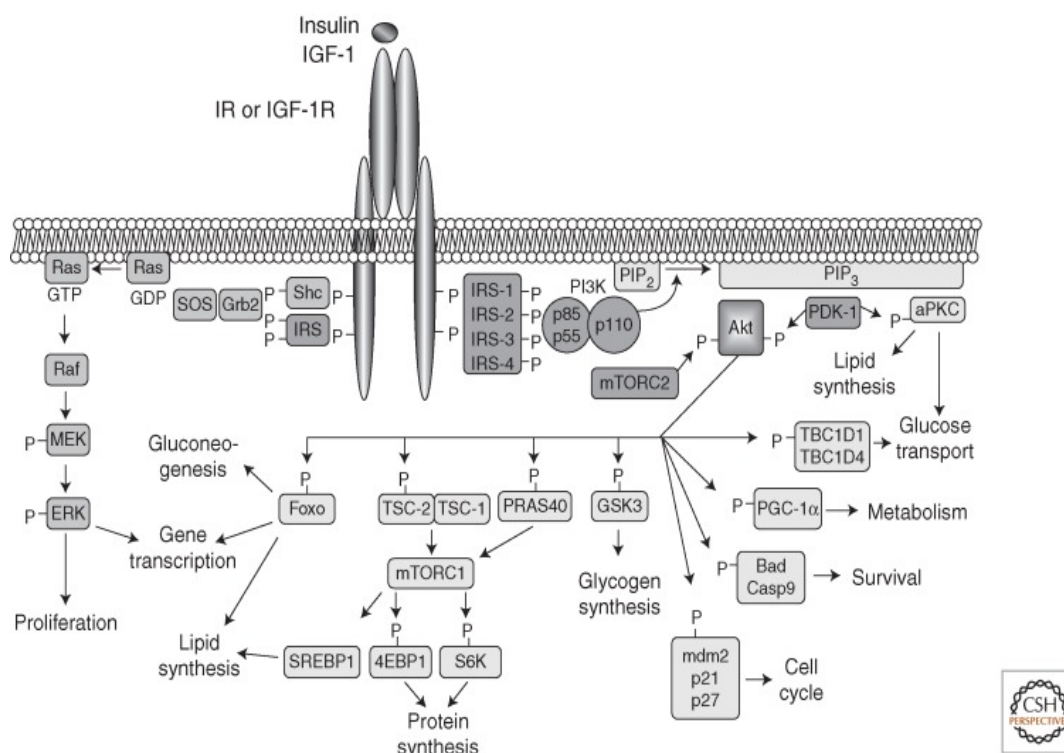
Jedan od načina daljeg prenosa signala nakon aktivacije beta podjedinice jeste fosforilacija nekoliko supstrata kao što su: 1) insulin receptor supstrat (IRS) proteini; 2) Shc; 3) Gab-1; 4) protoonkogen c-Cbl. Svaki od ovih supstrata dalje aktivira različit signalni put fosforilacijom tirozinskih ostataka nishodnih proteina. Insulin receptor supstrat

(IRS) sadrži aminoterminalni deo sa fosfotirozin vezujućom domenom koja učestvuje u vezivanju za aktiviranu tirozin kinazu insulinskog receptora [117]. Karboksi-terminalni kraj svakog IRS proteina sadrži set tirozin fosforilacionih mesta koja učestvuju u aktiviranju nishodnih signalnih proteina. Stimulacija insulinom dovodi do tirozin fosforilacije IRS proteina koji se specifično vezuju za Src-homolognu-2 domenu (SH-2) nekoliko nishodnih signalnih proteina: 1) fosfatidil inozitol 3 kinaza-PI 3 kinaza; 2) SH-2 protein-tirozin fosfataza, SHP 2; 3) adaptorni proteini (Grb-2, nck, crk). Dakle IRS proteini su ključno mesto u daljem grananju signalnih puteva insulina [118, 119]. Tirozin fosforilisani IRS protein se vezuje za PI-3 kinazu. PI-3 kinaza katalizuje stvaranje fosfatidil inozitol tri fosfata (PIP-3) koji je sekundarni glasnik i dovodi do aktivacije nekoliko PI-3 zavisnih serin/treonin kinaza: fosfatidil inozitol zavisna protein kinaza 1 (PDK 1), Akt/PKB, protein kinaza C (PKC) [120]. Pokazano je da stimulacija insulinom u skeletnim mišićima i adipocitima dovodi do translokacije Akt/PKB i atipičnih izoformi PKC iz citozola u ćelijsku membranu gde se aktiviraju pod uticajem PDK1. Ovim putem dolazi do translokacije GLUT4 i GLUT 1 i povećanog preuzimanja glukoze. PKC može da redukuje insulinski signal serin fosforilacijom tirozin kinaze insulinskog receptora ili serin fosforilacijom IRS 1 i na taj način dovodi do redukuje preuzimanja glukoze u perifernim tkivima [121]. Aktivacija Akt putem PDK-1 i mammalian target of rapamycin (mTORC2) omogućava fosforilaciju i aktivaciju brojnih nishodnih molekula. Akt fosforiliše tuberozne skleroze kompleks protein 2 (TSC-2), indukujući degradaciju tumor supresor kompleksa TSC-2 i TSC-1, što aktivira mTORC1 kompleks. Akt aktivacija mTORC1 se može ostvariti fosforilacijom proline-rich Akt substrate 40 KDa (PRAS40), koji je inače inhibitor mTORC1. mTORC1 kompleks zatim fosforiliše i inhibira 4E-binding protein 1 (4E-BP1), aktivira ribosomalni protein S6 kinaze S6K1 i S6K2 i SREBP1, čime reguliše čitavu gmrežu gena koji kontroliču metabolizam, sintezu proteina i ćelijski rast [122].

Pored regulacije glukoznog transporta i sinteze proteina pokazano je da Akt/PKB ima direktnu ulogu u regulaciji sinteze glikogena (fosforilacijom i inaktivacijom glikogen sintetaze kinaze 3, GSK3) i sintezi lipida (aktivirajući kinaznu kaskadu preko signalnog puta mTOR koji suprimuje transkripciju transkripcionih faktora Forkhead box O (Foxo1) [123]. U stanju IR supresija IRS1 i IRS2 dovodi do inhibicije PIP3 signalnog puta i nishodne aktivacije Akt i Foxo1, uzrokujući hiperinsulinemiju i metaboličku inflamaciju.

IRS-Akt-Foxo1 signalni put direktno povećava aktivnost azot oksid sintetaze (eNOS) i stvaranje NO u endotelu krvnih sudova dovodeći do vazodilatacije [124].

Atipične izoforme protein kinaze C (PKC) pored regulacije glikoznog transporta, imaju ulogu u sintezi proteina i genskoj ekspresiji (aktivacijom signalnog puta mitogen aktivirajuće protein kinaze, MAPK). Interakcijom adaptornog proteina Grb-2 (growth factor receptor binding protein-2) i IRS1/IRS2 dolazi do aktivacije Ras/Raf/MAPK signalnog puta koji dovodi do transkripcije gena utičući na rast i diferencijaciju. SHP-2 takođe ima ulogu u aktivaciji MAPK kinaze [125].



Slika 6 Insulinski receptor i postkinazni prenos signala. Preuzeto iz Boucher J et al. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014

Insulinska rezistencija u masnom tkivu ima veoma važnu ulogu u patofiziologiji MetS [126]. Sa povećanjem gojaznosti, posebno visceralnog masnog tkiva, povećava se

fluks SMK [127]. Normalno insulin stimuliše aktivnost adipocitne LPL, naročito postprandijalno. LPL oslobađa SMK iz lipoproteinskih triglicerida (VLDL, hilomikroni). Insulin stimuliše ulazak SMK u adipocite i njihovu reesterifikaciju u trigliceride. U gojaznosti u uslovima hiperinsulinemije, postoji rezistencija na antilipolitičko dejstvo insulina, odnosno rezistencija hormon senzitivne lipaze na inhibitorno dejstvo insulina što rezultuje povećanom hidrolizom triglicerida i oslobađanja SMK u cirkulaciju [126, 128], kao i rezistencija lipoproteinske lipaze na stimulatorno dejstvo insulina što dovodi do sniženog klirensa VLDL [129]. Ne samo da IR dovodi do porasta SMK, već i same SMK uzrokuju IR. Visceralni adipociti su osetljiviji u odnosu na subkutane na kateholaminima stimulisanu lipolizu što rezultuje povišenom koncentracijom SMK u portnom sistemu, povećanim preuzimanjem SMK u jetri gde uzrokuju IR [130]. Povišen nivo SMK i hiperinsulinemija u jetri stimulišu sintezu i deponovanje triglicerida, a višak se oslobađa kao VLDL. Hipertrigliceridemija je udružena sa smanjenjem koncentracije HDL. Stvara se manji i trigliceridima bogat HDL koji je supstrat za razgradnju od strane hepatične lipaze. Partikule koje nastaju, eliminišu se brzo preko bubrega uz sniženje koncentracije HDL. Aktivnošću hepatične lipaze povećan je transfer triglicerida iz trigliceridima bogatih masnih partikula u LDL, što dovodi do stvaranja proaterogenih malih gustih čestica. Dislipidemiju u insulinskoj rezistenciji i MetS karakteriše hipertrigliceridemija (VLDL), snižena koncentracija lipoproteina visoke gustine (HDL) i izmenjen sastav lipoproteina male gustine (LDL) [130].

U jetri SMK stimulišu glukoneogenezu zbog izostanka inhibitornog efekta insulina usled IR. Snižena je aktivnost glukokinaze (rezistencija na stimulatorno dejstvo insulina) u jetri i povećano je bazno otpuštanje glikoze. U skeletnim mišićima SMK inhibiraju insulinom posredovano preuzimanje glukoze i oksidaciju, smanjuju sintezu glikogena zbog snižene aktivnosti glikogen sintetaze (smanjena sposobnost insulina da aktivira ovaj enzim) i povećavaju nivo intramiocitnih lipida. U pankreasnim ostrvcima SMK smanjuju sekreciju insulina, utiču na mitohondrije beta ćelije dovodeći do oksidativnog stresa i oštećenja ćelije [131]. Kao posledica javlja se relativna hiperglikemija koja je kompenzovana hiperinsulinemijom. Sa nastankom disfunkcije pankreasne β ćelije dolazi do pojave postprandijalne, a potom i hiperglikemije naše.

Masno tkivo, kao endokrini organ sekretuje brojne adipokine kao što je adiponektin, retinol-binding protein (RBP4), resistin i plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) i pokazuje ekspresiju proinflammatoryh citokina kao što su IL-6, IL-18 i C-reaktivni protein (CRP) koje sekretuje u cirkulaciju i TNF-alfa koji ostvaruje efekte parakrinim putem. Citokini se sintetišu i u većim adipocitima i monocitima porekla makrofaga [132], moduliraju efekat insulina u jetri, masnom tkivu i skeletnim mišićima. IL-6 stimuliše hepatičnu sintezu CRP-a, serumskog amiloida A, fibrinogena i PAI-1, stimuliše hepatičnu produkciju glukoze, sintezu VLDL u jetri i povećava IR na nivou mišića. TNF alfa preko serin kinaza i tirozin fosfataza inhibira tirozin kinazu IR (inhibira autofosforilaciju), a preko serin fosforilacije inhibira IRS-1. Na taj način inhibira signalnu transdukciju insulina u adipocitima i skletnim mišićima. Pokazano je da visceralno masno tkivo u odnosu na subkutano ima različitu ekspresiju gena za adipokine i to smanjenu ekspresiju gena za adiponektin, a veću ekspresiju gena i sintezu PAI-1 [133, 134]. Značajno više sadrži makrofaga koji sinteišu IL-6 i TNF-, koji stimulišu sekreciju CRP-a [135]. Pokazano je da je plazma nivo adiponektina snižena kod osoba sa MetS odnosno u gojznosti i DM2, a takođe i kod pacijentata sa koronarnom bolesti. Nivo adiponektina u plazmi negativno korelira sa stepenom gojznosti a pozitivno sa insulinskom senzitivnišću. Adiponektin povećava insulinsku senzitivnost povećavajući oksidaciju masnih kiselina, što rezultuje smanjenjem nivoa cirkulišućih masnih kiselina i smanjenjem intracelularnog sadržaja triglicerida u mišićima i jetri. Ovaj protein takođe suprimuje ekspresiju adhezivnih molekula na vaskularni endotel i smanjuje produkciju citokina iz makrofaga inhibirajući zapaljenski proces tokom rane faze aterogeneze. Zbog toga se pretpostavlja da se aterogena uloga hiperinsulinemije u metaboličkom sindromu bar delom ostvaruje putem sniženja adiponektina [136].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti učestalost polimorfizma gena za hGR (N363S, BcII, ER22/23EK, A3669G) kod pacijenata sa unilateralnim i bilateralnim adrenalnim incidentalomima.
2. Ispitati povezanost polimorfizma gena za hGR sa aktivnošću HHA osovine, odnosno sa glukokortikoidnom senzitivnosti.
3. Odrediti učestalost subkliničkog hiperkorticizma kod pacijenata sa unilateralnim i bilateralnim incidentalomima.
4. Ispitati povezanost polimorfizma gena za GR, insulinske senzitivnosti i parametara metaboličkog sy.
5. Ispitati povezanost polimorfizma gena za GR i telesnog sastava kod pacijenata sa unilateralnim i bilateralnim incidentalomima
6. ispitati povezanost polimorfizma gena za GR i koštane gustine kod pacijenata sa unilateralnim i bilateralnim incidentalomima.
7. Ispitati ekspresiju GR (GR α i GR β) u tumorskom i peritumorskom tkivu adrenalnih incidentaloma i normalnom adrenalnom tkivu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Tip studije, mesto i vreme istraživanja

Vrsta studije: studija preseka

Ispitivanje je sprovedeno u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije u Beogradu, u periodu od 2010 do 2013 godine. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

3.2. Ispitanici

U studiju su bila uključena 152 uzastopna pacijenta sa adrenalnim incidentalomima (AI), od kojih je 105 (69.1%) imalo unilateralan adrenalin incidentalom (UAI), a 47 (30.9%) bilateralni incidentalom nadbubrega (BAI). Svi pacijenti su dali informisani pristanak. Pacijenti su hospitalno lečeni. Sve adrenalne mase dijagnostikovane su ultrazvukom, kompjuterizovanom tomografijom (CT) ili magnetnom rezonancom (MR). Mase uočene ultrazvukom su potvrđene putem CT ili MR. Kontrolna grupa je obuhvatila 100 zdravih dobrovoljaca (65 žena, starosti 28-76 godina). Kontrolni subjekti su uključeni u studiju nakon što je kod svakog od njih ultrazvučnim pregledom potvrđeno odsustvo adrenalnog tumora.

Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su: 1. slučajno otkriveni UAI i BAI; 2. CT/MRI morfološke karakteristike adenoma; 3. odsustvo simptoma i znakova klinički manifestne hiperfunkcije.

Kriterijumi za isključivanje bili su: 1. ACTH zavisni oblici hiperplazije nadbubrega (M. Kušing, kongenitalna adrenalna hiperplazija), primarni aldosteronizam, feohromocitom, adrenokortikalni karcinom i metastatska bolest; 2. bolesti koje bi uticale na koštani metabolizam.

3.3. Protokol ispitivanja

3.3.1. Antropometrijski parametri

Antropometrijski parametri su obuhvatili merenje telesne težine (TT), telesne visine (TV), obima struka (OS) i obima kuka (OK). Vrednosti $OS \geq 94$ cm za

muškarce i ≥ 80 cm za žene su smatrane abdominalnim tipom gojaznosti [137]. Indeks telesne mase (*Body mass index*, BMI) je računat prema sledećoj formuli [TT (kg)/TV² (m²)]. Pacijenti sa BMI > 25 kg/m² su okarakterisani kao prekomerno uhranjeni, a sa BMI ≥ 30 kg/m² kao gojazni [137, 138]. Telesni sastav je procenjivan pomoću “dual energy x-ray absorptiometry” (DEXA) metode, model Discovery W (S/N 82874). Takođe smo računali *fat mass index* FM index (FMI = FM (kg)/TV² (m²)) i *lean body mass index* LBM index (LBMI = LBM (kg)/TV² (m²)). Prednost upotrebe FMI i LBMI, u poređenju sa BMI, je što bolje procenjuje relativni uticaj starosti i individualnih varijacija u masnoj i mišićnoj masi [139]. Nedavne studije su procenile da je centralna distribucija masti, merena DEXA metodom koristan marker insulinske senzitivnosti kod zdravih osoba i da merenje totalne abdominalne masne mase (visceralno plus anteriorno i posteriorno subkutano masno tkivo) ima visoku prediktivnu moć za zdravlje. Pokazana je dobra korelacija između centralne abdominalne masti merene DEXA metodom i visceralne masti merene CT i MR.

3.3.2. Procena visine krvnog pritiska, metabolizma glukoze i lipidnog statusa

Osobe sa sistolnim krvnim pritiskom ≥ 130 mmHg i/ili dijastolnim krvnim pritiskom ≥ 85 mmHg ili upotrebom antihipertenzivne terapije su definisane kao hipertenzivni [138]. Tip 2 dijabetes melitusa (DM2) je definisan ako je osoba imala raniju dijagnozu ili je bila na anti-dijabetičnoj terapiji. Pacijenti bez dijabetesa podvrgnuti su oralnom testu opterećenja glukozom (OGTT) sa 75g glukoze, sa određivanjem glukoze i insulina u plazmi na početku i posle 30, 60, 90 i 120min. Kriterijumi koji se koriste za definisanje DM2 u skladu su sa preporukama *American Diabetes Association* [140]. Dislipidemija je definisana kad nivo triglicerida (TG) u serumu ≥ 1.7 mmol/l, ili nivo holesterola visoke gustine (HDL) < 1.0 mmol/l kod muškaraca i < 1.3 mmol/l kod žena [138, 141]. Insulin resistance was assessed by homeostasis model assessment (HOMA) index [(fasting glucose (mmol/l) x fasting insulin (mIU/l))/22.5] [142].

3.3.3. Hormonske analize

Hormonske analize su obuhvatile: plazma kortizol u 08.00h i 24.00h (RIA); 24-h urinarni slobodni kortizol (*urinary free cortisol*, UFC) (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), plazma koncentraciju adrenokortikotropnog hormona (ACTH) (RIA). Primenjen je prekoćni i dexametazon supresivni test sa 1mg dexametazona (DST-1mg) oralno u 23.00h i uzorkovanjem krvi za plazma kortizol narednog jutra u 08.00h. Takođe je sproveden dvodnevni nisko-dozni dexametazon supresioni test (low-dose dexamethasone suppression test LDDST): 0.5mg oralno, svakih 6h tokom dva dana, sa određivanjem serumskog kortizola 8h nakon poslednje doze deksametazona. Radi isključenja druge hormonske produkcije, određivano je: koncentracija kateholamina u 24h urinu (HPLC nakon solidne faze ekstrakcije, Waters, HLB 30mg, Milford, MA, USA; referentni opseg 40-245nmol/24h), plazma reninska aktivnost (PRA) (RIA) i plazma koncentracija aldosterona (PKA) (RIA), sa računanjem posturalnog PKA/PRA odnosa, plazma 17-OH-progesteron (RIA), ukupni testosteron (RIA), androstenedion (RIA) i dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) (RIA).

Dijagnoza SH je postavljena na osnovu nivoa DST-1mg kortizola > 50 nmol/l i LDDST kortizola > 50 nmol/l i pozitivnim bar jednim navedenim kriterijumom: 1) ACTH nivo < 10 ng/l; 2) ponoćni kortizol > 208 nmol/l; 3) UFC > 245 nmol/24h, koji odgovara gornjoj granici normale naše metode. Kriterijumi za supresiju kortizola: DST-1mg kortizol ≤ 50 nmol/l dijagnostički kriterijum za isključenje autonomne sekrecije kortizola; DST-1mg kortizol između 50.1 i 137.9 nmol/l kriterijum za „moguću autonomnu sekreciju kortizola“; i DST-1mg kortizol ≥ 138 nmol/l kriterijum za „autonomnu sekreciju kortizola“ [143].

3.3.4. Biohemijske analize

Plazma glukoza je određivana metodom glukozo - oksidaze, (Beckman Glucose Auto-Analyzer, Fullerton, CA, USA). Serumski holesterol i trigliceridi su mereni metodom hromatografije. Koncentracija insulina je merena metodom radioimunoeseja (RIA) (IINEP, Zemun, Srbija); lower limit of sensitivity was 3.0 mU/L, whereas intra and inter-assay coefficients of variations (CVs) were $< 10.0\%$; koncentracija plazma kortizola RIA metodom (CORT-CT2; CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette Cedex, France) Minimum detectible concentration was 4.6 nmol/L; intra- and inter-assay CVs were

5.4% and 7.3%, respectively, UFC HPLC metodom, ACTH imunoradiometrijskim esejem (CIS Bio International) sensitivity of the method was 5pg/mL, with intra- and inter-assay CVs ranging from 3.1% to 8.9%. betacross laps, osteocalcin (ECLMA), PTH (RIA), vitamin D (HPLC).

3.3.5. Procena koštane gustine

Koštana gustina *Bone Mineral Density* (BMD) je merena metodom dual-energy X-ray absorptiometry (DXA, model Hologic Discovery W, MA, USA (S/N 82874) na nivou lumbalnog dela kičme i kuka. Z - i T – skorovi su računati prema referentnim krivama proizvođača. Normalna BMD je definisana kao T-score >-1.0 kod post-menopauzalnih žena i muškaraca preko 50 god starosti; Z score > -2 kod premenopauzalnih žena ili žena mlađih od 50 god. Osteopenia je definisana kao T score između -1.0 i -2.5 kod post-menopauzalnih žena i muškaraca preko 50 god starosti; Z score $< -$ kod premenopauzalnih žena ili žena i muškaraca mlađih od 50 god. Kod pacijenata starosti iznad 50 god, T-score < -2.5 je pokazatelj osteoporoze [144, 145]. Kriterijumi za koštanu gustinu celog skeleta: osteoporoza je definisana ako T score <2.35 , osteopenija T score između -2.35 i -0.9 , normalan BMD T score > -1 [146]

3.3.6 Izolovanje DNK iz uzoraka

Za izolovanje DNK iz leukocita periferne krvi korišćen je komercijalni kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemačka). Postupak je izveden prema uputstvu proizvođača. Izolovanje DNK iz tkiva izvedeno je primenom standardne fenol-hloroform metode uz korišćenje proteinaze K. Koncentracije dobijenih DNK određene su spektrofotometrijskom metodom na aparatu Gene Quant Pro (GE healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija) [147].

PCR metoda: da bi utvrdili moguće prisustvo polimorfizama *ER22/23EK*, *BclII*, *N363S* i *A3669G* u genu za hGR, urađene su PCR amplifikacije sa specifično dizajniranim PCR prajmerima (eng. *primers*), u aparatu Thermocycler T3 Combi (Biometra, Goettingen, Nemačka). Svi prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer 3 (v. 0.4.0.) [147].

RFLP metoda: analiza podrazumeva fragmentisanje uzorka DNK pomoću odgovarajućeg restrikcionog enzima, koji prepoznaje i seče DNK na mestima gde je prisutna specifična

kratka sekvenca, a sam proces se naziva restrikciona digestija. Dobijeni DNK fragmenti se, u zavisnosti od njihove dužine, razdvajaju tokom procesa elektroforeze na agaroznom gelu. U ovom istraživanju RFLP metodom smo želeli da utvrdimo da li su ispitanici eventualni nosioci polimorfnih alela u *ER22/23EK*, i *BclII* polimorfizmima u GR genu

Direktno sekvenciranje DNK: da bi se potvrdilo postojanje *ER22/23EK*, *BclII*, *N363S* i *A3669G* polimorfizama u genu za hGR, PCR produkti su direktno sekvencirani u oba pravca u aparatu ABI PRISM Genetic Analyzer 3130 (Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, SAD). PCR produkti su prečišćeni pomoću kita PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka). Nakon toga je po 25 ng prečišćenih PCR produkata, korišćenjem ABI PRISM Big Dye Terminator Kit v1.1 (Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, SAD) reamplifikovano PCR metodom, prema uputstvu proizvođača. Dobijeni PCR produkti su prečišćeni korišćenjem kita Dye Ex 2.0 Spin Columns (Qiagen, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga su prečišćeni PCR produkti, prema protokolu predviđenom za korišćenje kit za sekvenciranje, podvrgnuti kapilarnoj elektroforezi u genetičkom analizatoru ABI PRISM Genetic Analyzer 3130, a zatim analizirani primenom programa AB DNA Sequencing Analysis Software v5.2. Dobijene sekvence upoređene su sa odgovarajućim genomskim sekvencama introna 2, egzona 2 i 9 β hGR [147].

3.3.7 Analiza adrenalnog tkiva

Uzorak adrenalnog tkiva je dobijen od ispitanika kod kojih je postojala indikacija za operativnim lečenjem tumora nadbubrega u odnosu na MRI/CT morfološke karakteristike i na osnovu veličine tumora. Tumorsko tkivo je analizirano od strane patohistologa, sa separacijom tumorskog i peritumorskog tkiva. Analizirani su patohistološki uzorci dobijeni sečenjem 15 parafinskih kalupa adrenokortikalnih adenoma, kao i 11 parafinskih kalupa odgovarajućeg peritumorskog tkiva i 11 sveže zamrznutih, ili parafinskih uzoraka zdravog humanog adrenalnog tkiva. Ekspresija GR na nivou mRNK i proteinskom nivou analizirana je putem Western blota.

3.3.8. Western Blot analiza

Lizati tumorskog, peritumorskog i normalnog adrenokortikalnog tkiva su pripremljeni homogenizacijom sveže smrznutog uzorka tkiva u puferu koji sadrži 0.1%

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) i proteazni inhibitor (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Uzorci su denaturisani (70°C za 10 min) pre elektroforeze na 4–12% Bis-Tris gelu (Invitrogen; Life Technologies), a potom je učinjen transfer razdvojenih polipeptida sa gela na nitrocelulozne membrane Hybond ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Potom je učinjeno blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela za membranu u TBST koji sadrži 5% rastvor obranog mleka u prisustvu deterdženta 0.1% TWIN 20 u trajanju od 1 sata na sobnoj temperaturi. Inkubacija blotova primarnim antitelom za GR izvršena je u rastvoru za blokiranje nespecifičnog vezivanja, preko noći, na sobnoj temperaturi (clone 4H2, NCL-GCR; Novocastra; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle upon Tyne, UK). Nakon ispiranja blotovi su testirani anti-mišjim sekundarnim antitelima. Inkubacija je vršena 1 sat na sobnoj temperaturi.

Za detekciju proteina upotrebljeni su *Western blotting* reagensi Amersham ECL Plus (GE Healthcare). Količina proteina je normalizovana AC-15 antitelom za β -actin (Sigma-Aldrich). Proteinski lizati za pozitivnu kontrolu ekspresije GR su dobijeni iz MCF-7 ćelija i humanih limfocita. Za određivanje koncentracije Hsp70 i Hsp90 u tkivnom lizatu, proteini su razdvojeni elektroforezom na 4–12% natrijum dodecyl sulfat–polyacrylamide gelu (SDS-PAGE). Potom su transportovani na nitrocelulozne membrane, koje su inkubirane sa SPA-820 (Stressgen) i CA (SC-13119) (Santa Cruz Biotechnology) primarnim antitelima. Nakon vizualizacije imunoreaktivnih traka, membrane su stripovane sa 0.2 mol/L NaOH i blokirane sa antitelom AC-15 za β -actin. Detekcija imunoreaktivnih traka je učinjena reakcijom hemifluorescencije (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Amersham, UK), signali su skenirani STORM skenerom, a trake su kvantifikovane korišćenjem softvera [148].

3.4. Statistička analiza

Podaci su analizirani korišćenjem softverskog paketa SPSS *for Windows* verzije 17.0. Rezultati za neprekidne varijable su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, a za binarne varijable kao apsolutne vrednosti i proporcije. $P < 0.05$ je smatran statistički značajnim. Primenjene analitičke statističke metode za neprekidne promenljive su *Studentov t-test* ili *Mann–Whitney U-test*, a za binarne promenljive *Pearson-ov χ^2 -test* ili *Fisher'ov test*. Samo su komparacije ekspresije GR između različitih uzoraka tkiva

(adrenokortikalni adenomi, peritumorsko i zdravo tkivo nadbubrežnih žlezda) dobijeni *Kruskal - Wallis* testom. Povezanost između obeležja je testirana korelacionim analizama korišćenjem Pearson-ovog koeficijenta linearne korelacije (kontinuirana obeležja a normalnom raspodelom, logaritamski transformisana HOMA, trigliceridi, insulinemije, glikemije), odnosno Spearman-ovog koeficijent ranga korelacije (kontinuirana obeležja koja nemaju normalnu raspodelu ili kategorijska obeležja). Linearna i binarna logistička regresija je korišćena za modelovanje odnosa zavisnih i nezavisnih promenljivih. Za proveru odstupanja od Hardy-Weinberg principa primenjen je χ^2 test korišćenjem dobijenih učestalosti genotipova tokom istraživanja i očekivanih učestalosti genotipova dobijenih primenom Hardy-Weinberg principa. Procene relativnog rizika za nastanak adrenokortikalnog tumora, kao i ORs (*Odd Ratios*) izračunate su sa 95% CIs (*Confidence Intervals*), te na osnovu toga izražene u opsegu gornjih i donjih granica. Za sve polimorfizme, osim za BclI, OR su izračunati iz odnosa nosilaca manjeg alela kod pacijenata i kontrolnih subjekata. Tamo gde je učestalost bila 0, dodata je minimalna pozitivna vrednost (1) u sve četiri ćelije 2 x 2 tabele, te izračunat OR i 95% CI nakon ovih operacija. Za procenu insulinske rezistencije korišćen je HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance*) model [149].

4.0. REZULTATI

4.1. Karakteristike pacijenata sa unilateralnim i bilateralnim incidentalomima

4.1.1. Demografske, kliničke i metaboličke karakteristike pacijenata sa UAI i BAI

U istraživanje je bilo uključeno 152 pacijenta, od kojih 105 (69.1%) sa unilateralnim adrenalnim incidentalomima (UAI) i 47 (30.9%) sa bilateralnim adrenalnim incidentalomima (BAI). Grupe se nisu međusobno razlikovale po starosti, polu, BM i OS. Većina pacijenata je imala abdominalni tip gojaznosti. Između pacijenata sa UAI i BAI nije bilo razlike u prevalenciji tipa 2 dijabetesa (DM2) i hipertenzije, trajanju hipertenzije, visini sistolnog dijastolnog krvnog pritiska. Takođe nije bilo razlike u nivou lipida i HOMA-IR. Žene su bile zastupljenije u grupi sa BAI u odnosu na UAI (80.9% vs 64.8%, $p=0.046$). Iako su pacijenti sa BAI imali veću dimenziju većeg adrenalnog tumora u odnosu na unilateralni adrenalni tumor, nije bilo statistički značajne razlike (30.0 ± 12.2 vs 32.3 ± 9.9 mm, $p=0.254$). Demografske, kliničke i metaboličke karakteristike su prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2. Demografske, kliničke i metaboličke karakteristike pacijenata sa UAI i BAI

Karakteristike	Unilateralni Mean \pm SD	Bilateralni Mean \pm SD	<i>p</i>
Starost, god	58.0 \pm 11.09	59.17 \pm 10.17	0.539
Pol, n (%)			
Muškarci	37 (35.2)	9 (19.1)	0.046
Žene	68 (64.8)	38 (80.9)	
Veličina tumora, mm (opseg)	30.0 \pm 12.2 (10-65)	32.3 \pm 9.9 (14-58)	0.254
ITM, kg/m ²	28.3 \pm 5.5	28.2 \pm 5.1	0.951
ITM kategorija, %			
18.5 - 25.0	26.7	23.4	0.516
25.1 - 29.9	40.0	48.9	
\geq 30.0	33.3	27.6	
Obim struka, cm	96.2 \pm 12.7	96.4 \pm 15.2	0.961
\geq 94 cm (m), \geq 80 cm (f), %	81.1	81.8	0.914
Struk/kuk odnos	0.91	0.90	0.558
Hipertenzija, %	77.1	66	0.148
Trajanje hipertenzije, god	6.8 \pm 8.0	6.9 \pm 8.8	0.954
SKP (mmHg)	140 \pm 24	140 \pm 22	0.952
DKP (mmHg)	86 \pm 13	87 \pm 11	0.554
Glc, 0 min OGTT	4.8 \pm 0.7	4.6 \pm 0.7	0.074

Glc, 120 min OGTT	6.5±2.5	6.0±2.2	0.272
Ins, 0 min OGTT	15.7±8.3	16.1±8.3	0.777
Ins, 120 min OGTT	64.3±49.3	59.6±36.3	0.606
DM2 ukupan, n %	26 (17.1)	9 (5.9)	0.447
Holesterol, mmol/L	5.79 ± 1.15	6.0 ± 0.96	0.270
HDL holesterol, mmol/L	1.27 ± 0.33	1.38 ± 0.36	0.060
Muškarci < 1.03 mmol/L, %			
Žene < 1.29 mmol/L (f), %	45.2	39.1	0.490
LDL holesterol, mmol/L	3.7 ± 1.0	3.8 ± 0.8	0.811
Trigliceridi, mmol/L	1.7± 0.7	1.8 ± 0.9	0.398
>1.7 mmol/L, %	42.3	46.8	0.606
Statini, %	16 (10.5)	11 (7.2)	0.223
HOMA IR	3.40 ± 2.08	3.27 ± 1.63	0.739

ITM indeks telesne mase; SKP sistolni krvni pritisak; DKP dijastolni krvni pritisak, Glc glikemija; ins insulin; DM2 dijabetes mellitus tip2, HDL high density lipoprotein, LDL low density lipoprotein, HOMA IR homeostasis assessment model index

4.1.2. Hormonske karakteristike pacijenata sa UAI i BAI

Pacijenti sa BAI imaju niže vrednosti ACTH i veće vrednosti kortizola nakon DST-1mg i LDDST. Takođe, imaju više vrednosti urinarnog slobodnog kortizola (UFC), ali nije dostignuta statistička značajnost. Nije bilo razlike u koncentraciji jutarnjeg i ponoćnog kortizola (Tabela 3).

U celoj grupi pacijenata nađena je negativna korelacija ACTH sa DST-1mg kortizolom ($\rho=-0.309$, $p<0.001$) kao i negativna korelacija sa LDDST kortizolom ($\rho=-0.420$, $p<0.001$). Uočena je pozitivna korelacija ponoćnog kortizola sa DST-1mg kortizolom ($\rho=0.470$, $p<0.001$) i LDDST kortizolom ($\rho=0.354$, $p<0.001$).

Tabela 3. Hormonske karakteristike pacijenata sa UAI i BAI

ACTH-adrenokortikotropni hormon; UFC *urinary free cortisol*; SH subklinički hiperkortizam

Characteristike	Unilateralni	Bilateralni	<i>p</i>
ACTH, ng/L	23.95 ± 19,0	17.07 ± 10.87	0.023
Kortizol 08h, nmol/L	474.77 ± 326.19	486.95 ± 133.19	0.806
Kortizol 24h, nmol/L	123.22 ± 81.16	127.65 ± 73.96	0.758
UFC, nmol/24h	120.28 ± 20,63	145.45 ± 26.39	0.450
Kortizol DST-1mg, nmol/L	59.23 ± 55.00	91.94 ± 82.54	0.005
Kortizol LDDST, nmol/L	54.51 ± 5.33	87.8 ± 11.92	0.040
Pacijenti sa SH-DST, n (%)	17/104 (16.3)	14/47 (29.8)	0.058
Pacijenti sa SH-LDDST, n (%)	16/105 (15.2)	14/45 (31.1)	0.026
ACTH < 10 ng/L, n (%)	19/104 (18.3)	8/46 (17.4)	0.897
kortizol 24h > 208nmol/L, n (%)	10/102 (9.8)	7/43 (16.3)	0.268
UFC >245nmol/24h, n (%)	2/35 (5.7)	4/20 (16.7)	0.172

Rezultati pokazuju visoku učestalost neadekvatne supresije kortizola nakon DST-1mg, a još značajnije nakon LDDST, sa značajno većom učestalošću izostanka supresije kod pacijenata sa BAI, nezavisno od primenjenih kriterijuma supresije (kortizol<50nmol/l; 50-137.9nmol/l; >138nmol/l) (Tabela 4).

Tabela 4. Serumski kortizol nakon dexametazon supresivnih testova

Kortizol nmol/L	DST-1mg, n=151			LDDST, n=150		
	UAI n (%)	BAI n (%)	<i>p</i>	UAI n (%)	BAI n (%)	<i>p</i>
≤ 50	66 (63.5)	18 (38.3)	0.014	69 (65.7)	18 (40.0)	0.013
50.1 – 137.9	30 (28.8)	24 (51.1)		27 (25.7)	19 (42.2)	
≥ 138	8 (7.7)	5 (10.6)		9 (8.6)	8 (17.8)	

UAI unilateralni adrenalni incidentalomi; BAI- bilateralni adrenalni incidentalomi; DST-1mg- dexametazon supresivni test sa 1mg; LDDST- niskodozni DST

U cilju poboljšanja specifičnosti evaluacije prisustva subkličkog hiperkorticismu (SH), glavnom kriterijumu (kortizol nakon DST 1mg ili LDDST) dodat je bar jedan abnormalan hormonski rezultat (ACTH, ponoćni kortizol i UFC). Prevalencija SH na osnovu DST-1mg (SH-DST) u ukupnom broju pacijenata iznosila je 20.5%, a na osnovu LDDST (SH-LDDST) iznosila je 20%. Uočen je trend veće prevalencije SH kod pacijenata sa BAI na osnovu SH-DST (29.8% vs 16.3, p=0.058) i statistički značajna razlika u prevalenciji SH-LDDST između pacijenata sa BAI i UAI (31.1% vs 15.2%, p=0.026) (Tabela 3).

4.1.3. Korelacija veličine adrenalnog incidentaloma i parametara HHA osovine

Kada se posmatra veličina većeg bilateralnog adenoma i veličina unilateralnog adenoma, nađena je značajna negativna korelacija sa vrednostima ACTH, a značajna pozitivna sa ponoćnim kortizolom >208nmol/l, sa UFC >245nmol/l, sa DST-1mg kortizolom, LDDST kortizolom i SH-DST i SH-LDDST. Nije postojala korelacija veličine sa jutarnjim, ponoćnim kortizolom i UFC (Tabela 5).

Tabela 5. Korelacija veličine adrenalnog incidentaloma i parametara HHA osovine

Veći BAI i UAI	ACTH	ACTH <10ng/l	Kortizol 24h>208	UFC >245	DST 1mg	LDDST	SH LDDST	SH DST
		-0.213	0.153	0.274	0.264	0.206	0.237	0.282
	0.009	0.062	0.001	0.044	0.011	0.003	<0.001	0.001

Multivarijantna logistička regresija je pokazala da je veličina tumora nadbubrega nezavisan prediktor nastanka SH-LDDST (OR=1.055, 95% CI 1.017-1.094, $p=0.004$), nakon kontrole za starost, OS, BMI, prisustvo UAI ili BAI. Kada se posmatraju pacijenti samo sa UAI postoji značajna pozitivna korelacija veličine nadbubrega i SH-LDDST ($\rho=0.197$, $p=0.044$), trend značajne korelacije sa SH DST ($\rho=0.183$, $p=0.063$). Kada se radi o pacijentima sa BAI veličina većeg adenoma je pokazuje značajnu korelaciju sa SH-DST ($\rho=0.419$, $p=0.003$) i SH-LDDST ($\rho=0.392$, $p=0.008$).

Kod pacijenata sa UAI i BAI nije nađena značajna korelacija veličine većeg bilateralnog i unilateralnog adenoma sa parametrima MetS, HOMAIR, OS, HTA i DM2 (Tabela 6).

Tabela 6. Korelacija veličine AI i parametara MetS

	MetS	HOMA IR	OS	HTA	DM2
Veći BAI i	0.066	0.067	0.042	0.112	0.130
UAI	0.421	0.483	0.625	0.169	0.111

4.1.4. Korelacija antropometrijskih, metaboličkih parametara, insulinske rezistencije i komorbiditeta u celoj grupi

Stariji pacijenti imaju višu glikemiju u 120min OGTT, češće oboljevaju od DM2 i hipertenzije, imaju viši sistolni pritisak i češće upotrebljavaju hipolipemike. Gojazniji pacijenti imaju češće MetS, hipertenziju, viši i sistolni i dijastolni pritisak. Postoji pozitivna povezanost BMI i glikemije našte i TG. Pacijenti sa većim OS, odnosno abdominalnom gojaznosti, imaju veću glikemiju našte, češće DM2, niži HDL, više TG (dislipidemiju), izraženiju insulinsku rezistenciju i MetS, češće hipertenziju i viši sistolni i dijastolni krvni pritisak (Tabela 7).

Tabela 7. Korelacija antropometrijskih parametara i parametara MetS u celoj grupi

	Glc 0min	Glc 120min	DM2	HOL	HDL	LDL	TG	statini
Starost	0.163	0.262	0.212	0.046	0.093	0.032	-0.009	0.181
	0.070	0.005	0.009	0.577	0.256	0.699	0.914	0.026
BMI	0.245	0.067	0.133	-0.028	-0.136	-0.071	0.261	0.011
	0.006	0.483	0.102	0.729	0.095	0.387	0.001	0.895
OS	0.356	0.167	0.263	-0.118	-0.369	-0.125	0.323	0.011
	<0.001	0.088	0.002	0.168	<0.001	0.144	<0.001	0.901

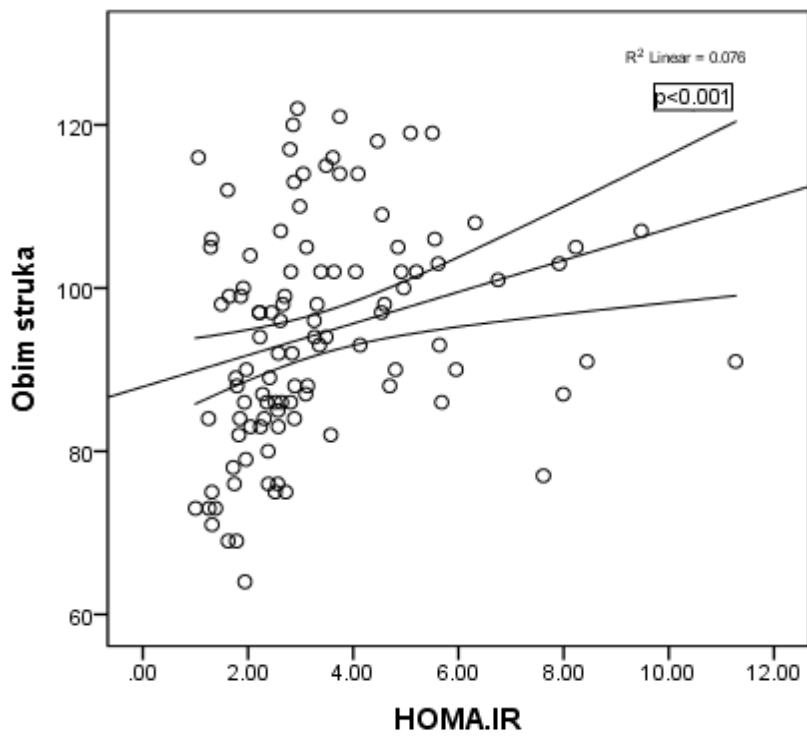
Nastavak tabele 7. Korelacija antropometrijskih parametara i parametara MetS u celoj grupi

	MetS	HOMAIR	HTA	Sist TA	Dijast TA
Starost	0.115	0.092	0.305	0.211	0.060
	0.159	0.334	<0.001	0.009	0.463
BMI	0.334	0.306	0.231	0.233	0.351
	<0.001	0.001	0.004	0.004	<0.001
OS	0.463	0.428	0.317	0.334	0.395
	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Pojava hipertenzije i visina krvnog pritiska su u negativnoj korelaciji sa HDL, a pozitivnom korelacijom sa glikemijom u 0min i 120 min OGTT, sa TG, HOMA IR i MetS. (Tabela 8).

Tabela 8 Korelacija metaboličkih parametara i hipertenzije

	Glc 0min	Glc 120	HDL	TGL	statini	HOMAI	MetS
HTA	0.320	0.209	-0.237	0.252	0.160	0.249	0.580
	<0.001	0.026	0.003	0.002	0.048	0.008	<0.001
sistolTA	0.374	0.273	-0.184	0.209	0.021	0.118	0.457
	<0.001	0.003	0.023	0.010	0.795	0.215	<0.001
dijastTA	0.401	0.164	-0.221	0.318	0.019	0.255	0.535
	<0.001	0.083	0.006	<0.001	0.816	0.006	<0.001



Grafiikon 1. Korelacija OS i HOMAIR

4.1.5. Korelacija parametara HHA osovine, parametara MetS i HOMAIR u celoj grupi

Uočena je pozitivna korelacija glikemije našte i DST-1mg kortizola, glc našte i LDDST kortizola > 50 nmol/l, glikemije u 120 min OGTT i DST-1mg kortizola > 50 nmol/l, HOMA IR i UFC > 245nmol/l, negativna korelacija HDL-MetS i DST-1mg kortizola. Takođe je postojala pozitivna korelacija ITM kategorija i OS MetS i baznog kortizola. Nije nađena značajna korelacija drugih parametara HHA osovine i parametara MetS i HOMAIR (Tabela 9).

Tabela 9. Korelacija parametara HHA osovine, parametara MetS i HOMAIR

	Kortizol 8h	Kortizol kat †	UFC Kat †	DST	DST Kat ‡	LDDS T	LDDST Kat•	SH LDDST	SH DST
ITM	0.167	0.067	0.136	0.016	0.014	0.044	0.009	0.135	0.084
kategorija	0.039	0.424	0.306	0.841	0.863	0.594	0.912	0.100	0.303
OS *	0.225	0.094	0.026	0.126	0.079	0.140	0.105	0.124	0.079
	0.008	0.282	0.854	0.140	0.355	0.100	0.220	0.149	0.354
HTA	0.086	0.080	0.170	0.002	0.039	0.054	0.006	0.000	0.029
	0.291	0.337	0.198	0.983	0.639	0.505	0.941	1.000	0.721
OGTT	0.083	0.051	0.089	0.179	0.117	0.172	0.220	0.134	0.028
glc 0	0.362	0.585	0.551	0.048	0.199	0.057	0.015	0.141	0.763
OGTT	0.062	0.127	0.258	0.144	0.185	0.090	0.024	0.043	0.018
glc 120	0.516	0.192	0.095	0.129	0.051	0.343	0.802	0.656	0.853
OGTT	0.012	0.016	0.258	0.041	0.046	0.064	0.024	0.144	0.138
ins 0	0.899	0.873	0.090	0.668	0.628	0.501	0.804	0.131	0.145

OGTT	0.102	0.105	0.206	0.110	0.152	0.098	0.037	0.054	0.112
ins120	0.287	0.287	0.185	0.254	0.114	0.306	0.706	0.580	0.245
DM 2	0.086	0.015	0.068	0.029	0.031	0.084	0.137	0.000	0.085
	0.294	0.854	0.611	0.727	0.703	0.302	0.094	1.000	0.300
HDL	-0.083	0.019	-0.032	0.156	-0.142	-0.167	0.078	0.053	-0.038
Snižen*	0.313	0.819	0.810	0.058	0.085	0.042	0.348	0.523	0.648
TG	0.036	0.002	-0.149	0.124	-0.105	0.040	0.069	0.003	0.114
Povišen*	0.665	0.978	0.265	0.131	0.200	0.630	0.403	0.972	0.165
MetS	0.119	0.026	0.073	0.077	0.047	0.021	0.013	-0.020	0.029
	0.144	0.760	0.584	.346	0.565	0.795	0.878	0.806	0.728
HOMAIR	0.028	0.038	0.318	0.019	0.012	0.102	0.078	0.158	0.136
	0.769	0.696	0.036	0.845	0.898	0.282	0.416	0.098	0.152

* kriterijumi MetS: OS muškarci ≥ 94 cm; žene ≥ 80 cm; HDL-muškarci < 1.0 mmol/l; žene < 1.3 mmol/l; TG ≥ 1.7 mmol/l; † kategorija kortizol 24h >208 nmol/l; ‡ kategorija DST1mg kortizol >50 mol/l; □ UFC kategorija >245 nmol/l; •kategorija LDDST kortizol >50 mol/l

4.1.6. Korelacija telesnog sastava i parametara MetS u celoj grupi

Kada se posmatra telesni sastav, pokazana je negativna korelacija starosti i mase masnog tkiva na nogama, bez uticaja na mišićnu masu. OS značajno pozitivno korelira sa masnom masom na rukama, sa abdominalnom masnom masom i procentom abdominalnog masnog tkiva, ukupnom masnom masom i indeksom masne mase (*Fat mass indeksom*, FMI) (Tabela 10). OS značajno pozitivno korelira sa svim parametrima mršave mase (*Lean Body mass*, LBM) odnosno sa mišićnom masom (*Lean mass*) ruku i nogu pojedinačno i u zbiru (apendikularna mišićna masa, AMM), procentom AMM, ukupnom mišićnom masom (*Total Lean Mass*) i LBM indeksom (LBMI) (Tabela 10).

Veća masa abdominalnog masnog tkiva vezana je za pojavu hipertenzije i pozitivno korelira sa visinom sistolnog i značajnije dijastolnog krvnog pritiska, sa glikemijom i insulinemijom našte, hipertrigliceridemijom, odnosno MetS i insulinskom rezistencijom.

FMI značajno negativno korelira sa mišićnom masom ekstremiteta pojedinačno i u zbiru, značajno negativno korelira sa procentom ukupne mišićne mase. Značajno pozitivno korelira sa LBMI. Porast FMI korelira pozitivno sa visinom dijastolnog pritiska,

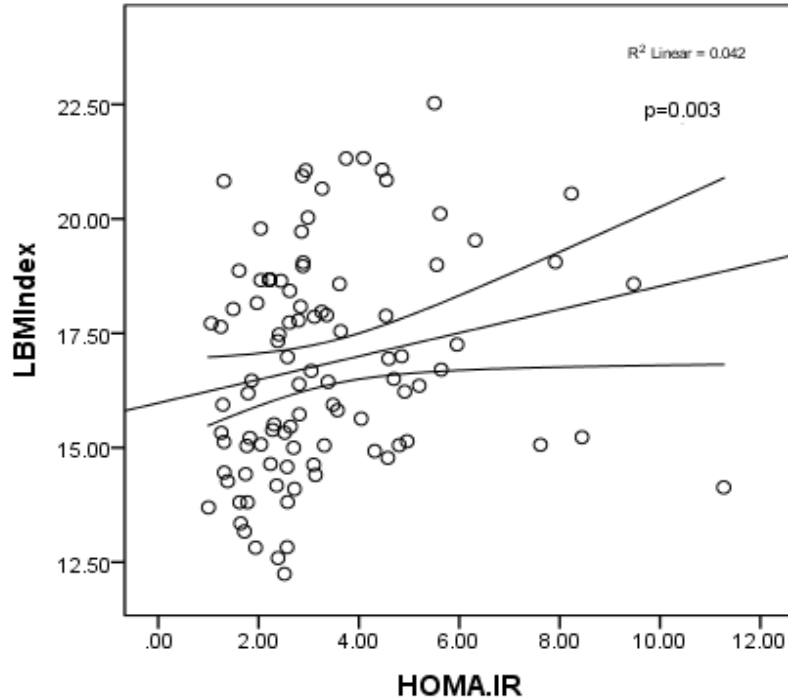
insulinemijom u 0 min OGTTa, trigliceridima i HOMA IR. Porast FAI vezan je za nastanak MetS (Tabela 10.).

LBMI značajno pozitivno korelira sa OS, nastankom hipertenzije, visinom sistolnog i dijastolnog KP, glikemijom u 0min i 120 min OGTTa, nastankom DM2, trigliceridima, negativno da HDL, a pozitivno sa HOMAIR (Grafikon 2) i nastankom MetS (Tabela10).

Tabela 10. Korelacija telesnog sastava i parametara MetS u celoj grupi

	Lean L. Arm	Lean R.Arm	Lean Trunk	Lean. L.Leg	Lean R.Leg	lean total	AMM	LBMI
starost	-0.011	0.044	0.079	-0.083	-0.072	0.028	-0.058	0.078
	0.900	0.622	0.377	0.351	0.419	0.756	0.514	0.380
OS	0.518	0.554	0.731	0.554	0.530	0.694	0.525	0.741
	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
HTA	-0.184	-0.255	-0.283	-0.128	-0.113	-0.250	-0.119	-0.325
	0.038	0.004	0.001	0.149	0.205	0.004	0.182	<0.001
Sistolni TA	0.188	0.244	0.268	0.139	0.104	0.233	0.114	0.333
	0.034	0.005	0.002	0.118	0.245	0.008	0.199	<0.001
Dijastolni TA	0.203	0.250	0.353	0.133	0.108	0.300	0.119	0.387
	0.021	0.004	<0.001	0.135	0.223	0.001	0.182	<0.001
Glc 0 min	0.228	0.268	0.257	0.215	0.239	0.264	0.232	0.322
	0.019	0.006	0.008	0.027	0.014	0.006	0.017	0.001
Ins 0 min	0.186	0.240	0.219	0.205	0.172	0.234	0.188	0.189
	0.067	0.017	0.031	0.043	0.091	0.020	0.064	0.062
Glc 120min	0.209	0.173	0.121	0.105	0.083	0.137	0.115	0.236
	0.041	0.092	0.238	0.310	0.419	0.182	0.265	0.020
Ins 120min	0.201	0.228	0.175	0.117	0.131	0.180	0.158	0.239
	0.051	0.026	0.089	0.260	0.207	0.081	0.125	0.020

DM2	-0.273 0.002	-0.288 0.001	-0.309 <0.001	-0.283 0.001	-0.241 0.006	-0.293 0.001	-0.271 0.002	-0.308 <0.001
holesterol	-0.292 0.001	-0.233 0.008	-0.206 0.020	-0.247 0.005	-0.253 0.004	-0.262 0.003	-0.243 0.006	-0.136 0.125
HDL	-0.315 <0.001	-0.332 <0.001	-0.321 <0.001	-0.308 <0.001	-0.275 0.002	-0.326 <0.001	-0.276 0.002	-0.271 0.002
LDL	-0.305 0.001	-0.239 0.007	-0.233 0.009	-.240 0.007	-0.262 0.003	-0.261 0.003	-0.259 0.003	-0.148 0.099
TGL	0.146 0.101	0.187 0.035	0.282 0.001	0.153 0.086	0.124 0.163	0.230 0.009	0.136 0.129	0.304 0.001
MetS	-0.168 0.058	-0.238 0.007	-0.341 <0.001	-0.165 0.063	-0.141 0.111	-0.275 0.002	-0.145 0.103	-0.383 <0.001
HOMA	0.259	0.327	0.308	0.274	0.260	0.319	0.268	0.295
IR	0.010	0.001	0.002	0.007	0.010	0.001	0.008	0.003
FMI	-0.229 0.009	-0.179 0.043	0.142 0.110	-0.171 0.054	-0.164 0.065	0.010 0.911	-0.192 0.029	0.305 <0.001



Grafikon 2. Korelacija lean body mass indexa (LBMI) i HOMAIR

4.1.7. Korelacija telesnog sastava i parametara HHA osovine u celoj grupi

U celoj grupi nije nađena ni jedna značajna korelacija između komponenti telesnog sastava vezanih za masno tkivo i ni jednog parametra HHA osovine. Kada posmatramo mišićnu komponentu, nađena je negativna korelacija mišićne mase ruku i nogu pojedinačno kao i u zbiru (AMM) sa DST-1mg i LDDST kortizolom i negativna korelacija AMM i SH-DST.

Tabela 11. Korelacija telesnog sastava i parametara HHA osovine u celoj grupi

UFC	DST-1mg	LDDST	SH LDDST	SH DST
-----	---------	-------	-------------	-----------

Lean.L.Arm	-0.221 0.118	-0.185 0.037	-0.249 0.005	-0.153 0.086	-0.160 0.073
Lean.R.Arm	-0.259 0.067	-0.176 0.047	-0.196 0.026	-0.143 0.111	-0.139 0.120
Lean.Trunk	-0.364 0.009	-0.091 0.312	-0.132 0.136	-0.054 0.549	-0.111 0.213
Lean.L.Leg	-0.265 0.060	-0.196 0.027	-0.236 0.007	-0.168 0.061	-0.183 0.039
Lean.R.Leg	-0.254 0.072	-0.196 0.027	-0.252 0.004	-0.164 0.067	-0.158 0.077
leanTOTAL (Kg)	-0.304 0.030	-0.134 0.134	-0.189 0.033	-0.107 0.233	-0.127 0.153
lean TOTAL % TT	0.030 0.835	-0.107 0.229	-0.072 0.419	-0.008 0.930	-0.064 0.473
AMM	-0.274 0.051	-0.197 0.026	-0.250 0.004	-0.170 0.056	-0.190 0.032
LBMI	-0.234 0.099	-0.096 0.285	-0.102 0.253	-0.068 0.452	-0.100 0.261

Nije nađena statistički značajna razlika između pacijenata sa UAI i BAI u telesnom sastavu, odnosno ukupnoj masi i regionalnoj distribuciji masnog tkiva, ukupnoj mišićnoj i apendikularnoj mišićnoj masi, u procentu mišićne mase u odnosu na telesnu težinu i LBM indeksu (Tabela 12).

Tabela 12. Telesni sastav pacijenata sa UAI i BAI

	UAI	BAI	<i>p</i>
Ukupna masna masa, kg	26.4±9.6	27.6±8.9	0.527
Ukupna masna masa (% TT)	34.1±8.4	35.6±7.3	0.350
Abdominalna masna masa, kg	14.1±5.8	14.3±6.1	0.821
Abdominalna masna masa, (% TT)	34.0±8.2	35.6±7.3	0.512
Index telesne masti, (kg/m ²)	9.7±3.7	10.0±3.3	0.689
Ukupna mišićna masa, kg	47.7±9.4	46.4±8.5	0.456
Ukupnamišićna masa, % TT	60.9±8.3	60.4±6.9	0.758
AMM, kg	19.9±9.0	19.5±8.7	0.783
AMM, % TT	26.7±16.6	25.7±13.0	0.756
LBM indeks, (kg/m ²)	17.1±2.3	16.7±2.5	0.357

4.2. Učestalost funkcionalnih polimorfizama GR

4.2.1. Učestalost funkcionalnih polimorfizama GR u odnosu na zdravu populaciju

Genotipizacija je učinjena kod 135 od 152 pacijenata, nedostajućih je 17 (11.2%). Svi polimorfizmi su u Hardy Wiinberg-ovom (HW) ekvilibrijumu (Tabela 13).

Tabela 13 Hardy Wiinberg-ov ekvilibrijum

Genotipovi				
BclI	GG, n (%)	GC, n (%)	CC, n (%)	<i>p</i>
observirani	70 (51.9)	52 (38.5)	13 (9.6)	
očekivani	68 (51%)	55 (41%)	11 (8%)	0.468
N363S	AA, n (%)	AG, n (%)	GG, n (%)	<i>p</i>
observirani	132 (97.8)	3 (2.2)	0	
očekivani	132 (97.8%)	3 (2.2%)	0 (0%)	0.896
ER22/23EK	AA, n (%)	AG, n (%)	GG, n (%)	<i>p</i>
observirani	119 (88.1%)	16 (11.9)	0 (0)	
očekivani	119 (88.5%)	15 (11.1%)	0 (0%)	0.464
A3669G	AA, n (%)	AG, n (%)	GG, n (%)	<i>p</i>
observirani	88 (65.7%)	41 (30.6%)	5 (3.7%)	
očekivani	88 (65.6)	41 (30.1)	5 (3.6)	0.934

U celoj grupi, rezultati pokazuju značajno povećanu učestalost nosilaca dužeg C alela *BclI* polimorfizma, prisustvo kraćeg alela *A3669G* polimorfizma i *Er22/23Ek* polimorfizma u grupi pacijenata u odnosu na zdravu populaciju. Nosioci dužeg C alela *BclI* polimorfizma imaju 1.8 x veći rizik od nastanka adrenalnog tumora. Nosioci *Er22/23Ek* alela imaju 13x veći rizik za nastanak adrenalnih tumora. Nosioci G alela *9beta A3669G* imaju 2.5x veći rizik za nastanak adrenalnog tumora. Nije zabeležena razlika u učestalosti *N363S* polimorfizma u genu za hGR između pacijenata i zdravih. Kod pacijenata i zdravih kontrola nismo detektovali homozigote za *N363S* i *ER22/23EK* polimorfizme (Tabela 14).

U DNK izolovanoj iz tumorskog tkiva su dobijeni identični genotipovi kao i u konstitutivnoj DNK.

Tabela 14 Učestalost polimorfizama GR u odnosu na zdravu polulaciju

Polimorfizam	Pacijenti	Kontrole	OR (95% CI)	<i>p</i>
--------------	-----------	----------	-------------	----------

n	135	100		
BclII (TGA u TCA)				
GG	70 (51.8)	66 (66.0)	reference	
GC	52 (38.5)	30 (30.0)	1.63 (0.90-2.98)	0.085
CC	13 (9.6)	4 (4.0)	3.06 (0.87-11.79)	0.051
Nosioci C alela	65 (48.1)	34 (34.0)	1.80 (1.02-3.19)	0.029
N363S (ATT u GTT)				
AA	132 (97.7)	95 (95.0)	reference	
AG	3 (2.3)	5 (5.0)	2.32 (0.47-12.57)	0.290
ER22/23EK (GAGAGG u GAAAAG)				
GG	119 (88.1)	99 (99.0)	reference	
AG	16 (11.9)	1 (1.0)	13.31 (1.81- 273.89)	0.001
A3669G				
AA	88 (65.2)	83 (83.0)	reference	
AG	41 (30.4)	17 (17.0)	2.27 (1.15-4.54)	0.011
GG	5 (4.4)	0 (0.0)	5.66 (0.65- 127.45)	0.121
Nosioci G alela	46 (34.8)	17 (17.0)	2.55 (1.30-5.05)	0.003

Kada posmatramo učestalost funkcionalnih polimorfizama GR kod pacijenata sa UAI u odnosu na zdravu populaciju, nosioci C alela imaju 1.9 x veći rizik od nastanka unilateralnog adrenalnog tumora Homozigoti za CC alel imaju 3.95 x veći rizik za nastanak unilateralnog. Nosioci Er22/23EK alela imaju 13x veći rizik za nastanak tumora. Nosioci G alela 9beta A3669G imaju 4x veći rizik za nastanak tumora, a heterozigoti AG 3x veći (Tabela 15).

Tabela 15 Učestalost polimorfizma GR u grupi sa unilateralnim incidentalomima

Polimorfizam	Pacijenti	Kontrole	OR (95%CI)	<i>p</i>
n	92	100		
BclII (TGA u TCA)				
GG	46 (50.0)	66 (66.0)	reference	
GC	35 (38.0)	30 (30.0)	1.67 (0.86-3.25)	0.100
CC	11 (12.0)	4 (4.0)	3.95 (1.07-15.8)	0.018
Nosioci C alela	46 (50.0)	34 (34.0)	1.94 (1.04-3.62)	0.025
N363S (ATT u GTT)				
AA	90 (97.8)	95 (95.0)	reference	
AG	2 (2.2)	5 (5.0)	0.42 (0.06-2.54)	0.447
ER22/23EK				

(GAGAGG u GAAAAG				
GG	81 (88.0)	99 (99.0)	reference	
AG	11 (12.0)	1 (1.0)	13.44 (1.74-284.39)	0.040
A3669G				
AA	54 (58.7)	83 (83.0)	reference	
AG	34 (25.2)	17 (17.0)	3.07 (1.49-6.40)	<0.001
GG	4 (16.1)	0 (0.0)	7.64 (0.83-177.5)	0.081
Nosioci G alela	38 (41.3)	17 (17.0)	3.98 (1.97-8.10)	<0.001

Kada posmatramo pacijente sa BAI, nosioci polimorfizma za ER22/23EK 13x veći rizik od nastanka bilateralnih tumora (Tabela 16).

Tabela 16 Učestalost polimorfizma GR kod pacijenata sa BAI

Polimorfizam	Pacijenti	Kontrole	OR (95%CI)	<i>p</i>
n	43	100		
BclI (TGA u TCA)				
GG	24 (55.8)	66 (66.0)	reference	
GC	17 (39.5)	30 (30.0)	1.56 (0.68-3.55)	0.248
CC	2 (4.7)	4 (4.0)	1.38 (0.16-9.63)	0.660
Nosioci C alela	19 (44.2)	34 (34.0)	1.54 (0.69-3.40)	0.247
N363S (ATT u GTT)				
AA	42 (97.7)	95 (95.0)	reference	
AG	1 (2.3)	5 (5.0)	0.45 (0.02-4.20)	0.668
ER22/23EK (GAGAGG u GAAAAG				
GG	38 (88.4)	99 (99.0)	reference	
AG	5 (11.6)	1 (1.0)	13.03 (1.40-304.57)	0.009
A3669G				
AA	34 (79.1)	83 (83.0)	reference	
AG	7 (16.3)	17 (17.0)	1.01 (0.34-2.88)	0.991
GG	1 (4.6)	0 (0.0)	4.80 (0.33-138.53)	0.218
Nosioci G alela	8 (20.9)	17 (17.0)	1.15 (0.41-3.17)	0.769

S obzirom da je homozigotno prisustvo polimorfizama u genima za glukokortikoidni receptor detektovano kod malog broja ispitivanih osoba, oni su pridruženi heterozigotnim nosiocima, kako bi se izvršilo poređenje pacijenata koji su nosioci polimorfizama, sa pacijentima kod kojih nije detektovano prisustvo polimorfizama.

4.2.2 Karakteristike pacijenata u odnosu na Bcl I polimorfizam u celoj grupi

U grupi unilateralnih bilo je homozigota GG 46 (50%), heterozigota GC 35 (38 %), a homozigota CC 11 (12%). U grupi bilateralnih bilo je homozigota 24 (55.8%), heterozigota GC 17 (39.5 %), a homozigota CC 2 (4.7%), ali nije bilo statistički značajne razlike za homozigote CC. S obzirom na mali broj homozigota CC oni su združeni sa heterozigotima

U ukupnom broju pacijenta nije nađena statistički značajna razlika između pacijenata sa *wild type* (WT) i nosioca dužeg C alela BCII polimorfizma vezana za starost, pol, veličinu incidentaloma, prevalenciju hipertenzije, DM2, dislipidemiju, HOMAIR i metaboličkog sy. Nije bilo razlike u nivou insulina u dexametazonskim testovima sa 0.25mg, 0.5mg, DST-LDDST kod nosioca C alela BCL polimorfizma kod svih pacijenata sa unilateralnim i bilateralnim incidentalomima.

Takođe nisu nađene statistički značajne razlike u ukupnom broju pacijenata u nivou ACTH, baznog i ponoćnog kortizola, urinarnog slobodnog kortizola, nivou supresije kortizola nakon 0.25mg, 0.5mg, 1mg, 8mg dexametazona i procentu supresibilnosti kortizola sa ovim dozama dexametazona. Prevalenca SH se nije značajno razlikovala.

Nije bilo razlike u BMD na nivou kičme, kuka i celog tela, prevalence osteoporoze, osteopenije, markerima koštanog metabolizma, nivou Ca, P, PTH i vitD između nosioca WT i nosioca dužeg C alela BCII polimorfizma

Nije nađena razlika u antropometrijskim parametrima (BMI, OS, SK odnos) i telesnom sastavu (ukupnoj masnoj masi, abdominalnom masnom tkivu, mišićnoj masi) između WT i nosioca dužeg C alela BCII polimorfizma u ukupnom broju pacijenata sa UAI i BAI.

Kada se izolovano posmatraju pacijenti sa UAI i BAI u odnosu na BcII polimorfizam, unutar samih grupa nije nađena statistički značajna razlika između pacijenata sa WT i nosioca dužeg C alela vezana za starost, pol, veličinu nadbubrega prevalencu hipertenzije, DM2, dislipidemiju, HOMAIR i metabolički sy. Nisu nađene statistički značajne razlike u parametrima HHA osovine. Prevalenca SH se nije značajno razlikovala. Nije nađena razlika u antropometrijskim parametrima (BMI, OS, SK odnos) i telesnom sastavu (ukupnoj masnoj masi, abdominalnom masnom tkivu, mišićnoj masi) i koštanoj gutini.

4.3. Analiza antropometrijskih parametara, telesnog sastava, MetS, komorbiditeta, učestalosti polimorfizama GR i parametara HHA osovine u odnosu na pol

4.3.1 Analiza antropometrijskih parametara, telesnog sastava, MetS, komorbiditeta, učestalosti polimorfizama GR i parametara HHA osovine kod žena

4.3.1.1. Analize u odnosu na prisustvo BcII polimorfizma GR

Nije bilo statistički značajne razlike u starosti, BMI, OS, prevalenciji hipertenzije, visini pritiska, nivou lipida, HOMA IR između žena koje su nosioci dužeg C alela BcII polimorfizma u odnosu na one sa WT. Žene u obe grupe su imale veću učestalost abdominalnog tipa gojaznosti, pri čemu je iako ne statistički značajno, manja zastupljenost bila kod nosilaca BcII polimorfizma (80.9% vs 71.7%, $p=0.322$). Iako je prevalencija MetS niža kod nosioca polimorfizma BcII, nije postojala statistička značajnost (45.5 vs 60.0%, $p=0.158$). Takođe, kod nosilaca BcI polimorfizma uočene su, mada ne statistički značajno niže vrednosti TG (1.76 vs 1.56, $p=0.182$) i HOMAIR (3.1 vs 2.9, $p=0.619$). Žene nosioci C polimorfizma imaju statistički značajno nižu glikemiju našte (4.5 ± 0.6 vs 4.8 ± 0.8 , $p=0.046$) i u 120min OGTTa (5.3 ± 1.5 vs 6.7 ± 2.6 mmol/l, $p=0.010$) i imaju manju prevalenciju DM2 (9.1% vs 26%, $p=0.034$), IFG (2.6% vs 15.0%, $p=0.052$) i IGT (2.6% vs 17.5%, $p=0.031$). Postojala je negativna korelacija dužeg C alela BcII i glc u 120min ($\rho=-0.234$, $p=0.046$) i nastanka DM2 ($\rho=-0.219$, $p=0.034$). Nakon kontrole za potencijalne prediktivne faktore za nastanak DM2 kao što su starost, abdominalna masna masa, LBMI i BcII polimorfizam, kao nezavisan protektivni prognostički factor ostaje BcII polimorfizam (OR=0.193, 0.038-0.964, $p=0.045$). Kada se ovim varijablama doda HOMA IR, insulinska rezistencija postaje nezavisan negativni prognostički faktor (OR=1.790, 0.997-3.216, $p=0.051$).

Uočeno je da u odnosu na WT, žene nosioci C polimorfizma imaju veći procenat masti na nogama (leva noga: 40.0 ± 7.7 vs $43.7\pm 5.8\%$, $p=0.023$; desna noga: $39.6\pm 7.6\%$, $p=0.030$), manju mišićnu masu na levoj ruci (1.9 ± 0.3 vs 1.7 ± 0.3 kg, $p=0.029$) i levoj nozi (6.42 ± 0.98 vs 5.8 ± 10.2 kg, $p=0.007$), ne na desnoj ruci (2.1 ± 0.3 vs 2.0 ± 0.4 kg, $p=0.119$) i desnoj nozi (6.8 ± 1.0 vs 7.6 ± 8.6 kg, $p=0.564$) i imaju trend manje ukupne mišićne mase (44.1 ± 5.7 vs 41.7 ± 6.4 kg, $p=0.080$). Nije bilo razlike u ostalim parametrima masne i mišićne telesne mase. Uočena je negativna korelacija prisustva BcII polimorfizma sa AMM, LBMI, ukupnom mišićnom masom, mišićnom masom ekstremiteta (tabela 17). Takođe je uočena negativna korelacija starosti i AMM ($\rho=-0.295$, $p=0.005$) i menopauze

i AMM ($\rho=-0.241$, $p=0.022$). Nakon kontrole za parametre koji su pokazali značajnu korelaciju sa AMM (starost, BclI polimorfizam, SH, menopauza) multivarijantnom linearnom regresijom kao nezavisni prediktor smanjenja apendikularne mišićne mase dobijena je menopauza ($r^2=0.073$, $\beta= - 3.625\pm 1.454$, $\beta= - 0.270$, $p=0.015$), a kada posmatramo ukupnu mišićnu masu u odnosu na iste faktore, trend smanjenja postoji samo za prisustvo BclI ($\beta = -2.377\pm 1.342$, $\beta= - 0.195$, $p=0.080$)

Tab.17 korelacije BclI polimorfizma GR i telesnog sastava

Telesni sastav	Bcl polimorfizam
FAT.Trunk	-0.076 0.502
FAT.Total	-0.052 0.643
FAT.R.Arm	-0.021 0.850
FAT.L.Arm	0.000 1.000
FAT.L.Leg	0.042 0.713
FAT.R.Leg	0.005 0.962
% FAT R.Arm	0.104 0.353
%.FAT L.Arm	0.140 0.212
% FAT L.Leg	0.221 0.047
% FAT R. Leg	0.217 0.052
leanTOTAL	-0.232 0.037
AMM	-0.319 0.004
LBMI	-0.230 0.039
FMI	-0.063 0.577
Lean.L.Arm	-0.259 0.020
Lean.R.Arm	-0.214 0.055

Lean.L.Leg	-0.341 0.002
Lean.R.Leg	-0.344 0.002

Parametri HHA osovine u odnosu na BclI polimorfizam kod žena

Pacijentkinje koji su nosioci dužeg C BclI polimorfizma u odnosu na WT imaju značajno viši nivo kortizola nakon 0.5mg dexametazona (126.4 ± 111.4 nmol/l vs 80.9 ± 75.7 nmol/l, $p=0.026$). Nije postojala značajna razlika između ACTH, kortizola u 8h i 24h, UFC, dex 0.25mg kortizola, dex 1mg kortizola, DEX I kortizola i prevalencije SH.

4.3.1.2. Analize u odnosu na prisustvo N363S polimorfizma GR

Metabolički parametri u odnosu na prisustvo N363S polimorfizma GR kod žena

Tri pacijentkinje koje su N363S heterozigoti su gojazne, imaju hipertenziju značajno duže u odnosu na WT, viši sistolni i dijastolni krvni pritisak i DM2, bez razlike u nivou lipida (Tabela 18).

Tabela 18 Metabolički parametri žena sa N363S polimorfizmom GR

	N363S polimorfizam	Mean±SD	<i>p</i>
BMI	WT	28.4±6.1	0.014
	He	37.3±4.7	
OS	WT	92.6±14.4	0.059
	He	108.7±9.0	
Trajanje HTA	WT	6.1±7.6	0.012
	He	18.0±15.7	
Sistolni TA	WT	136.2±23.7	0.005
	He	176.7±37.8	
Dijastolni TA	WT	84.2±13.8	0.053
	He	100.0±13.2	
holesterol	WT	5.9±1.0	0.825
	He	6.1±2.0	
HDL	WT	1.37±0.38	0.563
	He	1.24±0.25	
LDL	WT	3.8±0.9	0.728
	He	4.0±1.9	
TGL	WT	1.66±0.73	0.597
	He	1.88±0.95	

Telesni sastav u odnosu na prisustvo N363S polimorfizma GR kod žena

Takođe pacijentkinje nosioci N363S polimorfizma GR imaju značajno veću ukupnu i abdominalnu masnu masu i procenat masnog tkiva na ekstremitetima i FMI, bez značajne razlike u mišićnoj masi ekstremiteta, ali imaju trend većeg LBMI (19.4 vs 16.2, $p=0.058$) (Tabela 19).

Tabela 19 Telesni sastav nosioca N363S polimorfizma

N363S polimorfizam		Mean± SD	<i>p</i>
FAT.Trunk	WT	14.3±6.4	0.004
	He	28.8±5.1	
FAT.Total	WT	28.1±9.8	0.004
	He	48.6±2.6	
Lean.Total	WT	42.9±6.0	0.081
	He	50.5±1.7	
LBMIindex	WT	16.2±2.3	0.058
	He	19.4±0.5	
FMI	WT	10.6±3.7	0.003
	He	18.6±0.1	
FAT % R.Arm	WT	41.5±9.1	0.052
	He	54.3±0.4	
FAT % L.Arm	WT	42.9±8.9	0.027
	He	57.2±0.5	
FAT % L.Leg	WT	41.3±6.9	0.015
	He	53.6±6.2	
FAT % R.Leg	WT	40.8±6.8	0.021
	He	52.3±4.9	
Lean.L.Arm	WT	1.8±0.3	0.715
	He	1.9±0.3	
Lean.R.Arm	WT	2.0±3.5	0.093
	He	2.5±1.0	
Lean.L.Leg	WT	6.2±1.0	0.343
	He	5.4±2.1	
Lean.R.Leg	WT	7.2±5.7	0.819
	He	6.2±2.5	

Uočena je pozitivna korelacija N363S polimorfizma sa BMI ($\rho=0.235$, $p=0.023$), DM2 ($\rho=0.386$, $p<0.001$), abdominalnim masnim tkivom ($\rho=0.238$, $p=0.032$), FMI

(rho=0.255, p=0.021). Uočena je pozitivna korelacija LBMI sa hipertenzijom (rho=0.367, p<0.001, sa DM2 (rho=0.249, p=0.018), TG>1.7 mmol/l i MetS (rho=0.469, p<0.001).

Parametri HHA osovine u odnosu na N363S polimorfizam GR kod žena

Nije postojala razlika između WT i heterozigota ni u jednom parametru HHA (ACTH, kortizola u 8h i 24h, UFC, dex 0.25mg, dex 0.5mg, dex 1mg, LDDST, prevalenciji SH).

4.3.1.3. Analize u odnosu na prisustvo ER22/23EK polimorfizma GR

Metabolički parametri u odnosu na prisustvo ER22/23EK polimorfizma kod žena

Nije bilo statistički značajne razlike između žena koje su nosioci polimorfizma i WT u BMI, OS, prevalenciji hipertenzije, visini pritiska, DM2 i HOMA IR, MetS i nivou lipida izuzev nižeg HDL 1.18 ± 0.42 vs 1.40 ± 0.36 , p=0.050)

Telesni sastav u odnosu na prisustvo ER22/23EK polimorfizma kod žena

Nije bilo razlike u masnoj i mišićnoj masi između WT i nosioca polimorfizma

Parametri HHA osovine u odnosu na prisustvo ER22/23EK polimorfizma kod žena

Pokazana je značajna razlika u procentu supresije kortizola DST-1mg u smislu manjeg % supresije kod heterozigota za ER22/23EK (74.3 ± 19.7 vs $84.6 \pm 14.0\%$, p=0.019). Vrednosti DST-1mg kortizola se nisu značajno razlikovale (69.6 ± 67.25 vs 103.3 ± 84.6 nmol/l, p=0.100). Uočen je trend ka manjoj supresiji kortizola nakon LDDST kod nosioca polimorfizma ER22/23EK u odnosu na WT što ukazuje na relativnu rezistenciju (102.1 ± 73.9 vs 66.1 ± 69.7 , p=0.081). Nije postojala razlika između WT i heterozigota u ACTH, kortizola u 8h i 24h, UFC, dex 0.25mg, dex 0.5mg, DST-1mg i prevalenciji SH).

4.3.1.4. Analize u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma kod žena

Metabolički parametri u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma kod žena

Nije bilo statistički značajne razlike između žena koje su nosioci polimorfizma i WT u BMI, OS, prevalenciji hipertenzije, visini pritiska, DM2, nivou lipida i HOMA IR, MetS.

Telesni sastav u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma kod žena

Nije bilo razlike u masnoj i mišićnoj masi između WT i nosioca polimorfizma

Parametri HHA osovine u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma kod žena

Žene nosioci A3669G polimorfizma češće imaju UAI nego BAI (77.4% vs 22.6%, p=0.048). Nije postojala razlika između WT i heterozigota u ACTH, kortizolu u 8h i 24h, UFC, dex 0.25mg, dex 0.5mg, DST-1mg, LDDST i prevalenciji SH).

4.3.1.5. Karakteristike žena u odnosu na prisustvo SH

Nije uočena statistički značajna razlika između žena sa i bez SH u godinama, trajanju menopauze, BMI, OS, prevalenciji hipertenzije (76.2 vs 66.3%, p=0.383), visini sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, glikemijama i insulinemijama u 0min i 120min OGTT-a, prevalenciji DM2 (19.0 vs 19.3%, p=0.981), nivou lipida, HOMA IR i prevalenciji MetS (61.9 vs 54.2%, p=0.526). Uočeno je da žene sa SH češće piju hipolipemike (14.5% vs 38.1%, p=0.014). Nije postojala razlika u telesnom sastavu: totalnoj masnoj masi, totalnoj trunkalnoj masi, FMI, totalnoj mišićnoj masi (TMM), procentu TMM i LBMI. Pacijentkinje sa SH su imale češće BAI u odnosu na UAI (61.9% vs 38.1%, p=0.003). Postojala je značajna razlika u veličini većeg BAI i veličini UAI između žena bez SH i sa SH (28.5±10.6mm vs 37.2±8.4mm, p=0.001). Nije nađena razlika u učestalosti polimorfizama između žena sa i bez SH.

Tabela 20 Korelacije telesnog sastava i parametara MetS

	FAT Trunk	FAT Total	FMI	Lean Trunk	Lean TOTAL	Lean Total%TT	AMM	LBMI
Starost	0.007 0.948	-0.063 0.553	-0.021 0.844	-0.060 0.577	-0.144 0.176	0.093 0.385	-0.295 0.005	-0.027 0.799
BMI	0.909 <0.001	0.895 <0.001	0.921 <0.001	0.781 <0.001	0.758 <0.001	-0.750 <0.001	0.479 <0.001	0.833 <0.001
OS	0.889 <0.001	0.850 <0.001	0.848 <0.001	0.700 <0.001	0.702 <0.001	-0.710 <0.001	0.460 <0.001	0.748 <0.001
menopauza	-0.046 0.667	-0.064 0.548	-0.048 0.653	-0.124 0.245	-0.162 0.126	0.032 0.766	-0.241 0.022	-0.115 0.281
HTA	0.334 0.001	0.264 0.012	0.314 0.003	0.254 0.016	0.210 0.047	-0.219 0.038	0.023 0.827	0.367 <0.001
Sistolni TA	0.340 0.001	0.274 0.009	0.342 0.001	0.251 0.017	0.200 0.059	-0.273 0.009	-0.011 0.921	0.391 <0.001
Dijastolni TA	0.453 <0.001	0.400 <0.001	0.443 <0.001	0.394 <0.001	0.350 0.001	-0.325 0.002	0.097 0.362	0.475 <0.001
OGTT Glc 0	0.299 0.009	0.245 0.033	0.307 0.007	0.213 0.065	0.234 0.042	-0.210 0.069	0.199 0.084	0.341 0.003
OGTT	0.074	0.016	0.072	-0.054	-0.044	-0.029	-0.088	0.089

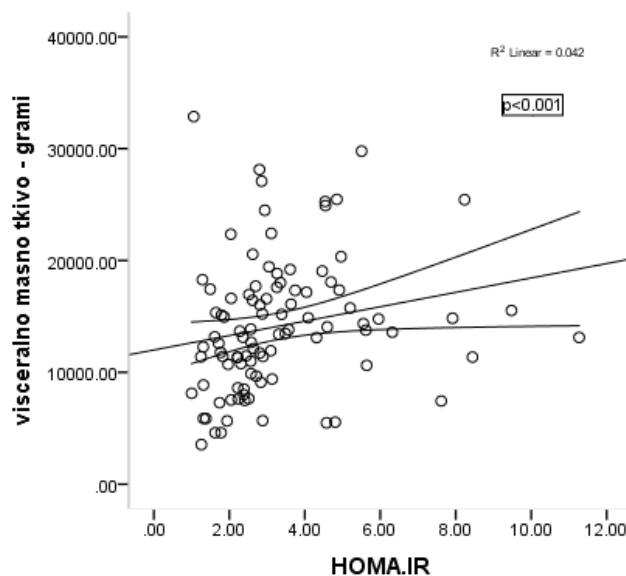
Glc 120	0.543	0.896	0.556	0.657	0.720	0.815	0.472	0.466
OGTT	0.349	0.325	0.335	0.172	0.141	-0.332	0.060	0.200
Ins 0	0.003	0.006	0.004	0.151	0.241	0.005	0.622	0.095
OGTT	0.333	0.290	0.284	0.205	0.202	-0.233	0.138	0.247
Ins 120	0.005	0.015	0.018	0.091	0.097	0.054	0.258	0.041
DM	0.191	0.160	0.143	0.216	0.247	-0.056	0.190	0.249
	0.071	0.132	0.178	0.041	0.019	0.601	0.073	0.018
holesterol	-0.038	-0.044	-0.027	-0.056	-0.122	-0.031	-0.184	-0.079
	0.720	0.680	0.803	0.603	0.252	0.769	0.083	0.459
HDL	-0.286	-0.196	-0.219	-0.145	-0.171	0.184	-0.080	-0.206
	0.006	0.064	0.038	0.173	0.108	0.083	0.452	0.052
LDL	-0.040	-0.052	-0.029	-0.108	-0.163	-0.040	-0.245	-0.109
	0.710	0.629	0.791	0.314	0.127	0.711	0.021	0.308
TGL	0.370	0.293	0.327	0.290	0.249	-0.258	0.116	0.303
	<0.001	0.005	0.002	0.006	0.018	0.014	0.277	0.004
HOMA IR	0.438	0.381	0.403	0.297	0.271	-0.348	0.183	0.353
	<0.001	0.001	0.001	0.012	0.023	0.003	0.129	0.003
MetS	0.517	0.422	0.456	0.399	0.378	-0.289	0.202	0.469
	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	0.056	<0.001
SH	0.014	-0.032	-0.035	-0.026	-0.108	0.023	-0.235	-0.105
LDDST	0.900	0.767	0.744	0.813	0.316	0.829	0.027	0.331

Kod žena sa starenjem i sa nastankom menopauze značajno se smanjuje mišićna masa ekstremiteta, dolazi do gubitka i masne mase na donjim ekstremitetima, bez značajnih promena u BMI, OS, abdominalnoj masnoj masi i ukupnoj masnoj masi (tabela 20). Postoji negativna korelacija starosti i masne mase donjih ekstremiteta: značajna desne noge ($\rho = -0.209$, $p = 0.048$), trend leve noge ($\rho = -0.195$, $p = 0.066$); značajna negativna korelacija mišićne mase leve ruke ($\rho = -0.266$, $p = 0.011$), leve noge ($\rho = -0.309$, $p = 0.003$), desne noge ($\rho = -0.274$, $p = 0.009$) i AMM ($\rho = -0.295$, $p = 0.005$). Sa nastankom SH dolazi do redukcije ukupne mišićne mase ekstremiteta (tabela 20).

Kod žena je uočena značajna korelacija BMI i OS sa svim parametrima masne i mišićne mase tela. Sa porastom masne i mišićne mase češća je pojava hipertenzije, viši sistolni i dijastolni krvni pritisak, viši trigliceridi, veća insulinska rezistencija i češća pojava MetS. Korelacija abdominalne mase i HOMA IR priazana je na Grafikonu 3. Bazne glikemije i insulinemije, kao i insulinemije u 120 min OGTTa pozitivno koreliraju sa

abdominalnom masnom masom, totalnom masnom masom i FMI. Sa porastom ukupne mišćne mase i LBMI raste učestalost DM2 (tabela 20).

Kada posmatramo potencijalne prediktivne faktore za nastanak insulinske rezistencije, kao što su starost, SH, ukupna masna masa, abdominalna masna masa, ukupna mišićna masa i TG kao nezavisni prediktori HOMA IR ostaju masa abdominalnog masnog tkiva (beta 0.231, $p=0.050$ i trigliceridi (beta 0.264, $p=0.028$) i zajedno objašnjavaju 20% ($r^2=0.202$) varijanse povećanja IR.



Grafikon 3. Korelacija abdominalnog masnog tkiva (DXA) i HOMA IR

4.3.2. Analiza antropometrijskih parametara, telesnog sastava, MetS, komorbiditeta, učestalosti polimorfizama GR i parametara HHA osovine kod muškaraca

Tabela 21 Korelacije parametara HHA osovine i telesnog sastava kod muskaraca

	Kortizol 8h	Kortizol 24h	Kortizol >208	UFC	DST 1mg	DST-1mg >50nmol	LDDST
FAT.L.Arm	-0.158 0.342	0.181 0.276	0.165 0.323	0.217 0.357	-0.042 0.801	-0.083 0.618	-0.057 0.736
FAT.R.Arm	-0.222 0.181	0.167 0.317	0.236 0.154	0.050 0.833	-0.036 0.831	-0.033 0.845	-0.029 0.862
FAT.Trunk	-0.110 0.512	0.326 0.046	0.360 0.026	0.040 0.867	-0.211 0.204	-0.210 0.206	-0.183 0.272
FAT.L.Leg	0.049 0.771	0.350 0.031	0.263 0.111	0.195 0.410	-0.168 0.314	-0.205 0.217	-0.122 0.465
FAT.R.Leg	0.112 0.503	0.294 0.074	0.227 0.171	0.240 0.308	-0.131 0.432	-0.164 0.324	-0.168 0.313
FAT.Total	0.010 0.954	0.378 0.019	0.307 0.061	0.163 0.492	-0.209 0.208	-0.200 0.229	-0.199 0.232
FMI	-0.014 0.932	0.397 0.014	0.387 0.016	0.055 0.818	-0.161 0.334	-0.169 0.309	-0.116 0.489
Lean.L.Arm	-0.169 0.310	0.075 0.656	0.076 0.652	0.148 0.533	-0.157 0.347	-0.422 0.008	-0.073 0.661
Lean.R.Arm	-0.132 0.430	0.038 0.822	0.129 0.440	0.085 0.722	-0.142 0.395	-0.387 0.016	-0.074 0.659
Lean.L.Leg	-0.082 0.626	0.050 0.764	0.013 0.937	0.193 0.414	-0.234 0.157	-0.427 0.007	-0.170 0.308
Lean.R.Leg	-0.052 0.756	0.125 0.456	0.156 0.350	0.231 0.327	-0.182 0.273	-0.301 0.066	-0.206 0.214
Lean.Total	-0.118 0.482	0.093 0.579	0.058 0.730	0.078 0.745	-0.224 0.176	-0.448 0.005	-0.113 0.500
AMM	-0.185 0.267	0.032 0.851	0.049 0.770	0.145 0.541	-0.233 0.160	-0.453 0.004	-0.112 0.505
LBMI	-0.280 0.089	-0.021 0.902	0.352 0.030	-0.103 0.665	0.051 0.760	-0.271 0.712	0.237 0.152

Kod muškaraca je nezavisno od polimorfizama GR, uočena pozitivna korelacija ponoćnog kortizola i abdominalne masne mase, ukupne masne mase i FMI. Uočena je negativna korelacija ukupne mišićne mase i apendikularne mišićne mase, AMM i pojedinačne mišićne mase ekstremiteta (Tabela 21). Muškarci sa SH se nisu značajno razlikovali u odnosu na one bez SH u totalnoj masnoj masi, totalnoj trunkalnoj masi, FMI, totalnoj mišićnoj masi, procentu TMM i LBMI, nivou lipida, prevalenciji hipertenzije (66.7 vs 88.7 %, p= 0.092), dijabetesa (33.3 vs 32.4%, p=0.959) i MetS (55.6 vs 64.9%, p=0.604). Nije uočena razlika u učestalosti funkcionalnih polimorfizama u odnosu na prisustvo SH.

4.3.2.1. Analiza u odnosu na prisustvo BclI polimorfizma GR kod muškaraca

Nije bilo statistički značajne razlike između muškaraca koji su nosioci dužeg C polimorfizma BclI i WT u BMI, OS, prevalenciji hipertenzije, visini pritiska, nivou lipida i HOMA IR, MetS. Nije bilo razlike u masnoj i mišićnoj masi između WT i nosioca BclI polimorfizma. Nije postojala razlika između WT i hetero i homozigota za BclI polimorfizam u nivou ACTH, kortizolu u 8h i 24h, UFC, dexametazonskom testu sa 0.25mg,0.5mg, DST 1mg, LDDST i prevalenci SH.

4.3.2.2. Analiza u odnosu na prisustvo Er22/23EK polimorfizma GR kod muškaraca

Nije bilo statistički značajne razlike između muškaraca koji su nosioci Er22/23EK polimorfizma i WT u BMI, OS, prevalenciji hipertenzije, visini pritiska, nivou lipida i HOMA IR, MetS. Takođe, nije bilo razlike u masnoj i mišićnoj masi između WT i nosioca Er22/23EK polimorfizma. Nije postojala značajna razlika između WT i heterozigota sa parametrima HHA osovine.

4.3.2.3. U odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma GR kod muškaraca

Uočena je razlika u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma GR u metaboličkim parametrima. Muškarci nosioci A3669G polimorfizma u odnosu na WT, imaju značajno viši insulin u 0min (21.9 ± 9.9 vs 15.5 ± 5.55 , $p=0.034$), viši insulin u 120min OGTTa (102.8 ± 71.1 vs 54.6 ± 35.7 , $p=0.025$), viši holesterol (6.2 ± 1.09 vs 5.2 ± 1.07 , $p=0.006$), viši HDL (1.3 ± 0.25 vs 1.05 ± 0.34 , $p=0.021$), viši LDL (4.0 ± 0.8 vs 3.1 ± 0.9 , $p=0.005$) i imaju veću insulinsku rezistenciju HOMAIR (5.0 ± 2.7 vs 3.4 ± 1.4 , $p=0.051$).

Multivarijantna linearna logistička regresija je nakon korekcije za starost, abdominalno masno tkivo, LDDST kortizol $>50\text{nmol/l}$ i prisustvo A3669G polimorfizma pokazala da trigliceridi pozitivno ($\beta=0.498$, $p=0.006$) i ukupna mišićna masa negativno ($\beta=-0.401$, $p=0.023$) predstavljaju nezavisne prognostičke faktore i objašnjavaju 35% ($r^2=0.355$) varijanse HOMAIR.

Takođe je uočena razlika u telesnom sastavu muškaraca u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma GR. Muškarci nosioci polimorfizma A3669G imaju nižu ukupnu mišićnu masu (52.1 ± 5.2 vs 59.7 ± 7.6 , $p=0.004$), mišićnu masu ruku: leva $p=0.015$, desna $p=0.000$ i procenat masti na rukama za levu (29.7 ± 8.3 vs 24.0 ± 5.2 , $p=0.016$) za desnu

(29.5 ± 8.5 vs 24.5 ± 5.4 , $p=0.036$). Postoji negativna korelacija prisustva polimorfizma i AMM ($\rho=-0.488$, $p=0.003$), polimorfizma i ukupne mišićne mase (LBM) ($\rho=-0.505$, $p=0.002$). Nije postojala korelacija između parametara mišićne mase, starosti, DHEAS i testosterona.

Multivarijantna linearna logistička regresija je pokazala da prisustvo A3669G polimorfizma kod muškaraca predstavlja nezavisani prognostički factor za nižu ukupnu mišićnu masu ($r^2=0.221$, $\beta=-0.470$, $p=0.004$) nakon korekcije za starost, ukupno masno tkivo, testosteron, LDDST kortizol >50 nmol/l.

Kada se posmatraju parametri HHA osovine u odnosu na prisustvo A3669G polimorfizma GR, kod nosioca polimorfizma uočen je češće LDDST kortizol >50 nmol/l (60.0% vs 23.1% , $p=0.018$). Nije postojala značajna razlika između WT i heterozigota u drugim parametrima HHA. Očelikano češće, ali ne statistički značajno imaju SH-LDDST (33.3% vs 15.4% , ali $p=0.181$).

4.4. Parametri koštane gustine

4.4.1. Cela grupa - korelacija parametara koštane gustine i parametara HHA osovine

Kada se posmatra koštana gustina na nivou kičme, uočena je značajna negativna korelacija BMD i jutarnjeg kortizola, LDDST kortizola i SH; negativna korelacija T skora, odnosno pojave osteoporoze sa LDDST kortizolom i SH, negativna korelacija T i Z skora sa povišenim ACTH (cut off 10), negativna korelacija Z skora i jutarnjeg kortizola, negativna korelacija sniženog Z skora i UFC.

BMD vrata femura negativno korelira sa dex screening kortizolom, LDDST kortizolom i SH-LDDST. T score ne korelira ni sa jednim parametrom HHA osovine izuzev negativno sa UFC. Kategorija T score (pojava osteoporoze) negativno korelira sa povišenim UFC (>245 nmol/l), a Z score negativno korelira sa LDDST kortizolom.

Totalni BMD femura, T i Z score femura i pojava osteoporoze koreliraju negativno sa dex screening, LDDST kortizolom i SH-LDDST. T score negativno korelira još sa ponoćnim kortizolom i UFC, a kategorija T score negativno sa jutarnjim kortizolom.

BMD celog skeleta i pojava osteoporoze na celom skeletu negativno koreliraju sa DST-1mg kortizolom i LDDST kortizolom i SH-LDDST.

Osteoporoza na nivou kičme i kuka značajno korelira sa UFC, DST-1mg kortizolom i LDDST kortizolom i SH-LDDST (Tabela 22)

U celoj grupi, nezavisno od pola uočena je negativna korelacija starosti sa BMD vrata, totalnog femura i BMD totalnog skeleta, ali ne sa BMD lumbalnog dela kičme.

Tabela 22	ACTH >10	Kortiz 8h	Kortiz 24h >208	UFC	DST	LDDST	LDDST SH	starost
L1-L4								
BMD	0.143	-0.198	-0.118	0.172	-0.161	-0.270	-0.283	-0.128
	0.101	0.022	0.186	0.212	0.063	0.002	0.001	0.140
T score	-0.244	-0.153	-0.139	0.125	-0.161	-0.239	-0.331	0.052
	0.010	0.106	0.153	0.398	0.088	0.011	<0.001	0.581
T score kat	-0.178	0.151	0.131	0.209	0.136	0.184	0.300	0.049
	0.061	0.109	0.178	0.153	0.151	0.050	0.001	0.605
Z score	-0.214	-0.183	-0.107	0.023	-0.056	-0.129	-0.261	0.192
	0.013	0.033	0.225	0.868	0.517	0.136	0.002	0.025
Z score kat	0.087	0.161	0.135	0.317	0.064	0.027	0.116	0.129
	0.316	0.061	0.126	0.019	0.464	0.759	0.184	0.134
Vrat femura								
BMD	0.002	-0.170	-0.123	-0.329	-0.198	-0.244	-0.192	-0.282
	0.986	0.050	0.165	0.015	0.022	0.005	0.027	0.001
T score	-0.009	-0.146	-0.169	-0.339	-0.176	-0.177	-0.158	-0.113
	0.923	0.126	0.086	0.019	0.065	0.064	0.100	0.236
T score kat	0.062	0.097	0.115	0.351	0.170	0.162	0.120	0.151
	0.511	0.305	0.234	0.015	0.070	0.083	0.205	0.107
Z score	0.040	-0.142	-0.113	-0.085	-0.114	-0.170	-0.128	0.041
	0.649	0.103	0.203	0.543	0.190	0.049	0.143	0.636
Z score kat	0.008	0.122	0.023	-0.109	0.117	0.038	0.092	0.065
	0.929	0.160	0.798	0.433	0.180	.659	0.293	0.453
Total femura								
BMD	0.019	-0.167	-0.131	-0.319	-0.237	-0.295	-0.240	-0.236
	0.830	0.054	0.141	0.019	0.006	0.001	0.006	0.006
T score	0.010	-0.173	-0.196	-0.313	-0.230	-0.248	-0.202	0.128
	0.919	0.067	0.043	0.030	0.014	0.008	0.033	0.177
T score kat	-0.040	0.203	0.232	0.238	0.286	0.282	0.234	0.124
	0.678	0.032	0.017	0.103	0.002	0.003	0.014	0.194
Z score	0.086	-0.134	-0.081	-0.146	-0.102	-0.142	-0.191	0.040
	0.324	0.120	0.358	0.292	0.240	0.099	0.027	0.644
WB TOTAL								
BMD	0.003	-0.276	-0.229	-0.232	-0.243	-0.318	-0.227	-0.284
	0.974	0.003	0.010	0.102	0.006	0.000	0.010	0.001
T score	-0.008	-0.274	-0.350	-0.208	-0.221	-0.274	-0.269	0.166
	0.939	0.008	0.001	0.191	0.034	0.008	0.010	0.114
T score kat	0.058	0.225	0.391	0.324	0.272	0.225	0.242	0.176
	0.585	0.030	0.000	0.037	0.008	0.030	0.021	0.092
Z score	-0.045	-0.276	-0.298	-0.154	-0.107	-0.182	-0.162	-0.066
	0.630	0.003	0.001	0.297	0.257	0.050	0.085	0.480
Osteoporoza Kičma/kuk	0.119	-0.043	0.131	0.507	0.271	0.260	0.286	0.003
	0.203	0.642	0.169	0.000	0.003	0.004	0.002	0.977
Osteopenija Kičma/kuk	-0.062	-0.060	-0.080	0.462	-0.199	-0.196	-0.123	0.164
	0.510	0.520	0.399	0.001	0.031	0.033	0.190	0.076

U celoj grupi nije uočena značajna korelacija između beta cross laps, osteokalcina i parametara HHA osovine izuzev pozitivne korelacije betacross laps i LDDST kortizola, koji takođe pozitivno korelira sa sniženim DHEAS. Beta cross laps i osteocalcin negativno koreliraju sa BMD na nivou kičme, vrata i total femura i BMD celog skeleta. Nivo vitamina D negativno korelira sa SH-DST1mg. Nije uočena povezanost PTH sa parametrima HHA osovine i BMD (Tabela 23).

Tabela 23 Korelacija kostanih markera, vitD, PTH sa parametrima HHA i BMD

	LDDST	SH DST	SH LDDST	DHEAS snizen	Total L1-L4 BMD	Vrat femura BMD	Total femura BMD	Total skeleta BMD
osteocalcin	0.062	0.009	0.010	0.195	-0.307	-0.319	-0.368	-0.231
	0.470	0.919	0.907	0.024	0.001	<0.001	<0.001	0.011
betacross	0.206	0.026	0.046	0.188	-0.339	-0.281	-0.316	-0.344
	0.015	0.761	0.595	0.029	<0.001	0.002	<0.001	<0.001
vitD	-0.123	-0.211	-0.130	-0.045	0.056	0.084	0.086	0.043
	0.198	0.026	0.177	0.641	0.580	0.406	0.398	0.673
PTH	0.080	0.094	0.106	0.103	-0.076	-0.019	-0.051	-0.150
	0.337	0.263	0.207	0.223	0.395	0.829	0.567	0.094

4.4.2. Poređenje koštane gustine između pacijenata sa UAI i BAI

Nezavisno od pola, pacijenti sa BAI su imali statistički značajno niži BMD na nivou lumbalnog dela kičme, total kuka i celog skeleta. Samo na vratu butne kosti nije uočena razlika u BMD, prevalenci osteoporoze i osteopenije između grupa. Na osnovu T skora kičme i kuka i celog skeleta pacijenti sa UAI su imali veću učestalost normalne koštane gustine, dok je osteoporoza bila zastupljenija kod pacijenata sa BAI (p=0.004 i p =0.007 za WB). Kada se posmatraju zajedno lumbalni deo kičme i kuk prevalenca osteoporoze je iznosila 15.7% kod pacijenata sa UAI, a kod pacijenata sa BAI 37.1% (p=0.010). Između UAI i BAI pacijenata nije bilo razlike u procentu postmenopauzalnih žena i trajanju menopauze, koštanim markerima, nivou vitD i PTH (tabela 24.)

Tabela.24 Koštana gustina i prevalenca osteoporoze kod pacijenata sa UAI I BAI

Karakteristike	Unilateralni	Bilateralni	<i>p</i>
L1-L4, n	80	33	
BMD, g/cm ²	0.96 ± 0.14	0.87 ± 0.15	0.002
T score	-1.08 ± 1.23	-1.98 ± 1.23	0.001
Z score	0.06 ± 1.25	-0.36 ± 1.27	0.074
Normalan, n (%)	34 (42.0)	9 (27.3)	
Osteopenia, n (%)	39 (48.1)	12 (36.4)	
Osteoporoza, n (%)	8 (9.9)	12 (36.4)	0.003
Totalni kuk, n	79	33	
BMD, g/cm ²	0.90 ± 0.13	0.85 ± 0.14	0.045
T score	-0.72 ± 0.92	-1.03 ± 1.04	0.116
Z score	0.15 ± 0.91	0.04 ± 1.03	0.526
Normalan, n (%)	47 (59.5)	11 (33.3)	
Osteopenia, n (%)	32 (40.5)	19 (57.6)	
Osteoporoza, n (%)	0 (0.0)	3 (9.1)	0.003
Vrat femura, n			
BMD, g/cm ² 94uni/40bil/134uk	0.74 ± 0.12	0.71 ± 0.12	0.111
T score 78../33../134	-1.30 ± 0.98	-1.54 ± 0.96	0.246
Z score 94../40../134	-0.06 ± 0.90	-0.13 ± 0.97	0.716
Normalan n (%)	27 (33.8)	9 (25.7)	
Osteopenia, n (%)	47 (58.8)	22 (62.9)	
Osteoporoza, n (%)	6 (7.5)	4 (11.4)	0.606
Prevalenca osteoporoze	13/83	13/35	
Kičma i vrat zajedno, %	15.7	37.1	0.010
Prevalenca osteopenije	53/83	16/35	
Kičma i vrat femura zajedno	63.9	45.7	0.068
WB celog skeleta, n 129	89/105	39/47	
BMD, g/cm ²	1.11 ± 0.12	1.04 ± 0.13	0.003
T score, n 92/	-0.59 ± 1.70	-1.24 ± 1.44	0.022
Z score, n 116/152	0.26 ± 1.00	-0.08 ± 1.20	0.108
Normalan, n (%)	39 (63.9)	11 (34.4)	
Osteopenia, n (%)	19 (31.1)	14 (43.8)	
Osteoporoza, n (%)	3 (4.9)	7 (21.9)	0.007
Osteokalcin, 139/152	17.8 ± 9.1	18.9 ± 9.03	0.531
Beta crosslaps, 139/152	0.42 ± 0.24	0.83 ± 2.30	0.088
Ca (mmol/l), 152/152	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.180
P (mmol/l), 152/152	1.14 ± 0.18	1.19 ± 0.19	0.143
vitD (nmol/l), 112/152	35.6 ± 15.8	39.8 ± 20.6	0.233
PTH, 148/152	36.8 ± 20.9	38.4 ± 21.2	0.681
Postmenopauzalne žene, n (%)	50 (73.5)	29 (76.3)	0.752
Trajanje menopauze, rang	11.8 ± 7.8 (1 – 31)	15.5 ± 9.3 (2 – 33)	0.860

4.4.3. Uticaj polimorfizama GR na koštanu gustinu kod pacijenata sa UAI i BAI

U celoj grupi A3669G heterozigoti imaju značajno manju učestalost osteoporoze u odnosu na WT (12.8 vs 29.9%, $p=0.046$) i uočena je slaba negativna korelacija između A3669G polimorfizma i pojave osteoporoze ($\rho=-0.193$, $p=0.047$)

Kod pacijenata sa UAI nosioci dužeg C alela BclI imaju statistički značajno veću prevalencu osteoporoze na nivou lumbalne kičme u odnosu na WT. (Tabela 25)

Tabela 25 BclI polimorfizam kod pacijenata sa UAI

	WT BclI	Duži C BclI	<i>p</i>
DXA lumbar spine			
BMD, g/cm ²	0.96±0.12	0.95± 0.16	0.732
T score	-1.02±1.0	-1.13±1.41	0.702
Z score	0.19±1.08	-0.10±1.43	0.290
Normal BMD, n (%)	14 (37.8)	17 (50.0)	
Osteopenia, n (%)	22 (59.5)	11 (32.4)	0.025
Osteoporosis, n (%)	1 (2.7)	6 (17.6)	
DXA hip			
BMD, g/cm ²	0.90±0.13	0.88±0.12	0.543
T score	-0.68±0.89	-0.86±0.88	0.398
Z score	0.20±0.89	-0.01±0.87	0.277
Normal BMD, n (%)	22 (59.5)	19 (59.4)	
Osteopenia, n (%)	15 (40.5)	13 (40.6)	0.994
Osteoporosis, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	
DXA femoral neck			
BMD, g/cm ²	0.74 ± 0.11	0.73 ± 0.12	0.873
T score	-1.4±0.81	-1.35±1.03	0.865
Z score	-0.06±0.85	-0.18±0.86	0.527
Normal BMD, n (%)	12 (30.8)	10 (32.3)	
Osteopenia, n (%)	25 (64.1)	17 (54.8)	0.478
Osteoporosis, n (%)	2 (2.9)	4 (12.9)	
DXA WB total			
BMD, g/cm ²	1.10 ± 0.11	1.12±0.11	0.311
T score	-0.77±1.45	-0.84±1.09	0.744
Z score	0.35±1.05	0.22±1.00	0.578
Normal BMD, n (%)	20 (66.7)	16 (64.0)	
Osteopenia, n (%)	9 (30.0)	8 (32.0)	0.976
Osteoporosis, n (%)	1 (3.3)	1 (4.0)	
Prevalenca osteoporoze na nivou kičme i kuka, n (%)	3 (7.7)	9 (26.5)	0.031
Prevalenca osteopenije na nivou kičme i kuka, n (%)	29 (74.4)	18 (52.9)	0.057
Postmenopauza, n (%)	23 (74.2)	21 (75.0)	0.943
Trajanje menopauze	11.2±8.0	11.2±8.1	0.981
osteokalcin	16.6±7.5	19.5±10.9	0.147
Beta cross laps	0.47±0.25	0.38±0.24	0.111
PTH	36.0±15.0	36.2±20.4	0.964
vitD	35.1±15.8	36.0±15.1	0.807

Kada se posmatraju polimorfizmi GR kod pacijenta sa UAI uočena je pozitivna korelacija BclI polimorfizma i pojave osteoporoze kičme i kuka, odnosno nosioci C alela češće imaju osteoporozu u odnosu na WT. Nije uočena korelacija drugih polimorfizama kod UAI pacijenata (Tabela 26)

Tabela 26 Korelacija polimorfizama GR sa koštanom gustinom kod pacijenata sa UAI i BAI

	Unilateralni				Bilateralni			
	Bcl I	N363S	Er22/23Ek	A3669G	Bcl I	N363S	Er22/23Ek	A3669G
L1-L4	-0.028	0.038	-0.067	-0.188	-0.184	0.156	-0.100	-0.013
BMD	0.803	0.735	0.551	0.092	0.276	0.356	0.556	0.939
L1-L4	-0.039	0.070	0.075	-0.160	-0.112	0.245	-0.108	-0.032
T score	0.749	0.564	0.538	0.187	0.547	0.184	0.564	0.864
L1-L4	-0.024	-0.184	-0.088	0.043	0.047	-0.262	0.052	-0.005
T score.kat	0.840	0.125	0.468	0.722	0.804	0.154	0.782	0.979
L1-L4	-0.105	0.097	0.097	-0.171	-0.049	0.250	-0.374	0.036
Z score	0.343	0.384	0.381	0.121	0.775	0.136	0.022	0.834
Vrat femura	-0.004	0.053	-0.092	-0.075	-0.143	0.187	-0.056	0.074
BMD	0.974	0.641	0.412	0.503	0.398	0.267	0.744	0.662
Vrat femura	0.009	0.121	0.086	-0.042	-0.123	0.276	0.065	0.110
T score	0.942	0.324	0.487	0.733	0.508	0.133	0.730	0.557
Vrat femura	0.039	-0.165	-0.078	-0.026	0.072	-0.272	-0.047	-0.005
T score kat	0.746	0.173	0.521	0.830	0.692	0.125	0.796	0.980
Vrat femura	-0.060	0.117	0.084	-0.085	0.090	0.266	-0.293	0.049
Z score	0.595	0.297	0.458	0.450	0.598	0.112	0.078	0.775
Total femura	-0.038	0.005	-0.127	-0.104	-0.064	0.203	-0.107	0.113
BMD	0.739	0.966	0.259	0.354	0.707	0.228	0.527	0.505
Total femura	-0.111	-0.015	0.061	-0.110	0.018	0.286	0.032	0.155
T score	0.359	0.903	0.618	0.366	0.923	0.119	0.863	0.404
Total femura	0.001	0.033	-0.089	0.203	-0.087	-0.244	0.129	0.036
T score kat	0.994	0.787	0.469	0.094	0.643	0.186	0.490	0.846
Total femura	-0.129	0.083	0.053	-0.136	0.061	0.266	-0.300	0.152
Z score	0.246	0.455	0.632	0.221	0.718	0.112	0.071	0.369
WB total	0.124	0.026	-0.160	-0.186	-0.075	-0.057	-0.097	-0.078
BMD	0.269	0.816	0.154	0.097	0.662	0.741	0.575	0.652
WB total	-0.034	0.172	0.095	0.004	0.058	0.032	-0.176	-0.043
T score	0.810	0.213	0.495	0.980	0.761	0.866	0.353	0.820
WB total	0.029	-0.098	0.039	-0.023	0.041	0.035	0.055	-0.041
T score kat	0.833	0.476	0.776	0.865	0.828	0.856	0.774	0.828
WB total	-0.057	0.091	0.031	-0.127	-0.030	0.065	-0.256	-0.047
Zscore	0.642	0.455	0.800	0.298	0.864	0.706	0.133	0.784
Osteoporoza	0.253	0.074	0.069	0.168	-0.061	0.143	-0.005	0.115
kičma i kuk	0.031	0.531	0.561	0.154	0.737	0.429	0.977	0.524
Osteopenija	0.223	0.226	0.120	-0.138	0.045	0.161	0.046	-0.122
kičma i kuk	0.058	0.055	0.313	0.244	0.805	0.370	0.798	0.500

U grupi BAI, 5 od 36 (13.6 %) pacijenata su heterozigoti za ER22/23EK. Uočeno je da oni u odnosu na WT imaju na granici statističke značajnosti niži Z skor lumbalne kičme (-1.400 ± 0.800 vs -0.203 ± 1.31 , $p=0.057$) i niži Z skor totalnog kuka (-0.680 ± 0.873 vs 0.184 ± 1.031 , $p=0.085$). Kod pacijenata sa BAI nađena je negativna korelacija ER22/23EK polimorfizma i Z skora lumbalne kičme. Ni kod pacijenata sa UAI, ni kod pacijenta sa BAI nisu uočene druge statistički značajne razlike između WT i nosioca ispitivanih polimorfizama GR, kao ni značajne korelacije koštane gustine, koštanih markera i polimorfizama GR (Tabela 26).

4.4.4. Parametri koštane gustine kod BAI i UAI pacijenata u zavisnosti od prisustva SH

Pacijenati sa BAI sa SH-LDDST imaju statistički značajno niži BMD lumbalne kičme, vrata femura i totalnog skeleta kao i veću učestalost osteoporoze kičme i kuka u odnosu na pacijente sa BAI bez SH. Nije uočena statistički značajna razlika u koštanim markerima, vitD i PTH, starosti i učestalosti postmenopauzalnih žena. Kada posmatramo pacijente sa UAI nije nađena statistički značajna razlika između pacijenata sa SH i parametara koštane gustine, učestalosti i trajanju menopauze (tabela 27). Nije uočena značajna razlika u učestalosti polimorfizama GR u zavisnosti od SH ni kod pacijenata sa UAI, ni kod BAI pacijenata.

Tabela 27 Karakteristike koštanih parametara svih pacijenata u zavisnosti od prisustva SH

	Bilateralni incidentalomi			Unilateralni incidentalomi		
	SH - Mean±SD	SH + Mean±SD	<i>p</i>	SH - Mean±SD	SH + Mean±SD	<i>p</i>
L1-L4 BMD	0.91±0.14	0.80±0.15	0.027	0.97±0.14	0.90±0.12	0.095
Vrat femura BMD	0.73±0.09	0.64±0.12	0.020	0.75±0.12	0.72±0.13	0.508
Total femura BMD	0.87±0.11	0.80±0.13	0.067	0.91±0.13	0.85±0.13	0.129
WB BMD total	1.07±0.11	0.96±0.09	0.004	1.11±0.11	1.10±0.12	0.778
Osteoporoza kicma i kuk, %	19.0	66.7	0.006	14.3	23.1	0.423
osteokalcin	17.9±8.5	21.5±10.5	0.248	18.2±9.2	15.6±8.30	0.301
betacross	0.9±2.8	0.57±0.38	0.612	0.42±0.24	0.42±0.22	0.978
Vit D	43.5±21.5	31.9±18.3	0.113	35.7±15.6	35.4±17.8	0.966
PTH	37.9±24.6	39.8±12.1	0.795	36.9±22.0	35.9±12.3	0.858
Menopauza, n (%)	15 (65.2)	12 (92.3)	0.071	43 (71.7)	7 (87.55)	0.340
Trajanje menopauze	12.9±7.2	17.2±10.5	0.275	12.0±7.6	11.0±10.6	0.769
starost	57.6±10.5	62.1±9.8	0.185	57.7±11.6	59.4±7.5	0.576

4.4.5. Parametri koštane gustine kod svih pacijenata u zavisnosti od pola

Muškarci su bili značajno stariji od žena. Kod 87% muškaraca uočena je osteopenija na nivou kičme i/ili kuka, dok je samo kod jednog uočena osteoporoza i to na nivou lumbalnog dela kičme. Kod žena osteopenija je postojala kod 44.3%, a osteoporoza kod 31.6% pacijentkinja. Žene su značajno češće imale snižen BMD lumbalne kičme, vrata femura i celog skeleta. Prevalencija osteoporoze je bila značajno veća kod žena, a osteopenija kod muškaraca (Tabela 28).

Tabela 28 Učestalost osteopenije i osteoporoze kod muškaraca i žena

	Muškarci N (%)	Žene N (%)	<i>p</i>
starost	61.8±10.5	56.8±10.6	0.008
L1-L4			
Normalan	19 (50.0)	24 (31.6)	0.008
Osteopenija	18 (47.4)	33 (43.4)	
Osteoporoza	1 (2.6)	19 (25.0)	
Vrat femura			0.050
normalan	12 (30.8)	24 (31.6)	0.140
Osteopenija	27 (69.2)	42 (55.3)	
Osteoporoza	0 (0.0)	10 (13.2)	
Total femura			
normlan	24 (63.2)	34 (45.9)	0.140
Osteopenija	14 (36.8)	37 (50.0)	
Osteoporoza	0 (0.0)	3 (4.1)	
Totalni skelet			0.042
Normlan	17 (73.9)	33 (47.1)	0.042
Osteopenija	6 (26.1)	27 (38.6)	
Osteoporoza	0 (0.0)	10 (14.3)	
Osteopenija kičma/kuk	34 (87.2)	35 (44.3)	<0.001
Osteoporoza kičma/kuk	1 (2.6)	25 (31.6)	<0.001

4.4.5.1. Korelacije kod žena (BMD, starosti, menopauze, SH, veličine nadbubrega)

Kada se posmatraju žene u celoj grupi uočene su značajne negativne korelacije starosti sa BMD na nivou lumbalne kičme, vrata femura, totalnog femura i BMD celog skeleta. BMI pozitivno korelira sa BMD na svim delovima skeleta. Menopauza značajno negativno korelira sa BMD na nivou kičme, BMD vrata i totalnog femura i BMD totalnog

skeleta, dok značajno negativno korelira sa kategorijom T skora odnosno pojavom osteoporoze na svim delovima skeleta, osim na totalnom femuru i celom skeletu. SH-LDDST značajno negativno korelira sa BMD kičme, totalnog femura i celog skeleta, ne i sa BMD vrata femura, a kada se posmatra korelacija SH i pojava osteoporoze, pozitivna postoji na nivou kičme, totalnog femura i celog skeleta, ali ne i na nivou vrata butne kosti. Veličina nadbubrega značajno pozitivno korelira sa pojavom osteoporoze na total femuru i celom skeletu, odnosno na delovima skeleta gde postoji korelacija još samo sa SH-LDDST (tabela 29).

Tabela 29. Korelacije u grupi žena sa UAI i BAI: starost, menopauza, vitD, SH, veličina nadbubrega, koštana gustina

	starost	BMI	menopauza	vitD	LDDST SH	Veci BAI UAI
TotalL1L4.BMD	-0.384 <0.001	0.356 <0.001	-0.516 <0.001	0.071 0.542	-0.302 0.004	-0.008 0.940
TotL1.L4.T.score.kat	0.179 0.121	-0.504 <0.001	0.257 0.025	-0.128 0.308	0.346 0.003	0.048 0.678
VratFEM.BMD	-0.461 <0.001	0.471 <0.001	-0.518 <0.001	0.143 0.219	-0.190 0.073	0.054 0.610
VratFEM.Tsc.kateg	0.221 0.055	-0.364 <0.001	0.306 0.007	-0.204 0.103	0.203 0.083	0.073 0.533
TOTfemBMD	-0.394 <0.001	0.510 <0.001	-0.477 <0.001	0.155 0.182	-0.254 0.016	-0.059 0.580
TOTfem.T.kateg	0.195 0.095	-0.452 <0.001	0.177 0.132	-0.138 0.277	0.299 0.011	0.312 0.007
WB.BMD.TOTAL	-0.467 <0.001	0.241 <0.001	-0.530 <0.001	0.097 0.405	-0.314 0.003	-0.165 0.121
WB.BMD.Tsc.Kateg	0.205 0.089	-0.281 <0.001	0.033 0.789	-0.195 0.132	0.284 0.019	0.347 0.003
osteoporoz.kicma/kuk	0.126 0.270	-0.385 <0.001	-0.195 0.085	-0.148 0.232	0.357 0.001	-0.133 0.244
osteopenija kičma/kuk	0.105 0.356	-0.030 0.795	-0.160 0.160	0.012 0.920	0.196 0.087	0.169 0.137

Kod žena je uočena značajna negativna korelacija jutarnjeg kortizola sa BMD LS kičme i celog skeleta, negativna UFC sa BMD femura, totalnog kuka i celog skeleta, a pozitivna sa nastankom osteoporoze. DST-1mg kortizol značajno negativno korelira sa BMD LS kičme, totalnog femura i celog skeleta i pozitivno sa nastankom osteoporoze. LDDST kortizol negativno korelira sa BMD svih delova skeleta i pozitivno sa nastankom

osteoporozе. SH LDDST negativno korelira sa svim delovima skeleta izuzev vrata femura, a pozitivno sa nastankom osteoporozе (Tabela 30).

Tabela 30. Korelacija HHA osovine i parametara koštane gustine kod žena

	Kortizol 8h	Kortizol 24h	UFC	DST 1mg	LDDST	LDDST SH
L1-L4 BMD	-0.211 0.043	-0.128 0.234	-0.316 0.074	-0.219 0.037	-0.302 0.003	-0.302 0.004
L1-L4 T score kategorija	0.153 0.186	0.072 0.550	0.341 0.070	0.170 0.145	0.171 0.140	0.346 0.003
Vrat femura BMD	-0.139 0.185	-0.023 0.833	-0.540 0.001	-0.167 0.113	-0.215 0.040	-0.190 0.073
Vrat femura T score kategorija	0.065 0.578	-0.063 0.598	0.468 0.010	0.190 0.102	0.224 0.052	0.203 0.083
Total femura BMD	-0.147 0.162	-0.067 0.532	-0.472 0.006	-0.251 0.017	-0.280 0.007	-0.254 0.016
Total femura T score kategorija	0.118 0.316	-0.011 0.930	0.482 0.008	0.380 0.001	0.350 0.002	0.299 0.011
Total BMD	-0.289 0.006	-0.241 0.026	-0.377 0.036	-0.267 0.011	-0.322 0.002	-0.314 0.003
Total BMD T score kategorija	0.174 0.150	0.171 0.170	0.478 0.012	0.306 0.010	0.230 0.056	0.284 0.019
Osteoporozа Kičma i kuk	0.033 0.770	0.003 0.982	0.535 0.003	0.285 0.011	0.248 0.027	0.357 0.001

Prediktori nižeg BMD na nivou kičme, vrata femura i celog tela kod žena

Da bi smo ocenili prediktivnu moć skupa nezavisnih promenljivih (starost, menopauza i SH-LDDST) na određeni deo skeleta, primenili smo standardnu višestruku regresiju. Statistički značajani prediktori sniženja L1-L4 BMD su menopauza i SH-LDDST koji objašnjavaju 31% varijanse sniženja BMD, pri čemu menopauza najviše doprinosi sniženju L1-L4 BMD (tabela 31).

Tabela 31. Multivarijantna linearna višestruka regresija: zavisna varijabla L1-L4 BMD

	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	<i>P</i>
	B	Std. Error	Beta	
Prediktori	0.723	0.042		0.000
$R^2=0.31$ menopauza	0.161	0.030	0.479	<0.001
SH-LDDST	-0.074	0.033	-0.204	0.027

Kada se radi o vratu femura menopauza predstavlja statistički značajan prediktor i zajedno sa starošću objašnjava 29 % varijanse sniženog BMD vrata femura (tabela 32).

Tabela 32. Multivarijantna linearna višestruka regresija: zavisna varijabla BMD vrata femura

	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	<i>p</i>
	B	Std. Error	Beta	
Prediktori	0.746	0.132		0.000
$R^2=0.29$ menopauza	0.099	0.039	-0.343	0.013
starost	-0.003	0.002	-0.231	0.091

Linearna višestruka regresija je pokazala da je menopauza statistički značajan prediktor sniženog BMD totalnog femura (tabela 32), a da su menopauza i SH-LDDST statistički značajni prediktori sniženog BMD celog skeleta. Menopauza najviše doprinosi sniženju BMD totalnog skeleta (tabela 33).

Tabela 33. Multivarijantna linearna višestruka regresija: zavisna varijabla BMD totalnog femura

	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	<i>p</i>
	B	Std. Error	Beta	
Prediktori	0.691	0.042		0.000
$R^2=0.25$ Menopauza	0.142	0.031	0.440	<0.001
SH-LDDST	-0.055	0.033	-0.150	0.100

Tabela 34 Multivarijantna Linearna višestruka regresija: zavisna varijabla BMD totalnog skeleta

		Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	<i>p</i>
		B	Std. Error	Beta	
R ² =0.30	Prediktori	0.911	0.036		0.000
	menopauza	0.128	0.026	0.463	<0.001
	SH-LDDST	-0.062	0.028	-0.204	0.031

Kako bi se ocenio uticaj više faktora (starost, BMI, menopauza, vitD, SH-LDDST) na nastanak osteoporoze kičme i kuka (T score < -2.5) sprovedi smo multivarijantnu logističku regresionu analizu. Kao nezavisni prediktor nastanka osteoporoze na nivou kičme i kuka ostaju SH-LDDST (OR=5.77, 95% CI 1.423-23.426, *p*=0.014) i BMI. Količnik verovatnoće 5.77 ukazuje da pacijenti sa SH imaju skoro 6 puta veći rizik za razvoj osteoporoze kičme i kuka (tabela 34).

Tabela 35. Multivarijantna logistička regresiona analiza, varijabla osteoporoza kičme i kuka

	B	S.E.	Wald	<i>p</i>	OR (Odds Ratio)	CI 95%	
						Donja granica	Gornja granica
starost	-0.025	0.042	0.364	0.546	0.974	0.898	1.059
menopauza	-19.924	16666.537	0.000	0.999	0.000	0.000	
vitD	0.012	0.018	0.465	0.495	1.013	0.977	1.049
SH-LDDST	1.753	0.714	6.023	0.014	5.775	1.423	23.426
BMI	0.204	0.069	6.023	0.003	1.226	1.071	1.405
Konstanta	-6.010	1.940	9.600	0.002	0.002		

Kada posmatramo markere koštanog prometa, nije nađena značajna korelacija između beta cross laps, osteokalcina i parametara HHA osovine izuzev pozitivne korelacije betacrosslaps i LDDST kortizola (tabela 36) Beta cross laps i osteocalcin negativno koreliraju sa BMD na nivou kičme, vrata i total femura i celog skeleta. Nivo vitamina D negativno korelira sa SH-DST1mg.

Table 36 Korelacija kkoštanih markera, PTH i vitD sa parametrima HHA i BMD skeleta

	Osteocalcin	Betacross	vitD	PTH
L1L4.BMD	-0.358 0.001	-0.343 0.002	0.071 0.542	-0.011 0.917
VratFEM.BMD	-0.371 0.001	-0.338 0.002	0.143 0.219	-0.077 0.474
TOTfemBMD	-0.397 0.000	-0.344 0.002	0.155 0.182	-0.073 0.500
WB.BMD total	-0.335 0.002	-0.371 0.001	0.097 0.405	-0.120 0.265
Osteoporoza kicma.i.vrat	-0.097 0.425	-0.171 0.156	0.148 0.232	0.017 0.884
Kortizol DST1mg	0.108 0.300	0.068 0.517	-0.135 0.225	0.080 0.428
Kortizol LDDST	0.130 0.210	0.220 0.032	-0.168 0.126	0.073 0.468
SH DST1 mg	0.033 0.749	0.027 0.794	-0.263 0.016	0.048 0.638
SH LDDST	0.089 0.394	0.091 0.386	-0.203 0.068	0.092 0.367

Korelacija parametara koštane gustine i polimorfizama GR kod žena

Nije uočena značajna povezanost polimorfizama GR sa BMD i nastankom osteoporoze kod žena (Tabela 37). Logističkom regresijom polimorfizmi GR nisu imali značajan prediktivni efekat na smanjenje koštane gustine ni jednog dela skeleta. Nosioci sva tri N363S polimorfizma AG su bile žene u postmenopauzi i sve tri su imale normalnu koštanu gustinu na nivou kičme i kuka (nisu imale ni osteopeniju). Jedna je imala BAI, prisutan SH, bila je heterozigot GC BCLI, WT Er22/23EK i WT A3669G u menopauzi je bila 24 god, a BMI je bio 39kg/m². Druge dve žene su imale UAI, nisu imale SH, jedna od njih je bila heterozigot GC za BCLI uz WT ER22/23EK i WT A3669G sa trajanjem menopauze 7 god i BMI 32kg/m², a druga je bila nosilac WT za ostala tri polimorfizama BCLI, ER22/23EK i A3669G i trajanjem menopauze 7 godina, BMI 41kg/m².

Table 37 Korelacija polimorfizma i parametara koštane gustine kod žena

	BCL I	N363S	ER22/23EK	A3669G
L1-L4 BMD	-0.121 0.280	0.119 0.290	-0.056 0.619	-0.055 0.626
L1- L4 T score kategorija	0.029 0.814	-0.269 0.026	-0.151 0.216	-0.060 0.627
Vrat femura BMD	-0.157 0.161	0.122 0.276	-0.040 0.721	-0.009 0.937
Vrat femura T score kategorija	0.081 0.508	-0.226 0.061	-0.095 0.437	-0.055 0.653
Total femura BMD	-0.108 0.339	0.112 0.318	-0.080 0.479	-0.003 0.980
Total femura T kategorija	0.039 0.756	-0.093 0.455	-0.090 0.468	0.062 0.619
Total WB BMD	-0.060 0.597	0.031 0.786	-0.064 0.573	-0.016 0.887
Total WB T score kategorija	0.060 0.639	-0.035 0.786	-0.064 0.616	-0.137 0.281
Osteoporozna kičma i vrat	-0.198 0.096	0.147 0.216	0.124 0.299	0.225 0.058

Karakteristike koštanih parametara žena u zavisnosti od prisustva SH

Žene sa SH imaju niži BMD na nivou LS kičme, totalnog kuka, celog skeleta. Žene koje nemaju SH imaju češće osteopeniju, a one sa SH značajno češće osteoporozu. Iako su starije sa češćom učestalosti menopauze, nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na one bez SH. Nije bilo razlike u učestalosti polimorfizma GR između grupa. Pacijentkinje sa SH su imale statistički značajno veći adenom i češće BAI u odnosu na pacijentkinje bez SH (Tab 38).

Tabela 38 oređenje žena u zavisnosti od prisustva SH-DEX I

	SH-	SH+	<i>p</i>
	Mean± SD	Mean± SD	
L1L4.BMD	0.93±0.13	0.83±0.15	0.005
Vrat femura BMD	0.72±0.11	0.66±0.12	0.069
Total femura BMD	0.87±0.13	0.79±0.13	0.022
WB.BMD total	1.07±0.11	0.99±0.11	0.006
Osteoporozna kičma i kuk, %	22.0	61.1	0.002
Osteopenija kičma kuk, %	81.2	18.8	
osteocalcin	18.85±10.03	20.42±9.41	0.539
betacross	0.65±1.77	0.54±0.34	0.775
vitD	38.25±19.16	29.82±15.02	0.089
PTH	38.36±22.85	38.30±12.45	0.990
starost	55.8±10.7	60.3±9.9	0.084
Menopauza, %	70.0	90.5	0.054
Trajanje menopauze	12.7±7.5	14.9±10.7	0.233
Veličina većeg BAI i UAI	28.5±10.6	37.3±8.4	0.001
UAI, %	72.3	38.1	0.003
BAI, %	27.7	61.9	

4.4.5.2 Korelacije BMD, starosti, SH i veličine nadbubrega kod muškaraca u celoj grupi

U celoj grupi, kod muškaraca je uočena značajna negativna korelacija starosti i BMD lumbalnog dela kičme, ne i drugih delova skeleta i negativna korelacija testosterona i pojave osteopenije na nivou vrata femura. Nisu uočene druge statistički značajne korelacije koštane gustine sa starošću, testosteronom, sniženim DHEAS, veličinom nadbubrega (tabela 39). Muškarci sa SH su u odnosu na one bez SH imali niži BMD, niži Z i T score na svakom merenom mestu skeleta, međutim bez statističke značajnosti.

Tabela 39 Korelacija BMD, starosti, DHEAS, vitD, testosterona i SH-DEX I

	starost	DHEAS snižen	Vit D	Testosteron	SH DEX I	Veličina nadbubrega
L1L4	-0.312	0.040	-0.061	0.129	-0.229	-0.004
BMD	0.044	0.803	0.776	0.417	0.144	0.980
L1-L4	0.222	0.015	-0.075	0.083	-0.251	0.049
T score	0.181	0.929	0.976	0.622	0.128	0.771
L1-L4 Tsc kat	-0.116	-0.162	0.106	-0.099	0.184	-0.025
	0.490	0.330	0.640	0.522	0.270	0.880
Vrat femura	-0.021	-0.200	-0.173	0.248	-0.121	-0.118
BMD	0.897	0.209	0.419	0.113	0.444	0.458
Vrat femura	-0.149	-0.211	0.009	0.131	-0.097	-0.176
T score	0.380	0.210	0.970	0.438	0.567	0.297
Vrat femura T	0.022	0.112	0.032	-0.415	0.122	0.020
score kateg	0.893	0.504	0.885	0.009	0.458	0.905
Total femura	-0.055	-0.254	-0.369	0.220	-0.156	-0.149
BMD	0.731	0.109	0.076	0.162	0.325	0.345
Total femura	-0.057	-0.256	-0.279	0.163	-0.121	-0.169
T score	0.731	0.121	0.208	0.327	0.468	0.311
Total femura	0.052	0.215	0.229	-0.152	0.059	0.055
T score kateg	0.755	0.194	0.304	0.363	0.724	0.744
WB Total	-0.118	0.082	-0.225	0.073	0.013	0.043
BMD	0.474	0.623	0.290	0.659	0.939	0.794
WB Total	-0.056	0.097	-0.097	0.100	-0.217	-0.184
T score	0.800	0.661	0.741	0.651	0.321	0.401
Osteopenija	-0.082	-0.064	-0.233	0.102	-0.179	0.003
kičma/kuk	0.620	0.703	0.285	0.535	0.275	0.984

Prediktori nižeg BMD na nivou kičme, kuka i celog tela i nastanka osteopenije kod muškaraca

Standardnom višestrukom regresijom i binarnom logističkom regresijom ispitivan je uticaj starosti, nivoa testosterona i vitamina D i prisustva SH-DEX I na sniženje BMD i nastanak osteopenije. Nisu nađeni statistički značajni prediktori.

Korelacija parametara koštane gustine i polimorfizama GR kod muškaraca

Nije uočena značajna povezanost polimorfizama GR sa BMD i nastankom osteoporoze kod muškaraca. Logističkom regresijom polimorfizmi GR nisu imali značajan prediktivni efekat na smanjenje koštane gustine ni jednog dela skeleta. Osteoporozi je imao samo jedan muškarac koji je bio nosilac heterozigotnog GC polimorfizma BCII, WT N363S, WT ER22/23EK i WT A3669G, sa UAI, bez SH.

Korelacija koštanih parametara, parametara HHA osovine kod muškaraca

Muškarci sa višim ponoćnim kortizolom su imali niži BMD i češće osteopeniju lumbalne kičme. Viši jutarnji kortizol pozitivno korelira sa nastankom osteopenije na Total femuru., a viši UFC pozitivno sa nastankom osteopenije totalnog skeleta (Tabela 40).

Tabela 40 Korelacija HHA osovine i parametara koštane gustine kod muškaraca

	Kortizol 8h	Kortizol 24h	UFC	DST1mg	LDDST	LDDST SH
L1-L4 BMD	-0.126 0.428	-0.324 0.039	0.300 0.186	0.116 0.464	0.000 0.999	-0.229 0.144
L1-L4 T score kategorija	0.063 0.706	0.363 0.027	0.520 0.022	0.114 0.495	-0.092 0.583	-0.251 0.128
Vrat femura BMD	-0.272 0.081	-0.128 0.424	0.193 0.402	-0.003 0.984	-0.039 0.806	-0.121 0.444
Vrat femura T score kategorija	0.324 0.051	0.152 0.375	0.043 0.860	0.002 0.992	0.038 0.822	-0.097 0.567
Total femura BMD	-0.246 0.116	-0.030 0.850	0.195 0.397	0.072 0.650	-0.055 0.729	-0.156 0.325
Total femura T score kategorija	0.324 0.047	0.006 0.973	0.127 0.604	0.016 0.925	0.059 0.725	-0.121 0.468
Total BMD	-0.180 0.272	-0.083 0.615	0.409 0.074	0.028 0.867	0.041 0.805	0.013 0.939
Total BMD T score kategorija	0.213 0.328	0.216 0.322	0.671 0.006	0.092 0.678	0.090 0.683	-0.217 0.321
Osteopenija Kičma i kuk	0.157 0.341	0.039 0.816	0.172 0.481	0.034 0.837	0.014 0.934	0.179 0.275

Nije nađena značajna korelacija između beta cross laps, osteokalcina i parametara HHA osovine. Beta cross laps negativno korelira sa T skorom na nivou lumbalne kičme ($\rho=-0.333$, $p=0.047$). Nije uočena povezanost sa drugim delovima skeleta.

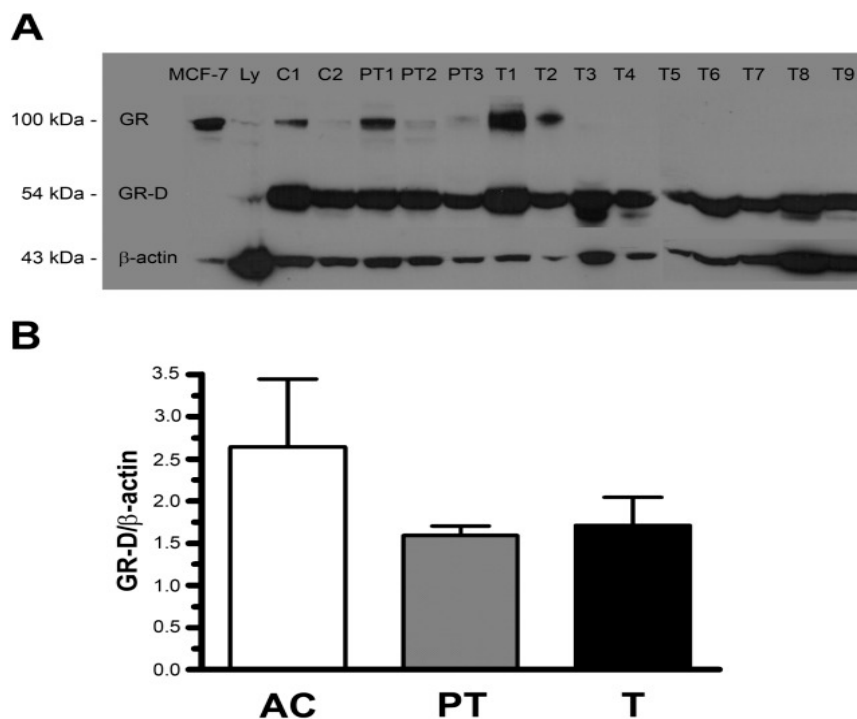
Iako su muškarci sa SH-DEX I imali niži BMD i veći adenom nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na SH negativne muškarce. Svi muškarci (100%) sa SH su imali osteopeniju, dok je bez SH 84.4% imalo osteopeniju (Tabela 41).

Tabela 41 Poređenje muškaraca u zavisnosti od prisustva SH-DEX I

	SH- Mean± SD	SH+ Mean± SD	<i>p</i>
L1L4.BMD	1.00±0.14	0.92±0.10	0.183
Vrat femura BMD	0.78±0.10	0.74±0.12	0.394
Total femura BMD	0.95±0.10	0.91±0.09	0.314
WB.BMD total	1.15±0.08	1.16±0.07	0.885
Osteopenija kičma/kuk, %	84.4	100.0	0.263
osteocalcin	16.77±6.32	13.98±9.20	0.289
betacross	0.38±0.17	0.38±0.21	0.932
vitD	36.36±12.37	44.76±22.26	0.229
PTH	34.7±22.2	36.6±13.3	0.807
starost	61.9±11.5	61.5±4.9	0.899
Veličina većeg BAI i UAI	31.2±13.3	35.1±14.5	0.263
UAI, %	78.4	88.9	0.476
BAI, %	21.6	11.1	

4.5. Western Blot analiza GR i Heat Shock proteina

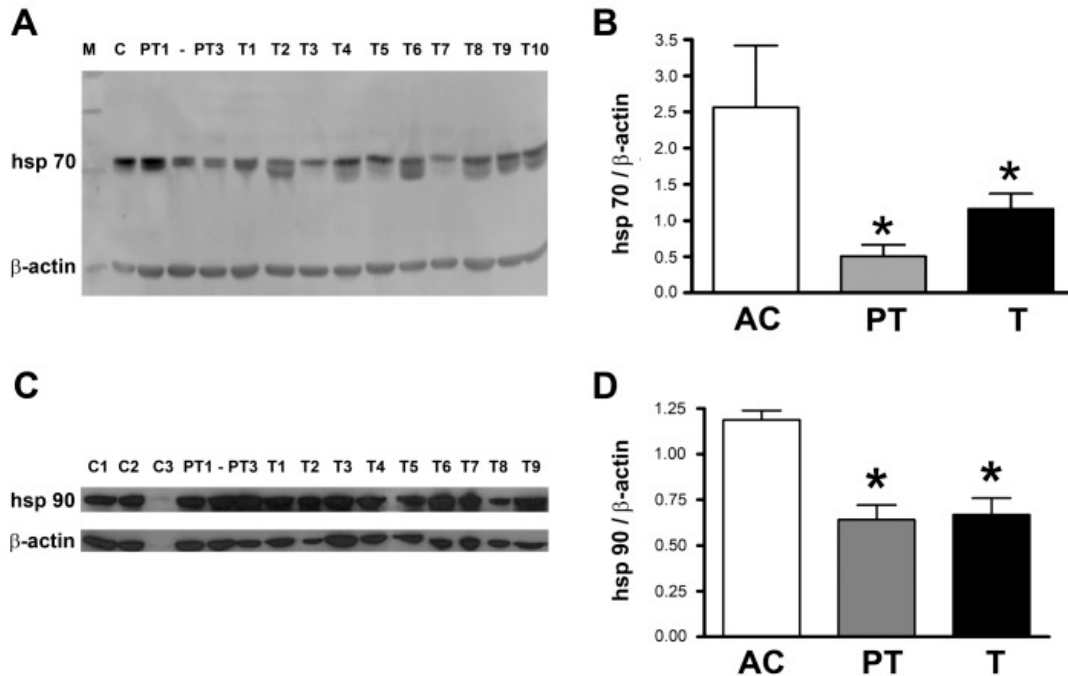
Western blot analiza izoformi GR u lizatima humanog normalnog adrenalnog koreteksa, peritumorskog i adenomatoznog tkiva je pokazala dominantnu i sličnu ekspresiju receptorskog proteina 53-56 kDa koji odgovara GR-D izoformi. U većini tumorskih uzoraka uočena je jedino izoforma GR-D, dok su druge N-terminalne izoforme GR detektovane samo u netumorskom tkivu.



Slika 7 Western blot analiza GR. (A) MCF-7 ćelije i humani limfociti (Ly) su korišćeni za pozitivne kontrole. Monoklonska anti-GR antitela koja prepoznaju α i β transkripcione izoforme GR, pokazuju prisustvo traka oko 100 kDa; dominantno 53-56 kDa receptorsku izoformu koja odgovara GR-D koja je detektovana u normalnom adrenalnom korteksu (AC) i peritumorskom tkivu (PT). U većini tumorskih uzoraka (T), GR-D je jedina izoforma. (B) Ekspresija GR-D je slična u normalnom adrenalnom korteksu, peritumorskom i tumorskom tkivu

Western blot analizom ćelijskog lizata za *heat shock* proteine, u tumorskom, peritumorskom i normalnom adrenokortikalnom tkivu detektovani su 73-kDa konstitutivni *heat shock cognate* protein (Hsc70) i Hsp90, dok je stresom indukovana izoforma molekulske težine 72-kDa Hsp70 ekspimirana samo u tumorskom tkivu. Ekspresija totalnog Hsp70 (dve proteinske izoforme) i Hsp90 u peritumorskom i tumorskom tkivu je bila redukovana u poređenju sa normalnim adrenalnim korteksom ($p \leq 0.01$).

Genotipovi GR ispitivanih tumorskih tkiva i odgovarajućih konstitutivnih DNK se nisu razlikovali



Slika 8 Western blot analiza ćelijskog lizata za *heat shock* proteine (A) Inducibilna izoforma Hsp70 (donja traka) je eksprimirana samo u tumorskom tkivu (T). (B) Ekspresija ukupnog Hsp70 u tumoru (suma dve proteinske izoforme) i peritumorskom tkivu (PT) je snižena u poređenju sa normalnim adrenalnim korteksom. (C) Ekspresija Hsp90 u normalnom adrenalnom korteksu, adenomatoznom i peritumorskom tkivu. (D) Relativna ekspresija Hsp90 je redukovana u adenoma i peritumorskom tkivu u poređenju sa normalnim adrenalnim korteksom ($p \leq 0.01$).

5.0. DISKUSIJA

5.1. Subklinički hiperkorticizam kod pacijenata sa adrenalnim incidentalom

Subklinički hiperkorticizam (SH) se definiše kao stanje izmenjene hipotalamo-hipofizno-adrenalne aktivnosti u odsustvu klasičnih kliničkih simptoma i znakova hiperkorticizma [150, 151]. Poslednjih godina je interesovanje za dijagnozu i terapiju SH postalo značajnije zbog uočene velike prevalencije. Procenjuje se da je učestalost SH 5-30% kod pacijenata sa adrenalnim incidentalomima [152]. S obzirom da su AI prisutni kod 4-7% odraslih, prevalencija SH se procenjuje između 0.2 i 2% populacije [151]. U upotrebi je više termina, ranije “preklinički” i “subklinički Kušingov sy.”, a obzirom da je progresija u manifestni Kušingov sy. vrlo retka [4] predložen je naziv “subklinički hiperkorticizam”, a po novijim preporukama “moguća autonomna sekrecija kortizola” [143]. U ovom radu koristi se termin “subklinički hiperkorticizam” s obzirom da se široko upotrebljava u najnovijoj stručnoj literaturi, a po našem mišljenju koje je u saglasnosti sa drugim autorima [153] najprikladnije opisuje ovo stanje.

Iako je definicija SH prihvaćena, ne postoji konsenzus o kliničkim i biohemijskim kriterijumima za postavljanje dijagnoze. Kod pacijenta sa AI postoje značajne međusobne razlike u nivou sekrecije kortizola, od normalnih do jasno povišenih, koja može biti kontinuirana i periodična, a takođe postoje i značajne intraindividualne varijacije sekrecije [150]. Osim toga, postoje interindividualne i tkivno specifične razlike u glukokortikoidnoj senzitivnosti [95, 154]. Druge bolesti kao što su gojaznost i DM2 i brojni lekovi mogu uticati na rezultat deksametazon supresivnog testa. Ovi razlozi uz različito definisane kriterijume za procenu sekrecije kortizola neminovno vode u greške pri selekciji nekih pacijenata i diskordantne rezultate o prevalenciji SH kod pacijenata sa AI.

Rezultati naše studije pokazuju značajnu razliku u biohemijskim markerima hiperkorticizma između pacijenata sa UAI i BAI. Pacijenti sa BAI imaju niže vrednosti ACTH i veće vrednosti kortizola nakon DST-1mg i nakon LDDST. Takođe imaju više vrednosti UFC, ali nije dostignuta statistička značajnost. Ovi rezultati ukazuju na značajnije suprimovanu aktivnost HHA osovine usled veće autonomne produkcije kortizola kod pacijenata sa BAI. Kod pacijenata sa AI opisani su različiti poremećaji u HHA aktivnosti koji upućuju na SH. Kod značajnog broja pacijenata postojao je izostanak supresije kortizola nakon 1mg ili 3mg prekonocnog DST i dvodnevnog LDDST [155], povišen 24h

UFC [156], gubitak diurnalnog ritma kortizola [156, 157], izmenjen odgovor kortizola i ACTH na CRH stimulaciju [158, 159], nizak jutarnji ACTH [160] i nizak DHEAS [161, 162].

Iako se za dijagnozu SH najčešće koristi DST-1mg, nisu usaglašena mišljenja o *cut off* vrednostima za supresiju kortizola u testu. Do sada je publikovano više vodiča sa različitim preporukama [163, 164, 165, 166, 167]. Od strane pojedinih asocijacija kao vrednost koja ukazuje na normalnu supresiju kortizola predložena je vrednost od 138 nmol/l koja ima visoku specifičnost, dok je po drugim stanovištima to supresija ispod 50nmol/l [165], a po nekim autorima koji su procenjivali odgovor u kontrolnoj grupi zdravih osoba, nivo kortizola ispod 30.1nmol/l se smatra normalnim odgovorom [168]. Spuštanjem granice za normalan odgovor kortizola svakako se dobija na senzitivnosti (>98%), posebno kod pacijenata sa blagim hiperkorticizmom, a gubi na specifičnosti testa (≤80%), odnosno raste procenat lažno pozitivnih dijagnoza SH, poput brojnih stanja pseudo-Kušingovog sy. kao što su alkoholizam, psihijatrijski poremećaji, DM2, akutne i hronične bolesti [169]. Mišljenje pojedinih autora je da *cutoff* vrednost od 83 nmol/l nakon DST-1mg predstavlja najbolji kompromis između senzitivnosti i specifičnosti za screening SH [170]. Naši rezultati pokazuju visoku učestalost neadekvatne supresije nakon DST 1mg, a još značajnije nakon LDDST, sa značajno većom učestalošću izostanka supresije kod pacijenata sa BAI, nezavisno od primenjenih kriterijuma. Bez obzira na korišćenu *cut off* vrednost za supresiju kortizola, značajan procenat pacijenata nije imao supresiju.

Prema nedavnim preporukama, za pacijente bez kliničkih elemenata hiperkorticizma i AI, nivo DST 1mg kortizola >140nmol/l označava postojanje “autonomne sekrecije kortizola”, nivo kortizola od 51 do 140 nmol/l predstavlja “moguću autonomnu sekreciju kortizola”, odnosno SH, dok supresija ≤ 50 nmol/l isključuje eksces kortizola [143]. Dvodnevni niskodozni DST takođe služi za dijagnozu SH bez prednosti u odnosu na DST 1mg, izuzev što ima veću preciznost isključenja pseudo-Kušingovog sy. [171]. S obzirom da nije pogodan za izvođenje, primenjuje se kao konfirmativni test sa istim *cut off* kriterijumima kao DST 1mg. Kod naših pacijenata dijagnostički kriterijum za isključenje autonomne produkcije kortizola sa *cut off* vrednošću 50 nmol/l imalo je 63.5% pacijenata sa UAI i 38.3% pacijenata sa BAI. “Moguću autonomnu sekreciju kortizola” imalo je 28.8% pacijenata sa UAI i 51.1% pacijenata sa BAI, dok je autonomnu sekreciju kortizola imalo

7.7% pacijenata sa UAI i 10.6% sa BAI. Nakon LDDST adekvatnu supresiju kortizola imalo je 65.7% pacijenata sa UAI, a samo 40% sa BAI. Kada se razmatraju rezultati samo na osnovu DST testova sa vrednošću 50 nmol/l raste broj lažno pozitivnih dijagnoza SH, dok je sa vrednošću 140nmol/l začajno potcenjen broj pacijenata sa SH.

Drugi parametri HHA osovine pokazuju značajno manju prediktivnu moć. Nekoliko studija kod pacijenata sa AI je pokazalo povišene vrednosti UFC kod više od 25% pacijenata [156]. Međutim, UFC ne može pouzdano da pokaže diskretno povećane vrednosti kortizola u SH. Gubitak dnevnog ritma kortizola, odnosno povišene vrednosti ponoćnog kortizola su uočene u više studija sa AI i SH [150]. Iako je ponoćni kortizol značajan za dijagnozu SH (22), zahteva hospitalizaciju pacijenta, zbog čega praktično predstavlja konfirmativni test. Povišen serumski ili salivarni kortizol je pokazao prihvatljivu pouzdanost u predikciji postoperativne pojave hipokorticismusa (senzitivnost 64%, specifičnost 81%) što je indirektni pokazatelj adrenalne autonomije [170]. O potencijalnoj koristi ponoćnog salivarnog kortizola se raspravlja, s obzirom da je u nekim studijama pokazana niska senzitivnost, a u drugim da osobe sa povremeno ili stalno povišenim vrednostima u stvari imaju SH [172, 173].

Nizak nivo ACTH je čest nalaz kod pacijenata sa AI. Dok je nivo ACTH generalno suprimovan kod pacijenata sa manifestnim ACTH nezavisnim hiperkorticismom (14), kod pacijenata sa SH pokazuje vrednosti od suprimovanih do normalnih, zbog čega je senzitivnost za dijagnozu SH niska 41-66% [174]. Generalno ACTH nivo iznad 20pg/ml ukazuje na ACTH zavisni, dok ACTH ispod 10pg/ml ukazuje na ACTH nezavisni uzrok SH. Određivanje ACTH nakon CRH stimulacije ne pokazuje prednost u dijagnostici SH, međutim, upravo u situaciji intermedijernih vrednosti ACTH, ovaj test može pomoći u razlikovanju od ACTH zavisnog hiperkorticismusa, posebno kod pacijenata sa unilateralnim ili bilateralnim AI. CRH stimulisan skok ACTH ispod 30pg/ml, praktično isključuje ACTH zavisni SH [175]. Nizak serumski nivo DHEAS je najčešće registrovana promena HHA osovine kod pacijenata sa AI [176]. Iako može reflektovati autonomnu ACTH nezavisnu hipersekreciju kortizola, podaci ne pokazuju da je nizak DHEAS pouzdan pokazatelj SH, s obzirom da nivo DHEAS opada sa godinama [177].

U cilju poboljšanja specifičnosti, a bez uticaja na senzitivnost dijagnostičkih testova, predložena je kombinacija različitih parametara aktivnosti HHA osovine kao što su povišen

UFC, kortizol nakon DST-1mg, povišen ponoćni kortizol, suprimovan bazalni ACTH ili nizak odgovor ACTH na CRH stimulaciju [170]. Da bi se pojednostavilo, za dijagnostikovanje SH se predlaže korišćenje najmanje dva izmenjena parametra HHA. U slučaju intermedijernih vrednosti kortizola nakon DST 1mg (50-140nmol), da bi se povećala senzitivnost dodaju se testovi sa manjom prediktivnom vrednosti (ACTH, UFC, ponoćni kortizol, DHEAS) [167].

U našoj studiji u ukupnom broju pacijenata prevalencija SH iznosila je 20%, što je u skladu sa rezultatima nedavno objavljenih studija u kojima se prevalencija procenjuje između 19.2 i 23.9% [178]. Kada smo evaluirali SH na osnovu rezultata kortizola nakon DST 1mg u kombinaciji sa bar jednim abnormalnim hormonskim rezultatom (ACTH, ponoćni kortizol i UFC), prevalencija SH je imala trend veće učestalosti kod pacijenata sa BAI u odnosu na UAI (29.8 vs 16.3). Međutim, kada smo umesto DST 1mg kortizola uzeli za kriterijum kortizol nakon LDDST, razlika između pacijenata sa BAI i UAI je dostigla statističku značajnost (31.1% vs 15.2%), što je očekivano s obzirom na veću senzitivnost LDDST kao konfirmativnog testa.

Meta analiza, objavljena ove godine, je pokazala da je do sada objavljeno samo šest studija koje su poredile prevalenciju SH kod pacijenata sa UAI i BAI [178], od kojih su tri pokazale razliku, a ostale nisu. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima studija koje su koristile slične kriterijume za definisanje SH. Studije koje su koristile LDDST kao glavni dijagnostički kriterijum, Vassilatou i sar. (35.1 vs 17.9) [179] i Vassiliadi i sar. (41.5 vs 12.2) [180] su našle značajno veću prevalenciju SH kod pacijenata sa BAI, dok studija Androulalis i sar. ovim testom nije našla razliku [181]. Naši rezultati bazirani na DST 1mg kortizolu su takođe u skladu sa druge dve studije Yener i sar. [182] i Morelli i sar. [183] koje nisu našle značajnu razliku korišćenjem DST 1mg kortizola kao glavnog kriterijuma, dok su Olsen i sar. pokazali postojanje značajne razlike ovim testom kada se koristi kao glavni kriterijum (42.0% vs 23.0%) [184]. Ove razlike se bar delimično mogu objasniti korišćenjem različitih biohemijskih kriterijuma sa dijagnostikovanjem SH.

U našoj studiji nivo ACTH je bio nižih vrednosti kod pacijenata sa BAI. Kod pacijenata sa AI sekrecija kortizola varira od normalnih do jasno povišenih vrednosti. Stoga je očekivano da koncentracija ACTH, prateći nivo kortizola, bude u rasponu suprimovanih i nesuprimovanih vrednosti, reflektujući nivo autonomne produkcije kortizola. Neke od

pomenutih studija su kao i naša, pokazale više vrednosti ACTH kod pacijenata sa UAI u odnosu na BAI [179, 180, 181], dok druge to nisu [183, 184]. Studije koje su prikazale rezultate ponoćnog kortizola i UFC nisu našle značajnu razliku između UAI i BAI [179, 180] što je u skladu sa našim nalazom.

U pojedinim studijama, ispitivana je povezanost mase adrenalnog tumora i produkcije kortizola. U našoj studiji dimenzija većeg bilateralnog adenoma je bila veća, ali ne značajno u odnosu na dimenziju unilateralnog adenoma, ali je postojala veća prevalencija SH kod pacijenata sa BAI. Ovakav nalaz je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima Vasilatou i sar. [179]. U drugim studijama, pokazano je da su i dimenzije i prevalencija SH slični kod pacijenata sa UAI i BAI [181] ili postojanje slične prevalencije SH uz veću tumorsku masu koju su međutim računali zbirom najvećih dijametara bilateralnih tumora [183]. Kod naših pacijenata uočena je povezanost veličine adrenalnog tumora sa parametrima izmenjene aktivnosti HHA osovine i nastanka SH. Ovakav nalaz perzistira kada se analiziraju odvojeno pacijenti sa UAI od pacijenata sa BAI. Multivarijantna logistička regresija je pokazala da je veličina nadbubrega nezavisni prognostički faktor nastanka SH. To pokazuje da je neophodna kritična masa adrenalnog tumora koja bi uslovlila produkciju dovoljne količine kortizola za indukovanje SH. Druge studije Vassiliadi i sar. [180, 185] i Olsen i sar. [184] su takođe pokazale pozitivnu korelaciju adrenalne mase i verovatnoće pojave SH. Smatra se da komparacija adrenalne mase UAI sa veličinom većeg bilateralnog AI, pokazuje bolju procenu efekta blagog kortizolskog ekscesa u odnosu na sabranu veličinu bilateralnih adenoma, jer je pokazano da kod BAI veći adenom najviše participira u hipersekreciji kortizola [179]. Ovo mišljenje je podržano studijom u kojoj je unilateralna hipersekrecija kortizola detektovana kateterizacijom kod pet od sedam pacijenata sa BAI i SH, a kod četiri od ovih pet pacijenata to je bila veća adrenalna masa [186].

Međutim, moguće je da se radi o različitoj etiopatogenezi tumorigeneze unilateralnih i bilateralnih AI. U grupi sa BAI prisustvo ACTH nezavisne makronodularne hiperplazije se ne može sa sigurnošću isključiti vizualizacionim metodama. Osim toga izvestan broj pacijenata se inicijalno prezentuje unilateralnim tumorom, a kasnije dolazi do nastanka i kontralateralnog tumora nadbubrega. Pojedine studije ukazuju da polimorfizam GR može imati ulogu u nastanku adrenalnih tumora.

5.2. Funkcionalni polimorfizmi GR i adenalni tumori

Majnik i sar. su pokazali da je N363S varijanta polimorfizma gena za GR češće zastupljena kod pacijenata sa BAI u odnosu na UAI, ali nisu uočili razliku u sekreciji hormona [187]. Naši rezultati pokazuju da u odnosu na kontrolnu grupu zdrave populacije, N363S polimorfizam ne pokazuje povezanost sa pojavom tumora nadbubrega, već da su duži alel BclI i kraći alel 9 β A3669G polimorfizma povezani sa predispozicijom za nastanak unilateralnih AI i sniženu senzitivnost na GC. Nosioци dužeg C alela BclI polimorfizma imaju skoro dva puta veći, a homozigoti za duži C alel skoro četiri puta veći rizik za nastanak unilateralnog adrenalnog tumora. Heterozigoti, nosioци kraćeg alela 9 β polimorfizma GR imaju tri puta, a homozigoti četiri puta veći rizik za nastanak unilateralnog adrenalnog tumora. Pokazali smo da nosioци ER22/23EK alela imaju 13 puta veći rizik za nastanak adrenalnih tumora. Ovaj polimorfizam uzrokuje redukciju ekspresije GR α translacione izoforme i pokazana je manja supresibilnost kortizola u DST 1mg, što ukazuje na relativnu glukokortikoidnu rezistenciju [95]. Do sada nije opisana povezanost Er22/23EK polimorfizma BclI sa predispozicijom za adrenalne tumore.

Iako je kasnih sedamdesetih godina prošlog veka bilo evidentno da GC imaju efekat na adrenalnu žlezdu pacova, [188] odnosno da sam adrenalni korteks predstavlja ciljno tkivo za glukokortikoide, tek nedavno je dokazana ekspresija GR u humanom adrenalnom korteksu [189, 190] i adrenalnim tumorima. [191, 192.) Upotrebom RT-PCR, Western blot i imunohistohemijske analize Paust i sar. su 2006 god. prvi put pokazali prisustvo GR mRNA u adrenalnom korteksu, što je potvrđeno na proteinskom nivou. Imunohistohemija je pokazala slabije bojenje GR u adrenalnoj meduli, ali izrazito u zoni retikularis ukazujući na ulogu u androgenoj biosintezi [190]. Osamdesetih godina pokazana je ekspresija GR u humanoј adrenalnoj meduli [193] povećana ekspresija GR kod kortizol sekretujućeg adenoma i adrenokortikalnog karcinoma [194] što je potvrđeno nedavnim studijama [192]. Studija Bourdeau i sar. je pokazala ekspresiju GR mRNA u PPNAD tkivu i to u kortikalnim ćelijama nodula koji su glavno mesto steroidogeneze. Međutim, okolni korteks nije pokazao pozitivnost. U normalnim adrenokortikalnim ćelijama, ekspresija GR je bila slaba, dominantna u zoni fascikulati, dok je kod adrenalnog adenoma i tkiva AIMAH bila jedva primetna [195]. Nedavno je učinjeno i ispitivanje ekspresije GR α i GR β mRNA i

pokazano je da su obe izoforme značajno povećane kod kortizol produkujícíeg adenoma ali ne i nefunkcijskog adenoma u odnosu na kontrolno normalno adrenokortikalno tkivo. Pokazana je jaka imunoreaktivnost na anti-GR α antitelo nukleusa kod nefunkcijskog i kortizol produkujícíeg adenoma, dok je manja zapažena u nekim nukleusima normalnih adrenokortikalnih ćelija. GR β imunoreaktivnost je bila odsutna u normalnom tkivu i nefunkcijskim adenomima, dok je jaka citoplazmatska i nuklearna imunopozitivnost nađena kod kortizol produkujícíeg adenoma. Ova ekspresija GR α i GR β u kortizol produkujícíem adenomu ukazuje na moguću ulogu u patofiziologiji ovih tumora [196].

U našoj studiji smo pokazali da pored brojnih N-terminalnih izoformi GR normalan humani adrenalni korteks, dominantno eksprimira GR-D izoformu. Međutim, većinu tumorskih uzoraka karakteriše odsustvo drugih receptorskih izoformi, izuzev GR-D što je praćeno smanjenom ekspresijom molekula šaperona. *In vitro*, izoforma GR α -D je lokalizovana u nukleusu vezana za GRE specifičnih ciljnih gena i nezavisno od prisustva ili odsustva liganda pokazuje slabu transkripcionu aktivnost u odnosu na GR α -A [197]. S obzirom da se GR α i GR β mRNA razlikuju samo na njihovim 3' krajevima, pretpostavka je da brojne N-terminalne izoforme postoje i za GR β [198]. Imunohistohemijskom analizom pokazana je u adenomskom tkivu smanjena imunoreaktivnost za glukokortikoidni receptor, kao i nukleusna lokalizacija GR β . Ovakav rezultat bi mogao da ukazuje na aktivnu ulogu GR β u smanjivanju GR α transkripcione aktivnosti [148]. Dominantna ekspresija GR-D izoforme u adenomima i smanjena ekspresija Hsp izgleda da je tkivno specifična i može biti odgovorna za fiziološku rezistenciju adrenalnog korteksa na GC. Stećena intraadenomatozna GC rezistencija može dovesti do disregulacije sinteze kortizola i tumorskog rasta istovremeno [148]. S obzirom da GR obezbeđuju *feedback* regulaciju adrenokortikalne steroidne produkcije [199], konstitutivno uslovljena smanjena senzitivnost HPA osovine dodatno modulira ove efekte [200]. Naši rezultati pokazuju tri nezavisna mehanizma GC rezistencije: konstitutivno redukovanu senzitivnost na GC, selektivnu ekspresiju izoforme GR-D i smanjenu sintezu Hsp [148]. Da li su ove varijante polimorfizma GR uključene u nastanak AI zahteva dalja istraživanja. Opisana je moguća uloga mutacije u genu za 21 hidroksilazu (CYP21) u patogenezi BAI i UAI [201]. Molekularne studije vezane za patogenezu sporadičnih kortizol sekretujućićh adrenalnih

tumora pokazuju različite poremećaje u ekspresiji specifične grupe gena uključenih u steroidogenezu [202].

5.3. Adrenalni incidentalomi i pridružene bolesti

Nakon prve studije Terzolo i sar. 2002 god [203], veliki broj studija je pokazao da pacijenti sa AI imaju veću prevalenciju dijabetesa, hipertenzije, gojaznosti i dislipidemije [203, 204, 205, 206, 207]. Pojedini autori naglašavaju da pacijenti sa AI imaju isuviše kriterijuma za MetS i da su AI praktično neprepoznata manifestacija MetS, ukazujući na značaj hiperinsulinemije kao glavnog proliferativnog faktora tumorskog rasta, bez uticaja na steroidogenezu [208]. Međutim, ove bolesti se sa visokom prevalencijom javljaju u opštoj populaciji. Gojaznost, pre svega visceralna ima glavnu ulogu u patofiziologiji insulinske rezistencije i posledičnih metaboličkih abnormalnosti [209, 210, 211]. U našoj populaciji pacijenata sa AI, pokazano je da gojazniji pacijenti, posebno sa abdominalnom gojaznosti (merenom obimom struka), imaju češće hipertenziju, viši sistolni i dijastolni pritisak, imaju češće DM2, dislipidemiju, izraženiju insulinsku rezistenciju i MetS. Porast insulinske rezistencije (HOMAIR) dovodi do porasta glikemije naše i u 120min OGTT, porasta TG i sniženja HDL. Kada se posmatra telesni sastav (meren DXA metodom), OS pokazuje kompatibilnost sa abdominalnom masnom masom, procentom abdominalnog masnog tkiva, ukupnom masnom masom i indeksom masne mase. Veća masa abdominalnog masnog tkiva (DXA) vezana je za pojavu hipertenzije, viši sistolni i značajnije dijastolni krvni pritisak, sa višom glikemijom i insulinemijom naše, hipertrigliceridemijom, izraženijom insulinskom rezistencijom i nastankom MetS kod naših pacijenata.

Dosadašnja ispitivanja pokazuju de su kod pacijenata sa SH najčešći metabolički i kardiovaskularni poremećaj DM2 i hipertenzija. Kako je uticaj manifestnog hiperkortizma na metabolički i kardiovaskularni sistem poznat, više autora je ispitivalo potencijalni značaj diskretne hipersekrecije kortizola koja može dovesti do dugoročnih komplikacija u smislu metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti (KVB) kao što su DM2, dislipidemija, hipertenzija, gojaznost i osteoporoza. U jednoj od prvih studija Tauchmanova i sar. su analizom 28 pacijenata sa SH pokazali prisustvo KVB (kardiomiopatija,

obstruktivna vaskularna bolest, aterosklerotski plakovi karotida) kod 64% pacijenata. [204]. Tek je studija sprovedena 2012 god, pokazala asocijaciju između SH and KVB [212]. Kod 348 pacijenata sa AI pokazan je progresivni porast prevalencije infarkta miokarda kod pacijenata sa SH (kod 2.9% afunkcionalnih i 11.9% sa intermedijernih i 26.3% sa SH). Prevalencija koronarne bolesti kod intermedijarnog fenotipa je bila (OR 4.1, 95% CI 1.5–11.4, P=0.007) a kod pacijenata sa SH (OR 6.1, 95% CI 1.4–26.5, P=0.016). Tokom praćenja, pacijenti sa SH i pogoršanjem hipersekrecije su pokazali veću incidencu KVB u odnosu na afunkcionalne tumore. Rezultati ove studije su kasnije, 2014 god. od strane istih autora potvrđeni. Retrospektivnom analizom 198 pacijenata sa AI koji su klasifikovani kao stabilna afunkcionalna, stabilna SH i progresivna SH grupa (prema DST 1mg cut off nivo 83nmol/l). Tokom praćenja od 7.5±3.2 godine, pacijenti sa SH i oni sa progresijom SH su pokazali veću incidencu KVB u odnosu na one sa nefunkcionalnim incidentalomima. Sa porastom nivoa kortizola tokom perioda praćenja povećala se učestalost KVB (Hazard ratio (HR) 1.1, 95% CI 1.1–1.2, P<0.001) nezavisno od drugih faktora rizika [206]. Još jedna multicentrična retrospektivna studija, publikovana je 2014 god., sa 206 pacijenata, u kojoj je SH definisan na osnovu kortizola nakon DST većeg od 138 nmol/l i još dva abnormalna hormonska testa, je praćenjem tokom 6 godina, pokazala veću incidencu kardiovaskularnih događaja kod pacijenata sa SH u odnosu na one sa afunkcionalnim AI (OR 3.1, 95% CI 1.1–9.0, P<0.05) [213]. Slični rezultati su dobijeni nedavnom retrospektivnom studijom sa 206 pacijenata, tokom praćenja 4.2±2.3 god, u kojoj su pacijenti sa SH (definisanim na osnovu DST 1mg kortizolom iznad 83nmol/l) pokazali veći KVB morbiditet i mortalitet u odnosu na nesekretorne adenome, a veći mortalitet od KVB i infekcija u odnosu na opštu populaciju [214]. Iako se ne može proceniti direktan uzročno-posledični odnos, s obzirom da je većina studija dizajnirana kao studije preseka, njihovi rezultati pokazuju da hipersekrecija kortizola ima veoma važnu ulogu u nastanku KVB. Rezultati naše studije kada se posmatraju u zavisnosti od pola, ne pokazuju razliku kod pacijenata sa i bez SH u odnosu na BMI, OS, telesni sastav odnosno masnu i mršavu telesnu masu, prevalenciju hipertenzije, DM2, nivo lipida, HOMA IR i prevalenciju MetS, izuzev što žene sa SH češće piju hipolipemike. Pacijentkinje sa SH su imale značajno češće BAI u odnosu na UAI i imale su veću veličinu BAI u odnosu na veličinu UAI, dok kod muškaraca nije uočena razika u učestalosti i veličini BAI i UAI.

Pretpostavlja se da slični mehanizmi postoje i u sukliničkom i *overt* hiperkorticizmu. Moguće je da je za razvoj neželjenih efekata, pošto se radi o blagoj hiperkorticizemiji, neophodna izloženost tokom dužeg vremenskog perioda.

Kod pacijenata sa SH poremećaj glukoznog metabolizma može biti različitog nivoa, od oštećene glikozne tolerancije i insulinske rezistencije koja se pogoršava sa porastom hiperkorticizemije do manifestnog DM2 [215]. Patogenetska uloga kortizola u nastanku oštećenog metabolizma glukoze obuhvata efekte na glukoneogenezu, oštećenje insulin zavisnog preuzimanja glukoze u perifernim tkivima i inhibitornu ulogu na sekreciju pankreasne beta ćelije. DM2 se javlja prosečno kod trećine pacijenta sa SH, mada je prevalencija procenjena u različitim studijama od 5 do 69%. Međutim, subklinička hiperprodukcija kortizola može i indirektnim mehanizmima uzrokovati poremećaj glukoznog metabolizma. Nedavna studija Debono et al. je pokazala da pacijenti sa SH imaju značajno veću akumulaciju visceralnog masnog tkiva (mereno CT skenom) u odnosu na pacijente sa nefunkcijskim incidentalomima, ali nije bilo razlike u odnosu na pacijente sa Kušingovim sy. [214]. U celoj grupi naših pacijenata, nije nađena značajna korelacija između masnog tkiva i parametara HHA osovine i kako je pomenuto nije uočena razlika u masi abdominalnog masnog tkiva merenog DXA metodom između osoba sa i bez SH. Međutim uočena je negativna korelacija mišićne mase ruku i nogu pojedinačno, kao i u zbiru (AMM) sa DST-1mg i LDDST kortizolom i negativna korelacija AMM i SH-DST, što bi ukazivalo na katabolički efekat hiperkorticizemije na metabolizam mišića. Takođe su nedavne studije pokazale da pacijenti sa SH imaju veću prevalenciju nealkoholne masne bolesti jetre i lipidne poremećaje, koji su su nezavisno povezani sa sekrecijom kortizola [216], a druge da u odsustvu poremećaja metabolizma glukoze prisustvo SH nema uticaja na metabolizam lipida, odnosno da poremećaj glukoznog metabolizma ima uticaj na metabolizam lipida nezavisno od prisustva SH [217]. U našoj studiji uočena je povezanost pojedinih parametara izmenjene aktivnosti HHA osovine sa metaboličkim parametrima. Pacijenti sa izostankom supresije kortizola u DST-1mg i LDDST ispod 50nmol/l imaju veću glikemiju 0min i u 120 min OGTT i niži HDL holesterol. Pacijenti sa UFC većim od 245nmol/l imaju značajniju insulinsku rezistenciju. Dakle, iako može imati značajnu i nezavisnu ulogu, hiperkorticizemija je dodatni u nizu faktora koji doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja.

Naši rezultati pokazuju da uprkos većoj prevalenciji SH kod pacijenata sa BAI nije bilo razlike u učestalosti metaboličkih premećaja i hipertenzije. Pacijenti sa BAI i UAI su imali slične antropometrijske parametre, abdominalni tip gojaznosti i visoku prevalenciju ali bez međusobne razlike DM2, dislipidemije i hipertenzije. Za poslednjih 10 godina objavljeno je pomenutih 6 studija koje su ispitivale pored prisustva SH i potencijalne komorbiditete. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ovih studija koje takođe nisu uočile razliku u prevalenciji hipertenzije, DM2 i MetS, osim u jednoj u kojoj je uočena povezanost UAI i hipertenzije [179, 180, 181, 182, 183, 184].

Postavlja se pitanje da li je ova razlika u diskretnoj autonomnoj hipersekreciji kortizola između pacijenata sa UAI i BAI glavni uzrok metaboličkih abnormalnosti. Ovo bi moglo biti posledica različitog trajanja hiperkortizma i interindividualne varijacije u glukokortikoidnoj senzitivnosti, koje su posledica polimorfizama gena za GR [95] i 11 β -HSD1 [154]. U jednoj studiji pokazano je da nosioci N363S polimorfizma češće imaju DM2 kod pacijenata sa BAI u odnosu na UAI patients, ali bez razlike u hipersekreciji kortizola [187].

5.4. Funkcionalni polimorfizmi GR, aktivnost HHA osovine, telesni sastav i MetS

Pokazano je da je postojanje različitih varijanti NR3C1 gena povezano sa različitom osetljivošću na glukokortikoide, kako na nivou hipotalamusa i hipofize gde se ostvaruje negativna povratna sprega, tako na nivou svih perifernih tkiva uključujući i sam nadbubreg. Različita senzitivnost GR ima ulogu u moduliranju efekta kortizolskog ekscesa. Mi smo ispitivali povezanost funkcionalnog polimorfizma GR i telesnog sastava u odnosu na pol s obzirom na činjenicu da se muškarci i žene razlikuju u odnosu na procentualnu zastupljenost mišićnog i masnog tkiva [218].

Od kada su Weaver i sar. objavili povezanost insulinske rezistencije, odnosno HOMA indeksa i homozigota za duži alel Bc11 polimorfizma kod gojaznih osoba, sprovedene su brojne studije u kojima je ispitivana povezanost ovih polimorfizama hGR, gojaznosti i metaboličkog sy. [219]. Ove studije su pokazale povezanost dužeg C alela BcII polimorfizma sa parametrima koji upućuju na povećan efekat GC usled povećane osetljivosti GR, kao što su abdominalna gojaznost [220], hiperinsulinemija [221], BMI [222], povišen sistolni krvni pritisak i povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti [223,

224]. Van Rossum i sar su pokazali da nosioci C alela BclI polimorfizma pokazuju veću supresiju kortizola nakon DST-1mg kao i nakon 0.25mg deksametazona [223].

Suprotno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je u našoj populaciji, kod žena sa AI, duži C alel Bcl polimorfizma povezan sa manjom osetljivošću GR. Žene nosioci dužeg C alela imaju manji nivo supresije kortizola nakon 0.5mg dexametazona, što ukazuje na relativnu rezistenciju HHA osovine. Takođe, imaju manju prevalenciju IFG, IGT i DM2. Žene, nosioci WT i C alela BclI polimorfizma su imale veću učestalost abdominalnog tipa gojaznosti. Multivarijantnom regresionom analizom kao protektivni prognostički faktor za nastanak DM2 ostao je BclI polimorfizam, nezavisno od starosti, abdominalne gojaznosti i LBMI, odnosno prisustvo C alela BclI polimorfizma smanjuje rizik za nastanak DM2 za 80% kod pacijenata sa abdominalnim tipom gojaznosti. Međutim, kada se ovim faktorima rizika doda HOMAIR, insulinska rezistencija postaje nezavisan negativni prognostički faktor, odnosno sa pogoršanjem IR, rizik od nastanka DM2 raste 1.8 puta.

Uočeno je da u odnosu na WT, nosioci polimorfizma imaju trend manje ukupne mišićne mase, značajno manju mišićnu masu na levoj ruci i levoj nozi, ne na desnoj ruci i desnoj nozi (većina su dešnjaci). Prisustvo dužeg alela BclI polimorfizma korelira sa nižom ukupnom mišićnom masom, nižom mišićnom masom ekstremiteta i većim subkutanim masnim tkivom na nogama. Takođe, starenje, menopauza, sniženje IGFI, značajno smanjuju AMM, te se ne može tačno proceniti u kojoj meri polimorfizam GR utiče na smanjenje AMM. Nakon kontrole za starost i BclI polimorfizam, prisustvo SH i menopauze multivarijantnom linearnom regresijom kao nezavisni prediktor smanjenja AMM ostaje menopauza, a kada posmatramo ukupnu mišićnu masu u odnosu na iste faktore, trend smanjenja postoji samo za prisustvo BclI polimorfizma. Po svemu sudeći osobe nosioci BclI polimorfizma imaju predispoziciju za veći gubitak mišićne mase starenjem. To ukazuje na selektivnost tkivne osetljivosti, s obzirom da se ova povećana osetljivost BclI polimorfizma GR uočava i u smanjenju koštane gustine i većoj prevalenciji osteoporoze kod pacijenata sa UAI. U studiji van Rossum i sar. pokazano je da kraći alel BclI polimorfizma ima uticaj na telesni sastav u smislu povećanja abdominalne gojaznosti kod mladih, dok je uticaj suprotan kod starijih osoba u smislu nižeg BMI i to na račun mišićne mase, bez promena u masnoj masi. Zaključili su da je ova mišićna atrofija zdravih starijih osoba posledica glukokortikoidne hipersenzitivnosti kod nosioca BclI polimorfizma [225].

Naši rezultati ukazuju na različitu, tkivno specifičnu osetljivost GR. Tkivno specifična varijabilnost u GC senzitivnosti je ispitivana u više studija, centralna GC senzitivnost primenom 0.25mg i 0.5mg dexametazona, a periferna primenom dermalnog vazokonstriktornog testa sa beklometazonom i merenjem uticaja na imuni sistem putem inhibicije oslobađanja proinflamatornih citokina iz monocita i makrofaga [226].

Veći broj studija je pokazao da ne postoji intra-individualna podudarnost u tkivnom odgovoru na GC [227, 228, 229]. GC senzitivnost je pod uticajem brojnih faktora. GC ostvaruju različite efekte preko multiplih izoformi GR koje nastaju alternativnim splajsovanjem egzona 9, a daljim post-translacionim modifikacijama receptorskog proteina omogućena je vrlo heterogena receptorska funkcija, koja modulira odgovor na GC, koji je tkivno i ćelijski specifičan [230]. Ekspresija GR se razlikuje u pituitarnom tkivu u odnosu na druga target tkiva za GC. Pituitarni GR u poređenju sa GR perifernih tkiva poput imunog sistema ili mozga ne podležu nishodnoj regulaciji nakon davanja visokih doza kortikosterona. Osim toga, intracelularna raspoloživost GC je modulirana 11 β -HSD enzimima. Obe izoforme su različito eksprimirane u različitim tkivima. 11 β -HSD1 je važna i na pituitarnom nivou gde se odvija negativna povratna sprega i gde se modulira i efekat dexametazona. Takođe, postoje razlike u afinitetu vezujućih proteina za GC. Senzitivnost na GC zavisi i od kompleksa *heat shock* proteina hsp90 i hsp70 koji su vezani za GR u citoplazmi i održavaju receptor u transkripciono neaktivnoj strukturnoj formi, sa visokim afinitetom za vezivanje liganda. Naročito je hsp90, koji je dominantno eksprimiran u perifernim tkivima, potencijalni modulator različite GC senzitivnosti u ovim tkivima [231].

Pokazano je da N363S polimorfizam povezan sa povećanom senzitivnosti na egzogene GC. Osobe koje su nosioci ovog polimorfizma pokazuju veću supresiju kortizola na dexametazon *in vivo* i trend veće redukcije limfocitne proliferacije pod uticajem dexametazona *in vitro* [97]. Međutim, uticaj BclI polimorfizma na senzitivnost se razlikuje *in vivo* i *in vitro*. Osobe koje su homozigoti za duži C alel BclI u odnosu na homozigote za G alel, pokazuju veću senzitivnost u dermalnom testu sa beklometazonom, a sniženu senzitivnost na dexametazonom indukovanu inhibiciju lizozomalnog oslobađanja od strane mononuklearnih ćelija [229]. Bez obzira na intronsku lokalizaciju *BclI* polimorfizma njegov funkcionalni značaj u regulaciji transkripcije nije umanjen, s obzirom da je lociran u intronu 2, neposredno nakon egzona 2, koji je prvi kodirajući egzon u ovom genu.

Pokazano je da ovaj polimorfizam može indirektno putem uticaja na pozitivne ili negativne GRE u promotorskom regionu ciljnih gena uticati na modulaciju genske transkripcije i tkivno specifičnu GC senzitivnost, koja može biti snižena ili povećana [229]. Ispitivanje senzitivnosti BclI polimorfizma GR kod PTSD pacijenata, sa 0.25mg dexametazonom i dermalnim testom beklometazonom nije pokazalo razliku u senzitivnosti GR u odnosu na kontrole u oba testa [232]. Treba imati u vidu da koekspresija drugih polimorfizama GR odnosno prisustvo određenih haplotipova utiče na tkivnu senzitivnost. Analiza haplotipova nije obuhvaćena ovim radom.

Sve navedeno ukazuje da u našoj grupi žena sa AI, BclI polimorfizam pokazuje tkivno specifičnu senzitivnost. Rezultati dex 0.5mg kortizola ukazuju na relativnu rezistenciju na nivou HHA osovine. Žene se nisu razlikovale po zastupljenosti abdominalne gojaznosti, koja kao metabolički aktivno tkivo uslovljava hipertrigliceridemiju, insulinsku rezistenciju i nastanak DM2. Prisustvo dužeg C alela BclI polimorfizma na visceralnom masnom tkivu sa smanjenom senzitivnosti na GC i/ili aktivnost 11β -HSD1, doprinose manjoj metaboličkoj aktivnosti visceralnog masnog tkiva i štite žene sa abdominalnom gojaznosti od poremećaja metabolizma glukoze i nastanka DM2. Sa druge strane BclI polimorfizam GR na skeletnim mišićima kao i na kostima kod žena sa UAI pokazuje povećanu senzitivnost i potencira smanjenje mišićne mase ekstremiteta koje je inače uslovljeno starošću i pojavom menopauze, ali i ukupne mišićne mase nezavisno od starosti što ima odraza na insulinsku senzitivnost.

Većina studija je fokusirana na distribuciju masnog tkiva u smislu opšte i abdominalne gojaznosti. Samo nekoliko studija je ispitalo povezanost masnog tkiva na nogama sa metaboličkim parametrima, adipokinima i inflamatornim markerima. Rezultati su ukazali na protektivnu ulogu masnog tkiva nogu na metabolizam glukoze (233, 234, 235, 236, 237, 238), lipidni profil (233, 234, 235, 237, 238, 239), krvni pritisak (233, 234, 235, 238, 239, 240, 241) i druge faktore rizika za KVB [242]. Nedavno sprovedene studije su pokazale da je veće masno tkivo na nogama povezano sa povoljnim profilom adipokina, odnosno višim nivoom adiponektina [243, 244], a nižim nivoom PAI-1 [242, 245] i RBP4 [242] kod postmenopauzalnih žena, odnosno da veća masna akumulacija na nogama čak u prisustvu trunkalnog masnog tkiva, ne samo da ima manje štetan efekat od abdominalnog, već da pokazuje i protektivan efekat uticajem na adipokine i inflamatorne markere i da

smanjuje rizik od MetS. Treba imati u vidu da je u ovim studijama kao i u našoj procena masnog tkiva vršena DEX metodom kojom se ne može napraviti razlika visceralnog i subkutanog trunkalnog masnog tkiva, kao i intramuskularnog i subkutanog masnog tkiva na nogama.

Naši rezultati ukazuju da se sa pojavom SH usled autonomne produkcije kortizola iz nadbubrega (čija veličina korelira sa pojavom SH), gubi protektivna uloga BclI polimorfizma, te se žene nosioci ovog polimorfizma izjednačavaju sa nosiocima WT u učestalosti DM2 i raste učestalost MetS. Sa pojavom hiperkortizolemije moguće je da se menja aktivnost lokalniog 11β -HSD1 enzima ili dolazi do nishodne regulacije, odnosno smanjene ekspresije GR. Pokazano je da u prisustvu viška liganda, odnosno GC, nezavisno od tkivno specifičnih transkripcionih faktora dolazi do nishodne regulacije ekspresije GR. Identifikovan je negativni GRE u 6 egzonu gena za hGR koji ima važnu ulogu u represiji hGR gena. Nakon aktivacije ligandom, odnosno glukokortikoidima, vezivanje ovog nGRE regrutuje NCoR1 (*nuclear receptor corepressor*) i HDAC3 (*histone deacetylase 3*) na proksimalnom delu promotora formirajući represioni kompleks koji inhibira transkripciju hGR. [246]. Ova nishodna regulacija GR je mehanizam održavanja homeostaze normalnih ćelija, ali i mehanizam ograničenja terapijskog odgovora na GC u inflamatornim i malignim bolestima, a mogla bi biti i potencijalni mehanizam efekta hiperkortizolemije u SH na nishodnu regulaciju BclI polimorfizma GR u metabolički aktivnom visceralnom masnom tkivu i gubitka njegove protektivne uloge kod naših pacijentkinja. Sa prisustvom SH uočava se češća pojava hipertenzije, viši sistolni i dijastolni krvni pritisak, viši trigliceridi, veća insulinska rezistencija i češća pojava MetS. Takođe je uočena povezanost glikemija i insulinemija našte, kao i insulinemije u 120 min OGTTa sa abdominalnom masnom masom, totalnom masnom masom i FMI i da žene sa SH češće piju hipolipemike.

Poznato je da distribucija masnog tkiva, odnosno abdominalno masno tkivo, ima značajnu ulogu u etiologiji IR i sa njom povezanim metaboličkim abnormalnostima [247, 248, 249, 250]. U nekim studijama je pokazano da je veća mišićna masa povezana sa nižom insulinskom rezistencijom i nižim rizikom za DM2, nezavisno od gojaznosti. Međutim i mršava telesna masa (*lean body mass*, LBM) koju čini mišićna masa, dorinosi patogenezi IR i MetS [251, 252]. Prvo su Krotkiewski i Bjorntorp još 1986 god. pokazali da gojazne žene sa manje trunkalne masti i nižim LBM imaju veću insulinsku senzitivnost u odnosu na

one sa muskularnim tipom i većom trunkalnom akumulacijom masti. Naši rezultati pokazuju kao i nekoliko drugih studija [252, 253, 254, 255, 256] da gojazne žene imaju veći LBMI koji je povezan sa IR, DM2 i hipertenzijom, odnosno MetS. U novije vreme, sa pojavom preciznijih tehnika za procenu telesne kompozicije (DEX), distribucije masnog tkiva (CT) i insulinske senzitivnosti (euglikemijski/hiperinsulinemijski klamp), pokazano je da insulin rezistentne gojazne postmenopauzalne žene imaju značajno više visceralne masti i LBM u odnosu na insulin senzitivne gojazne žene. Nedavne studije su pokazale da je kod starijih gojaznih postmenopauzalnih žena MetS povezan sa većom mišićnom masom i većim visceralnim masnim tkivom [255], a da je manja mišićna masa i manje visceralno masno tkivo kod gojaznih povezano sa manjom inflamacijom (snižen CRP i alfa 1 antitripsin [253])

Ovo ukazuje da je mišićna masa potencijalni modulator insulinske rezistencije kod gojaznih postmenopauzalnih žena. Pored različite ekspresije adipokin *realted* gena i različita ekspresija i polimorfizam GR utiče na metabolički milje i nastanak MetS. U našoj studiji, žene koje su nosioci BCL polimorfizma imaju manju mišićnu masu i verovatno je i to dodatni faktor koji participira u boljem metaboličkom profilu i manjoj prevalenciji dijabetesa. Žene heterozigoti za N363S polimorfizam u odnosu na WT imaju veću ukupnu i abdominalnu masnu masu i procenat masnog tkiva na ekstremitetima, bez značajne razlike u mišićnoj masi ekstremiteta, ali granične značajnosti LBMI. Uočena je pozitivna korelacija N363S polimorfizma sa BMI, DM2, abdominalnim masnim tkivom, FMI. Imaju hipertenziju značajno duže u odnosu na WT, viši sistolni i dijastolni krvni pritisak. Sve imaju DM2 i MetS ali bez razlike u nivou lipida. Nedavne studije su pokazale da N363S polimorfizam povezan sa povećanom senzitivnosti GR, povećanim BMI i sniženom koštanom gustinom [97, 257] i abdominalnom gojaznosti kod muškaraca [258] Suprotno, nekoliko studija nije pokazalo uticaj na BMI [259, 260]. Kao što je pomenuto kod naše tri pacijentkinje nije uočena smanjena koštana gustina, što upućuje na povećanu senzitivnost GR sa ovim polimorfizmom na metabolički aktivnom masnom tkivu, a relativnu rezistenciju na koštanom tkivu, odnosno različitu tkivnu osetljivost GR. S obzirom da se radi o polimorfizmu GR sa niskom učestalosti, da bi se potvrdila ova zapažanja, potrebna su ispitivanja na većem uzorku pacijenata.

Sa starenjem dolazi do promena na mišićima koje su uslovljene genetskim, hormonskim mahanizmima i fizičkom neaktivnošću. Starenje je povezano sa promenama u

funkciji HHAosovine i kod muškaraca i kod žena, što je praćeno povećanim vrednostima kortizola, posebno ponoćnim i manjom supresijom kortizola u dexametazonskom testu, mada pojedine studije ukazuju na normalne vrednosti kortizola [261, 262, 263]. Takođe je pokazano u više studija da muškaraci imaju više vrednosti kortizola, mada postoje nedoumice vezane za godine starosti u kojima se ovo uočava ali i studije koje pokazuju da žene sa starenjem imaju viši nivo salivarnog kortizola [264]. Nivo kortizola fiziološki raste sa starenjem i povezan je sa mišićnom slabosti. Stanja endogenog ili egzogenog glukokortikoidnog ekscesa su praćena mišićnom atrofijom i slabošću zbog katabolizma i inhibicije sinteze muskularnih proteina, dominantno tipa II mišićnih vlakana. Prva studija koja je ispitivala uticaj kortizola na mišićnu masu i snagu kod starijih osoba, 2008 god, je pokazala uticaj polimorfizama GR, ER22/23EK i N363S u smislu smanjenja površine, broja i veličine tipa II mišićnih vlakana, što rezultuje smanjenjem mišićne mase. Pokazana je veza između jutarnjeg i ponoćnog salivarnog kortizola i gubitka snage stiska šake [265]. Druge studije nisu pokazale povezanost serumskog kortizola i gubitka AMM, već da mladi muškarci, nosioci ER22/23EK polimorfizma imaju veću mišićnu masu i snagu, za razliku od žena kod kojih je pokazan samo trend smanjenja telesne masti [266]. U našoj studiji, žene nosioci ER22/23EK polimorfizma imaju manju supresiju kortizola nakon DST 1mg i DEX I u odnosu na WT što ukazuje na rezistenciju GR na nivou HHA osovine ili na veću autonomnu produkciju kortizola. Takođe imaju niži HDL. Nismo uočili druge metaboličke razlike, kao ni razlike u telesnom sastavu. Neke studije su pokazale veću visinu i mišićnu masu kod muškaraca nosioca ER22/23EK polimorfizma, što je objašnjeno postojanjem relativne rezistencije na GC [267]. Ista grupa autora je u starijoj populaciji pokazala da nosioci polimorfizma ER22/23EK imaju bolju insulinsku senzitivnost i niži totalni i LDL holesterol. Uočili su veću učestalost ovog polimorfizma u starijoj populaciji, što je ukazivalo na duže preživljavanje [268].

Kada posmatramo A3669G polimorfizam GR u našoj studiji, nisu uočene posebnosti vezane za žene. Muškarci nosioci ovog polimorfizma GR, imaju nižu ukupnu mišićnu masu, mišićnu masu ruku i procenat masti na rukama. Postoji negativna korelacija prisustva polimorfizma i AMM, polimorfizma i ukupne mišićne mase. Nije postojala korelacija između parametara mišićne mase, starosti, DHEAS i testosterona. Multivarijantna linearna logistička regresija je pokazala da prisustvo A3669G polimorfizma

kod muškaraca predstavlja nezavisan prognostički faktor za nižu ukupnu mišićnu masu nakon korekcije za starost, ukupno masno tkivo, testosteron i supresiju kortizola iznad 50nmol/l nakon LDDST.

Muškarci nosioci 9β polimorfizma u odnosu na WT, imaju značajno viši insulin našte i u 120min OGTT-a, viši holesterol, viši HDL, viši LDL i imaju veću insulinsku rezistenciju. Multivarijantna linearna logistička regresija je nakon korekcije za starost, abdominalno masno tkivo, LDDST kortizol $>50\text{nmol/l}$ i prisustvo 9β polimorfizma pokazala da su nezavisni prognostički faktori insulinske rezistencije povišeni trigliceridi i manja ukupna mišićna masa kod muškaraca nosioca 9β polimorfizma. Svi metabolički parametri upućuju na povećanu osetljivost GR na mišićnom tkivu, koja dovodi do smanjenja insulinske senzitivnosti. Uticaj koekspresije drugih polimorfizama nije ispitivana.

Smanjenje mišićne mase i snage sa godinama, odnosno pojava sarkopenije [269], karakteriše se smanjenjem veličine ukupnog broja skeletnih mišićnih vlakana [270], što je posledica sniženog anabolizma i izraženijeg katabolizma [271], a rezultuje smanjenjem mišićnog obima i povećanjem intramuskularnog sadržaja masti [272, 273]. Iako nije identifikovan specifični mehanizam, sarkopenija se povezuje sa starenjem, malnutricijom, sedanternim načinom života i inflamacijom [274, 275, 276], oksidativnim stresom [277] i smanjenjem hormona rasta i testosterona [278]. Sarkopenija doprinosi nastanku insulinske rezistencije i DM2 s obzirom da su skeletni mišići primarno mesto insulinom stimulisane utilizacije glukoze i održavanja euglikemije [279, 280, 281, 282, 283]. Pored smanjenja mišićne mase, starenje je praćeno disfunkcijom mitohondrijalne aktivnosti, odnosno oksidativnog kapaciteta skeletnih mišića koje pogoršava insulinsku rezistenciju, a sa druge strane IR potencira dalji gubitak mišićne mase [284]. Starenje je praćeno redistribucijom masnog tkiva, koje karakteriše porast intermuskularnog, intramuskularnog masnog tkiva, intrahepatične i visceralne akumulacije masti što sve uzrokuje IR. U ovom istraživanju, muškarci nosioci 9β polimorfizma pokazuju na mišićnom tkivu veću osetljivost GR na kataboličke efekte GC. Tip II mišićnih vlakana su manje senzitivna na insulin u odnosu na tip I mišićnih vlakana, te stoga pokazuju veću vulnerabilnost i sklonost atrofiji u uslovima insulinske rezistencije, a posebno u slučaju povećane osetljivosti na GC. Međutim, etiologija sarkopenije se verovatno razlikuje u različitim uzrastnim grupama i zavisi od

prisustva gojaznosti. U studijama je pokazano da prisustvo ovog polimorfizma dovodi do povećane stabilnosti GR β mRNK i povećane ekspresije GR β proteina uzrokujući inhibiciju transkripcije GR α , što rezultuje glukokortikoidnom rezistencijom. 9 β polimorfizam značajno redukuje transrepresiju što uzrokuje proinflamatorno stanje i ovaj polimorfizam neki dovode u vezu sa većom učestalosti reumatoidnog artritisa [105], dok drugi nisu našli tu povezanost [285]. Osobe koje su homozigoti za 9 β imaju veći rizik za kardiovaskularne bolesti, najverovatnije zbog hroničnog proinflamatornog stanja [107]. Neke studije su pokazale da je prisustvo A3669G alela povezano sa smanjenjem centralne gojaznosti kod žena i povoljnim lipidnim profilom kod muškaraca [106], dok druge nisu pokazale povezanost 9 β polimorfizma sa BMI, abdominalnom gojaznosti, insulinskom senzitivnosti, lipidnim statusom i CRP [286], niti razliku u supresibilnosti kortizola nakon DST između nosioca WT i 9 β polimorfizma [286, 287]. Kada se u našoj studiji posmatraju parametri HHA osovine u odnosu na prisustvo 9 β polimorfizma GR, kod nosioca polimorfizma uočena je češće supresija kortizola iznad 50nmol/l nakon LDDST što ukazuje na veću produkciju kortizola kod ovih pacijenata i/ili na relativnu rezistenciju.

5.5. Adrenalni incidentalomi i koštana gustina

Dosadašnji podaci o uticaju SH na koštanu gustinu kod pacijenata sa AI su kontradiktorni što je posledica različitih kriterijuma za definisanje SH, pa samim tim i selekcije pacijenata. Veći broj studija novijeg datuma, pre svega onih dizajniranih u pravcu ispitivanja ovog problema, ukazuje da pacijenti sa AI i SH poput manifestnog CS imaju smanjenu koštanu gustinu i veću incidencu vertebralnih fraktura [158, 288, 289]. U prilog tome idu podaci studije Tauchmanove i sar. koji nisu našli značajnu razliku u BMD i vertebralnim frakturama između pacijenata sa subkliničkim i manifestnim CS [290]. Rezultati nedavne studije Morelli i sar. koja je pratila tokom 24 meseca 103 pacijenta sa AI, pokazuju da je pojava novih vertebralnih fraktura bila povezana sa SH (OR=12.3, 95% CI: 4.118–36.529) nezavisno od starosti, pola, BMI, BMD, indeksa spinalnog deformiteta i dužine menopauze [291]. Kod pacijenta sa AI i SH u poređenju sa pacijentima bez SH, kao kod manifestnog CS, indeks spinalnog deformiteta i trabekularni koštani skor ukazuju na oštećenu mikroarhitekturu i smanjen kvalitet kosti, nezavisno od starosti, pola i menopauze

[292], što objašnjava pojavu fraktura u odsustvu osteoporoze. Dve studije su ispitivale prevalenciju SH kod pacijenata sa osteoporozom i rezultati su pokazali neočekivano visoku učestalost SH, 3.8% i 4.8% [293, 294].

U našoj studiji, kada posmatramo sve pacijente, nezavisno od pola, oni sa SH u odnosu na one bez, imaju niži BMD na svim delovima skeleta: lumbalnoj kičmi, vratu femura, totalnom femuru i totalnom skeletu. Uočena je značajna negativna korelacija parametara HHA osovine (jutarnjeg kortizola, DST-1mg kortizola, LDDST kortizola, UFC i SH) i BMD lumbalne kičme, vrata femura, totalnog kuka i celog skeleta, a prisustvo SH negativno korelira sa BMD svih merenih mesta (lumbalne kičme, vrata i totalnog femura i totalnog skeleta).

Međutim, ovaj negativni efekat SH je prisutan samo kod žena, kod kojih dovodi do sniženja koštane gustine na lumbalnom delu kičme, totalnom kuku i celom skeletu, ali ne i na vratu femura. Žene sa SH u odnosu na one bez, imaju veću prevalenciju osteoporoze kičme i kuka. Takođe je uočeno da starenje i pojava menopauze uzrokuju sniženje BMD lumbalne kičme, totalnog femura, perifernog skeleta i sniženje vrata femura, dok gojaznost ima protektivni efekat na svim BMD. Iako su žene sa SH starije i sa češćom pojavom menopauze, nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na one bez SH. Pacijentkinje sa SH su imale statistički značajno veći adenom i češće BAI u odnosu na pacijentkinje bez SH. Sa starenjem incidenca AI raste, te je značajan broj žena sa AI u postmenopauzi, zbog čega je teško proceniti stepen uticaja SH na kosti. Naši rezultati pokazuju da sniženju BMD lumbalne kičme i celog skeleta doprinose zajedno SH i menopauza, sniženju BMD vrata femura starost i menopauza, a BMD totalnog femura samo menopauza. Međutim, multivarijantna regresiona analiza je pokazala da nezavisno od starosti, menopauze i nivoa vitD, žene sa SH imaju skoro 6 puta veći rizik za nastanak osteoporoze kičme i kuka, a da porast BMI smanjuje rizik od osteoporoze za 22%. Proces gubitka koštane mase na trabekularnoj i kortikalnoj kosti počinje kod oba pola nakon treće decenije života i kotinuirano i postepeno se nastavlja tokom života. Neposredni postmenopauzalni period je praćen intenzivnim gubitkom pre svega trabekularne kosti jer se u njoj odvija brže remodeliranje [295]. Povećana stopa gubitka koštane mase dostiže ravnotežu približno 10 godina nakon menopauze, te prosečno posle 60-te godine života nastavlja se kontinuirani gubitak pretežno kortikalne kosti. Prospektivne longitudinalne studije su pokazale da u

starijim godinama ubrzan koštani gubitak pogađa uglavnom kuk. S obzirom da kortikalna kost čini 80% skeleta, a ostatak trabekularna, u suštini, gubitak je na oba nivoa, sa posledičnim značajnim procentom i vertebralnih i nevertebralnih fraktura [296].

Međutim, teško je proceniti relativni doprinos starenja i nedostatka estrogena sniženju koštane gustine. Sa druge strane, opšte prihvaćeno stanovište je da endogeni ili egzogeni hiperkorticizam ima negativan efekat dominantno na trabekularnu kost [297, 298]. Podaci o uticaju na kortikalnu kost nisu konzistentni, verovatno usled malog uzorka, različitih dijagnostičkih kriterijuma za SH, različite proporcije muškaraca i žena i gonadnog statusa [299, 171].

Rezultati naše studije pokazuju negativan uticaj SH na BMD lumbalne kičme (trabekularna kost), celog kuka (trabekularna i kortikalna) i perifernog skeleta (80% kortikalna kost), izuzev vrata femura (75% kortikalna kost) koji je pod negativnim uticajem starosti i menopauze. Torlontano i sar. su pokazali značajnu redukciju BMD samo kod postmenopauzalnih žena sa SH što ukazuje da deficit estrogena potencira efekat SH na kosti [300]. Više studija je pokazalo negativan uticaj i na kortikalnu kost, odnosno vrat femura i periferni skelet [301, 302]. Analizom jutarnjeg serumskog kortizola i UFC kod 82 zdrave žene, starosti 42-61 god. uočena je negativna korelacija sa BMD lumbalne kičme, totalnog femura i vrata femura u ranom postmenopauzalnom periodu [303]. Hadjidakis i sar. su kod 42 postmenopauzalne žene, pokazali da žene sa SH (definisanim na osnovu LDDST kortizola >70 nmol/l) imaju niži BMD vrata femura, trohantera i Ward-ovog trougla, odnosno mešovite trabekularno kortikalne kosti, ali ne lumbalnog dela kičme [304]. Kristo sar. su pokazali da pacijenti sa aktivnim CS imaju nižu koštanu gustinu ne samo na kičmi i vratu femura, već i totalnom skeletu, s tim što je najveći efekat ispoljen na trabekularnoj kosti [305]. Nakon hirurškog izlečenja CS, proces je reverzibilan i na trabekularnoj i na kortikalnoj kosti. Regstruje se porast BMD koji je inicijalno najizraženiji na lumbalnoj kičmi [306], a potom se vremenom povećava prvo BMD vrata femura, a zatim i totalnog skeleta [307, 308].

I muškarci i žene starenjem gube koštanu masu. Međutim, postoje značajne razlike zbog kojih muškarci manje i sporije gube BMD u odnosu na postmenopauzalne žene. Tokom života žene gube 35% kortikalne i 50% trabekularne kosti, dok muškarci gube prosečno dve trećine tog iznosa [309]. Uloga polnih hormona je važna kako u formiranju,

tako i u gubitku koštane gustine. Sporo ali progresivno sniženje testosterona i još značajnije estradiola direktno je odgovorno za sniženje BMD [310]. Ovo se pre svega odnosi na gubitak trabekularne kosti kičme, potom na sniženje kortikalne komponente vrata femura, a zatim na smanjenje trabekularne komponente vrata femura. Jačina povezanosti estradiola i lumbalnog BMD je u zavisnosti od telesne težine [311]. Prospektivna studija koja je ispitivala 34 zdrava muškarca starosti 61 do 72 god. pokazala je značajnu negativnu korelaciju serumskog kortizola i BMD lumbalne kičme i tri od pet femoralnih mesta, kao i značajnu pozitivnu korelaciju kortizola i koštanog gubitka na nivou lumbalne kičme i kuka nakon četvorogodišnjeg praćenja [312]. Razlika postoji i u samom remodeliraju kosti. Kod muškaraca trabekule postaju tanje, dok kod žena trabekule gube povezanost [313].

Studija koja je obuhvatila 502 starije zdrave osobe, pokazala je negativnu povezanost serumskog jutarnjeg kortizola i BMD na nivou kuka, vrata femura, trohantera, intertrohanteričnog dela i lumbalnog dela kičme kod žena, dok ova poveznost nije uočena kod muškaraca [314]. U našoj studiji, kod 47 muškaraca koji su prosečno 5 godina stariji od žena zabeležena je osteopenija kod 87% pacijenata, a osteoporoza samo kod jednog. Za razliku od žena kod kojih postoji značajna povezanost BMD i brojnih parametara HHA, kod muškaraca je uočena samo negativna korelacija BMD lumbalne kičme sa ponoćnim kortizolom i jutarnjeg kortizola sa pojavom osteopenije na totalnom femuru. Kod muškaraca sa SH u odnosu na one bez, BMD, Z i T skor su bili niži i na kičmi, vratu femura i totalnom skeletu, ali nisu dostigli statističku značajnost. Nije uočena značajna povezanost SH i parametara koštane gustine, što ukazuje da protektivni efekat androgena prevazilazi negativan efekat SH. Starenje utiče na gubitak koštane gustine na nivou lumbalne kičme muškaraca, a na vratu femura pojava osteopenije korelira sa padom testosterona. Kod muškaraca nisu nađeni značajni nezavisni prediktori niže koštane gustine.

U prvoj objavljenoj studiji o uticaju SH na koštanu gustinu muškaraca sa AI pokazano je da imaju značajno niži BMD i Z skor lumbalne kičme u odnosu na SH negativne pacijente i zdravu kontrolu [315]. Prevalencija osteoporoze i osteopenije je bila značajno veća kod pacijenata sa SH 84.6% vs 36.0%. Kod muškaraca u našoj studiji osteopenija je postojala kod 87% pacijenata, a osteoporoza samo kod jednog bez SH. Svi muškarci sa SH su imali osteopeniju, a bez SH je imalo 84%. Korišćenjem BMD *cut off* vrednosti za muškarce [145] prosečno 3-6% muškaraca starijih od 50 god. u Americi ima

osteoporozu, a 28-47% ima osteopeniju. Analogni podaci kod žena su 13-18% sa osteoporozom i 37-50% sa osteopenijom [316]. Kada u svetlu prevalencije osteoporoze i osteopenije u opštoj populaciji posmatramo naše podatke, oni pokazuju značajno veću prevalenciju u odnosu na opštu populaciju, ali su u skladu sa objavljenom prevalencom kod muškaraca sa AI i SH [315]. Ograničenje naše studije je nedostatak kontrolne grupe zdravih muškaraca za procenu koštane gustine.

Nedavno je objavljena studija iste grupe autora, Chiodini i sar., sprovedena kod 287 pacijenata sa AI, koja je pokazala da pacijenti sa SH u odnosu na pacijente bez SH imaju nižu koštanu gustinu lumbalnog dela kičme i vrata femura, veću prevalenciju vertebralnih fraktura i indeksa spinalnog deformiteta. Postojala je pozitivna korelacija BMI i BMD lumbalne kičme i vrata femura, a negativna BMD lumbalne kičme i UFC. Kao nezavisni prediktori sniženog BMD lumbalne kičme, pokazani su SH, BMI, pol i menopauzalni status, dok su nezavisni prediktori sniženog BMD vrata femura bili SH i BMI. Prisustvo SH (OR=7.27), starenja (OR 1.05) i smanjenje BMD Z skora (OR=1.33) predstavljaju nezavisne faktore rizika za nastanak vertebralnih fraktura. U ovoj studiji negativni efekat SH je prisutan i kod muškaraca i kod žena prevazilazeći protektivni efekat polnih hormona, a kod žena nezavisno od starosti jer su premenopauzalne pacijentkinje sa SH imale veću prevalenciju vertebralnih fraktura u odnosu na postmenopauzalne žene bez SH [317].

Suprotno navedenom, rezultati pojedinih studija nisu pokazali značajnu razliku u BMD lumbalne kičme i femura između pacijenata sa AI vezano za prisustvo SH. Osella i sar. su sprovedli ispitivanje kod 27 pacijenata (18 žena i 9 muškaraca) [318]. Upravo prisustvo muškaraca sa verovatno manjom osetljivošću BMD na GC u odnosu na žene, može objasniti izostanak gubitka koštane gustine u celoj grupi. Razlike u dobijenim rezultatima su posledica i nedefinisanih kriterijuma za dijagnozu SH, zbog čega je ipak preporuka da se koristi kombinacija tri kriterijuma HHA. U studijama Rossi i sar. i Torlontano i sar. SH je definisan na osnovu jednog parametra poput 24h UFC [171].

Korelacije između koncentracije kortizola i markera koštanog prometa

Nedavne studije su pokazale značajnu negativnu korelaciju serumskog osteokalcina i serumskog jutarnjeg, ponoćnog i dex screening kortizola i salivarnog ponoćnog kortizola, dok je pozitivna korelacija uočena između karboksi i aminoterminalnih degradacionih

produkata kolagena tip1 i koncentracije kortizola kod pacijenata sa CS [319, 320]. Povezanost kortizola i markera koštanog prometa nije pokazana kod zdravih osoba [321], što ukazuje na neohodnost koncentracije kortizola iznad određenog praga da bi se ostvario uticaj na ove markere [319].

Analiza odnosa koštanih markera i parametara HHA osovine kod naših pacijenata je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju beta-crosslaps i LDDST kortizola, koja se zadržava kao značajna samo kod žena. Nisu uočene statistički značajne razlike u nivou koštanih markera, vitD, PTH, Ca i P između pacijenata sa UAI i BAI niti unutar grupa vezano za prisustvo SH, kao ni značajne korelacije sa parametrima HHA osovine i polimorfizmima GR. Kod žena beta-crosslaps i osteocalcin negativno koreliraju sa BMD na nivou kičme, vrata i total femura i BMD celog skeleta, dok se kod muškaraca zadržava negativna korelacija beta-crosslaps sa T skorom na nivou lumbalne kičme i nije uočena povezanost sa drugim delovima skeleta. U celoj grupi i kod žena nivo vitamina D negativno korelira sa SH-DST-1mg. Nije uočena povezanost PTH sa parametrima HHA osovine i BMD, što je nalaz u velikom broju studija [322, 323].

Funkcionalni polimorfizmi GR i koštana gustina

Razlika u interindividualnoj osetljivosti koštanih ćelija na GC kod zdravih i kod pacijenata sa CS je uslovljena različitim faktorima, među kojima su genetski određena varijabilnost GR i 11BHS1 enzima. Uočene su značajne korelacije između varijanti 11B-HSD1 gena i BMD kod zdravih postmenopauzalnih žena i kod pacijenata sa CS [324, 325]. Više studija je ispitivalo uticaj različitih polimorfizama gena za GR na BMD, među kojima i ER22/23EK, Bcl I, N363S, and A669G [326]. Kod zdravih i kod pacijenata sa hiperkorticismom heterozigoti i izraženije homozigoti CC za BclI polimorfizam imaju niži BMD [314, 327]. Kostik i sar. su pokazali da C alel i GC genotip Bcl I imaju uticaj na snižen BMD kod devojčica sa juvenilnim idiopatskim artritismom [328]. Međutim, druge studije nisu pokazale povezanost Bcl I i koštanog metabolizma [329, 330]. Nedavna studija Ragnarsson i sar., sprovedena kod 50 žena nakon izlečenja CS je pokazala povezanost BclI polimorfizma sa sniženim BMD celeg skeleta i vrata femura [331]. U našoj studiji, kod pacijenata sa UAI, heterozigotni i homozigotni nosioci C alela BclI polimorfizma, imaju i značajno veću prevalenciju osteoporoze na nivou lumbalne kičme u odnosu na WT. Uočena

je pozitivna korelacija BclI polimorfizma i pojave osteoporozne kičme i kuka. Treba napomenuti da manja mišićna masa uočena kod ovih pacijenata svakako doprinosi smanjenju koštane gustine. Povećana prevalencija vertebralnih fraktura je nađena kod heterozigotnih nosioca N363S i homozigota za BclI polimorfizam GR nezavisno od prisustva SH [183]. Majnik i sar. su pokazali da je N363S polimorfizam GR učestaliji kod pacijenata sa BAI u odnosu na UAI, mada nisu našli razliku u hormonskoj sekreciji (187). Time se otvorilo pitanje da li N363S varijanta gena za GR je uključena u nastanak i BAI i glukokortikoidima indukovanoj osteoporozni.

Huizenga i sar. su pokazali da nosioci N363S polimorfizma imaju veću osetljivost na GC, da imaju trend nižeg BMD lumbalne kičme (z-scores: 20.48 vs. 0.02, $p=0.08$), dok nije bilo razlike u BMD vrata femura [97], dok Szappanos i sar. i Van Schoor i sar. nisu našli povezanost sa nižim BMD [327]. U našoj studiji, nosioci sva tri N363S polimorfizma AG su bile žene u postmenopauzi i sve tri su imale normalnu koštanu gustinu na nivou kičme i kuka (nisu imale ni osteopeniju), a imale su višestruke faktore rizika za smanjenje koštane gustine. Jedna je imala BAI, prisutan SH, bila je heterozigot GC BclI, WT ER22/23EK i WT A3669G u menopauzi je bila 24 god, a BMI je bio 39kg/m². S obzirom na starost od 74 god. ova pacijentkinja je mogla imati i degenerativne promene zbog čega bi efekat SH i drugih negativnih faktora mogao biti potcenjen. Druge dve žene su imale UAI, nisu imale SH, jedna od njih je bila heterozigot GC za BclI uz WT ER22/23EK i WT A3669G sa trajanjem menopauze 7 god i BMI 32kg/m², a druga je bila nosilac WT za ostala tri polimorfizama BclI, ER22/23EK i A3669G i trajanjem menopauze 7 godina, BMI 41kg/m². Ovo upućuje da N363S polimorfizam nema uticaj na smanjenje koštane gustine ili da ima protektivni efekat. Slično zdravim osobama, BMI korelira pozitivno sa BMD pacijenata sa CS i ovaj protektivni efekat BMI je najizraženiji na lumbalnoj kičmi [332, 333] i moguće je da gojaznost pored genetski determinisane BMD ima protektivnu ulogu kod ovih pacijentkinja.

Do sada nije uočena povezanost polimorfizma ER22/23EK i BMD kod pacijenata sa hiperkorticismom. Kod naših pacijenata sa BAI uočeno je da heterozigoti za ER22/23EK imaju na granici statističke značajnosti niži Z skor lumbalne kičme i niži Z skor totalnog kuka i nađena je negativna korelacija ER22/23EK polimorfizma i Z skora lumbalne kičme. To ukazuje da u proseku mlađi pacijenti koji su heterozigotni nosioci ER22/23EK

polimorfizma imaju sklonost ka nižoj koštanoj gustini lumbalnog dela kičme. S obzirom da se radi o malom broju pacijenata sa ovim polimorfizmom, rezultate treba sa rezervom prihvatiti, odnosno ispitati na većoj populacionoj grupi.

Rezultati ove studije pokazuju da svi pacijenti sa AI koji su heterozigoti za A3669G imaju značajno manju učestalost osteoporoze u odnosu na WT (12.8 vs 29.9%, $p=0.046$) i uočena je negativna korelacija između A3669G polimorfizma i pojave osteoporoze. Ova protektivna uloga A3669G polimorfizma posledica je relativne rezistencije na GC. Osteoporozu je imao samo jedan muškarac sa UAI, bez SH, koji je bio nosilac heterozigotnog GC polimorfizma BclI, WT N363S, WT ER22/23EK i WT A3669G.

Individualna koštana osetljivost na GC nije uslovljena samo polimorfizmom GR. Pokazano je da izoenzimi 11 β -HSD-1 i 2 moduliraju uticaj GC i mineralokortikoida na kosti. Osobe sa većom aktivnosti 11 β -HSD-2 u kostima, imaju veći rizik za razvoj GIO [334]. Aktivaciju 11 β -HSD-1 sa posledičnim stvaranjem kortizola iz kortizona u humanim osteoblastima stimulišu proinflamatorni citokini (TNF alfa, IL-1b i IL-6) i sami GC [335, 336]. Sa starošću povećava se aktivnost 11 β -HSD-1, čime doprinosi naglašenijem efektu GC na skelet starijih osoba [337].

U našoj studiji, kada se posmatraju nezavisno od pola, pacijenti sa BAI su imali veću prevalenciju SH i osteoporoze, iako to nije bilo praćeno razlikom u učestalosti metaboličkih komplikacija i hipertenzije. Pacijenti sa BAI su imali značajno niži BMD lumbalne kičme i totalnog kuka u odnosu na pacijente sa UAI. Nije bilo razlike u prevalenciji osteopenije i osteoporoze vrata femura između pacijenata sa BAI i UAI. Kod pacijenata sa UAI ili BAI nisu uočene značajne razlike između WT i nosioca ispitivanih polimorfizama GR, niti vezano za SH i pol, kao ni značajna povezanost koštane gustine, koštanih markera i polimorfizama GR. Polimorfizmi GR nisu imali značajan prediktivni efekat na smanjenje koštane gustine ni jednog dela skeleta.

Do sada je objavljena samo jedna studija koja je poredila koštanu gustinu između 175 pacijenata sa UAI i 38 sa BAI, koja je našla niži BMD vrata femura kod pacijenata sa BAI (-0.45 ± 0.86 vs 0.09 ± 1.07 , $P=0.004$) i veću prevalenciju vertebralnih fraktura kod pacijenata sa BAI (52.6 vs 28%, $P=0.007$) [183]. Kao i u našoj studiji pacijenti sa BAI i UAI se nisu međusobno razlikovali po starosti, prevalenciji menopauze i trajanju menopauze. Za razliku od naših rezultata, nisu se razlikovali po prevalenciji SH. SH je

dijagnostikovano u prisustvu dva od tri kriterijuma koja su obuhvatila UFC >193 nmol/24 h, DST-1mg kortizol > 83 nmol/l ili ACTH<2.2 pmol/l. Prisustvo vertebralnih fraktura je bilo povezano sa BAI (OR= 2.6, 95% CI 1.2–5.6, p=0.016), nezavisno od prisustva SH (OR=1.77, 95% CI 0.85–3.7, p=0.12), BMI (OR 1.06, 95% CI 0.98–1.13, p=0.1), godina (OR 1.07, 95% CI 1.04–1.11, P=0.0001) i BMD lumbalne kičme (OR 1.31, 95% CI 1.03–1.67, P=0.03). Kada su posmatrali SH u odnosu na prevalenciju fraktura, našli su da je povezana sa većom prevalencijom samo kod UAI što su već prethodno pokazali u svojim radovima [291, 288, 289], ali ne kod pacijenata sa BAI. Zaključili su da zahvaćenost kostiju kod BAI pacijenata može biti povezana sa drugim uzrocima, ali da SH svakako doprinosi koštanom gubitku.

Moguće objašnjenje razlike u kliničkom fenotipu pacijenata je različita etiopatogeneza BAI and UAI [338, 339, 340]. Svakako, različito trajanje i diskretne autonomne produkcije kortizola može uticati na kliničku ekspresiju. Poznato je da je kod pacijenata sa AI sekrecija kortizola podložna fluktuacijama i da se u momentu hormonske evaluacije ne mora detektovati povećana sekrecija kortizola. Stoga su neophodne longitudinalne studije za procenu kliničkih implikacija subkliničkog hiperkorticismusa. Razlike u interindividualnoj glukokortikoidnoj senzitivnosti, ali i tkivno specifične razlike u senzitivnosti, zavise od polimorfizma gena za GR i 11BHS-1 koji mogu imati protektivnu ili vulnerabilnu ulogu u ispoljavanju komorbiditeta [341]. Pored toga, neophodno je usaglasiti kriterijume za dijagnozu SH. Rezultati naglašavaju potrebu za bliskim praćenjem pacijenata sa AI sa i bez SH, s obzirom da nemaju svi pacijenti sa SH isti rizik za nastanak metaboličkih i kardiovaskularnih komplikacija. Stoga su neophodna dalja ispitivanja koja će omogućiti bolje okarakterisanje fenotipskih i hormonskih karakteristika, odnosno koja će pomoći identifikaciji subpopulacije pacijenata sa visokim rizikom koji bi imali korist od hirurškog lečenja ili intenzivnijeg lečenja komorbiditeta.

6. ZAKLJUČCI

1. Pacijenti sa UAI i pacijenti sa BAI se nisu međusobno razlikovali po starosti, polu, BMI i OS. Većina pacijenata je imala abdominalni tip gojaznosti. Između pacijenata sa UAI i BAI nije bilo razlike u prevalenciji DM2 i hipertenzije, trajanju hipertenzije, visini sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska. Takođe nije bilo razlike u nivou lipida, HOMA-IR i prevalenciji MetS.
2. Između pacijenata sa UAI i BAI postojala je značajna razlika u biohemijskim markerima hiperkorticizma. Pacijenti sa BAI imaju niže vrednosti ACTH i veće vrednosti kortizola nakon DST-1mg i nakon LDDST. Ovi rezultati ukazuju na značajnije suprimovanu aktivnost HHA osovine usled veće autonomne produkcije kortizola kod pacijenata sa BAI.
3. Kod pacijenata sa BAI postoji značajno veća učestalost izostanka supresije kortizola nakon DST-1mg i nakon LDDST u odnosu na pacijente sa UAI, nezavisno od primenjenih kriterijuma supresije (kortizol < 50nmol/l; 50-137.9nmol/l; > 138nmol/l).
4. U ukupnom broju pacijenata prevalencija SH na osnovu DST-1mg je iznosila 20.5%, a na osnovu LDDST iznosila je 20%.
5. Prevalencija SH je značajno bila veća kod pacijenata sa BAI u odnosu na pacijente sa UAI.
6. Nije bilo statistički značajne razlike u veličini većeg adrenalnog tumora u odnosu na unilateralni adrenalni tumor.
7. U celoj grupi pacijenata, veličina tumora nadbubrega je nezavisan prediktor nastanka subkliničkog hiperkorticizma. Kod pacijenata sa UAI postoji značajna pozitivna korelacija veličine nadbubrega i SH. Kod pacijenata sa BAI veličina većeg adenoma pokazuje značajnu korelaciju sa SH. To ukazuje da je neophodna kritična masa adrenalnog tumora koja bi uslovlila produkciju dovoljne količine kortizola za indukovanje SH.
8. U celoj grupi, značajno je češće prisustvo nosilaca dužeg C alela *BcII* polimorfizma, prisustvo kraćeg alela *A3669G* polimorfizma i *Er22/23Ek* polimorfizma u grupi pacijenata u odnosu na zdravu populaciju.

9. Duži alel BclI i kraći alel 9 β A3669G polimorfizma su povezani sa predispozicijom za nastanak unilateralnih AI. Nosioци dužeg C alela BclI polimorfizma imaju 1.8 puta veći, a homozigoti za duži C alel skoro četiri puta veći rizik za nastanak unilateralnog adrenalnog tumora. Heterozigoti, nosioци kraćeg alela 9 β polimorfizma GR imaju tri puta, a homozigoti četiri puta veći rizik za nastanak unilateralnog adrenalnog tumora. Nosioци ER22/23EK alela imaju 13 puta veći rizik za nastanak adrenalnih tumora.
10. Normalan humani adrenalni korteks pored brojnih N-terminalnih izoformi GR, dominantno eksprimira GR-D izoformu. Većinu tumorskih uzoraka karakteriše odsustvo drugih receptorskih izoformi, izuzev GR-D što je praćeno smanjenom ekspresijom molekula šaperona. Ovo može biti odgovorno za fiziološku rezistenciju adrenalnog korteksa na GC, disregulaciju produkcije kortizola i tumorski rast.
11. U celoj populaciji pacijenata, pokazana je značajna korelacija gojaznosti, posebno abdominalne gojaznosti (OS), sa hipertenzijom, sistolnim i dijastolnim krvnim pritiskom, pojavom DM2, dislipidemije. Uočena je pozitivna korelacija OS sa insulinskom rezistencijom i MetS.
12. Uočena je pozitivna korelacija HOMAIR sa glikemijom našte i u 120min OGTT, pozitivna korelacija HOMAIR i TG i sniženog HDL.
13. Kada se posmatra telesni sastav (meren DXA metodom), OS pokazuje kompatibilnost sa abdominalnom masnom masom, procentom abdominalnog masnog tkiva, ukupnom masnom masom i indeksom masne mase.
14. Postoji pozitivna korelacija mase abdominalnog masnog tkiva (DXA) i pojave hipertenzije, višeg sistolnog i značajnije dijastolnog krvnog pritiska. Takođe pozitivna korelacija sa glikemijom i insulinemijom našte, hipertrigliceridemijom, HOMAIR i nastankom MetS.
15. Analizom telesnog sastava DXA metodom, u celoj grupi, nije nađena značajna korelacija između masne mase i parametara HHA osovine. Uočena je negativna korelacija mišićne mase ruku i nogu pojedinačno, kao i u zbiru (AMM) sa DST-1mg i LDDST kortizolom i negativna korelacija AMM i SH-DST.
16. Uočena je značajna pozitivna korelacija izostanka supresije kortizola u DST-1mg i LDDST ispod 50nmol/l i glikemije 0min i u 120 min OGTT i negativna korelacija

sa HDL holesterolom. Takođe UFC veći od 245nmol/l pozitivno korelira sa HOMAIR.

17. Kod žena duži C alel Bcl polimorfizma pokazuje tkivno specifičnu senzitivnost. Žene nosioci dužeg C alela imaju manji nivo supresije kortizola nakon 0.5mg dexametazona, što ukazuje na relativnu GC rezistenciju na nivou HHA osovine. Imaju manju prevalenciju IFG, IGT i DM2 što ukazuje na GC rezistenciju. Prisustvo dužeg alela BclI polimorfizma kod žena korelira sa nižom ukupnom mišićnom masom, nižom mišićnom masom ekstremiteta i većim subkutanom masnim tkivom na nogama, što ukazuje na povećanu GC senzitivnost. Starenje i menopauza značajno negativno koreliraju sa AMM. Žene nosioci BclI polimorfizma imaju predispoziciju za veći gubitak mišićne mase starenjem.
18. Prisustvo SH kod žena pozitivno korelira sa pojavom hipertenzije, visinom sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, sa trigliceridima, HOMAIR i pojavom MetS. Žene sa SH češće piju hipolipemike.
19. Kod žena je uočena povezanost glikemija i insulinemija našte, kao i insulinemije u 120 min OGTT-a sa abdominalnom masnom masom, totalnom masnom masom i FMI
20. Žene heterozigoti za N363S polimorfizam u odnosu na WT imaju veću ukupnu i abdominalnu masnu masu i procenat masnog tkiva na ekstremitetima, bez značajne razlike u mišićnoj masi ekstremiteta, ali granične značajnosti LBMI. Uočena je pozitivna korelacija N363S polimorfizma sa BMI, DM2, abdominalnim masnim tkivom, FMI. Imaju hipertenziju značajno duže u odnosu na WT, viši sistolni i dijastolni krvni pritisak. Sve imaju DM2 i MetS ali bez razlike u nivou lipida. Nije uočena razlika u supresibilnosti kortizola na nivou HHA osovine.
21. Žene nosioci ER22/23EK polimorfizma imaju manju supresiju kortizola nakon DST 1mg i LDDST u odnosu na WT što ukazuje na rezistenciju GR na nivou HHA osovine.
22. Muškarci nosioci A3669G polimorfizma GR, imaju nižu ukupnu mišićnu masu, mišićnu masu ruku i procenat masti na rukama. Postoji negativna korelacija prisustva A3669G polimorfizma i AMM, prisustva polimorfizma i ukupne mišićne mase. Nije postojala korelacija između parametara mišićne mase, starosti, DHEAS i

testosterona. Prisustvo A3669G polimorfizma kod muškaraca predstavlja nezavisan prognostički faktor za nižu ukupnu mišićnu masu.

23. Muškarci nosioci A3669G polimorfizma u odnosu na WT, imaju značajno viši insulin našte i u 120min OGTT-a, viši holesterol, viši HDL, viši LDL i imaju veću insulinsku rezistenciju. Nezavisni prognostički faktori insulinske rezistencije kod muškaraca nosioca 9 β polimorfizma su povišeni trigliceridi i manja ukupna mišićna masa. Svi metabolički parametri upućuju na povećanu osetljivost GR na mišićnom tkivu, koja dovodi do smanjenja insulinske senzitivnosti.
24. Kod muškaraca nosioca 9 β polimorfizma GR uočena je češće supresija kortizola iznad 50nmol/l nakon LDDST što ukazuje na veću produkciju kortizola kod ovih pacijenata i/ili na relativnu rezistenciju.
25. Kod svih pacijenata, nezavisno od pola, osobe sa SH u odnosu na one bez SH, imaju niži BMD na svim delovima skeleta: lumbalnoj kičmi, vratu femura, totalnom femuru i totalnom skeletu. Uočena je značajna negativna korelacija parametara HHA osovine (jutarnjeg kortizola, DST-1mg kortizola, LDDST kortizola, UFC i SH) i BMD lumbalne kičme, vrata femura, totalnog kuka i celog skeleta, a prisustvo SH negativno korelira sa BMD svih merenih mesta (lumbalne kičme, vrata i totalnog femura i totalnog skeleta).
26. Kod žena, prisustvo SH negativno korelira sa koštanom gustinom na lumbalnom delu kičme, totalnom kuku i celom skeletu, ali ne i na vratu femura. Žene sa SH u odnosu na one bez, imaju veću prevalenciju osteoporoze kičme i kuka.
27. Starenje i pojava menopauze negativno koreliraju sa BMD lumbalne kičme, totalnog femura, perifernog skeleta i vrata femura, dok gojaznost ima protektivni efekat na svim BMD.
28. Pacijentkinje sa SH su imale statistički značajno veći adenom i češće BAI u odnosu na pacijentkinje bez SH. Nezavisan prediktor nastanka osteoporoze kičme i kuka kod žena je SH. Prisustvo SH pokazuje 6 puta veći rizik za nastanak osteoporoze kičme i kuka. Porast BMI smanjuje rizik od osteoporoze za 22%.
29. Kod muškaraca zabeležena je osteopenija kod 87% pacijenata, a osteoporoza samo kod jednog. Kod muškaraca je uočena negativna korelacija BMD lumbalne kičme sa ponoćnim kortizolom i jutarnjeg kortizola sa pojavom osteopenije na totalnom

femuru. Starost korelira negativno sa koštanom gustinom na nivou lumbalne kičme, a na vratu femura pojava osteopenije korelira sa padom testosterona.

30. U celoj grupi, uočena je značajna pozitivna korelacija beta-crosslaps i LDDST kortizola, koja se zadržava kao značajna samo kod žena. Kod žena beta-crosslaps i osteocalcin negativno koreliraju sa BMD na nivou kičme, vrata i totalnog femura i BMD celog skeleta, dok se kod muškaraca zadržava negativna korelacija beta-crosslaps sa T skorom na nivou lumbalne kičme.
31. Nisu uočene statistički značajne razlike u nivou koštanih markera, vitD, PTH, Ca i P između pacijenata sa UAI i BAI niti unutar grupa vezano za prisustvo SH, kao ni značajne korelacije sa parametrima HHA osovine i polimorfizmima GR.
32. Kod pacijenata sa UAI, nosioci dužeg C alela BclI polimorfizma, imaju značajno veću prevalenciju osteoporoze na nivou lumbalne kičme u odnosu na WT. Uočena je pozitivna korelacija BclI polimorfizma i pojave osteoporoze kičme i kuka. Ovo ukazuje na veću senzitivnost GR.
33. Nosioci N363S polimorfizma su bile žene u postmenopauzi i sve tri su imale normalnu koštanu gustinu na nivou kičme i kuka.
34. Pacijenti sa AI koji su heterozigoti za A3669G imaju značajno manju učestalost osteoporoze u odnosu na WT i uočena je negativna korelacija između A3669G polimorfizma i pojave osteoporoze. Ova protektivna uloga A3669G polimorfizma posledica je relativne rezistencije na GC.
35. Kada se posmatraju nezavisno od pola, pacijenti sa BAI su imali značajno niži BMD lumbalne kičme i totalnog kuka u odnosu na pacijente sa UAI. Nije bilo razlike u prevalenciji osteopenije i osteoporoze vrata femura između pacijenata sa BAI i UAI.
36. Rezultati ukazuju na tkivno specifičnu razliku u glukokortikoidnoj senzitivnosti u kojoj polimorfizmi gena za GR mogu imati protektivnu ili vulnerabilnu ulogu, posebno u uslovima autonomne produkcije kortizola. Polimorfizmi gena za GR su povezani sa predispozicijom za nastanak AI, intraadrenalnu rezistenciju korteksa na GC i disregulaciju produkcije kortizola.

7. SPISAK LITERATURE

1. Gorovits R, Ben-Dror I, Fox LE, Westphal HM, Vardimon L. Developmental changes in the expression and compartmentalization of the glucocorticoid receptor in embryonic retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(11):4786–90.
2. Hsu SC, DeFranco DB. Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem*. 1995; 270(7):3359–64.
3. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, et al. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocrine Reviews*, 1995; 16: 460–484.
4. Barzon L, Sonino N, Fallo F, et al. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *European Journal of Endocrinology*, 2003; 149: 273–285.
5. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, et al. Incidentally Discovered Adrenal Tumors: Endocrine and Scintigraphic Correlates. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83: 55-62.
6. Chiodini I. Diagnosis and Treatment of Subclinical Hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96:1223-1236
7. Stratakis CA, Kirschner LS. Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing syndrome. *Horm Metab Res*.1998. 30:456–463
8. Stratakis A C, Boikos AS. Genetics of adrenal tumors associated with Cushing’s syndrome: a new classification for bilateral adrenocortical hyperplasias. *nature clinical practice, Endocrinology & metabolism*, 2007; 11:748-757
9. Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberration in macronodular adrenal disease. *Ann NY Acad Sci*.2002; 968:240–25
10. Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B, Zacharieva S, Pignatelli D, Carney JA, Luton JP, Bertagna X, Stratakis CA, Bertherat J Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet*. 2002; 71:1433–1442

11. Barisson MC, Villares Fragoso, Guilherme Asmar Alencar, Antonio Marcondes Lerario, et al. Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia. *Journal of Endocrinology*, 2015; 224: R31–R43.
12. Assie G, Libe R, Espiard S, et al. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 2013;369:2105-2114
13. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, et al. Macronodular hyperplasia due to mutations in an Armadillo repeat containing 5 (ARMC5) Gene: a clinical and genetic investigation. *JCEM*. 2014; 99:E1113-9.
14. Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, Johnson TA, Voss TC, Lightman SL, Hager GL. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol*. 2009; 11:1093-1102.
15. Melmed S, Williams RH 2011 *Williams textbook of endocrinology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
16. de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998;19 (3):269-301.
17. Spencer RL, Kim PJ, Kalman BA, Cole MA. Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Endocrinology*. 1998;139(6):2718-26.
18. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 2000; 886(1-2):172-89.45.
19. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr rev*. 2004;25:947.
20. AritW, Stewart PM, Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *ndocrinol Metab Clin North Am*. 2005;34-293
21. Aranoff G, Rösler A. Urinary tetrahydrocortisone and tetrahydrocortisol glucosiduronates in normal newborns, children and adults. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1980; 94(3):371-5.
22. JR. Seckl. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharm*. 2004;4:597

23. Walker EA, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14(7):334-9.
24. Argaud D, Zhang Q, Pan W, Maitra S, Pilkis SJ. Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence. *Diabetes.* 1996; 45(11):1563-71.
25. Wang CN, McLeod RS, Yao Z, Brindley DN Effects of dexamethasone on the synthesis, degradation, and secretion of apolipoprotein B in cultured rat hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(9):1481-91.
26. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004; 279(31):32345-53
27. Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab (Lond).* 2005; 2: 3
28. Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest.* 1997; 99(3):414-23.
29. Lloyd-MacGilp SA, Nelson SM, Florin M, Lo M, McKinnell J, Sassard J, Kenyon CJ. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid action in Lyon hypertensive rats. *Hypertension.* 1999; 34(5):1123-8.
30. Magiakou MA, Smyrniaki P, Chrousos GP. Hypertension in Cushing's syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006; 20:467
31. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A: Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 144–149
32. Manelli F, Giustina A: Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 79–85.
33. Chiodini I, Torlontano M, Carnevale V, Trischitta V, Scillitani A: Skeletal involvement in adult patients with endogenous hypercortisolism. *J Endocrinol Invest.* 2008; 31:267–276
34. Ueland, T., Bollerslev, J., Godang, K. et al. Increased serum osteoprotegerin in disorders characterized by persistent immune activation or glucocorticoid excess—possible role in bone homeostasis. *European Journal of Endocrinology.* 2001; 145: 685–690.

35. Camozzi, V., Sanguin, F., Albigier, N. et al. Persistent increase of osteoprotegerin levels after cortisol normalization in patients with Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology*. 2010; 162: 85–90.
36. Canalis E: Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2005; 3:98–102
37. Weinstein, R.S. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *New England Journal of Medicine*,2001; 365: 62–70.
38. Pierotti, S., Gandini, L., Lenzi, A. et al. Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid- induced osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2008; 108: 292–299
39. Abu, E.O., Horner, A., Kusec, V. et al. The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009; 85: 883–889
40. Cooper, M.S., Walker, E.A., Bland, R. et al. Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone*.2000; 27: 375–381.
41. Lekva, T., Bollerslev, J., Kristo, C. et al. The glucocorticoid- induced leucine zipper gene (GILZ) expression decreases after successful treatment of patients with endogenous Cushing's syndrome and may play a role in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.2010; 95: 246–255.
42. Lekva, T., Ueland, T., Boyum, H. et al. TXNIP is highly regulated in bone biopsies from patients with endogenous Cushing's syndrome and related to bone turnover. *European Journal of Endocrinology*.2012;166:1039–1048.
43. Wang, F.S., Wu, R.W., Ko, J.Y. et al. Heat shock protein 60 protects skeletal tissue against glucocorticoid-induced bone mass loss by regulating osteoblast survival. *Bone*.2011; 49:1080–1089.
44. Beavan S., Horner A., Bord S., Ireland D.,Compston J. Colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in human bone. *J Bone Miner Res*. 200; 16 (8): 1496-504.

45. Masera R.G., Dovio A., Sartori M.L., Racca S.,Angeli A. Interleukin-6 upregulates glucocorticoid receptor numbers in human osteoblast-like cells. *Z Rheumatol.*2001; 59, 2: II/103-7.
46. Dovio A., Masera R.G., Sartori M.L., Racca S.,Angeli A. Autocrine up-regulation of glucocorticoid receptors by interleukin-6 in human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int.*2001;69(5): 293-8.
47. Angeli A., Dovio A., Sartori M.L., Masera R.G., Ceoloni B., Prolo P., Racca S.,Chiappelli F. Interactions between glucocorticoids and cytokines in the bone microenvironment. *Ann N Y Acad Sci.*2002; 966: 97-107.
48. Hock J.M., Centrella M.,Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology.*1988; 122(1): 254-60
49. Canalis E., Rydziel S., Delany A.M., Varghese S.,Jeffrey J.J. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology.*1995; 136(4): 1348-54.
50. Delany A.M., Durant D.,Canalis E. Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol.*2001; 15(10): 1781-9.
51. Bennett A., Chen T., Feldman D., Hintz R.L.,Rosenfeld R.G. Characterization of insulin-like growth factor I receptors on cultured rat bone cells: regulation of receptor concentration by glucocorticoids. *Endocrinology.*1984; 115(4): 1577-83.
52. Rechler M.M.(1993) Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm;* 47: 1-114
53. Gabbitas B., Pash J.M., Delany A.M.,Canalis E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures by transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.*1996; 271(15): 9033-8
54. Shaker JL, Lukert BP: Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005; 34: 341–343.
55. Van Staa, T.P., Leufkens, H.G., Abenhaim, L. et al. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *Journal of Bone and Mineral Research.*2000; 15: 993–1000.

56. Vestergaard, P., Rejnmark, L. & Mosekilde, L. Fracture risk associated with different types of oral corticosteroids and effect of termination of corticosteroids on the risk of fractures. *Calcified Tissue International*.2008; 82: 249–257
57. Vestergaard, P., Lindholm, J., Jorgensen, J.O. et al. Increased risk of osteoporotic fractures in patients with Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology*.2002;146: 51–56.
58. Futo, L., Toke, J., Patocs, A. et al. Skeletal differences in bone mineral area and content before and after cure of endogenous Cushing's syndrome. *Osteoporosis International*.2008; 19: 941–949.
59. Tauchmanova, L., Pivonello, R., Di Somma, C. et al. Bone demineralization and vertebral fractures in endogenous cortisol excess: role of disease etiology and gonadal status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.2006; 91: 1779–1784
60. van der Eerden, A.W., den Heijer, M., Oyen, W.J. et al. Cushing's syndrome and bone mineral density: lowest Z scores in young patients. *Netherlands Journal of Medicine*.2007; 65: 137–141
61. Kristo C., Jemtland, R., Ueland, T. et al. Restoration of the coupling process and normalization of bone mass following successful treatment of endogenous Cushing's syndrome: a prospective, long-term study. *European Journal of Endocrinology*.2006; 154: 109–118.
62. Karavitaki, N., Ioannidis, G., Giannakopoulos, F. et al. Evaluation of bone mineral density of the peripheral skeleton in pre- and postmenopausal women with newly diagnosed endogenous Cushing's syndrome. *Clinical endocrinology (Oxford)*. 2004; 60: 264–270.
63. Godang, K., Ueland, T. & Bollerslev, J. Decreased bone area, bone mineral content, formative markers, and increased bone resorptive markers in endogenous Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology*.1999; 141: 126–131
64. N.C. Harvey, C.C. Glüer, N. Binkley, E.V. McCloskey, M.-L. Brandi, et al. Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice. *Bone*. 2015; 78: 216–224.

65. Chiodini, I., Carnevale, V., Torlontano, M. et al. Alterations of bone turnover and bone mass at different skeletal sites due to pure glucocorticoid excess: study in eumenorrheic patients with Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.1998; 83:1863–1867
66. Majnik, J., Szucs, N., Patocs, A. et al. Effect of single doses of dexamethasone and adrenocorticotrop hormone on serum bone markers in healthy subjects and in patients with adrenal incidentalomas and Cushing's syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*.2004; 27: 747–753.
67. Dovio, A., Perazzolo, L., Saba, L. et al.High-dose glucocorticoids increase serum levels of soluble IL-6 receptor alpha and its ratio to soluble gp130: an additional mechanism for early increased bone resorption. *European Journal of Endocrinology*.2006; 154: 745–751
68. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*.1998; 94(6):557–72.
69. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000; 21(1):55–89.
70. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression,biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem*.1996; 271(16):9550–9.
71. Kino T, Su YA, Chrousos GP. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understandingof its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(21): 3435–48.
72. Schaaf MJ, Cidlowski JA. AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*. 2002; 67(7):627–36.
73. Ray DW, Davis JR, White A, Clark AJ. Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res*. 1996; 56(14):3276
74. Beger C, Gerdes K, Lauten M, Tissing WJ, Fernandez-Munoz I, Schrappe M, et al. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in

- human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol.* 2003; 122(2):245– 52.
75. Oakley and Cidlowski. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132(5): 1033–1044
 76. Kumar R, Calhoun WJ. Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics.* 2008; 2(4):845–54.
 77. Kadmiel M, Cidlowski AJ. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2013; Vol. 34, No. 9
 78. Tian S, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA. Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J.* 2002; 367(3):907–11.
 79. Le Drean Y, Mincheneau N, LeGoff P, Michel D. Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology.* 2002; 143(9):3482–9.
 80. Kumar R, Thompson EB. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 94(5):383–9
 81. Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 275(1-2):2–12.
 82. Uhlenhaut NH, Barish GD, Yu RT, Downes M, Karunasiri M, Liddle C, et al. Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cisomes. *Mol Cell.* 2013; 49(1):158–71.
 83. Ronacher K, Hadley K, Avenant C, Stubbsrud E, Simons SS Jr, Louw A, et al. Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 299(2):219–31
 84. Reddy TE, Gertz J, Crawford GE, Garabedian MJ, Myers RM. The hypersensitive glucocorticoid response specifically regulates period 1 and expression of circadian genes. *Mol Cell Biol.* 2012; 32(18):3756–67.
 85. Samarasinghe RA, Di Maio R, Volonte D, Galbiati F, Lewis M, Romero G, et al. Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular

- communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(40):16657–62
86. Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome *Nutrition & Metabolism* 2005, 2:3
87. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, et al. Glucocorticoid receptor polymorphisms, skin vasoconstriction, another metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83 (6): 1846-1852.
88. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic Acids Research* 1987;15(16):6765.
89. van Rossum, E. F. C., Koper, J. W., van den Beld, A. W., et al. *Clin. Endocrinol.* 2003; 59: 585–592.
90. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, et al. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obesity Research* 2000;8(3):211-218.
91. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG. An association between a Bcl1 restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *Journal of Molecular Endocrinology* 1992;9(3):295-300.
92. Bumann B, Vohl MC, Chagnon M, et al. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obesity Research* 1997;5(3):186-192.
93. Ukkola O, Perusse L, Chagnon YC, Despres JP, Bouchard C. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders*. 2001;25(9):1332-1339.
94. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Despres JP, Drapeau V, Perusse L. Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(7):3141-5).
95. van Rossum, E. F. C. and Lamberts, S. W. *Rec. Prog. Horm. Res.* 2004; 59: 333–357.

96. Di Blasio A M, van Rossum E F, Maestrini S et al. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 59: 68–74.
97. Huizenga N A, Koper J W, De Lange P et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 144–151.
98. Roussel R, Reis A F, Dubois-Laforgue D et al. The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 2003; 59:237–241.
99. Dobson M G, Redfern C P, Unwin N, Weaver J U. The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2270–2274.
100. Rosmond R, Bouchard C, Björntorp P. Tsp509I polymorphism in exon 2 of the glucocorticoid receptor gene in relation to obesity and cortisol secretion: cohort study. *BMJ* 2001; 322: 652–653.
101. Halsall D J, Luan J, Hales N et al. Glucocorticoid receptor variant and body mass index. <http://bmj.bmjournals.com/cgi/eletters/319/7221/1337>
102. Echwald S M, Sorensen T I, Andersen T, Pedersen O. The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25: 1563–1565.
103. Morris B J, Lin R C, Wang X L et al. Central obesity is associated with glucocorticoid receptor N363S variant: big picture sheds light 2003; *Obes Res.* 11: 1607–1609.
104. Buemann B, Black E, Holst. Et al. The N363S Polymorphism of the Glucocorticoid Receptor and Metabolic Syndrome Factors in Men The N363S Polymorphism of the Glucocorticoid Receptor and Metabolic Syndrome Factors in Men. *Obesity Research* 2005;13: 862–867
105. DeRijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the

- glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2001; 28 (11): 2383-2388.
106. Syed AA, Irving JAE, Redfern CPF, Hall AG, Unwin NC, White M, Bhopal RS, Weaver JU, Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G in exon 9 β with reduced central adiposity in women. *Obesity*, 2006; 14 (5): 759-764.
 107. E.L. van den Akker, J.W. Koper, E.F. van Rossum, M.J. Dekker, H. Russcher, F.H. de Jong, A.G. Uitterlinden, A. Hofman, H.A. Pols, J.C. Witteman, S.W. Lamberts, Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease, *Arch. Intern. Med.* 2008; 168 (1): 33–39.
 108. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49(4): 403-14
 109. Hanley AJ, Karter AJ, Williams K, et al. Prediction of type 2 diabetes mellitus with alternative definitions of the metabolic syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation*. 2005; 112(24): 3713-21.
 110. Grundy SM Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47: 1093–1100.
 111. Meigs JB, Rutter MK, Sullivan LM, Fox CS, D'Agostino Sr RB, Wilson PW .Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2007; 30: 1219–1225
 112. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120 (16): 1640-5.
 113. Micić D, Danica Stamenković-Pejković, Snežana Polovina Metabolički sindrom, diabetes mellitus tip 2 i kardiovaskularni poremećaji. *Medicinski glasnik* 2010; 19-42
 114. Cornier MA, Dabalea D, Hernandez TL, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2008; 29 (7): 777-822.

115. Kahn C R: Insulin resistance, Insulin Insensitivity and Insulin Unresponsivines: A necessary Distintion. *Metabolism*, 1987; 27:1893-1902.
116. Consensus Development Conference on Insulin resistance. 5-6 Nov 1997. American Diabetes Association. *Diabetes Care*.1998;21 (2):310-4.
117. White MF Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 ; 84(7):725-37.
118. Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1*Mol Cell Biol*. 1993; 13(12):7418-28
119. Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport.*Nature*.2000; 407: 202–207
120. Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A, Williams RL. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal*.2011;4: re2.
121. Schultze SM, Jensen J, Hemmings BA, Tschopp O, Niessen M. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch Physiol Biochem*.2011;117: 70–77.
122. Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*.2010; 39: 171–183
123. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO cription factors; Regulation by AKT and 14–3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*.2011; 1813: 1938–194.
124. Kim J, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction.*Circulation*. 2006;113:1888-1904.
125. Boucher J et al. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6:0091911
126. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ .The metabolic syndrome. *Lancet*.2005; 365:1415–1428
127. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1:785–789

128. Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.*2002; 43:1585–1594
129. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R, Zimmermann R .Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *JBiol Chem.*2006; 281:40236 -40241
130. Tančić-Gajić M. Efekti redukcije telesne mase na promene androgenog statusa, metaboličkog i opstruktivnog apneja sindroma u izrazito gojaznih muškaraca. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2016
131. Bergman RN, Ader M, Huecking K, Van Citters G. Accurate assessment of β -cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes.*2002; 51(1):S212–S220.
132. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab.*2007; 92:1023–1033
133. Sopasakis VR, Sandqvist M, Gustafson B, Hammarstedt A, Schmelz M, Yang X, Jansson PA, Smith U . High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res.*2004; 12:454–460
134. Hube F, Hauner H. The role of TNF- α in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm Metab Res.*1999; 31:626–631
135. Ohman MK, Wright AP, Wickenheiser KJ, Luo W, Eitzman DT. Visceral adipose tissue and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.*2009; 7:169–179
136. Kershaw EE, Flier JS 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548–2556
137. Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults - the evidence report. National Institutes of Health. *Obesity Research*, 1998; 6(2): 51S–209S
138. Joint Scientific Statement. Harmonizing the Metabolic Syndrome. A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 2009;120:1640-1645

139. Brochu M. Contribution of the Lean Body Mass to Insulin Resistance in Postmenopausal Women With Visceral Obesity: A Monet Study. *Obesity* (2008) 16, 1085–1093
140. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 1997; 20: 1183-1197
141. National Cholesterol Educational Programm (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Educational Programm (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation*, 2002; 106: 3143
142. Matthews DR, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in men. *Diabetologia*, 1985; 28:412–9.
143. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, et al. ESE and ENSAT guidelines on adrenal incidentaloma. v.21.12.2015
144. Cosman F, De Beur SJ, Le Boff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R. National Osteoporosis Foundation. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2014; 25: 2359–2381
145. Nelson B. Watts, Robert A. Adler, John P. Bilezikian Osteoporosis in Men: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline *Clin Endocrinol Metab*.2012; 97: 1802–1822.
146. M. Boyanov. Estimation of lumbar spine bone mineral density by dual-energy X ray absorptiometry: standard anteroposterior scans vs sub-regional analyses of whole body scans, *British Journal of radiology*. 2008; v81,968: 637-642
147. Antić A.J. Značaj polimorfizama u genima za glukokortikoidni i adrenokortikotropni receptor u nastanku adrenalnih incidentaloma. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2015
148. Damjanović S, Antic J, Ilic B, Beleslin Cokic B, Ivovic M. et al. Glucocorticoid Receptor and Molecular Chaperones in the Pathogenesis of Adrenal Incidentalomas: Potential Role of Reduced Sensitivity to Glucocorticoids, *MOLMED*.2012;18:1456-1465

149. Matthews DR, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in men. *Diabetologia*, 1985; 28:412–9.
150. Terzolo M , Bovio S , Reimondo G , Pia A , Osella G , Borretta G , Angeli A. Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.*2005; 34:423–439
151. Reincke M .Subclinical Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.*2000; 29:47–56
152. Terzolo M , Reimondo G , Bovio S , Angeli A Subclinical Cushing's syndrome. *Pituitary.*2004; 7:217–223 .
153. Guido Di Dalmazi, Renato Pasquali, Felix Beuschlein, Martin Reincke. Subclinical hypercortisolism: a state, a syndrome, or a disease? *EJE* .2015; 173: M61–M71
154. Hwang JY , Lee SH , Kim GS , Koh JM , Go MJ , Kim YJ , Kim HC , Kim TH , Hong JM , Park EK , Lee JY , Kim SY. HSD11B1 polymorphisms predicted bone mineral density and fracture risk in postmenopausal women without clinically apparent hypercortisolemia. *Bone.*2009; 45:1098–1103
155. Chiodini I, Guglielmi G, Battista C, Carnevale V, Torlontano M, Cammisà M, Trischitta V, Scillitani A. Spinal volumetric bone mineral density and vertebral fractures in female patients with adrenal incidentalomas: the effect of subclinical hypercortisolism and gonadal status. *J Clin Endocrinol Metab.*2004; 89:2237–2241
156. Valli N, Catargi B, Ronci N, Vergnot V, Leccia F, Ferriere JM, Chene G, Grenier N, Laurent F, Tabarin A. Biochemical screening for subclinical cortisol-secreting adenomas amongst adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol.* 2001;144:401–408
157. Katabami T, Obi R, Shirai N, Naito S, Saito N. Discrepancies in results of low- and high-dose dexamethasone suppression tests for diagnosing preclinical Cushing's syndrome. *Endocr J.*2005; 52:463–469
158. Ambrosi B, Peverelli S, Passini E, Re T, Ferrario R, Colombo P, Sartorio A, Faglia G Abnormalities of endocrine function in patients with clinically silent adrenal masses. *Eur J Endocrinol.*1995; 132: 422–428

159. Bardet S, Rohmer V, Murat A, Guillemot C, Mare´chaud R, Chupin M, Lecomte P, Simon D, Delemer B, Schneebelli S, Beutter D, Jacquin V, Peltier P, Charbonnel B. 131I-6-b-Iodomethylnorcholesterol scintigraphy: an assessment of its role in the investigation of adrenocortical incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*.1996; 44: 587–596
160. Eller-Vainicher C, Morelli V, Salcuni AS, Battista C, Torlontano M, Coletti F, Iorio L, Cairoli E, Beck-Peccoz P, Arosio M, Ambrosi B, Scillitani A, Chiodini I. Accuracy of several parameters of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in predicting before surgery the metabolic effects of the removal of an adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol*.2010; 163:925–935
161. Osella G, Terzolo M, Borretta G, Magro G, Alí A, Piovesan A, Paccotti P, Angeli A. Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). *J Clin Endocrinol Metab*.1994; 79:1532–1539
162. Flecchia D, Mazza E, Carlini M, Blatto A, Olivieri F, Serra G, Camanni F, Messina M. Reduced serum levels of dehydroepiandrosterone sulphate in adrenal incidentalomas: a marker of adrenocortical tumour. *Clin Endocrinol (Oxf)*.1995; 42:129–134
163. NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass (“incidentaloma”). NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. 2002; 19: 1–25.
164. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, et al. The diagnosis of Cushing’s syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *JCEM*. 2008; 93:1526–1540.
165. Tabarin A, Bardet S, Bertherat J, Dupas B, Chabre O, et al. French Society of Endocrinology Consensus. Exploration and management of adrenal incidentalomas. French Society of Endocrinology Consensus. *Annales d’Endocrinologie*. 2008; 69: 487–500
166. Zeiger MA, Thompson GB, Duh QY, Hamrahian AH, Angelos P, et al. American Association of Clinical Endocrinologists; American Association of Endocrine Surgeons. The American Association of Clinical Endocrinologists and American

- Association of Endocrine Surgeons medical guidelines for the management of adrenal incidentalomas. *Endocrine Practice*. 2009; 15 (1): 1–20.
167. Terzolo M, Stigliano A, Chiodini I, Loli P, Furlani L, et al. Italian Association of Clinical Endocrinologists. AME position statement on adrenal incidentaloma. *European Journal Endocrinology*. 2011; 164: 851–870.
 168. Piaditis GP, Kaltsas GA, Androulakis II, Gouli A, Makras P, et al. High prevalence of autonomous cortisol and aldosterone secretion from adrenal adenomas. *Clinical Endocrinol*. 2009;71:772-778
 169. Arnaldi G , Angeli A , Atkinson AB , Bertagna X , Cavagnini F , Chrousos GP , Fava GA Findling JW , Gaillard RC , Grossman AB , Kola B , Lacroix A , Mancini T , Mantero F , Newell-Price J , Nieman LK , Sonino N , Vance ML , Giustina A , Boscaro M. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*.2003; 88:5593
 170. Chiodini i. Diagnosis and Treatment of Subclinical Hypercortisolism *J Clin Endocrinol Metab*.2011; 96: 1223–1236
 171. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, Del Viscovo L, Nuzzo V, Lombardi G. Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *J Clin Endocrinol Metab*.2000; 85:1440–1448.
 172. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo- Cushing's states. *Endocr Rev*.1998; 19:647–672
 173. Mazzuco TL, Bourdeau I, LacroixA. Adrenal incidentalomas and subclinical Cushing's syndrome: diagnosis and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*.2009; 16:203–210.
 174. Tsagarakis S, Vassiliadi D, Thalassinou N. Endogenous subclinical hypercortisolism: diagnostic uncertainties and clinical implications.*J Endocrinol Invest*.2006; 29:471–482.
 175. Raff H, Findling JW .A physiologic approach to diagnosis of the Cushing syndrome. *Ann Intern Med*.2003; 138:980–991

176. Tsagarakis S, Roboti C, Kokkoris P, Vasiliou V, Alevizaki C, Thalassinou N. Elevated post-dexamethasone suppression cortisol concentrations correlate with hormonal alterations of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in patients with adrenal incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*.1998; 49:165–171.
177. Bencsik Z, Szabolcs I, Kovács Z, Ferencz A, Vörös A, Kaszás I, Bor K, Gönczi J, Góth M, Kovács L, Dohán O, Szilágyi G. Low dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) level is not a good predictor of hormonal activity in nonselected patients with incidentally detected adrenal tumors. *JCEM*.1996; 81:1726– 1729
178. Paschou AS, Kandaraki E, Dimitropoulou F, Goulis GD, Vryonidou A. Subclinical Cushing's syndrome in patients with bilateral compared to unilateral adrenal incidentalomas: a systemic review and meta-analysis. *Endocrine*, 2016; 51:225-235.
179. Vassilatou E, Vryonidou A, Ioannidis D, Paschou SA, Panagou M, Tzavara I. Bilateral adrenal incidentalomas differ from unilateral adrenal incidentalomas in subclinical cortisol hyper-secretion but not in potential clinical implications. *EJE*, 2014;171: 37-45
180. Vassiliadi DA, Ntali G, Vicha E, Tsagarakis S. High prevalence of subclinical hypercortisolism in patients with bilateral adrenal incidentalomas: a challenge to management. *Clin Endocrinol*, 2011; 74:438-444
181. Androulakis I, Kaltsas G, Markou A, et al. The functional status of incidentally discovered bilateral adrenal lesions. *Clin Endocrinol*, 2011; 75: 44-49
182. Yener S, Yilmaz H, Demir T, Secil M, Comlekci A. DHEAS for the prediction of subclinical Cushing's syndrome: perplexing or advantageous? *Endocrine*, 2015; 48: 669-676
183. Morelli V, Palmieri S, Salcuni AS, et al. Bilateral and unilateral adrenal incidentalomas: biochemical and clinical characteristics. *Eur J Endocrinol*, 2013; 168: 235–241
184. Olsen H, Nordensrom E, Bergenfelz A, Nyman U, Valde-marsson S, Palmqvist E. Subclinical hypercortisolism and CT appearance in adrenal incidentalomas: a multicenter study from Southern Sweden. *Endocrine*, 2012; 42:164-173

185. Vassilatou E, Vryonidou A, Michalopoulou S, Manolis J, Caratzas J, Phenekos C & Tzavara I. Hormonal activity of adrenal incidentalomas – results from a long term follow-up study. *Clinical Endocrinology*. 2009; 70: 674–679.
186. Young WF Jr, du Plessis H, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, Richards ML, Erickson D, Vella A, Stanson AW, Carney JA et al. The clinical conundrum of corticotropin-independent autonomous cortisol secretion in patients with bilateral adrenal masses. *World Journal of Surgery*. 2008; 32: 856–862.
187. Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, et al. Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *JCEM*. 2006; 91: 2796–2799.
188. Loose DS, Do YS, Chen TL, Feldman D. Demonstration of glucocorticoid receptors in the adrenal cortex: evidence for a direct dexamethasone suppressive effect on the rat adrenal gland. *Endocrinology*. 1980; 107:137–146.
189. Condon J, Gosden C, Gardener D, et al. Expression of type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in early human fetal life. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:4490–4497
190. Paust HJ, Loeper S, Else T, et al. Expression of the glucocorticoid receptor in the human adrenal cortex. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2006; 114:6–10.
191. Bourdeau I, Lacroix A, Schürch W, Caron P, Antakly T, Stratakis CA. Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:3931–3937.
192. Tacon LJ, Soon PS, Gill AJ, et al. The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:4591–4599.
193. Tischler AS, Perlman RL, Morse GM, Sheard BE. Glucocorticoids increase catecholamine synthesis and storage in PC12 pheochromocytoma cell cultures. *J Neurochem*. 1983; 40:364–370.
194. Rayfield EJ, Rose LI, Cain JP, Dluhy RG, Williams GH. ACTH-responsive, dexamethasone suppressible adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*. 1971; 284:591–592.

195. Bourdeau I, Lacroix A, Schürch W et al. Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab*; 2003; 88: 3931-3937.
196. Boyle B, Butz B, Liko I et al. Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids*. 2010;75(10):695-700.
197. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2006; 102:11–21.
198. Chrousos GP, Kino T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci. STKE*. 2005:pe48.38
199. Gummow BM, Scheys JO, Cancelli VR, Hammer GD. Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the Dax-1 promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20:2711–23.9.
200. Graybeal ML, Fang VS, Landau RI. Enhancement of adrenal cortisol secretion after intravenous high dose dexamethasone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988; 61:607–11.39
201. Patocs A, Toth M, Barta C, Sasvari-Szekely M, Varga I, et al. Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas. *EJE*. 2002; 147: 349–355.
202. Roussel HW, Vezzosi D, Rizk-Rabin M, Barreau O, Ragazzon B, René'-Corail F, Reynies A, Bertherat J & Assie G. Identification of gene expression profiles associated with cortisol secretion in adrenocortical adenomas. *JCEM*. 2013; 98: E1109–E1121.
203. Terzolo , Pia A, Ali A, Osella G, Reimondo G, Bovio S et al. Adrenal incidentaloma: a new cause of the metabolic syndrome? *JCEM*. 2002; 87:998-1003.
204. Tauchmanova L, Rossi R, Biondi B, Pulcrano M, Nuzzo V, Palmieri EA et al. Patients with subclinical Cushing's syndrome due to adrenal adenoma have increased cardiovascular risk. *JCEM*, 2002; 87:4872-4878

205. Garrapa GG, Pantanetti P, Arnaldi G, Mantero F, Faloia E. Body composition and metabolic features in women with adrenal incidentaloma or Cushing's syndrome. *JCEM*, 2001; 86:5301–5306.
206. Di Dalmazi G, Vicennati V, Garelli S, Casadio E, Rinaldi E, Giampalma E, et al. Cardiovascular events and mortality in patients with adrenal incidentalomas that are either non-secreting or associated with intermediate phenotype or subclinical Cushing's syndrome: A 15-year retrospective study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014; 2:396–405
207. Morelli V, Reimondo G, Giordano R, Della Casa S, Policola C, Palmieri S et al. Long-term follow-up in adrenal incidentalomas: An Italian multicenter study. *JCEM*, 2014; 20133527.
208. Reincke M, Fassnacht M, Vath S, Mora P, Allolio B. Adrenal incidentalomas: a manifestation of the metabolic syndrome? *Endocr Res*. 1996; 22:757–761.
209. Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and IR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E941–E948.
210. Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes*. 1997;46:1579–1585.
211. Brochu M, Starling RD, Tchernof A et al. Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2378–23843.
212. Di Dalmazi G, Vicennati V, Rinaldi E, Morselli-Labate AM, Giampalma E, Mosconi C, Pagotto U & Pasquali R. Progressively increased patterns of subclinical cortisol hypersecretion in adrenal incidentalomas differently predict major metabolic and cardiovascular outcomes: a large cross-sectional study. *European Journal Endocrinology*. 2012 ;166: 669–677
213. Morelli V, Reimondo G, Giordano R, Della Casa S, Policola C, Palmieri S, Salcuni AS, Dolci A, Mendola M, Arosio M et al. Long-term follow-up in adrenal incidentalomas: an Italian multicenter study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014; 99: 827–834

214. Debono M, Bradburn M, Bull M, Harrison B, Ross RJ & Newell-Price J. Cortisol as a marker for increased mortality in patients with incidental adrenocortical adenomas. *JCEM*. 2014; 99: 4462–4470
215. Ivovic M, Marina LV, Vujovic S, Tancic-Gajic M, Stojanovic M, Radonjic NV, Gajic M, Soldatovic I, Micic D. Nondiabetic patients with either subclinical Cushing's or nonfunctional adrenal incidentalomas have lower insulin sensitivity than healthy controls: clinical implications. *Metabolism*. 2013; 62: 786–792.
216. Papanastasiou L, Pappa T, Samara C, Apostolopoulou G, Tsiavos V, Markou A, Alexandraki K, Piaditis G, Chrousos G & Kaltsas G. Nonalcoholic fatty liver disease in subjects with adrenal incidentaloma. *European Journal of Clinical Investigation*. 2012; 42 :1165–1172.
217. Masserini B, Morelli V, Palmieri S, Eller-Vainicher C, Zhukouskaya V, Cairoli E, Orsi E, Beck-Peccoz P, Spada A, Chiadini I. Lipid abnormalities in patients with adrenal incidentalomas: role of subclinical hypercortisolism and impaired glucose metabolism. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2015; 38: 623–628.
218. Wels JCK. Sexual dimorphism of body composition. *Clinical Endocrinology and metabolism*. 2007; 21(3):415-430.
219. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG, An association between a BclII restriction length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinemia in obese women. *J Mol Endocrinol*, 1992; 9 (3): 295-300
220. Buemann et al., 1997 B. Buemann, M.C. Vohl, M. Chagnon, Y.C. Chagnon, J. Gagnon, L. Perusse, F. Dionne, J.P. Despres, A. Tremblay, A. Nadeau and C. Bouchard, Abdominal visceral fat is associated with a BclII restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus, *Obes. Res.* 1997; 5:186–192
221. Weaver et al., 1992 J.U. Weaver, G.A. Hitman and P.G. Kopelman, An association between a BclII restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women, *J. Mol. Endocrinol*. 1992; 9: 295–300
222. van Rossum J.W. Koper, N.A.T.M. Huizenga, A.G. Uitterlinden, J.A.M.J.L. Janssen, A.O. Brinkmann, F.H. de Jong, C.M. van Duyn, H.A.P. Pols and S.W.J. Lamberts,

- Identification of a restriction site polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with increased sensitivity to glucocorticoids in vivo, corticosteroid-binding globulin and systolic blood pressure, Proc. 84th Annu. Sci. Meeting Endocr. Soc., San Francisco, CA (2002), pp. Oral 49– 1
223. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterhinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW, Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf.)*, 2003; 59 (5): 585-592
 224. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SW, The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf.)*, 2003; 59 (1): 68-74.
 225. Ebrecht et al., 2000 M. Ebrecht, A. Buske-Kirschbaum, D. Hellhammer, S. Kern, N. Rohleder, B. Walker and C. Kirschbaum, Tissue specificity of glucocorticoid sensitivity in healthy adults, *JCEM*. 2000; 85: 3733–3739.
 226. van Rossum EFC, Koper JW, Arp P, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, Pols HAP, Lamberts SWJ. Identification of the Bcl I polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo, and body mass index. *Clin Endocrinol*. 2003; 59:585–592
 227. Walker BR, Best R, Shackleton CH, Padfield PL, Edwards CR. Increased vasoconstrictor sensitivity to glucocorticoids in essential hypertension. *Hypertension*. 1996; 27:190–196.
 228. vanRijen E, Harvey RA, Barton RN, Rose JG, Horan MA. Sensitivity of mononuclear leucocytes to glucocorticoids in elderly hip-fracture patients resistant to suppression of plasma cortisol by dexamethasone. *Eur J Endocrinol*. 1998;138:659–666.
 229. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH, Kenyon CJ. 1998 Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *JCEM*; 83:1846–1852.

230. Nicolaides N, Charmandari E, Chrousos G, Kino T. Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor. *BMC Endocrine Disorders*. 2014; 14:71.
231. Vamvakopoulos NO. Tissue-specific expression of heat shock proteins 70 and 90: potential implication for differential sensitivity of tissues to glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol*. 1993; 98:49–54.
232. Anthony W, Bachmann A, Teresa L, Sedgley R, Richard V, Jackson C, John N, Gibson B, Ross McD, Young D, et al. Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *2006*; 24:233-239.
233. Boersma W, Snijder MB, Nijpels G, Guidone C, Favuzzi AMR, et al. Body composition, insulin sensitivity, and cardiovascular disease profile in healthy Europeans. *Obesity*. 2008; 16:2696–2701.
234. Paradisi G, Smith L, Burtner C, Leaming R, Garvey WT, et al. Dual energy X-ray absorptiometry assessment of fat mass distribution and its association with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*. 1999; 22: 1310–1317
235. Van Pelt RE, Evans EM, Schechtman KB, Ehsani AA, Kohrt WM. Contributions of total and regional fat mass to risk for cardiovascular disease in older women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 282:E1023–E1028
236. Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, et al. Trunk fat and leg fat have independent and opposite associations with fasting and postload glucose levels: the Hoorn study. *Diabetes Care*. 2004; 27:372–377
237. Van Pelt RE, Jankowski CM, Gozansky WS, Schwartz RS, Kohrt WM. Lower-body adiposity and metabolic protection in postmenopausal women. *JCEM*. 2005; 90:4573–4578
238. Sakai Y, Ito H, Egami Y, Ohoto N, Hijii C, et al. Favourable association of leg fat with cardiovascular risk factors. *J Intern Med*. 2005; 257:194–200
239. Williams MJ, Hunter GR, Kekes-Szabo T, et al. Regional fat distribution in women and risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 1997; 65:855–860

240. Tanko LB, Bagger YZ, Alexandersen P, Larsen PJ, Christiansen C. Peripheral adiposity exhibits an independent dominant antiatherogenic effect in elderly women. *Circulation*. 2003; 107:1626 – 1631
241. Godsland IF, Crook D, Proudler AJ, Stevenson JC. Hemostatic risk factors and insulin sensitivity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome. *JCEM*. 2005. 90:190–197
242. Hongyu Wu, Qibin Qi, Zhijie Yu, et al. Independent and Opposite Associations of Trunk and Leg Fat Depots with Adipokines, inflammatory Markers, and Metabolic Syndrome in Middle-Aged and Older Chinese Men and Women *JCEM*. 2010; 95(9):4389–4398
243. Buemann B, Astrup A, Pedersen O, Black E, Holst C, Toubro S, Echwald S, Holst JJ, Rasmussen C, Sørensen TI. Possible role of adiponectin and insulin sensitivity in mediating the favorable effects of lower body fat mass on blood lipids. *JCEM*. 2006; 91:1698–1704
244. Snijder MB, Flyvbjerg A, Stehouwer CD, Frystyk J, Henry RM, Seidell JC, Heine RJ, Dekker JM. Relationship of adiposity with arterial stiffness as mediated by adiponectin in older men and women: the Hoorn Study. *Eur J Endocrinol*. 2009; 160:387–395.
245. Godsland IF, Crook D, Proudler AJ, Stevenson JC. Hemostatic risk factors and insulin sensitivity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome. *JCEM*. 2005; 90:190–197.
246. Ramamoorthy S, Cidlowski JA: Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Mol Cell Biol*. 2013; 33:1711–1722.
247. Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and IR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:E941–E94
248. Brochu M, Starling RD, Tchernof A et al. Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women. *JCEM* 2000;85:2378–2384.

249. Després JP. The IR- hyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. *Obes Res.* 1998;6:8S–17S.
250. Ross R, Freeman J, Hudson R, Janssen I. Abdominal obesity, muscle composition, and IR in premenopausal women. *JCEM.* 2000;87:5044–5051
251. Krotkiewski M. Role of muscle morphology in the development of IR and metabolic syndrome. *Presse Med.* 1994;23:1393–1399.
252. Krotkiewski M, Björntorp P. Muscle tissue in obesity with different distribution of adipose tissue. Effects of physical training. *Int J Obes.* 1986;10:331–341
253. Karelis AD, Faraj M, Bastard JP et al. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *JCEM.* 2005;90:4145–4150.
254. Brochu M, Sites CK, Tchernof A et al. What are the physical characteristics associated with a normal metabolic profile despite a high level of obesity in postmenopausal women? *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1020–1025.
255. You T, Ryan AS, Nicklas BJ. The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. *JCEM.* 2004;89:5517–5522.
256. BrochuM, Mathieu ME, Karelis AD, Doucet E, Lavoie ME. Contribution of the Lean Body Mass to Insulin Resistance in Postmenopausal Women With Visceral Obesity: A Monet Study *Obesity.*2008; 16:1085–1093
257. Lin RC, Wang WY, Morris BJ. High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case-control study. *BMJ.* 1999;319(7221):1337-1338
258. Dobson MG, Redfern CP, Unwin N, Weaver JU. The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2270-4.
259. Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Pedersen O. The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(10):1563-5.
260. Rosmond R, Bouchard C, Bjorntorp P. Tsp509I polymorphism in exon 2 of the glucocorticoid receptor gene in relation to obesity and cortisol secretion: cohort study. *BMJ.* 2001;322(7287):652-3.

261. Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ: Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81: 2468-2473.
262. Kudielka BM, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C: HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology.* 2004, 29: 83-98.
263. Zhao Z-Y, Lu F-H, Xie Y, Fu Y-R, Bogdan A, Touitou Y: Cortisol secretion in the elderly. Influence of age, sex and cardiovascular disease in a Chinese population. *Steroids.* 2003, 68: 551-555.
264. Larsson CA, Gullberg B, Råstam L, Lindblad U. Salivary cortisol differs with age and sex and shows inverse associations with WHR in Swedish women: a cross-sectional study *BMC Endocrine Disorders,* 2009; 9:16.
265. G M. E. E. Peeters, N. M. van Schoor, E. F. C. van Rossum, M. Visser, P. Lips The relationship between cortisol, muscle mass and muscle strength in older persons and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor *Clinical Endocrinology,* 2003; 69, 673–682
266. van Rossum EF, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, et al. The ER22/23EK Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene is Associated with a Beneficial Body Composition and Muscle Strength in Young Adults *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* 2004;89(8):4004-9
267. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes.* 2002;51(10):3128-3134.
268. van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, et al. The ER22/23EK Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene is Associated with Better Survival and Low C-Reactive Protein Levels in Elderly Men. *American Journal of Medicine,* in press 2004.
269. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr.* 1997;127(5):990S–991S.

270. Abellan van Kan G, Rolland Y, Bergman H, Morley JE, Kritchevsky SB, Vellas B. The I.A.N.A Task Force on frailty assessment of older people in clinical practice. *J Nutr Health Aging*. 2008;12:29–37
271. Amati F, Dube JJ, Coen PM, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Goodpaster BH. Physical inactivity and obesity underlie the insulin resistance of aging. *Diabetes Care*. 2009;32:1547–1549.
272. Solerte SB, Gazzaruso C, Bonacasa R, Rondanelli M, Zamboni M, Basso C, Locatelli E, Schifino N, Giustina A, Fioravanti M. Nutritional supplements with oral amino acid mixtures increases whole-body lean mass and insulin sensitivity in elderly subjects with sarcopenia. *Am J Cardiol*. 2008;101(11A):69E–77E.
273. Pahor M, Kritchevsky S. Research hypotheses on muscle wasting, aging, loss of function and disability. *J Nutr Health Aging*. 1998;2:97–100.
274. Cesari M, Kritchevsky SB, Baumgartner RN, Atkinson HH, Penninx BW, Lenchik L, Palla SL, Ambrosius WT, Tracy RP, Pahor M. Sarcopenia, obesity, and inflammation: results from the Trial of Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and Novel Cardiovascular Risk Factors study. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:428–434.
275. Jensen GL. Inflammation: roles in aging and sarcopenia. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008;32:656–659.
276. Roubenoff R. Physical activity, inflammation, and muscle loss. *Nutr Rev*. 2007; 65(122):S208–S212.
277. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Walston J, Varadhan R, Guralnik JM, Fried LP. Oxidative stress and severe walking disability among older women. *Am J Med*. 2007;120:1084–1089.
278. Ochi M, Kohara K, Tabara Y, Kido T, Uetani E, Ochi N, Igase M, Miki T. Arterial stiffness is associated with low thigh muscle mass in middle-aged to elderly men. *Atherosclerosis*. 2010;212:327–332.
279. Fielding RA, Vellas B, Evans WJ et al. International working group on sarcopenia. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. *J Am Med Dir Assoc*. 2011;12:249–256.
280. Schatten GP. Current topics in developmental biology, vol 68. Burlington: Elsevier; 2005. Chapter 5, Sarcopenia of aging and its metabolic impact; pp.123–148.

281. Yang EJ, Lim S, Lim JY, Kim KW, Jang HC, Paik NJ. Association between muscle strength and metabolic syndrome in older Korean men and women: the Korean Longitudinal Study on Health and Aging. *Metabolism*. 2012;61:317–324.
282. Srikanthan P, Hevener AL, Karlamangla AS. Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *PLoS One*. 2010;5:e10805.
283. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*. 1981;30:1000–1007.
284. Phielix E, Szendroedi J, Roden M. Mitochondrial function and insulin resistance during aging: a mini-review. *Gerontology*. 2011;57:387–396.
285. Donn R, Payne D, Ray D. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Endocrinol*. 2007; 67:342-345.
286. van den Akker, et al. Staphylococcus aureus nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *J. Infect. Dis*. 2006;194:814-818.
287. van den Akker EL, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism affects transrepression but not transactivation. *JCEM*. 2006; 91:2800-2803.
288. Chiodini I, Viti R, Coletti F, et al. Eugonadal male patients with adrenal incidentalomas and subclinical hypercortisolism have increased rate of vertebral fractures. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009; 70:208–213
289. Chiodini, I., Morelli, V., Masserini, B. et al. Bone mineral density, prevalence of vertebral fractures, and bone quality in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism: an Italian multicenter study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009; 94: 3207–3214
290. Tauchmanova, L., Pivonello, R., De Martino, M.C. et al. Effects of sex steroids on bone in women with subclinical overt endogenous hypercortisolism. *European Journal of Endocrinology*. 2007; 157, 359–366.
291. Morelli, V., Eller-Vainicher, C., Salcuni, A.S. et al. Risk of new vertebral fractures in patients with adrenal incidentaloma with and without subclinical hypercortisolism: a multicenter longitudinal study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011;26:1816–1821

292. Eller-Vainicher, C. Morelli, V. Ulivieri F.M. et al. Bone quality, as measured by trabecular bone score in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012; 27: 2223–2230
293. Chiodini I., Masci M.L., Muscarella S. et al. Subclinical hypercortisolism among outpatients referred for osteoporosis. *Annals of Internal Medicine*. 2007; 147: 541–548.
294. Terzolo, M., Pia, A. & Reimondo, G. Subclinical Cushing's syndrome: definition and management. *Clinical endocrinology (Oxford)*. 2012; 76: 12–18.
295. Bui M, Bjørnerem A, Ghasem-Zadeh A, et al. Architecture of cortical bone determines in part its remodelling and structural decay. *Bone*. 2013; 55(2): 353-8.
296. Ego Seeman Age- and Menopause-Related Bone Loss Compromise Cortical and Trabecular Microstructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68(10): 1218–1225.
297. Di Somma C, Pivonello R, Loche S, Faggiano A, Klain M, Salvatore M, Lombardi G & Colao A. Effect of 2 Years of Cortisol Normalization on the Impaired Bone Mass and Turnover in Adolescent and Adult Patients With Cushing's Disease: a Prospective Study. *Clinical Endocrinology*. 2003; 58: 302–308.
298. Francucci CM, Pantanetti P, Garrapa GG, Massi F, Arnaldi G & Mantero F. Bone Metabolism and Mass in Women With Cushing's Syndrome and Adrenal Incidentaloma. *Clinical Endocrinology*. 2002; 57: 587–593.
299. Osella G, Reimondo G, Peretti P, et al. The patients with incidentally discovered adrenal adenoma (incidentaloma) are not at increased risk of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 604–607
300. Torlontano M, Chiodini I, Pileri M, et al. Altered bone mass and turnover in female patients with adrenal incidentaloma: The effect of subclinical hypercortisolism. *JCEM*. 1999; 84: 2381-2323.
301. Hermus ARS, Swinkels AG, Haysmans DA, Pieters GF, Sweep CF et al. Bone mineral density and bone turnover before and after surgical cure of Cushing's syndrome. *JCEM*, 1995; 80: 2859-2856.
302. Manning PJ, Evans MC, Reid I R. Normal bone mineral density following cure of Cushing's syndrome. *Clinical endocrinology*, 1992; 36: 229-234.

303. Osella, G., Ventura, M., Ardito, A., Allasino, B., Termine, A., Saba, L., Angeli, A. Cortisol secretion, bone health, and bone loss: a cross-sectional and prospective study in normal nonosteoporotic women in the early postmenopausal period. *European Journal of Endocrinology*. 2012; 166(5), 855–860.
304. Hadjidakis D, Tsagarakis S, Roboti C. Does subclinical hypercortisolism adversely affect the bone mineral density of patients with adrenal incidentalomas? *Clin Endocrinol*.2003; (Oxf) 58:72–77
305. Kristo C, Jemtland J, Ueland T, Godang K, Bollerslev J. Restoration of the coupling process and normalization of bone mass following successful treatment of endogenous Cushing’s syndrome: A prospective, long-term study *EJE*. 2006; 154: 109–118.
306. Tauchmanova, L., Pivonello, R., Di Somma, C. et al. Bone demineralization and vertebral fractures in endogenouscortisol excess: role of disease etiology and gonadal status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.2006; 91: 1779–1784
307. Futo, L., Toke, J., Patocs, A. et al. Skeletal differences in bone mineral area and content before and after cure of endogenous Cushing’s syndrome. *Osteoporosis International*.2008; 19:941–949.
308. Kawamata, A., Iihara, M., Okamoto, T. et al. Bone mineral density before and after surgical cure of Cushing’s syndrome due to adrenocortical adenoma: prospective study. *World Journal of Surgery*.2008;32:890–896.
309. David J Hunter and Philip N Sambrook Review Bone loss *Epidemiology of bone loss Arthritis Res*. 2000, 2:441–445.
310. Willson T, Nelson SD, Newbold J, et al. The clinical epidemiology of male osteoporosis: a review of the recent literature *Clinical Epidemiology*. 2015;7: 65–76.
311. Jane A. Cauley, Terri Blackwell, Joseph M. Zmuda, et al. Correlates of Trabecular and Cortical Volumetric Bone Mineral Density (vBMD) at the Femoral Neck and Lumbar Spine: The Osteoporotic Fractures in Men Study (MrOS) *J Bone Miner Res*. 2010; 25(9): 1958–1971.

312. Dennison, E., Hindmarsh, P., Fall, C., et al. Profiles of Endogenous Circulating Cortisol and Bone Mineral Density in Healthy Elderly Men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999; 84(9):3058–3063.
313. Chen C, Zhou X, Fujita H, et al. Age-Related Changes in Trabecular and Cortical Bone Microstructure *International Journal of Endocrinology*. 2013; article ID 213234.
314. Van Schoor, N. M., Dennison, E., Lips, P., Uitterlinden, A. G., & Cooper, C. Serum fasting cortisol in relation to bone, and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor. *Clinical Endocrinology*, 2007; 67(6), 871–878.
315. Chiodini I, Tauchmanova L, Torlontano M, Battista C, Guglielmi G. Bone Involvement in Eugonadal Male Patients with Adrenal Incidentaloma and Subclinical Hypercortisolism *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 5491–5494.
316. Lombardi A, Ross PD The assessment of bone mass in men. *Calcif Tissue Int*. 2001; 69:222–224.
317. Chiodini, I., Morelli, V., Masserini, B. et al. Bone mineral density, prevalence of vertebral fractures, and bone quality in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism: an Italian multicenter study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009; 94: 3207–3214
318. Osella G, Reimondo G, Peretti P, et al. Patients with Incidentally Discovered Adrenal Adenoma (Incidentaloma) Are Not at Increased Risk of Osteoporosis *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 604–607.
319. Szappanos, A., Toke, J., Lippai, D. et al. Bone turnover in patients with endogenous Cushing's syndrome before and after successful treatment. *Osteoporosis International*. 2010; 21: 637–645
320. Sereg, M., Toke, J., Patocs, A. et al. Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical Cushing's syndrome. *Steroids*. 2011; 76: 38–42.
321. Cooper, M.S., Syddall, H.E., Fall, C.H. et al. Circulating cortisone levels are associated with biochemical markers of bone formation and lumbar spine BMD: the Hertfordshire Cohort Study. *Clinical endocrinology (Oxford)*. 2005; 62: 692–697.
322. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids.

- Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998;102(2):274
323. Rubin MR, Bilezikian JP The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4033
324. Szappanos, A., Patocs, A., Gergics, P. et al. The 83,557insA variant of the gene coding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2011;123: 79–84
325. Hwang, J.Y., Lee, S.H., Kim, G.S. et al. HSD11B1 polymorphisms predicted bone mineral density and fracture risk in postmenopausal women without a clinically apparent hypercortisolemia. *Bone.*2009; 45: 1098–1103.
326. Gross, K.L. and Cidlowski, J.A. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol. Metab.* 2008;19: 331–339
327. Szappanos, A. et al. BclII polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2009; 71: 636–643.
328. Kostik, M.M. et al. Glucocorticoid receptor gene polymorphism and juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr. Rheumatol. Online J.*2001; 9: 2.
329. te Winkel, M.L. et al. Pharmacogenetic risk factors for altered bone mineral density and body composition in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.*2010; 95: 752–759
330. Tzanela, M. et al. Clinical and biochemical impact of BCL1 polymorphic genotype of the glucocorticoid receptor gene in patients with adrenal incidentalomas. *J. Endocrinol. Invest.* 2012; 35: 395-400.
331. Ragnarsson O, Glad CAM, Bergthorsdottir R, et al. Body composition and bone mineral density in women with Cushing's syndrome in remission and the association with common genetic variants influencing glucocorticoid sensitivity *European Journal of Endocrinology.*2015; 172: 1–10.

332. Hermus ARS, Swinkels AG, Haysmans DA, Pieters GF, Sweep CF et al. Bone mineral density and bone turnover before and after surgical cure of Cushing's syndrome. *JCEM*. 1995; 80:2859-2856.
333. Mancini, T., Doga, M., Mazziotti, G. et al. Cushing's syndrome and bone. *Pituitary*. 2004; 7: 249–252.
334. Cooper M.S., Walker E.A., Bland R., Fraser W.D., Hewison M., Stewart P.M. Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone*. 2000; 27(3): 375-81.
335. Cooper M.S., Bujalska I., et al. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Mineral Res*. 2001; 16: 1037-1044.
336. Williams L.J., Lyons V., MacLeod I., Rajan V., Darlington G.J., Poli V. C/EBP regulates hepatic transcription of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem*. 2000; 275: 30232-30239.
337. Cooper M.S., Rabbit E.H., Goddard P.E. Osteoblastic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Mineral Res*. 2002; 17: 979-986.
- 338 Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002; 968:240–255.
- 339 Brtherat J, Groussin L, Sandrini F et al. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22–24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Research*. 2003; 63: 5308–5319.
- 340 Mazzuco TL, Durand J, Chapman A, Crespigio J, Bourdeau I. Genetic aspects of adrenocortical tumours and hyperplasias. *Clinical Endocrinology*. 2012; 77: 1–10.
- 341 Pereira CD, Azevedo I, Monteiro R, Martins M J. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2012;14: 869–965.

8. SPISAK SKRAĆENICA

AI	- Adrenalni incidentalomi
UAI	- unilateralni adrenalin incidentalomi
BAI	- bilateraalni adrenalin incidentalomi
SH	- subklinički hiperkorticizam
CRH	- Kortikotropin-oslobađajući hormon (<i>corticotropin-releasing hormon</i>)
ACTH	- Adrenokortikotropni hormon (<i>adrenocorticotropic hormon</i>)
11 β HSD	-11 β -hidrosisteroid dehidrogenaza
UFC	- <i>urinary free cortisol</i> -urinarni slobodni kortizol
DST-1mg	- dexametazon supresivni test sa 1mg dexametazona
LDDST	- nisko-dozni dexametazon supresioni test (<i>low-dose dexamethasone suppression test</i>)
HHA	- hipotalamo – hipofizna – adrenalna osovina
GIO	- gluokortikoidima indukovana osteoporoza
MetS	- metabolički sindrom
IR	- insulinska rezistencija
BMD	- <i>bone mineral density</i> - mineralna koštana gustina
DXA	- <i>dual energy x-ray absorptiometry</i>
FMI	- <i>fat mass index</i>
LBMI	- <i>lean body mass index</i>
OS	- Obim struka
OK	- Obim kukova
ITM	- Indeks telesne mase (<i>body mass index BMI</i>)
WHR	- Odnos obima struka i kukova (<i>Waist to Hip Ratio</i>)
HTA	- hipertenzija
DM2	- tip2 šećerne bolesti
HOMA-IR	- <i>homeostasis model assesment-insulin resistance</i>
DHEAS	- Didehidroepiandrosteron sulfat
PRA	- plazma reninska aktivnost (<i>plasma renin activity</i>)
CT	- Kompjuterizovana tomografija

MR	- Magnetna rezonanca
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
GC	- Glukokortikoidni hormoni (glukokortikoidi)
GR	- Glukokortikoidni receptor
NR3C1	- Glukokortikoidni receptor (HUGO nomenklatura)
hGR	- Humani glukokortikoidni receptor
GREs	- Specifične sekvence u okviru promotora ciljnih gena (<i>glucocorticoid responsive elements</i>)
NTR	- Region koji se ne prevodi
NTD	- Amino terminalni domen
AP1	- Transkripcioni faktor
NFκB	- Transkripcioni faktor
NTR	- Netranslatirajući region
AF1	- Prvi transaktivacioni subdomen
AF2	- Drugi transaktivacioni subdomen
DBD	- DNK vezujući domen
LBD	- Ligand vezujući domen
iRNK	- Informaciona ribonukleinska kiselina
DNK	- Dezoksiribonukleinska kiselina
Hsp90	- Šaperon-protein toplotnog stresa od 90 kDa
Hsp70	- Šaperon-protein toplotnog stresa od 70 kDa

BIOGRAFIJA

Rođena 23.06.1967. u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala školske 1986/87.god, diplomirala 1993 god. sa opštim uspehom 8.61. Od 1994 god radi kao volonter, 1995-1998 god. zaposlena na određeno vreme, od 2001 god. na neodređeno vreme u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Klinički Centar Srbije. Magistarsku tezu pod naslovom "Ispitivanje insulinske rezistencije u hipertenziji i gojaznosti" odbranila 2003 god. i stekla naziv magistra medicinskih nauka iz oblasti endokrinologije. Specijalistički ispit iz Interne medicine položila je 1998 god. i stekla naziv specijaliste interne medicine. Naziv subspecijaliste iz oblasti endokrinologije stekla je 2013 god. odbranom rada uže specijalizacije: „Efekat transarterijske hemoembolizacije jetre na preživljavanje bolesnika sa neuroendokrinim karcinomom“, pod mentorstvom prof.dr Svetozara Damjanovića. Od 2014 god je izabrana u zvanje kliničkog asistenta za predmet interna medicina na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Autor ili član autorskog tima u 175 publikacija iz oblasti endokrinologije i 7 radova in extenso u časopisima JCR/medline baze podataka. Član je The European Society of Endocrinology (ESE), Srpskog lekarskog društva endokrinološke sekcije i Multidisciplinarnog udruženja za menopauzu i andropauzu Srbije (MUMIA).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Sanja Ognjanović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Glukokortikoidna senzitivnost, funkcionalni polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor i ekspresija glukokortikoidnog receptora u tumorskom tkivu kod pacijenata sa slučajno otkrivenim tumorima kore nadbubrežne žlezde“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 05.07.2016

Sanja Ognjanović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sanja Ognjanović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada _____ „Glukokortikoidna senzitivnost, funkcionalni polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor i ekspresija glukokortikoidnog receptora u tumorskom tkivu kod pacijenata sa slučajno otkrivenim tumorima kore nadbubrežne žlezde”

Mentor Prof dr Svetozar Damjanović

Potpisani Sanja Ognjanović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 05.07.2016

Potpis doktoranda

Sanja Ognjanović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Glukokortikoidna senzitivnost, funkcionalni polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor i ekspresija glukokortikoidnog receptora u tumorskom tkivu kod pacijenata sa slučajno otkrivenim tumorima kore nadbubrežne žlezde“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 05.07.2016

Potpis doktoranda

Stjepan Ogrizović