

Új laboratóriumi módszerek alkalmazása a hiperkortizolizmus diagnosztikájában

Doktori értekezés

Dr. Mészáros Katalin

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Konzervatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Patócs Attila, az MTA doktora, egyetemi tanár
Hivatalos bírálók: Dr. Mészáros Szilvia, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Bhattoa Harjit Pal, Dsc, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Igaz Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tőke Judit, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	8
2.1. A HIPERKORTIZOLIZMUS ELSŐ ORVOSI ÉSZLELÉSEI	8
2.2. A HIPERKORTIZOLIZMUS INCIDENCIÁJA	9
2.2.1. <i>Endogén eredetű hiperkortizolizmus incidenciája</i>	9
2.2.2. <i>Exogén eredetű hiperkortizolizmus incidenciája</i>	9
2.3. A KORTIZOL-TÚLTERMELŐDÉS LEHETSÉGES FORRÁSAI	10
2.4. A KORTIZOL ÉLETTANI HATÁSAI.....	11
2.5. JELÁTVITELI ÚTVONALAK SZEREPE A GC-HATÁS KÖZVETÍTÉSÉBEN.....	12
2.6. MI ^{RNS} -EK ÉS GLÜKOKORTIKOID-HATÁS	14
2.7. A HIPERKORTIZOLIZMUS HATÁSA AZ ÁLTALA KIEMELTEN BEFOLYÁSOLT SZERVEKRE, SZERVRENDSZEREKRE	15
2.7.1. <i>A hiperkortizolizmus hatása a csontrendszerre</i>	15
2.7.2. <i>A hiperkortizolizmus hatása a zsírszövetre</i>	16
2.7.3. <i>A hiperkortizolizmus hatása a központi idegrendszerre</i>	18
2.7.4. <i>A hiperkortizolizmus hatása a bőrre</i>	19
2.8. A HIPERKORTIZOLIZMUS TÜNETEI	21
2.9. A LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKA JELENTŐSÉGE A HIPERKORTIZOLÉMIÁVAL JÁRÓ ÁLLAPOTOK KORAI DIAGNÓZISÁBAN.....	22
3. CÉLKITŰZÉSEK	25
3.1. HIPERKORTIZOLIZMUS LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKÁJÁBAN ALKALMAZOTT ÚJ, SENZITÍV MÓDSZER BEÁLLÍTÁSA ÉS KLINIKAI TESZTELÉSE	25
3.2. HIPERKORTIZOLIZMUS SZÖVETSPECIFIKUS MI ^{RNS} - MINTÁZATÁNAK ANALÍZISE	25
3.3. GÉNEXPRESSZIÓS PROFIL MEGHATÁROZÁSA ÉS GÉNEXPRESSZIÓS ÚJRAELEMZÉS	25
4. MÓDSZEREK	26
4.1. HIPERKORTIZOLIZMUS LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKÁJÁBAN ALKALMAZOTT ÚJ MÓDSZER BEÁLLÍTÁSA ÉS KLINIKAI TESZTELÉSE	26

4.1.1.	<i>Nyálminták</i>	26
4.1.2.	<i>Nagy nyomású folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS/MS)</i>	26
4.1.2.1.	Ionszuppresszió vizsgálata:	28
4.1.2.2.	Linearitás vizsgálata:	29
4.1.2.3.	Kimutathatósági határ és számszerűsítési határ megállapítása:	29
4.1.2.4.	Pontatlanság meghatározása:.....	29
4.1.2.5.	Bizonytalanság meghatározása:.....	29
4.1.3.	<i>Immunoassay</i>	30
4.2.	HIPERKORTIZOLIZMUS SZÖVETSPECIFIKUS miRNS- MINTÁZATÁNAK ANALÍZISE	30
4.2.1.	<i>Mellékvese eredetű szövetminták</i>	30
4.2.2.	<i>HeLa és H295R sejtek</i>	30
4.2.3.	<i>RNS izolálás</i>	31
4.2.4.	<i>miRNS profil meghatározása TLDA-kártyák használatával</i>	31
4.3.	GÉNEXPRESSZIÓS PROFIL MEGHATÁROZÁSA ÉS GÉNEXPRESSZIÓS ÚJRAELEMZÉS	32
4.4.	STATISZTIKAI SZÁMÍTÁSOK	34
5.	EREDMÉNYEK	36
5.1.	HIPERKORTIZOLIZMUS LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKÁJÁBAN ALKALMAZOTT ÚJ MÓDSZER BEÁLLÍTÁSA ÉS KLINIKAI TESZTELÉSE	36
5.1.1.	<i>LC-MS/MS vizsgálat validálása</i>	36
5.1.1.1.	Ion szuppresszió:	36
5.1.1.2.	Linearitás:	36
5.1.1.3.	Kimutathatósági határ és számszerűsítési határ:	36
5.1.1.4.	Pontatlanság	36
5.1.1.5.	Bizonytalanság	37
5.1.2.	<i>Az immunoassay és az LC-MS/MS vizsgálatok közötti korreláció</i>	37
5.1.3.	<i>Kortizol- és kortizoneredmények a különböző betegcsoportokban</i>	38
5.1.4.	<i>Kortizol/kortizon arány a különböző betegcsoportokban</i>	39
5.1.5.	<i>ROC-görbe analízis és referenciatartomány-meghatározás</i>	39
5.2.	GLUKOKORTIKOID HATÁSBAN SZEREPET JÁTSZÓ SZÖVETI MARKEREK	41

5.2.1.	<i>Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS- mintázatának analízise.....</i>	41
5.2.1.1.	Eltérően expresszáldó miRNS-ek.....	41
5.2.2.	<i>Az eltérően expresszáldó miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak</i>	42
5.3.	A GC-TERMELŐ ÉS A GC-TÚLSÚLY ÁLTAL BEFOLYÁSOLT CÉLSZÖVETEK GÉNEXPRESSZIÓS PROFILJÁNAK MEGHATÁROZÁSA.....	47
5.3.1.	<i>Globális génexpresszió-változás vizsgálata GC-hatás célszöveiben és az ehhez kapcsolódó Wnt-útvonal eltérések.....</i>	49
5.3.2.	<i>Szövetspecifikus target-predikció GC-termelő mellékveseszövetekben.....</i>	50
6.	MEGBESZÉLÉS	52
6.1.	HIPERKORTIZOLIZMUS LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKÁJÁBAN ALKALMAZOTT ÚJ MÓDSZER BEÁLLÍTÁSA ÉS KLINIKAI TESZTELÉSE	52
6.2.	HIPERKORTIZOLIZMUS SZÖVETSPECIFIKUS miRNS-MINTÁZATÁNAK ANALÍZISE	54
6.2.1.	<i>A GC-túlsúly hatására eltérően expresszáldó miRNS-ek és a Wnt-útvonal kapcsolata.....</i>	54
6.2.1.1.	<i>Sejtek proliferációja és differenciációja</i>	56
6.2.1.2.	<i>Daganatok kialakulása</i>	57
6.2.1.3.	<i>Csontrendszer homeosztázisa</i>	57
6.3.	A GC-TÚLSÚLY HATÁSA A GLÜKOKORTIKOID-TERMELŐ, ILLETVE A GC- TÚLSÚLY ÁLTAL BEFOLYÁSOLT SZÖVETEKRE	58
6.3.1.	<i>A GC-túlsúly hatása a mellékveseszövetre</i>	58
6.3.2.	<i>A GC-túlsúly hatása a célsejtekre és –szövetekre</i>	59
7.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	61
8.	ÖSSZEFOGLALÓ	63
9.	SUMMARY.....	64
10.	IRODALOMJEGYZÉK	66
11.	AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	84

12. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	85
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	89

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTH: adrenokortikotrop hormon

APC: adenomatosus polyposis coli

AUC: görbe alatti terület (area under the curve)

BMD: a csont ásványianyag-sűrűsége (bone mineral density)

BMI: testtömeg-index (body mass index)

BMP: bonemorphogenetic protein

CAD: collision-activated dissociation

CE: ütközési energia (collision energy)

CK: kreatin kináz (creatine kinase)

CRH: kortikotropin-kibocsátó hormon (corticotropin-releasing hormone)

CS: Cushing-szindróma

CXP: cell exit potential

Dkk: Dickkopf (fehérje)

DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

DNS: dezoxiribonukleinsav

DP: declustering potential

DST: dexametazon szuppressziós teszt (dexamethasone suppression test)

Dvl: Dishevelled (fehérje)

ECLIA: elektrokemilumineszcens immunoassay

ETT-TUKEB: Egészségügyi Tudományos Tanács – Tudományos és Kutatásetikai Bizottság

FBS: magzati marhaszérum (fetal bovine serum)

FDA: Food and Drug Administration

GC: glükokortikoid

GH/IGF: növekedési hormon/inzulinszerű növekedési faktor (growth hormone/insulin-like growth factor)

GIO: glükokortikoid-indukálta oszteoporózis (glucocorticoid induced osteoporosis)

GSK-3 β : glikogén szintáz kináz-3 béta

HPA: hipotalamo-hípfizis-mellékvesekéreg tengely (hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

KEGG:Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LC-MS/MS: nagynyomású folyadékkromatográfiához kapcsolt tandem tömegspektrometria (liquidchromatography-tandem massspectrometry)

LNSC:éjszakai nyálkortizol (latenightsalivarycortisol)

LRP5/6:lipoprotein receptor related protein 5/6

MAPK:mitogen-activated protein kinase

MEM: minimum essentialmedium

MRI:mágneses magrezonancia vizsgálat(magneticresonanceimaging)

MRM: multiplereacion monitoring

mRNS: hírvivő RNS

MSC:mesenchymális őssejt (mesenchymalstemcell)

MSH:melanocitastimuláló hormon

NET:neuroendokrin tumor

NF-κB:nuclearfactor kappa-B

NPY:neuropeptid Y

OPG:oszteoprotegerin

PBS:phosphatebuffersaline

POMC:proopiomelanokortin

PPAR-γ:peroxisomeproliferatoractivated receptor- γ

RANK: receptor activator of nuclearfactor kappa-B

RANKL: receptor activator of nuclearfactor kappa-B ligand

RNS: ribonukleinsav

ROC:receiveroperatingcharacteristiccurve

RT-PCR:reverz transzkripció polimeráz-lánreakció
(reversetranscriptionpolymerasechainreaction)

SAT:szubkután zsírszövet(subcutanadiposetissue)

SD: standard deviáció

sFRP:secretedFrizzled-related protein

SMAD:Suppressor of MothersagainstDecapentaplegic

Sost:szklerosztin(fehérje)

TCF/LEF: T cellfactor/lymphoidenhancerfactor

TGFβ:transforminggrowthfactor-beta

TLDA: TaqMan low density array

TNF- α : tumor nekrosis faktor-alfa

UFC: vizelet szabad kortizol (urine free cortisol)

UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic mean

VAT: viscerális zsírszövet (visceral adipose tissue)

2. BEVEZETÉS

2.1. A hiperkortizolizmus első orvosi észlelései

A hiperkortizolizmus tüneteinek első leírása 1900-ból, Joseph Babinski lengyel orvos tollából származik, aki egy 17 éves fiatal lánybeteg esetén addig még nem ismert tünetegyüttest írt le: centrális obezitás, hirsutizmus, visszamaradott nemi jelleg (1). 10 évvel később Harvey Williams Cushing idegsebész Bostonban foglalkozni kezdett egy, a már leírt esettel szinte teljes tüneti egyezést mutató pácienssel. A páciens nevét Minnie G.-ként említi az orvostörténelem, a Cushinggal való találkozásakor 23 éves volt és a főbb tünete az alábbiak voltak: elhízás, hipertrichózis, amenorrea, álmatlanság, fülzúgás, szopora légzés, palpitáció, purpuraszerű kiütések, száraz bőr, izomgyengeség, hátfájás (2). Cushing 1912-ben a *The Pituitary Body and Its Disorders* című könyvében Minnie G. tüneteinek a háttérében „poliglanduláris szindrómát” feltételezett, vagyis az endokrin mirigyek másodlagos funkcionális károsodását valamelyik mirigy elsődleges károsodása következtében. 1932-ben, 20 évvel az első közleménye után Cushing (miután még egy saját betegének adatait és 10, más szerzők által közölt eset adatait összevetette) már a hipofízis bazofílenfestődőadenómáit és a szekunder módon kialakult adrenális hiperpláziákat tette felelőssé annak a specifikus tünetegyüttesnek a kialakulásáért, amit ma Cushing-szindrómának (CS) nevezünk (1,2). Természetesen még évtizedekbe telt, mire tisztázódott (hiszen 1932-ben még sem az ACTH-t, sem a kortizolt nem azonosították): a Cushing-szindróma nem egy egységes etiológiájú kórkép; bár minden esetben a kortizol-túltermelés okozza a tünetek megjelenését, de a kortizol-túltermelés oka nem minden esetben hipofízis-eredetű. A Cushing-szindróma háttérében a hipofízisen kívül a mellékvese elváltozásai is állhatnak (ahogy azt már a 30-as években Julius Bauer osztrák orvos is feltételezte (3)), illetve a tüneteknek lehetnek a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyen kívüli, ún. ektópiás okai is. (A változatos etiológiájú Cushing-szindrómán belül Cushing-kórnak a hipofízis ACTH-termelő sejtjeinek túlszaporodása miatt kialakuló hiperkortizolizmust nevezzük- ez a Cushing-szindróma leggyakoribb oka).

2.2. A hiperkortizolizmusincidenciája

2.2.1. Endogén eredetű hiperkortizolizmusincidenciája

Az endogén hiperkortizolizmus, vagyis a Cushing-szindróma nem tartozik a gyakori betegségek közé, az átlagpopulációban 0,7-2,4 új eset adódik 1 millió lakosra számolva évente (4). Ennél számottevően nagyobb az előfordulási gyakorisága cukorbeteg, túlsúlyos, illetve csonttritkulással rendelkező betegek körében. 200-, 2-es típusú diabétesz mellituszos beteg klinikai és laboratóriumi szűrővizsgálatai a betegek 5,5%-ánál igazoltak endogén hiperkortizolizmust(5). Egy másik vizsgálat során 150 túlsúlyos beteg 9,3%-ánál igazolódott különböző etiológiájú Cushing-szindróma (6). Csonttritkulásos betegek 4,8%-ánál, súlyos oszteoporotikus betegek 10,8%-ánál igazoltak szubklinikushiperkortizolizmust(7).

2.2.2. Exogén eredetű hiperkortizolizmusincidenciája

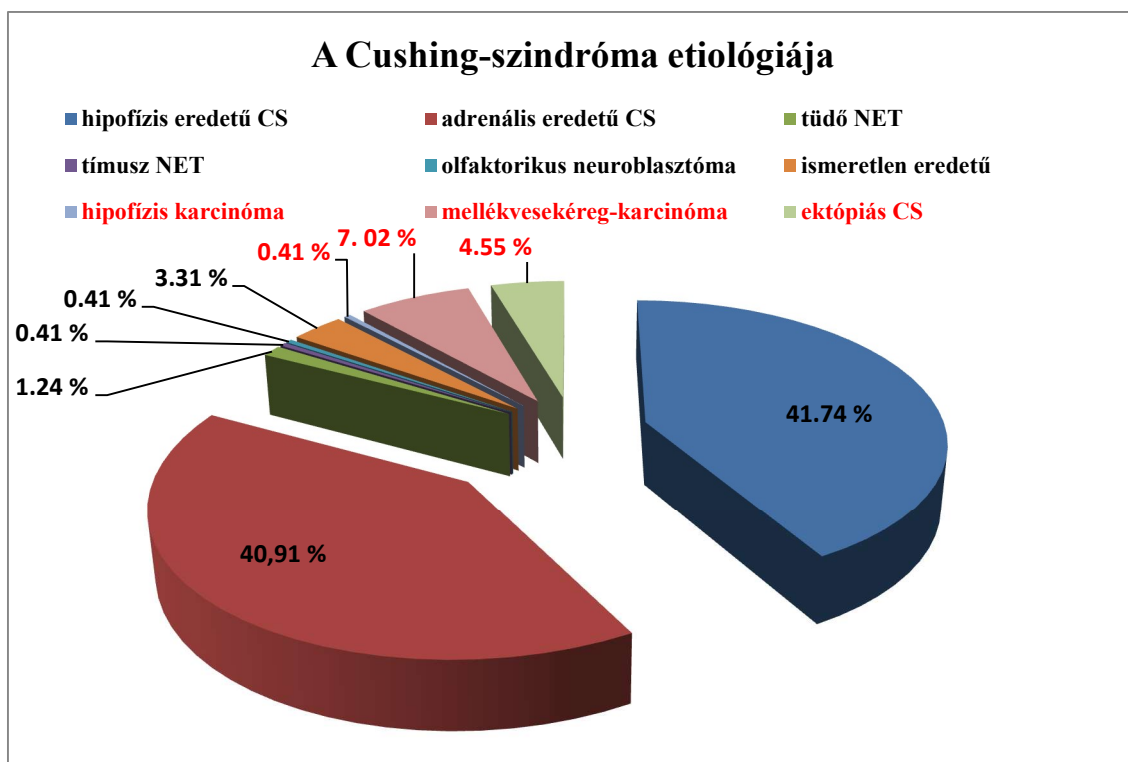
Az exogén vagy iatrogén eredetű hiperkortizolizmus gyakorisága nagyságrendekkel meghaladja az endogén eredetű hiperkortizolizmus gyakoriságát. Exogén eredetű hiperkortizolizmusról 1948 óta beszélhetünk, terápia céljával ekkor adagoltak először betegnek szintetikus glükokortikoidot. (A „compound E” nevű anyagról, amit a beteg kapott, csak később írták le, hogy 17-hidroxi-11-dehidrokortikoszteron, vagyis kortizon. A „compound E”-t kutató és előállító E. C. Kendall, T. Reichstein és P. S. Hench 1950-ben orvosi Nobel-díjat kaptak „a mellékvesekéreg hormonjainak, azok szerkezetének és biológiai hatásának felfedezéséért”). Az azóta eltelt időben a szintetikus glükokortikoidok az orvostudomány értékes és nélkülözhetetlen eszközeivé váltak: megfelelő adagban és megfelelő ideig adagolva a mellékhatások gyakorlatilag elhanyagolhatóak az értékes, sokszor életmentő hatások mellett. Elhúzódó terápia, illetve nem megfelelő adagolás esetén viszont a mellékhatások súlyos fokú életminőségromláshoz vagy akár rokkantsághoz is vezethetnek. Gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatásuk miatt a felnőtt lakosság elég jelentős része kénytelen hosszabb ideig glükokortikoid hatóanyagtartalmú gyógyszert fogyasztani: 2008-ban az Egyesült Királyságban a felnőtt (18 év feletti) lakosság 0,8%-a részesült glükokortikoid

kezelésben 3 hónapig vagy annál hosszabb ideig, és ez az arány az életkor előrehaladtával egyre nőtt, a 80 év feletti nőknél már 3,0% volt (8). Az Egyesült Államokban az 50 év feletti nők 1,66%-a, az 50 év feletti férfiak 1,65%-a szed valamilyen glükokortikoid tartalmú gyógyszert (9).

2.3. A kortizol-túltermelés lehetséges forrásai

Az endogén eredetű kortizol-túltermelés helye változatos, de leggyakrabban a kortizol-termelődést szabályozó hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (hypothalamic-pituitary-adrenalaxis- HPA) főbb „csomópontjainak” jó- vagy rosszindulatú betegsége okozza. Ezen kívül jelentős szerepe van (nem a gyakoriság, hanem sokszor a rendkívül gyors lefolyás miatt) a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyen kívüli, úgynevezett ektópiás eredetű Cushing-szindrómáknak is.

Egy 2021-ben megjelent, 242 Cushing-szindrómás beteg adatait elemző retrospektív tanulmány jól szemlélteti a különböző etiológiájú Cushing-szindrómák arányát: 213 betegnek, vagyis az összes beteg 88,02 %-ának volt benignus eredetű a betegsége, míg 29 betegnek, vagyis 11,98 %-nak malignus eredetű. A 213 benignus eredetű Cushing-szindróma megoszlása az alábbi volt: 101 betegnek, vagyis az összes beteg 41,7%-ának hipofízis eredetű volt a hiperkortizolizmusa, míg 99 betegnek (40,9%) adrenális eredetű. A fennmaradó 13, benignus Cushing-szindrómával rendelkező beteg közül 3 esetben igazolódott a tüdő neuroendokrintumora, 1 esetben a thymusneuroendokrintumora, 1 betegnél olfaktorikus neuroblasztóma, míg 8 beteg esetében nem sikerült megtalálni a kortizol-túltermelés helyét. A 29 malignus eredetű Cushing-szindrómás beteg esetében 1 hipofízis karcinóma, 17 mellékvesekéreg-karcinóma és 11 ektópiás Cushing-szindróma igazolódott (10).



1. ábra: Endogén eredetű kortizol-túltermelés lehetséges okai és azok relatív gyakorisága (piros színnel jelöltük a malignus okokat)

Egy 2023-as, nagyobb betegszámot, de kizárólag európai adatokat elemző tanulmány ettől eltérő adatokat tett közé: 1791 beteg adatait értékelve arra jutottak, hogy a CS 69%-ban volt hipofízis eredetű, 25%-ban mellékvese-, illetve 6%-ban ektópiás eredetű(11).

2.4. A kortizol élettani hatásai

A kortizol a mellékvesekéreg zonafasciculata-jában termelődő glükokortikoid hormon, elválasztását a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely szabályozza. A termelődő kortizol mennyisége erőteljes napszaki ingadozást mutat: legmagasabb a szintje a reggeli órákban, ébredés előtt, ezután folyamatosan csökken, legalacsonyabb értékét az elalvás utáni órákban érve el. Bár a „kortizol” kifejezést hallva a legtöbb embernek a „stresszhormon” kifejezés jut eszébe, hatása a stresszre adott válaszreakciókon, illetve a stresszhez való adaptáción messze túlmutat.

A kortizolpleiotróp hatású hormon, kiemelkedő szerepe van az emberi szervezet élettani folyamatainak szabályozásában. Hatással van az anyagcsere-folyamatokra, az

immunrendszer működésére, a só-és vízháztartásra, a csontképződés és -lebomlás folyamataira. Megfelelő mennyisége elengedhetetlen a kardiovaszkuláris rendszer és a központi idegrendszer működéséhez, valamint az egyedfejlődés és a növekedés folyamataiban is(12).

2.5. Jelátviteli útvonalak szerepe a GC-hatás közvetítésében

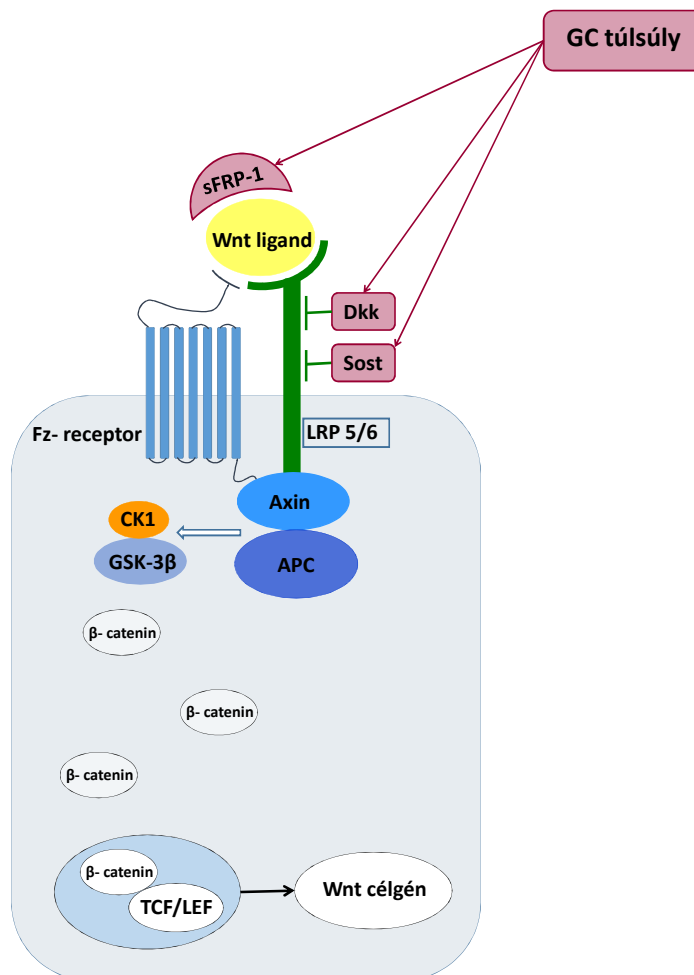
A GC-hatások közvetítése során különböző jelátviteli mechanizmusok teszik lehetővé az élettani folyamatok szabályozását a célszervek és -szövetek szintjén, a jelátviteli útvonalak prioritása azonban nem teljesen tisztázott még.

A GC-hatások közvetítése kapcsán a leggyakrabban tanulmányozott jelátviteli útvonalak: a GH/IGF-1-tengely, a TGF β -SMAD-útvonal, a PI3/Akt-jelátvitel, a MAPK-útvonal, a Wnt-útvonal, a BMP-útvonal és az NF- κ B-útvonal (13–19).

A mellékvese-adenómák és a Wnt-útvonal közötti lehetséges kapcsolatra a familiáris adenomatózuspolipózisban szenvedő betegek esetei hívták fel a figyelmet. A familiáris adenomatózuspolipózis az *APC* (adenomatosis polyposis coli) gén defektusa következtében, az APC fehérje hiánya miatt alakul ki. Ezekben a betegekben a gasztrointesztinális rendszerben kifejlődő polipusok sokasága mellett a mellékvese-adenómák előfordulási gyakorisága is jóval magasabb, mint az átlagpopulációban (20).

A Wnt/ β -catenin útvonal az egyik legrégebben ismert és legalaposabban tanulmányozott jelátviteli útvonal, amely a legegyszerűbb többsejtű élőlényben is fontos szerepet játszik a sejtek proliferációja, differenciációja során. Az útvonal zavartalan működése kiemelt fontosságú nem csak az embrionális fejlődés időszakában, hanem később, a homeosztatikus folyamatok megfelelő működése során is. A Wnt-fehérjék családjába tartozó 19 glikoprotein a sejt felszíni Frizzled (Fz) receptorok extracelluláris részéhez képes kötődni. Amennyiben a receptorokhoz nem kötődik ligand, az intracelluláris térben a β -catenint a GSK-3 β és a kazein-kináz 1 (caseinkinase 1-CK1) enzim folyamatosan elbontja, az enzimek megfelelő működéséhez az Axinból és APC-ből (adenomatosis polyposis coli) álló komplex jelenléte szükséges. A ligandnak a receptorhoz való kapcsolódása nem lehetséges az LRP5 és LRP6 (lipoprotein receptor related protein 5/6) jelenléte nélkül. Amennyiben a ligand hozzákötődik a receptorhoz és létrejön a Wnt-Fz-LRP 5/6 komplex, akkor a β -catenin folyamatos bontásához

szükséges Axin az LRP5/6-hoz kapcsolódva a sejt membránjához kötődik a Dishevelled (Dvl) fehérjék segítségével. Így a β -catenin folyamatos bontása leáll, a β -catenin szintje megnő. A szabad β -catenin a sejtmagban komplexet képez a DNS-hez kötődő TCF/LEF fehérjékkel (T cellfactor/lymphoidenhancerfactor) és aktiválja a Wnt-célgének átírását.



2. ábra: A Wnt/ β -catenin útvonal működésének vázlatos ábrázolása, valamint a GC-túlsúly által aktivált Wnt-útvonal gátlók befolyása az élettani működésre

A Wnt-útvonal gátlói 10 inhibitor-családba sorolhatóak; ezek közül a legtöbbet a Dickkopf- család (Dkk) fehérjéiről, a szklerosztinról (Sost) és az sFRP-család (secreted Frizzled-related proteins) tagjairól tudunk (21). A GC-túlsúly az említett három inhibitor (vagy inhibitor-család) mindegyikének a működését befolyásolja.

2.6. miRNS-ek és glükokortikoid-hatás

A jelátviteli útvonalak működése elképzelhetetlen a miRNS-ek „finomhangolása” nélkül. Ezek az átlagosan 19-22 nukleotidból álló, fehérjét nem kódoló RNS-molekulák a hírvivő (messenger) mRNS-ek poszttranszlációs módosításai révén fejtik ki rendkívül sokrétű szabályozó tevékenységüket. Jelenlétüket először 1993-ban írták le *C. elegans*-ban, az azóta eltelt három évtized alatt 3012 humán miRNS-t azonosítottak, csaknem 4,5 millió becsült interakciós lehetőséggel (22). Egy adott betegséghez, kórállapothoz köthető, jellegzetes miRNS-mintázatot emberekben először 2002-ben, B-sejtes krónikus limfoid leukémia kapcsán írtak le (23), mára már számos daganatos, fertőző, immunológiai- és anyagcserebetegség kapcsán igazolódott specifikus, eltérően expresszálódó miRNS-ek jelenléte. (24–28).

A GC-hatás közvetítésével kapcsolatban is számos miRNS szabályozó szerepe ismert, amelyek befolyásolják:

- **a szteroidogenezis során szerepet játszó enzimek működésének szabályozását:** a miR-24 és a miR-10b jelenléte a 11- β -hidroxiláz enzim, míg a miR-320a-3p a P450_{scc}, illetve a 17- α -hidroxilázenzim csökkent működéséhez vezet (29–31)
- **a GC-ok hozzáférhetőségét:**
 - a kortizol és a kortizon közötti átalakulás szabályozását: humán eredetű májsejtenyészetekben a miR-579 és a miR-561 gátolták a 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim kódoló gén expresszióját (32)
 - a GC-receptorok expressziójának a változását: megnövekedett miR-124-3p expresszió egerek agyában csökkent GR-expresszióval és depresszív viselkedéssel társult (33)
- **a GC-ok jelenlétére adott sejtválaszt:** dexametazon hatására oszteoblasztokban mind a miR-320, mind a miR-199-5p megnövekedett expresszója volt tapasztalható (34,35), patkányok csontszövetében az elhúzódó GC-kezelés hatására a miR-29a expressziója csökkent (36)

Ezen túlmenően, a miRNS-ek ígéretes eszközöknek tűnnek a hipofízis eredetű, illetve az ektópiás GC-túltermelés elkülönítésében (37), valamint külső forrásból származó GC-bevitel esetén a túladagolás elkerülésében (38).

2.7. A hiperkortizolizmus hatása az általa kiemelten befolyásolt szervekre, szervrendszerekre

2.7.1. A hiperkortizolizmus hatása a csontrendszerre

A kortizol-túlsúly az egyik „leglátványosabb” hatását a csontrendszerre fejt ki; a glükokortikoid-indukálta oszteoporózis (glucocorticoid-induced osteoporosis-GIO) a szekunder oszteoporózisok leggyakoribb megjelenési formája. A tartós glükokortikoid-túlsúly a csontok ásványianyag-tartalmának (bonemineraldensity-BMD) csökkenéséhez, valamint a csontok fokozott törékenységéhez vezet (39). A csontok fragilitása gyakran már akkor kialakul, amikor a BMD-érték még a referencia-tartományban van, ami arra utal, hogy a GC-túlsúlynak az egyes csontsejtekre gyakorolt hatása is jelentős szerepet játszik a csontok törékenységének kialakulásában (40).

A csontrendszer homeosztázisa az állandó csontképződési- és csontlebontási folyamatok egyensúlyán nyugszik, amelynek feltétele az oszteoblasztok, oszteociták és oszteoklasztok közötti folyamatos kommunikáció. Az oszteoklasztok differenciálódási és aktiválódási folyamatában fontos szerepet játszik a felszínükön jelenlévő RANK receptor, amelynek ligandját, a RANKL-t jelentős részben az oszteoblasztok termelik. Szintén az oszteoblasztok termelik az OPG-t, amely megakadályozza a RANKL kapcsolódását a RANK-hoz és csak meghatározott körülmények között engedi meg a RANKL-RANK kapcsolódást, vagyis az oszteoklasztok differenciálódását.

A csontképződést a GC-túlsúly több helyen is gátolja: negatívan befolyásolja az oszteoblasztokproliferációját és differenciálódását (41), az oszteoblasztokban és az oszteocitákban apoptotikus folyamatokat indukál részben közvetlenül, a pro-apoptotikus faktorok szintjét növelve (42,43), részben a reaktív oxigén-gyökök (reactive oxygen species-ROS) közvetítésével (44). Az oszteoblasztok és oszteociták apoptózisa miatt a különböző típusú csontsejtek közötti kommunikáció is zavart szenved, részben ez a hatás is hozzájárul ahhoz, hogy a GC-k elősegítik az oszteoklasztok differenciálódását (45) és növelik az oszteoklasztok élettartamát (46).

A Wnt/ β -catenin útvonal fontos szerepet játszik a fent említett folyamatok mindegyikében.

A GC-túlsúly a Wnt-útvonal gátlóinak felszaporodásához vezet: magasabb GC-koncentrációk emelkedett sFRP-1 expressziót eredményeztek mind mezenchimális sejtvonalakon, mind oszteoblasztokon végzett kísérletekben (47). Egy másik Wnt-útvonal gátló, a Dkk-1 expressziója is megemelkedett dexametazon kezelés után humán oszteoblasztokon végzett kísérletben (48). A Dkk-1 megnövekedett expressziója gátolta az oszteoblasztokdifferenciációs folyamatait egér eredetű koponyacsontsejtekben (49). GC-kezelés hatására egerek oszteocitáiban a szklerosztinexpressziója szintén emelkedett; szklerosztin-hiányos egerekben a GC-túlsúly csontokra kifejtett negatív hatása nem jelentkezett (50).

GC-kezelésben részesülő felnőtteknél különböző biokémiai markereket határoztak meg a kezelés megkezdése előtt, valamint 24, 48 és 96 órával a terápia megkezdése után. Az OPG és a szklerosztin szintje a 48 órás mintában szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott, amelyet az oszteociták hirtelen bekövetkező apoptózisa magyarázhat (51). Cushing-szindrómás betegeknél szintén alacsony szklerosztin értékeket mértek, amely a hiperkortizolizmus kezelésével párhuzamosan növekedésnek indult (52).

A Wnt-útvonal ép működése gátolja az oszteoklasztogenezist: pluripotensmezenchimális sejtekben a Wnt3a fehérje fokozta az OPG expresszióját, ezáltal gátolta a RANKL-RANK kapcsolódást és az oszteoklasztok következményes differenciálódását (53). A Wnt-útvonal inhibitorai közül a szklerosztin és a Dkk-1 fokozza a RANKL, és csökkenti az OPG expresszióját humán preoszteocitákban, illetve mezenchimális őssejtekben (54,55).

2.7.2. A hiperkortizolizmus hatása a zsírszövetre

A GC-túlsúlynak a zsírszövetre kifejtett hatása szorosan kapcsolódik a csontszövetre kifejtett hatásához, hiszen mind az oszteoblasztok, mind az adipociták ugyanabból a mezenchimális őssejtből (mesenchymalstemcell- MSC) differenciálódnak. A preadipociták differenciálódását elősegítő fő transzkripciós faktor, a PPAR- γ (peroxisomeproliferatoractivated receptor- γ) gátolja az oszteoblasztok differenciálódásához elengedhetetlen Wnt/ β -catenin útvonal működését (56), a Wnt/ β -catenin útvonal zavartalan működése esetén pedig a preadipociták differenciálódási

folyamata marad el (57). Az említetten kívül számos más, ellentétes hatású szabályozó mechanizmus van a két sejtvonal között (58–60).

A GC-túlsúly a centrális, különösen a vizszerális zsírszövet (visceraladiposetissue-VAT) tömegének a megnövekedéséhez, és a perifériás, bőr alatti zsírszövet (subcutanadiposetissue –SAT) csökkenéséhez vezet (61). A két különböző zsírszövet különböző módon reagál a GC-hatásra: a dexametazon kezelés hatására mindkét zsírszövet típus esetén a PPAR jelátviteli útvonal szignifikáns túlműködését tapasztalták, de a túlműködés mértéke jelentősebb volt VAT-ban, mint SAT-ban (62). A két zsírszövetben a GC-k hatása különböző a lipolízis tekintetében is: míg SAT-ban a GC-kezelés a lipolitikus enzimek szintjének növekedéséhez vezetett, addig VAT esetén a GC-k gátolták a lipolitikus folyamatokat (63). A vizszerális zsírszövet felhalmozódása önmagát felerősítő folyamattá válhat, hiszen a VAT 4-szer több glükokortikoid receptort tartalmaz, mint a SAT (64). Az is bizonyított, hogy a túltápláltság-okoza, illetve a nagymennyiségű GC-k által okozott VAT-túlsúly közül az utóbbinak van hosszabb távú hatása; ebben az esetben a megnövekedett intramuszkuláris zsírszövet-tartalom és a kóros inzulin-rezisztencia hosszú idővel a hiperkortizolémias állapot megszűnése után is kimutatható volt (65).

A zsírszövetben számos olyan peptid, illetve fehérje termelődik, amely a zsírszövet auto-, para- és endokrin hatásaiért felelős. Ezeknek az adipokineknek, citokineknek jelentős része (pl. leptin, chemerin, omentin, resistin, IL-6, TNF- α) az oszteoblasztokra és/vagy az oszteoklasztokra hatva a csontrendszer működését negatívan befolyásolja (58,59), így ezen a szinten is megnyilvánul a zsírszövet és a csontszövet közötti ellentétes szabályozás.

A leptin a zsírszövet által termelt egyik legfontosabb (és az elsők között azonosított) adipokin, amelynek kiemelkedő szerepe van a zsírszövet és a központi idegrendszer, a hasnyálmirigy és az ivarszervek közötti kommunikációban (66). A kutatások eredményei azt mutatják, hogy a zsírszövet kiterjedése, a leptin szintje és a Wnt-útvonal működése több ponton is szorosan kapcsolódik egymáshoz. A Wnt-útvonal aktiválódása amellett, hogy a preadipociták differenciálódását gátolja, fokozza a leptin termelődését érett adipocitákban (67). Elhízott egerek hipotalamuszának mediobazális sejtjeiben a GSK-3 β szintjét (amely a β -catenin folyamatos inaktiválásáért felel) emelkedettnek találták (tehát a Wnt/ β -catenin útvonal működése akadályozott volt), ennek az

állapotnak a következménye hiperfágia, valamint súlyosbodó glükóz-intolerancia és az elhízás fokozódása volt (68). Elhízott, leptin-hiányos egerek agyából készült metszeteken a Dkk-1 (Wnt-inhibitor) szintje szignifikánsan magasabb volt, mint normál testalkatú egerek agyában (68). Leptin-kezelés hatására az orexigénneuropeptid Y (NPY)-t termelő hipotalamikus sejtekben a GSK-3 β gátlódott, tehát a Wnt/ β -catenin útvonal működése biztosítottá vált (69). Ez azért jelentős, mert egerekben a neuropeptid Y deléciójaprotektív volt a GC-kezelés által indukált csontelváltozások kialakulása, valamint a csontvelő zsíros elfajulása tekintetében (70).

2.7.3. A hiperkortizolizmus hatása a központi idegrendszerre

A GC-túlsúly káros hatását a központi idegrendszeri struktúrákra, valamint a neurológiai és pszichés funkciók vonatkozásában számos tanulmány bizonyította már. Az agy különböző struktúrái közül a glukokortikoidokneurotoxikus hatására a hippokampusz sejtjei bizonyultak a legérzékenyebbeknek (71–73). 339 Cushing-szindrómás beteg MRI felvételeit elemezve arra a következtetésre jutottak, hogy a betegek hippokampuszának mérete zsugorodott, az agykamráik mérete kitágult, agyi atrófia tüneteit mutatták, és az elváltozások gyakrana betegség remisszióba kerülése után még hosszú ideig fennálltak (71).

A fentiekkel összhangban krónikus stressznek kitett egerek agyában a hippokampusz térfogatát kisebbnek találták, a gyrusdentatus területén csökkent neurogenézissel, a cornuammonis 1 régióban pedig fokozott neuronális pusztulással, illetve a neuronok dendritjeinek atrófiájával (72). Ezen felül a hippokampusz területén a Wnt-útvonalat gátló Dkk-1 fokozott jelenlétét, illetve a β -catenin szint csökkent expresszióját mutatták ki (72).

Humán eredetű neurális progenitor sejteket (amelyekből a neuronok, asztrociták, oligodendrociták is differenciálódnak) dexametazonnal kezelve a sejtek proliferációja és az idegsejt irányú differenciáció jelentősen csökkent, míg a gliasejtek képződése fokozódott (74). A dexametazon kezelés hatására a Dkk-1-erőteljes működését, ezáltal a Wnt-útvonalt gátlását lehetett észlelni, a hatás a GR-antagonista mifepriszton adásával kivédhető volt (74).

A GC-k hosszú távú hatásait valószínűleg epigenetikai változások is magyarázzák. Patkányembriókból származó neurális őssejteket dexametazon hatásnak kitéve a sejtekben átörökíthető elváltozások jöttek létre, amelyek kimutathatóak voltak a leánysejtekben is, noha azok GC-hatásnak nem voltak kitéve (75). A metilációs vizsgálatok a globális DNSmetilációs szintjének csökkenését mutatták ki mind az anya-, mind pedig a leánysejtekben; ezen túlmenően a dexametazon hatására egy-, oxidatív stresszre vonatkozó, átörökíthető receptivitást tapasztaltak. Ez abban nyilvánult meg, hogy a leánysejtek, amennyiben dexametazonnal találkoztak, megnövekedett számban pusztultak el apoptotikus sejthalálban a kontrollsejtekhez viszonyítva (75). Az epigenetikai változások jelentőségére hívja fel a figyelmet egy másik kísérlet is: kiterjedt, genomszintű elváltozásokat, főleg az érintett promóterekhipometilációját tapasztalták prenatális GC-terápiában részesült tengerimalacok agyában (76). A minták gyűjtése 24 órával, valamint 14 nappal a prenatális GC-kezelés megkezdése után történt. A kezelés befejezése után 24 órával levett mintákban egyes érintett gének hipometilációját és hiperacetilációját igazolták; a kezelés után 14 nappal levett mintákban az előzőleg érintett elváltozások nem voltak kimutathatóak, helyettük más promóterekhipo- vagy hipermetilációja volt detektálható (76). Ez azt bizonyítja, hogy a GC-knek az agyi struktúrákra kifejtett káros hatása nem statikus, ellenkezőleg: dinamikus, továbbgyűrűző jelleget mutat.

2.7.4. A hiperkortizolizmus hatása a bőrre

A bőr a protektív hatásain túl immunológiai folyamatokban és az extraadrenális szteroid-szintézisben is szerepet játszik: a bőrréteg különböző sejtípusai a HPA-tengely gyakorlatilag minden fontos elemét (CRH, POMC, ACTH, MSH) termelik, ezen kívül rendelkeznek a megfelelő enzimmérettel ahhoz, hogy koleszterinből számos szteroid hormont elő tudjanak állítani, többek között a kortizolt is (77,78). A bőr sejtjei közül a keratinociták, a melanociták és a fibroblasztok, a bőr függelékei közül a szőrtüszők bizonyítottan képesek kortizol-szintézisre (78,79).

A GC-túlsúly hatására a felhamban (epidermisz) az alábbi hisztopatológiai elváltozások tapasztalhatóak: a hámréteg elvékonyodik, a keratinociták száma csökken, a szarurétegben a lamellárislipid-rétegek elvékonyodnak (80). A hámréteg

elvékonyodásáért a GC-knek a keratinociták differenciálódására kifejtett kettős hatása felelős: a sejtek érése során a korai differenciálódási folyamatokat a GC-k gátolják, míg a késői szakaszokban serkentik (81). Humán keratinocitákat dexametazonnal kezelve fény derült arra is, hogy ezekben a sejtekben (számos más, GC-túlsúlynak kitett sejtípussal ellentétben, ahol a GC-k apoptózist indukálnak), a GC-k antiapoptotikus hatást fejtenek ki (81).

A dermiszben a GC-k hatására csökken a fibroblasztok száma, ezáltal a bőr kollagén- és elasztintartalma, amely végső soron a bőr mechanikai állóképességének és rugalmasságának csökkenéséhez vezet (80).

A bőr függelékei közül különösen a szőrtüszők érzékenyek a magas GC-koncentrációkra: 481 Cushing-szindrómás beteg közül 31%-nál jelentkezett hajhullás (82); női CS betegeknél pedig 5-ször gyakoribb a kopaszság, mint korhoz és nemhez illesztett kontrollcsoportokban (83).

A Wnt/ β -catenin útvonalnak szerepe van a bőr bizonyos sejtjeinek proliferációjában, illetve differenciálódásában: az epidermisz szintjén a Wnt-útvonal nem megfelelő működése esetén a bőr függelékei nem fejlődnek ki (84). A sebgyógyulásban a Wnt-útvonal jelentősége még kifejezettebb: Wnt10a hiányos egereken (a Wnt10a a Wnt-útvonal egyik fontos fehérjéje, hiányában a jelátvitel nem működik) az okozott sebek gyógyulása jelentősen elhúzódott a vad típusú társaik sebgyógyulásához képest (85). A Wnt-útvonal egyik gátlója, a Dkk-1 megnövekedett expressziója kísérleti állatokban megakadályozta sebzett területen a szőrtüszők újraképződését (86). Humán eredetű bőr szövetkultúrákon a β -catenin sejt-magban történő felszaporodása a sebgyógyulást kedvezőtlenül befolyásolta: a LiCl-al kezelt sebek (a LiCl gátolja a GSK-3 β -t, a β -catenin folyamatos degradálásáért felelős enzimet) gyógyulása jelentősen elmarad a kezeletlen sebek gyógyulásától (87). A GC-k humán keratinocitákban ugyanezt a folyamatot idézik elő: dexametazon kezelés erőteljes β -catenin felhalmozódást idézett elő a keratinociták sejt-magjában, a hatás GR-receptor antagonistá adásával kivédhető volt (88).

2.8. A hiperkortizolizmus tünetei

A Cushing-szindróma tüneteinek túlnyomó része nem specifikus, ezért a hiperkortizolizmus kezdeti szakaszában a tünetegyüttest néha nehéz elkülöníteni más, hasonló tünetekkel jelentkező kórképektől: magasvérnyomás-betegségtől, 2-es típusú diabétesz mellitustól, policisztás ovárium szindrómától, incidentálisan felfedezett melékvese-adenómáktól, oszteoporózistól, hipokalémiától(89).

Az amerikai Endokrin Társaság érvényben lévő (2008-as) iránymutatója szerint a Cushing-szindrómában tapasztalható tünetek és a betegek panaszai az alábbiak (89):

A legspecifikusabb tünetek:

- sérülékeny bőr
- az arc vérbősége
- a proximális izmok gyengesége
- sztriák (különösen, ha vöröses-lila színűek és 1 cm-nél szélesebbek)
- gyermekekben: súlygyarapodás és a magasságbeli növekedés lelassulása

A leggyakoribb tünetek és panaszok:

- „bölénypúp”
- az arc vagy a szupraklavikuláris árok teltsége
- obezitás
- a bőr rossz gyógyulási hajlama
- elvékonyodott bőr
- perifériás ödémák
- aknék
- fokozott szőrnövekedés (hirsutizmus)
- nőknél hajhullás, kopaszodás
- gyermekeknél: alacsonynövés, kóros virilizáció, korai vagy késői pubertás
- depresszió
- fáradtság, levertség
- hátfájás
- csökkent libidó
- a rövid távú memória romlása
- álmatlanság

- ingerlékenység
- menstruációs zavarok

Az európai Cushing-szindrómás betegek adatait elemző tanulmányok arra is rámutattak, hogy a specifikusnak gondolt tünetek nemenként, életkoronként, és a kortizol-túltermelés kiindulási pontjai szerint is eltérőek. A hirtizmus és a diabétesz (prevalenciájuk 92%, illetve 74%) jóval gyakoribb volt ektópiás CS esetén, mint hipofízis- vagy adrenális eredetű CS miatt kezelt betegekben(82). A libidó csökkenése, a gerincoszlop oszteoporózisa és a csigolyák, valamint a bordák törése gyakoribb tünet volt férfiaknál, míg a testsúly növekedése gyakrabban fordult elő nőknél (82).

Ezen túlmenően, a 65 év feletti betegeknél kisebb BMI és derékméret volt tapasztalható, mint a 65 évnél fiatalabbaknál (vagyis az abdominális típusú elhízás nem volt jellemző tünet). Ugyanígy nem volt jellemző az idősebb korcsoportban bőrtünetek, hajhullás, hirtizmus vagy depresszió jelenléte; a betegség vezető tünetei ebben az életkorban inkább izomgyengeség, diabétesz, magas vérnyomás, kardiovaszkuláris betegségek, vénás tromboembólia és csonttörések voltak, amely tünetek más betegségekhez kapcsolódóan is jelen lehetnek a 65 év feletti korosztályban (11).

A tünetek nem specifikus volta miatt a tünetek megjelenésétől a diagnózis megszületéséig eltelt idő viszonylag hosszú, a legfrissebb kutatások szerint is átlagosan 34 hónap: egy friss metaanalízisben 5367 beteg adatait elemezve azt közölték, hogy ektópiás Cushing-szindróma esetén 14 hónap, adrenális eredetű CS esetén 30 hónap, míg hipofízis eredetű Cushing-szindróma esetén 38 hónap volt a diagnózisig eltelt idő (90).

2.9. A laboratóriumi diagnosztika jelentősége a hiperkortizolémiával járó állapotok korai diagnózisában

A Cushing-szindróma kivizsgálására vonatkozó aktuális irányelv a diagnózis felállításához az alábbi laboratóriumi vizsgálatokat tartja a legmegbízhatóbbnak (89):

- vizelet szabad kortizol meghatározás (urine free cortisol-UFC), minimum két alkalommal elvégzendő

- éjszakai nyál-kortizol meghatározás (latenightsalivarycortisol-LNSC), két alkalommal elvégzendő
- 1 mg dexametazonnal elvégzett éjszakai szupressziós teszt (dexamethasonesuppressiontest-DST)
- alacsony dózissal, hosszabb ideig végzett DST- 2 mg/nap dexametazonnal 48 órán keresztül

Az Európai Endokrin Társaság a fenti vizsgálatokon kívül a dexametazon adása után mért CRH-tesztet és az éjszakai szérum-kortizolszint mérését ajánlja bizonyos betegek körében(91).

Az iránymutató tehát pontosan meghatározza azokat a vizsgálatokat, amelyeknek az eredményei a leghasznosabb információkkal szolgálnak diagnosztikai, differenciáldiagnosztikai kérdésekben. Abban viszont az iránymutató nem segít (egy szakmai szervezet által összeállított iránymutató nem is segíthet), hogy milyen gyártó által gyártott tesztek eredményeit tartják a legpontosabbaknak, melyek azok, amelyek esetében a legnagyobb az egyezés a laboratóriumi vizsgálatok eredményei és a klinikai állapot között.

A laboratóriumi reagensek túlnyomó része teljesen pontosan jelzi azokat az állapotokat, amikor a hiperkortizolizmus már szinte „tapintható” a klinikai tünetek alapján. A nehezen megválaszolható kérdések mindig a hiperkortizolizmus kezdeti állapotában, illetve a betegek követése során, az esetleges recidívák jelentkezésekor tevődnek fel. Ezekben az esetekben a klinikai tünetek még nem árulkodóak (akár teljes mértékben hiányozhatnak, illetve jelen lehetnek nem specifikus tünetekként), és ilyenkor egy határérték közeli laboratóriumi érték (legyen az a határérték bármely oldalán) nem sokat segít abban, hogy a laboratóriumi szakemberek megválaszolják a klinikus kollégák legfontosabb kérdését: „Van-e a betegnek hiperkortizolizmusa?”

A laboratóriumi tesztek fejlesztésekor ugyanez a kérdés nehezíti meg a fejlesztők munkáját, csak ellentétes oldalról megközelítve. Hiszen egy teszt fejlesztésekor a referenciatartományok megállapítására jól körülhatárolt betegcsoportokra van szükség. Kortizol-teszt esetében olyanokra, akiknek biztosan van, vagy biztosan nincs hiperkortizolizmusa. Azonban ha jól elkülönülő betegcsoportokkal dolgozunk, akkor nagyon nehéz olyan laboratóriumi határértéket meghatározni, amely elég érzékeny ahhoz, hogy egy kezdeti, alacsony, de a szövődményeket tekintve már potenciális

veszéllyel járó kóros kortizolszintet valóban kórosként jelezzen. Itt tehát a laboratóriumi tesztek gyártóknak olyan beteganyagra lenne szüksége, amelyben kezdeti, enyhe fokú hiperkortizolizmussal rendelkező személyek is vannak. Azonban ezeket a személyeket (mivel nagyon gyakran csak enyhe, vagy nem specifikus klinikai tünetei vannak) nehéz megtalálni és kiválasztani, és nehéz az ilyen betegek esetén a klinikusoknak a laboratóriumi szakemberek kérdésére válaszolni: „Van-e ezeknek a betegeknek enyhe, kezdeti hiperkortizolizmusuk?”

Érzékeny laboratóriumi módszerekre viszont szükség van, hiszen a hiperkortizolizmus egyes hatásai hosszú távúak, és évekkel a kortizol-túlsúly megszűnése után is jelen vannak. Éppen ezért kiemelkedő fontosságú olyan laboratóriumi módszerek létrehozása és alkalmazása, amelyek egy kortizol-túlsúlyal járó állapotot még korai stádiumban, a manifeszt tünetek kialakulása előtt diagnosztizálhatnak.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztem ki az alábbiakat:

3.1. Hiperkortizolizmus laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott új, szenzitív módszer beállítása és klinikai tesztelése

- a.) új, érzékeny, nagynyomású folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriás módszerrel (LC-MS/MS) mérhető meghatározás kidolgozása és validálás kortizol és kortizon egyidejű mérésére; az új módszer összehasonlítása a már rutinszerűen használt immunoassay módszerrel
- b.) az LC-MS/MS módszer alkalmazása és referenciatartomány meghatározása különböző betegcsoportok esetén

3.2. Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS- mintázatának analízise

Tanulmányozni kívántam különböző sejtvonalak hiperkortizolizmus hatására bekövetkező elváltozásait: milyen eltérően expresszálódomiRNS-ek jellemzik ezt az állapotot, illetve amiRNS-ek milyen jelátviteli útvonalak működésére utalnak? Mivel a Wnt/ β -catenin útvonal az egyik legrégebben ismert és legalaposabban tanulmányozott jelátviteli útvonal, kiemelt figyelmet fordítottam a Wnt-útvonal változásainak tanulmányozására.

3.3. Génexpressziós profil meghatározása és génexpressziósújraelemzés

A szakirodalomban fellelhető adatok bioinformatikai elemzésével szerettem volna vizsgálni a GC-hatásnak kitett szervekben, szövetekben a globális génexpresszió-változást és az ehhez kapcsolódó Wnt-útvonal eltéréseket. Továbbá, target-predikciós elemzéssel olyan, a Wnt-útvonalhoz tartozó géneket szerettem volna azonosítani, amelyeket a GC-túlsúly hatására eltérően expresszálódomiRNS-ek szabályoznak.

4. MÓDSZEREK

4.1. Hiperkortizolizmus laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott új módszer beállítása és klinikai tesztelése

4.1.1. Nyálminták

324 éjszakai nyálmintát elemeztünk, amelyek közül 272 minta a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikájára 2014. októbertől 2017. februárig beutalt betegektől származott. A 272 minta betegeit a kórelőzményük, az aktív klinikai státuszuk, valamint egyéb laboratóriumi és képalkotó-vizsgálati eredményeik alapján három csoportba osztottuk: olyan betegekre, akiknek a mintavétel időpontjában aktív Cushing-szindrómájuk volt (60 minta), olyanokra, akiknek a kórelőzményében szerepelt Cushing-szindróma, de a mintavétel időpontjában mind a klinikai, mind a laborvizsgálataik tünetmentességre utaltak (27 minta), és végül olyan betegekre, akiknek Cushing-szerű tüneteik voltak és akik körében a szakirodalmi adatok alapján a Cushing-szindróma előfordulási aránya magasabb (185 minta). Kontrollként 52 darab, fiatal, egészséges önkéntestől származó minta szolgált. A betegminták a rutin kivizsgálás során kerültek levételre, a vizsgálatainkat maradékmintákból végeztük el, célzott mintavételezésre nem került sor.

4.1.2. Nagy nyomású folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS/MS)

Az LC-MS/MS módszer kidolgozásához, validálásához ismert koncentrációjú és nagy tisztaságú standardokat használtunk: kortizolt, kortizont, és belső standardként 9,11,12,12-D4-kortizolt (Sigma-Aldrich).

A mintaelőkészítés során 90 µl nyálmintához 10 µl (1 µg/ml koncentrációjú) belső standardot (9,11,12,12-D4-kortizolt) adtunk, majd ehhez a keverékhez a fehérjék precipitációjának elősegítése céljából 300 µl acetonitrilt adagoltunk (VWR International). Amennyiben nincs elegendő nyálmennyiség, akkor ez szükség szerint változtatható, de az acetonitril mennyiségének mindig háromszorosnak kell lenni a

nyálmennyiséghez (ha belső standardot is használunk, akkor a nyál+belső standard keveréknek a mennyiségéhez) képest. Vortexelés után 13.500 rpm sebességgel centrifugáltuk a keveréket 5 percig. Ezután a felüliszót 1:1 arányban hígítottuk LC-MS tisztaságú vízzel (VWR International), majd a minta készen állt a mérésre.

A méréseket egy PerkinElmerFlexar FX 10 márkájú folyadékkromatográfiás készülékhez kapcsolt Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométeren végeztük. Az elválasztáshoz egy 50*2,1 mm méretű PhenomenexKinetex C18-as oszlopot használtunk (Gen-Lab), az oszlop szemcséinek átmérője 1,7 µm.

A tömegspektrométerrel MRM (multiplereaction monitoring) üzemmódban mértünk, minden mérni kívánt anyaghoz (kortizol, kortizon, D4-kortizol, vagyis a belső standard) két ionátmenetet választottunk ki. A tömegspektrométernek a különböző mérésekre vonatkozó technikai paramétereit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A tömegspektrométerre vonatkozó beállítások, technikai paraméterek kortizon és kortizol LC-MS/MS módszerrel történő meghatározására; a DP, CE és CXP mértékegysége volt (V)

ion neve	MRM átmenet	DP (declusteringspotenti al)	CE (collisionenergy)	CXP (cellexipotential)	mód	hőmérséklet	ionizációs feszültség	függőnygáz (curtaingas)	1. gáz (gas 1)	2. gáz (gas 2)	bemeneti feszültség (entrancenotential)	CAD gas
kortizol 1	407.2 → 331	-55	-22	-21	elektronegatív	350° C	-4500 V	35 psi	35 psi	35 psi	-10 V	medium
kortizol 2	407.2 → 282	-55	-31	-27								
kortizon 1	405.2 → 328.9	-35	-20	-21								
kortizon 2	405.2 → 137	-35	-48	-9								
D4- kortizol 1	411.2 → 335.2	-60	-31	-27								
D4- kortizol 2	411.2 → 301.2	-60	-45	-24								

A tömegspektrometriás mérések teljes körű validálására az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

4.1.2.1. Ionszuppresszió vizsgálata:

Az ionszuppressziótömegspektrometriás mérések esetén esetlegesen fellépő jelenség, amelynek eredménye a töltésekkel rendelkező részecskék nem megfelelő mértékben való keletkezése (a tömegspektrométer számára csak a töltésekkel rendelkező részecskék mérhetőek). Az ionszuppresszió oka leggyakrabban a mátrixban (vivőanyagban) található vegyületek jelenléte, olyan anyagoké, amelyek nem tartoznak a kimutatni kívánt anyagok közé, de befolyásolják az ionizáció folyamatát, ezáltal a mérés eredményét.

Az ionszuppresszió mértékének megállapításához szteroidmentes nyálmintát kellett előállítani. Ehhez 8 ml nyálmintához 80 mg aktív szenet adtunk, majd 15 perc vortexelés után 3500 rpm sebességgel 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót lepipettáztuk, majd ismét 80 mg aktív szenet adtunk hozzá, és az előbbi munkafolyamatokat megismételtük, összesen négyszer. Ezután a felülúszót lemértük az LC-MS/MS módszerrel, hogy tartalmaz-e kortizolt vagy kortizon. Ezt követően ebből a nyálmintából metanollal való 50:50 arányú keveréssel előállítottunk egy oldatot, majd víz és metanol 50:50 arányú keverésével egy másik oldatot. Ennek a két folyadéknak mindegyikét külön-külön kortizol és kortizon hozzáadásával dúsítottuk, majd a keletkezett mintákat az ismert LC-MS/MS módszerrel lemértük és a közöttük lévő különbségeket elemeztük (amelyek nyilvánvalóan csak az oldószeres különbözőségéből eredhetnek). Az alábbi koncentrációjú mintákat hoztuk létre kortizol és kortizon hozzáadásával a szteroidmentes nyál-metanol és a víz-metanol keverékekhez: 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml, 5,0 ng/ml, 10,0 ng/ml, 50,0 ng/ml koncentrációjú kortizol-oldatot és 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml, 5,0 ng/ml, 10,0 ng/ml, 50,0 ng/ml koncentrációjú kortizon-oldatot.

4.1.2.2. *Linearitás vizsgálata:*

0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1,0 ng/ml, 5,0 ng/ml, 10,0 ng/ml, 50,0 ng/ml és 100,0 ng/ml koncentrációjú kortizol-oldatot, és ugyanilyen koncentrációkkal rendelkező kortizon-oldatokat mértünk le a linearitási tartomány meghatározására.

4.1.2.3. *Kimutathatósági határ és számszerűsítési határ megállapítása:*

A kimutathatósági határ az a legalacsonyabb mérhető koncentráció, ahol a jel/zaj arány nagyobb, mint 3. A számszerűsítési határ az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél az ismételt méréseknél a pontatlanság maximum 20%-ot ér el.

4.1.2.4. *Pontatlanság meghatározása:*

Az egy mérési sorozaton belüli pontatlanság meghatározására négy nyálmintát egy napon egymás után tíz alkalommal mértünk le. A különböző mérési sorozatokon belüli pontatlanság meghatározására ugyanazt a négy mintát tíz különböző munkanapon is lemértük. A minták kortizol koncentrációja 0,163 µg/dl (4,5 nmol/l), 0,387 µg/dl (10,68 nmol/l), 1,26 µg/dl (34,76 nmol/l), és 2,16 µg/dl (59,6 nmol/l) volt, a kortizon koncentrációk pedig: 7,71 ng/ml (21,4 nmol/l), 10,38 ng/ml (28,8 nmol/l), 43,9 ng/ml (121,9 nmol/l) és 83,1 ng/ml (230,8 nmol/l).

4.1.2.5. *Bizonytalanság meghatározása:*

- hígítási teszt: négy nyálmintát PBS-sel (phosphatebuffersaline) 1:2, 1:4 és 1:8 arányban hígítottunk, majd lemértük a koncentrációikat és összehasonlítottuk a várt, valamint a kapott értékeket
- visszanyerési teszt: négy nyálmintát négy különböző, ismert koncentrációjú kortizolt és kortizont tartalmazó oldattal dúsítottunk, a mintákból mért koncentrációkat összehasonlítottuk a várt értékekkel

4.1.3. Immunoassay

Az immunoassay vizsgálatokat Roche e411 Cobas készüléken, ElecsysCortisol II. (Roche) teszttel végeztük. A teszt elektrokemilumineszcens elven működő immunoassay (electrochemiluminescentimmunoassay- ECLIA), kimutathatósági határa 0,054 µg/dl, számszerűsítési határa 0,109 µg/dl. Éjszakai nyálmintákra a gyártó által megadott, a referenciatartomány felső szintjét jelző határérték 0,274 µg/dl (95-ös percentilis), illetve 0,410 ug/dl (97,5-es percentilis).

4.2. Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS- mintázatának analízise

4.2.1. Mellékvese eredetű szövetminták

Mellékveseszöveteken végzendő kísérletünkhöz 4 darab, aktív Cushing-szindrómás beteg mellékvese-adenómájából, sebészeti beavatkozás során nyert minta állt rendelkezésünkre. Kontrollként olyan betegek szövetmintái szolgáltak, akiknek a mellékveséjéből nemfunkcionáló adenómákat távolítottak el. A vizsgálatokat a következő engedélyek alapján végeztük: ETT-TUKEB 4457/2012/EKrJ (67 EA12.), ETT-TUKEB 4457/2012/EKrJ (67 EA12.), ETT-TUKEB 61988/2015/EI (061s/15).

4.2.2. HeLa és H295R sejttenyészetek

A HeLasejtek MEM (Minimum EssentialMedium) tápoldatban (Gibco, 31095029) növekedtek, amelyhez 10%-os FBS-t (fetalbovineserumot) (Gibco, 10270106), 1%-os nátrium-piruvátot (Gibco, 11360070) és 1% antibiotikus-antimikotikus oldatot (Sigma-Aldrich) adtunk.

A H295R sejteket DMEM/F-12 (Dulbecco'sModified Eagle Medium/NutrientMixture F-12) tápoldatban (Gibco, 10565018) neveltük, amelyhez 2,5%-os Nu-Serumot (Corning, 355100), 1%-os inzulin-transzferrin-szelén oldatot (Gibco, 41400045), valamint 1% antibiotikus-antimikotikus oldatot (Sigma-Aldrich) adtunk.

A sejteket 37° C-os hőmérsékleten, 5%-os CO₂-al dúsított, párasított inkubátorban neveltük és a glükokortikoid kezelés előtt hormonmentes FBS-ben növesztettük 48 órán keresztül. A hormonmentesítéshez 6 ml FBS-t 0,1 g aktív szénnel (Sigma-Aldrich, C6241) inkubáltunk 24 órán át 4° C-on, ezután 300*g sebességgel centrifugáltuk 10 percig, amíg az aktív szén leülepedett, majd a felülúszót 0,22 µm-es pórusú szűrőn szűrtük át.

A glükokortikoid kezeléshez a sejteket 100 nMdexametazonnal (Sigma-Aldrich), a kontrollként használt sejteket pedig 100 nMdimetil-szulfoxiddal (Sigma-Aldrich) kezeltük 24 órán keresztül.

4.2.3. RNS izolálás

A mellékvesekéreg-adenómák bók származó szövetmintákat a műtét után azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és további felhasználásig -80° C-on tároltuk. Mind a szövetekből, mind a sejttenyészetekből a teljes RNS-t miRNeasy Mini Kittel (Qiagen) izoláltuk a gyártó előírásainak megfelelően. Az RNS integritását és koncentrációját AgilentBioanalyzer 2100 System segítségével mértük (AgilentTech).

4.2.4. miRNS profil meghatározása TLDA-kártyák használatával

Minden eljárást a gyártó utasításait követve, illetve a korábban leírtaknak megfelelően végeztünk el (92). Röviden, mintánként 900 ng teljes RNS-t reverz transzkripcióval átírtunk Megaplex RT primer Pool A és B használatával, TaqManMicroRNAReverseTranscription Kit (P/N: 4366596) alkalmazásával.

A miRNSexpressziós profilokat TaqMan Low DensityArray (TLDA) Human Micro RNA Panel v.1 (AppliedBiosystems) segítségével vizsgáltuk 7900HT Fast Real-Time PCR rendszeren (AppliedBiosystems).

Az RT-qPCR adatelemzést az RQ Manager 1.2 (AppliedBiosystems) segítségével végeztük.

A legjobb belső kontroll meghatározása érdekében a Real-Time StatMiner szoftvert (Integromics) használtuk Normfinder algoritmussal. (A Normfinder meghatározza az

egy mintakészletben meghatározott lehetséges „housekeeping” gének stabilitását a minták összetételétől függetlenül, valamint stabilitási sorrendet állít fel a csoportok közötti és a csoportokon belüli változékonyságok kifejezésére). A mellékveseszövetekhez és a HeLa sejtekhez RNU48-at, a H295R sejtekhez a MammU6-RNU44-RNU6B mértani középarányosát használtuk belső kontrollként. Az expressziós szinteket ddCt módszerrel, a változások mértékét a 2-ddCt képlettel határoztuk meg.

4.3. Génexpressziós profil meghatározása és génexpressziósújraelemzés

A glükokortikoid-termelő (mellékveseszövet és sejtvonalak), valamint a glükokortikoid-túlsúly által befolyásolt célszervek (csont, szinoviálisfibroblaszt, bőr alatti és omentális zsírszövet, bőrsejtek és agyszövet) transzkripciós változásainak meghatározása érdekében *in silico* vizsgálatokat végeztünk. AzNCBI Gene Expression Omnibus webhelyről nagy áteresztőképességű mRNS profilozási adatokat (génexpressziósmicroarray, RNS szekvenálás és RT-PCR array) töltöttünk le. Összesen 11 vizsgálat adatait (82 kontroll minta és 57 GC-túlsúlynak kitett minta, 2. táblázat) elemeztük újra ugyanazt a bioinformatikai eljárást alkalmazva, a különböző vizsgálati platformok, valamint az eltérő elemzési típusok és határértékek használatából eredő torzítások csökkentése érdekében. Minden esetben a GEO2R algoritmust (alapértelmezett beállításokkal) és a Benjamini-Hochberg (hamis észlelési arány) korrekciót alkalmaztuk.

2.táblázat: a szakirodalomban fellelhető miRNS-profilozási vizsgálatok azonosítási adatai, vizsgálati platformjai, ezek az adatok a génexpressziósújraelemzési vizsgálataink kiindulópontjai; K/D: kontroll, illetve dexametazonnal kezelt

Vizsgálati anyag	Kontrollminták száma	GC-túlsúlynak kitett minták száma	Adatállomány	Vizsgálati platform
csontszövet biopszia CS betegektől műtét előtt, illetve 3 hónappal műtét után	9	9	GSE30159 (93)	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
normál mellékvesekéreg vs. GC-szekretálóadenóma	4	4	GSE14992 (94)	Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44 K G4112F
mellékvesekéreg-karcinóma (H295R) sejtvonalK/D	3	3	GSE64826 (95)	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
oszteoblaszt sejtekK/D	6	3	GSE21727 (96)	Illumina humanRef-8 v2.0 expression bead chip
oszteoblaszt-szerű sejtek csont explantátumbólK/D	6	3	GSE10311 (97)	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
szinoviálisfibroblasztokK/D	6	3	GSE37520 (98)	AppliedBiosystems/ University of Birmingham Human RT-PCR array (custommade)
abdominálisszubkután zsírsejtekK/D	3	3	GSE88966 (62)	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array

abdominális mentális zsírsejtek K/D	3	3	GSE88966 (62)	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
epidermális keratinociták K/D	2	2	GSE26487 (81)	Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array
7 hetes, fajtiszta German Landrace malac hippokampusz szövege K/D	20	12	(99)	TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit; HiSeq 2500 instrument
7 hetes, fajtiszta German Landrace malac hipotalamusz szövege K/D	20	12	(99)	TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit; HiSeq 2500 instrument

A GC-termelő mellékveseszövetekben az *in silico* targetpredikciót a DIANA-mirPath v.2.0 program microT-CDS algoritmusával végeztük, majd ezt követték a többszörös miRNS-célgének dúsulási analízisei, összehasonlítva a miRNS-célcsoportok mindegyikét az összes ismert KEGG-útvonallal (100).

Az eltérően kifejeződő génfunkciókat a ToppGeneSuite segítségével elemeztük. Génkészlet-dúsulási elemzéseket végeztünk gén-ontológiai kategóriákra (biológiai folyamatok, molekuláris működés, sejtszövet), és elemeztük a KEGG-útvonalak génkészleteit.

4.4. Statisztikai számítások

A nyálkörtizol-eredmények statisztikai vizsgálatát SPSS v19. szoftverrel végeztük, a különböző betegcsoportok eredményeinek összehasonlítása Student-féle páros t-próbával történt. Az LC-MS/MS és az immunoassay vizsgálatok közötti kapcsolatot Pearson-féle korrelációs együtthatóval jellemeztük. A Bland-Altman grafikonokat MedCalc szoftverrel készítettük.

A szövetminták, illetve a sejtes kísérletek esetén a glükokortikoid-túlsúlynak kitett, illetve a kontrollminták közötti eltéréseket kétmintás t-próbával vagy Mann-Whitney U teszttel vizsgáltuk annak függvényében, hogy a Saphiro-Wilk teszt egyenletes eloszlásra utalt-e vagy sem. A statisztikai számításokat a Real Time StatMiner (Integromics) és a Statistica 13.4.0.14 (TIBCO) szoftverekkel végeztük.

A rangsor szerinti csoportosítást UPGMA módszerrel végeztük.

Minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Hiperkortizolizmus laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott új módszer beállítása és klinikai tesztelése

5.1.1. LC-MS/MS vizsgálat validálása

Az általunk fejlesztett LC-MS/MS vizsgálat teljes körű validálását a Food and Drug Administration (FDA) ajánlásának megfelelően végeztük el (101). A validálás során az alábbi eredményeket kaptuk:

5.1.1.1. Ion szuppresszió:

A víz-metanol keverékben oldott, illetve a szteroidmentesített nyál-metanol keverékhez adott kortizol és kortizon koncentrációk összehasonlításakor szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk, így tehát megállapítható, hogy a vizsgálni kívánt mátrix (nyál) esetén az eredményeket esetlegesen torzító ion szuppresszió nem áll fent.

5.1.1.2. Linearitás:

A vizsgálat lineáris volt a vizsgált tartományban, az ismert koncentrációjú standard oldatokkal végzett meghatározások során kapott korrelációs együtthatók: $r^2 = 1,0000$ a kortizol, míg $r^2 = 0,9996$ a kortizon esetében.

5.1.1.3. Kimutathatósági határ és számszerűsítési határ:

A 0,005 ng/ml-es koncentrációt tekintettük kimutathatósági határnak mind a kortizol, mind a kortizon esetében (0,005 ng/ml koncentrációnál a jel/zaj arány 5,3 volt a kortizol, míg 4,0 a kortizon esetében). A számszerűsítési határ 0,05 ng/ml mindkét vizsgált anyag esetében.

5.1.1.4. Pontatlanság

Az egy mérési sorozaton belüli pontatlanság (intraassayvariationcoefficient) 1,55% és 4,36% közötti volt a különböző kortizol-koncentrációjú minták esetében. Kortizon-koncentrációk esetén ezek az értékek 0,83% és 3,11% közöttiek voltak.

A különböző mérési sorozatok közötti pontatlanság (interassayvariationcoefficient) 2,02% és 3,97% között változott kortizol meghatározások, míg 2,55% és 6,05% közöttiek kortizon mérések esetében.

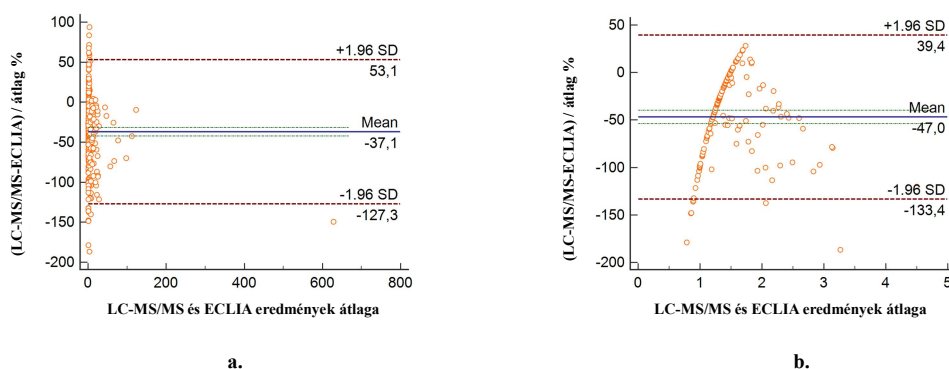
5.1.1.5. Bizonytalanság

- hígítási teszt: a mért és az elvárt értékek közötti korreláció kortizol esetén $r^2=0,998$, kortizon esetén $r^2=0,999$ volt
- visszanyerési teszt: a visszanyert értékek a valós értékekhez képest 89,28%-103,8% közöttiek (átlag 97,9%) voltak a kortizol mérések kapcsán, míg 89,2%-107,7% közöttiek (átlag 99,7%) kortizon meghatározások kapcsán

5.1.2. Az immunoassay és az LC-MS/MS vizsgálatok közötti korreláció

A két különböző mérési módszerrel kapott kortizol eredmények között erős és szignifikáns korrelációt tudunk kimutatni, az összes eredményre vonatkoztatva a korrelációs együttható $r^2= 0,892$ volt. Azonban az alacsonyabb tartományokban, jellemzően $0,0725 \mu\text{g/dl}$ ($2,0 \text{ nmol/l}$) alatti kortizol koncentrációnál, ahol az immunoassay vizsgálat számos esetben a $< 0,054 \mu\text{g/dl}$ (méréshatár alatti) eredményt adta meg, korrelációról nem beszélhetünk (ebben a tartományban az $r^2= 0,02$ volt).

Az LC-MS/MS módszerrel mért kortizol értékek minden vizsgált betegcsoportban alacsonyabbak voltak az immunoassay-vizsgálattal mért eredményeknél, a Bland-Altman ábrák is ezt a szisztémás eltérést mutatják a két módszerrel kapott eredmények között.



3. ábra: Bland-Altman analízis a két mérési módszer (ECLIA és LC-MS/MS)

egyezésének kimutatására: a.) a teljes mérési tartományban, illetve b.) 2,0 nmol/l alatti koncentrációjú mintákban. A vízszintes tengelyen a két különböző módszerrel mért eredmények átlaga található, a függőleges tengelyen az LC-MS/MS vizsgálattal nyert eredmény értékéből kivontuk a hagyományos, ECLIA-módszerrel kapott eredményt, majd ezt az értéket elosztottuk a két eredmény átlagával- az, hogy az így kapott átlagérték negatív, azt bizonyítja, hogy az LC-MS/MS módszerrel mért eredmények alacsonyabbak a hagyományos módszerrel mért értékeknél.

Kortizon meghatározást csak LC-MS/MS módszerrel mértünk, így ott összehasonlító vizsgálatokat nem végeztünk.

5.1.3. Kortizol- és kortizoneredmények a különböző betegcsoportokban

A betegcsoportok felosztása az alábbiak szerint történt:

- 1. csoport:** egészséges önkéntesek, referencia-populáció
- 2. csoport:** „Cushing-szerű” tünetekkel rendelkező páciensek (hipertóniás, obez, hirzutizmusos betegek, vagy mellékvese-adenómával rendelkezők)
- 3. csoport:** Cushing-szindrómás betegek, jelenleg tünetmentesek
- 4. csoport:** aktív Cushing-szindrómás betegek

A négy csoport eredményei közül természetesen az egészséges önkéntesek eredményei lettek a legalacsonyabbak és az aktív Cushing-szindrómás betegekéi a legmagasabbak. A Cushing-szerű tünetekkel rendelkező betegek és a mintavétel időpontjában tünetmentes Cushing-szindrómás betegek kortizol- és kortizoneredményei nem különböztek szignifikánsan egymástól, de ebben a két csoportban is magasabbak voltak az eredmények, mint az egészségesek csoportjában (3. táblázat).

3. táblázat: LC-MS/MS és ECLIA módszerrel mért éjszakai nyál kortizol és LC-MS/MS módszerrel mért éjszakai nyál kortizon, valamint a kortizol/kortizon arányok értékeinek összehasonlítása négy különböző betegcsoportban: 1. referencia populáció, 2. fizikai megjelenésük, klinikai tüneteik alapján Cushing-szindróma-„gyanús” betegek, akiknél később a Cushing-szindróma kizárásra került, 3. a mintavétel időpontjában tünetmentes, kezelt Cushing-szindrómás

beteg, 4. a mintavétel időpontjában aktív Cushing-szindrómával rendelkező páciensek. (A koncentrációk nmol/l-ben vannak megadva).

Betegcsoport	kortizol LC-MS/MS		kortizolimmut oassay		kortizon LC-MS/MS		kortizol/ kortizon	
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD
1.	1.43	0.83	2.10	1.13	7.77	5.35	0.212	0.080
2.	2.12	1.96	3.01	2.95	9.29	8.57	0.275	0.131
3.	2.57	1.24	3.50	2.54	12.48	6.88	0.225	0.064
4.	21.63	27.42	48.01	140.9	76.26	62.16	0.251	0.084

5.1.4. Kortizol/kortizon arány a különböző betegcsoportokban

Mivel az LC-MS/MS módszerrel lehetővé vált a kortizol- és kortizonszintek egyidejű meghatározása, könnyen kiszámíthattuk az egyes betegcsoportokban a két mért hormonkoncentráció arányát. A nyálban (a vérben található koncentrációkkal ellentétben) nem a kortizol, hanem a kortizon koncentrációja magasabb, átlagosan 3-5-ször nagyobb a kortizon mennyisége, mint a kortizolé.

A legalacsonyabb kortizol/kortizon arányt itt is az egészségesek csoportjában találtuk, a legmagasabb arány viszont (és egyedül ez különbözött szignifikánsan az egészséges populációban mért aránytól) a 2.-es betegcsoportban, a „Cushing-szerű” tünetekkel rendelkezők között volt.

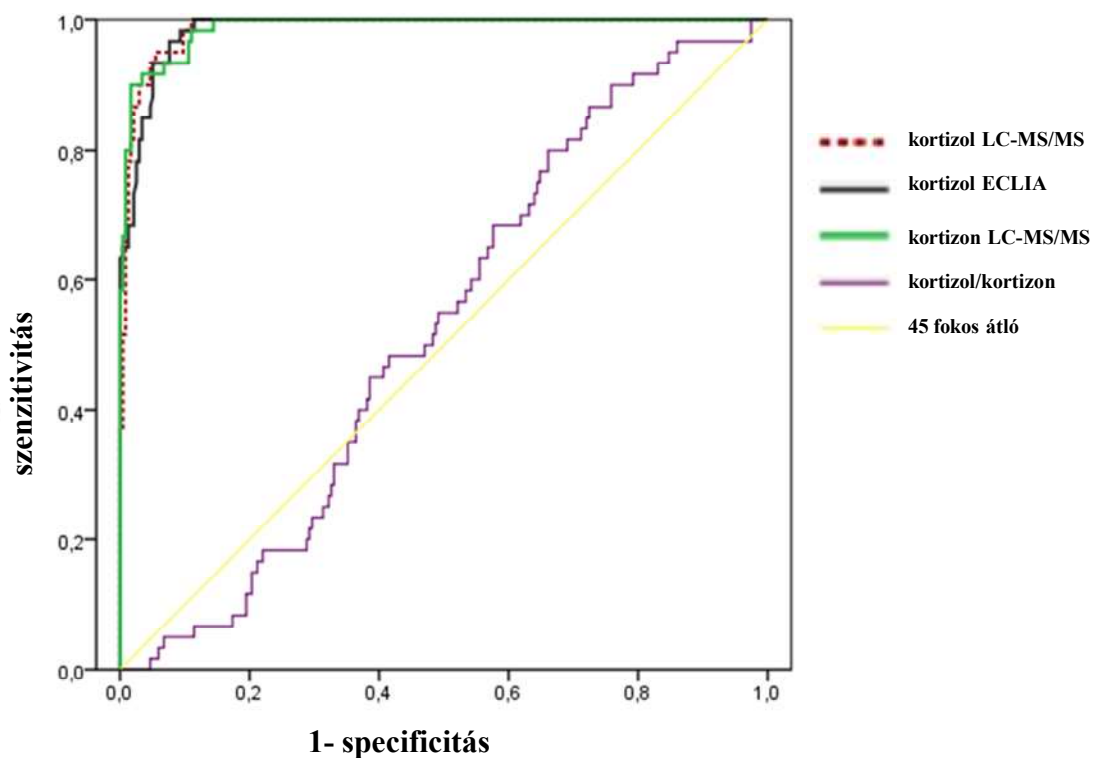
5.1.5. ROC-görbe analízis és referenciatartomány-meghatározás

A ROC-görbe analízis arra mutatott rá, hogy mind az LC-MS/MS módszerrel mért kortizol- és kortizonszint, mind pedig az immunoassay vizsgálattal mért kortizol-meghatározás egyformán hasznos eszköz a hiperkortizolizmus diagnózisának a felállításában. A ROC-görbe alatti terület az LC-MS/MS módszerrel mért kortizol- és kortizon-meghatározás esetében (mindkét esetben, külön-külön) 0,987, míg az immunoassay vizsgálattal mért kortizol meghatározás esetén 0,985. A kortizol/kortizon

arány diagnosztikus értéke hiperkortizolizmusban nem igazolódott, a ROC-görbe alatti terület ebben az esetben csak 0,525 volt.

A legjobb diagnosztikus teljesítményhez tartozó határértékek az alábbiak voltak:

- LC-MS/MS kortizol meghatározás esetén: 1,84 ng/ml (5,1 nmol/l), ebben az esetben a szenzitivitás 95%, a specificitás 94,4%
- LC-MS/MS kortizon mérés esetén: 10,1 ng/ml (28 nmol/l), ekkor a szenzitivitás 91,7%, a specificitás 96,6%. Ehhez a vizsgálathoz tartozóan egy másik, ugyanilyen diagnosztikus értékkel rendelkező határérték is van: 12,35 ng/ml (34,3 nmol/l), ennél a határértéknél a szenzitivitás ugyan alacsonyabb, 90%, de a specificitás kiemelkedően magas, 98,3%.
- immunoassay (ECLIA) kortizol meghatározás esetén: 2,64 ng/ml (7,28 nmol/l), ennél a határértéknél a szenzitivitás 96,7%, a specificitás 92,3%



4. ábra: ROC-görbe analízis, mely az egyes vizsgálatok diagnosztikus értékéről nyújt információt. Az ábrán látható, hogy (megfelelő cut-off értékek meghatározása mellett) mind az LC-MS/MS módszerrel mért kortizol- és kortizon-, mind pedig az

ECLIA módszerrel mért kortizol-meghatározás kiváló diagnosztikai értékkel bír, míg a kortizol/kortizon arány szinte a 45 fokos átló vonalát követi, azaz semmilyen diagnosztikus értékkel nem rendelkezik.

5.2. Glukokortikoid hatásban szerepet játszó szöveti markerek

5.2.1. Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS- mintázatának analízise

5.2.1.1. *Eltérően expresszálódó miRNS-ek*

Mindhárom kísérleti modellben 265 miRNS expresszióját vizsgáltuk. A hiperkortizolizmus hatásának kitett mellékveseszövetek és sejtvonalak expressziós profilját összehasonlítottuk a kontrollsejtek és -szövetek expressziós profiljával és az alábbi eltéréseket találtuk (4. táblázat):

- az aktív Cushing-szindrómás betegek mellékveseszöveiben két miRNS volt felül-, míg három miRNS alulexpresszált a kontroll mellékveseszövetekhez képest
- a dexametazonnal kezelt H295R sejtekben a kontrollsejtekhez viszonyítva négy felül- és két alulexpresszált miRNS-t azonosítottunk
- a HeLa sejtekben a dexametazon kezelés hét miRNS felül-, illetve egy miRNS alulexpresszióját eredményezte

4. táblázat: **Eltérően expresszálódó miRNS-ek.** Az alul-, illetve a felülexpressziómértékét mutató log₂FC-, valamint a szignifikanciára vonatkozó p-értékek

miRNA	log ₂ FC	p-érték
Kortizol-termelő adenómák vs. normális mellékveseszövet		
hsa-miR-375-3p	-3.18283	0.002756
hsa-miR-566	-2.0934	0.012993

hsa-miR-95-3p	0.435871	0.014638
hsa-miR-506-3p	1.96571	0.021431
hsa-miR-210-3p	-1.18389	0.038611
Dexametazon-kezelt HeLa sejtek vs. kontrollsejtek		
hsa-miR-183-5p	0.203726	0.037677
hsa-miR-195-5p	1.355332	0.043846
hsa-miR-26a-5p	1.321971	0.020827
hsa-miR-30e-3p	-0.86986	0.02123
hsa-miR-335-3p	1.586908	0.045771
hsa-miR-572	1.58437	0.042381
hsa-miR-622	3.287344	0.03071
hsa-miR-95-3p	2.307738	0.040524
Dexametazon-kezelt H295R sejtek vs. kontrollsejtek		
miR-331-5p	2.14926	0.018581
miR-7-1-3p	-0.25662	0.004913
miR-27a-3p	0.457272	0.010971
miR-346	0.921683	0.017707
miR-376a-3p	0.581655	0.034872
miR-668-3p	-0.56929	0.041363

Mindössze egy olyan eltérően expresszáldottmiRNS volt, amely közös volt a kísérletekben, a miR-95-3p, amely a Cushing-szindrómás betegek mellékveséjében és a HeLa sejtekben is felülexpresszáldott a megfelelő kontrollokhoz képest.

5.2.2. Az eltérően expresszáldómiRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak

A megváltozott expressziójúmiRNS-ekhez kapcsolódóan, útvonal-elemző szoftver segítségével meghatároztuk az általuk érintett jelátviteli útvonalakat. A szignifikáns eltérést mutató jelátviteli útvonalak száma és milyensége a három kísérletben jelentős különbségeket mutatott (5. táblázat).

5. táblázat: Az eltérően expresszáldómiRNS-ek által szignifikánsan befolyásolt jelátviteli útvonalak

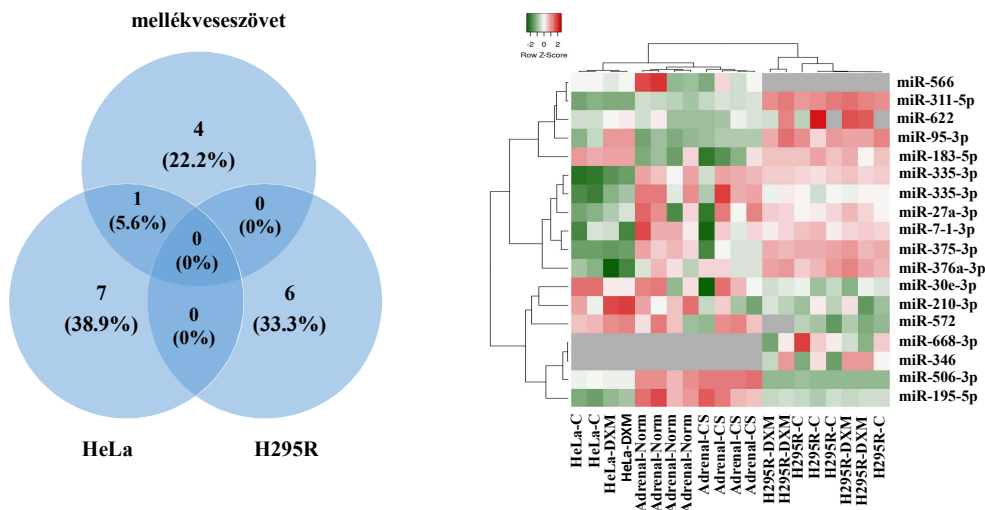
GC-termelő mellékveseszövet		HeLa sejtek		H295R sejtek	
KEGG-útvonal	p-érték	KEGG-útvonal	p-érték	KEGG-útvonal	p-érték
Biotinmetabolism	5.90E-06	PI3K-Akt signalingpathway	1.87E-26	Focaladhesion	5.71E-09
Axonguidance	5.90E-06	Prostatecancer	5.59E-20	Wntsignalingpathway	4.44E-08
Long-termdepression	3.95E-04	Wntsignalingpathway	8.18E-14	Neurotrophinsignalingpathway	4.44E-08
Insulinsignalingpathway	3.23E-03	mTORSignalingpathway	5.65E-13	ErbBSignalingpathway	1.08E-07
Gapjunction	7.57E-03	Insulinsignalingpathway	1.74E-12	Gapjunction	1.08E-07
Chronicmyeloidleukemia	8.75E-02	Focaladhesion	2.14E-11	PI3K-Akt signalingpathway	1.08E-07
Glutamatergicsynapse	1.84E-01	Ubiquitinmediatedproteolysis	8.16E-11	GnRHsignalingpathway	1.85E-06
Adipocytokinesignalingpathway	1.84E-01	TGF-betasignalingpathway	1.03E-10	Circadianrhythm	2.06E-05
Wntsignalingpathway	2.65E-01	Pathways in cancer	5.91E-10	MAPK signalingpathway	2.06E-05
Gastricacidsecretion	2.65E-01	Melanoma	1.32E-09	Ubiquitinmediatedproteolysis	3.30E-05
Salmonella infection	2.91E-01	p53 signalingpathway	1.69E-09	Glioma	5.05E-05
Neurotrophinsignalingpathway	3.95E-01	Regulation of actincytoskeleton	1.02E-08	Long-termpotentiation	1.06E-04
MAPK signalingpathway	5.45E-01	Glioma	2.31E-08	Pathways in cancer	2.11E-04
Retrogradeendocannabinoidsignaling	6.21E-01	Long-termpotentiation	2.58E-08	Insulinsignalingpathway	2.58E-04
ErbBSignalingpathway	6.21E-01	Long-termdepression	2.76E-08	mTORSignalingpathway	2.08E-03
TGF-betasignalingpathway	6.77E-01	Gapjunction	4.83E-08	Axonguidance	2.45E-03
Pathways in cancer	7.03E-01	Endometrialcancer	4.83E-08	Dopaminergicsynapse	4.01E-03
Acutemyeloidleukemia	9.43E-01	Dopaminergicsynapse	5.80E-07	Smallcelllungcancer	5.79E-03

HTLV-I infection	9.76E-01	Fattyacidbiosynthesis	5.87E-07	Lysinedegradation	6.25E-03
GnRHsignalingpathway	1.34E+00	Neurotrophinsignalingpathway	6.26E-07	Protein processing in endoplasmicreticulum	9.83E-03
Shigellosis	1.48E+00	MAPK signalingpathway	8.51E-07	Prostatecancer	2.00E-02
Regulation of actincytoskeleton	1.86E+00	Chronicmyeloidleukemia	4.10E-06	TGF-betasignalingpathway	2.13E-02
Pancreaticcancer	2.43E+00	HIF-1 signalingpathway	6.81E-06	Amphetamineaddiction	6.20E-02
Maturityonset diabetes of theyoung	3.57E+00	ErbBsignalingpathway	7.23E-06	Hedgehogsignalingpathway	9.27E-02
Cholinergicsynapse	4.00E+00	Smallcelllungcancer	1.07E-05	Chronicmyeloidleukemia	1.13E-01
mTORsignalingpathway	4.04E+00	Non-smallcelllungcancer	4.37E-05	RNA transport	1.54E-01
Focaladhesion	4.79E+00	Acutemyeloidleukemia	5.51E-05	Melanogenesis	2.37E-01
Pancreaticsecretion	4.79E+00	Priondiseases	4.79E-04	Regulation of actincytoskeleton	4.01E-01
Non-smallcelllungcancer	5.54E+00	mRNA surveillancepathway	6.30E-04	Renalcellcarcinoma	6.54E-01
Salivarysecretion	7.96E+00	Transcriptionalmisregulation in cancer	1.48E-03	Glutamatergicsynapse	6.54E-01
		Gastricacidsecretion	3.44E-03	p53 signalingpathway	9.56E-01
		Calciumsignalingpathway	6.18E-03	Gastricacidsecretion	1.39E+00
		Aldosterone-regulatedsodiumreabsorption	8.44E-03	Biotinmetabolism	1.63E+00
		Hedgehogsignalingpathway	1.28E-02	Transcriptionalmisregulation in cancer	2.47E+00
		T cell receptor signalingpathway	1.83E-02	Bacterialinvasion of epithelialcells	4.44E+00
		RNA transport	2.76E-02	Fc gamma R-mediatedpagocytosis	7.41E+00
		Glutamatergicsynapse	3.14E-02	Fcepsilon RI signalingpathway	7.97E+00
		Renalcellcarcinoma	4.60E-02		
		Oocyteiosis	4.81E-02		

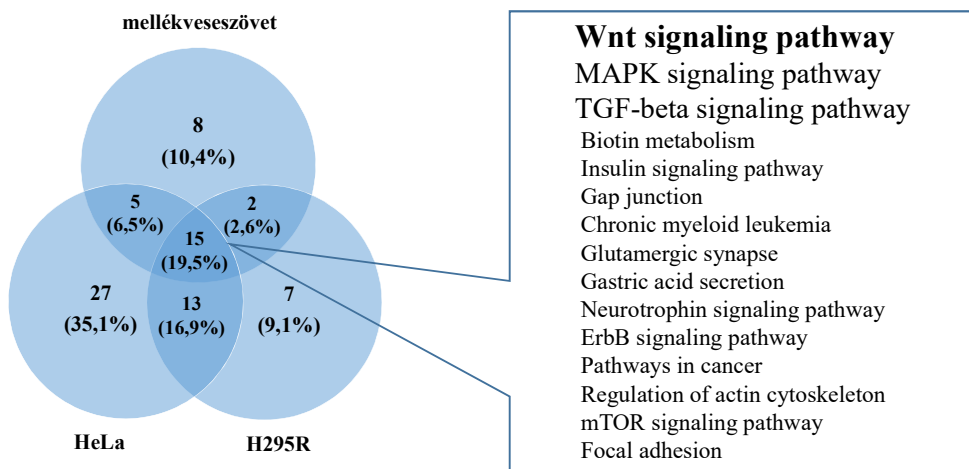
Cellcycle	4.89E-02
Biotinmetabolism	6.21E-02
Colorectalcancer	1.11E-01
Basal cellcarcinoma	2.68E-01
Inositolphosphatemetabolism	2.68E-01
VEGF signalingpathway	2.68E-01
B cell receptor signalingpathway	2.68E-01
Pancreaticcancer	2.68E-01
Cholinergicsynapse	3.50E-01
Melanogenesis	3.72E-01
Arrhythmogenicrightventricularcardiomyopathy (ARVC)	1.19E+00
Hypertrophiccardiomyopathy (HCM)	1.21E+00
Progesterone-mediatedoocytematuration	1.21E+00
Apoptosis	1.52E+00
Tightjunction	1.52E+00
Thyroidcancer	1.52E+00
Viralcarcinogenesis	2.40E+00
Phosphatidylinositolsignalingsystem	2.41E+00
Bladdercancer	2.65E+00
Cocaineaddiction	3.14E+00
Fanconi anemiapathway	3.92E+00

Mégis, az eltérő expressziójú miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak közül 15 közös volt mindhárom kísérletben, ez az összes, eltérést mutató útvonalak 19,5%-át teszi ki.

A **Eltérően kifejeződő miRNS-ek**



B **Eltérően kifejeződő miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak**



5. ábra: A három különböző kísérletben az eltérően expresszálódó miRNS-ek száma (A). Bár egyetlen olyan miRNS-t találtunk, amely a három kísérlet közül kettőben közös volt (miR-95-3p), a kórosan expresszálódó miRNS-ek által meghatározott jelátviteli útvonalak jelentős része (19,5%) azonos volt mindhárom kísérlet során.

5.3. A GC-termelő és a GC-túlsúly által befolyásolt célszövetek génextpressziós profiljának meghatározása

A GC-termelő és GC-túlsúly által befolyásolt célszervek, illetve szövettípusok teljes transzkriptóma-változásaira vonatkozó adatok (82 kontrollminta és 57 GC-túlsúlynak kitett minta)újraelemzésesorána megváltozott gének számát(vizsgált szövettípustól függően) 1125 és 6809 közöttinek találtuk. A glükokortikoidoknak viszonylag kevés hatása volt a GC-termelő mellékveseszövetre (a gének mindössze 4-8%-ának expressziója változott meg), ezzel szemben a célszervekben a hatás sokkal erőteljesebbnek mutatkozott (a gének 10-20%-ában szignifikáns eltérés igazolódott). A felül-, illetve alulexpresszáldott gének száma az egyes sejt-, illetve szövettípusokban nagyságrendileg azonos volt, ez alól csak az oszteoblaszt-szerű sejtek voltak kivételek, ahol túlnyomórészt alulexpresszáldó géneket lehetett kimutatni (6. táblázat).

6. táblázat: Glukokortikoid-túlsúlynak kitett szövetekben az eltérően expresszáldó gének aránya az összes vizsgált gén számához képest (*-az egyes betegek kortizol-túltermelésének függvényében, ** - a kísérletben alacsonyabb számú gént vizsgáltak, ennek megfelelően kell az eredményeket értékelni); K/D: kontroll, illetve dexametazonnal kezelt

Vizsgálati anyag	Dexametazon kezelés időtartama	Dexametazon dózisa	Összes vizsgált gén	Változatlanul expresszáldó gének száma	Eltérően expresszáldó gének száma	A kezelés által befolyásolt gének aránya	Felilexpresszáldó ó gének száma	Alulexpresszáldó gének száma
mellékvese-adenómavs. egészséges cortex	na	na	41078	37522	3556	0.08	1631	1925
mellékvesekéreg-karcinóma (H295R) sejtvonal K/D	6 óra	100 nM	29153	27886	1267	0.04	585	682
csontszövet biopszia CS betegektől műtét előtt, illetve 3 hónappal műtét után	na	változó*	54675	53417	1258	0.02	608	650
humán oszteoblaszt sejtek K/D	24 óra	100 nM	22177	16834	5343	0.24	2683	2660
humán oszteoblaszt-szerű sejtek csont explantátumból K/D	24 óra	100 nM	54675	47866	6809	0.12	199	6610
humán szinoviálisfibroblasztok K/D	24 óra	100 nM	81**	74**	7**	0.08**	6**	1**
humán abdominálisszubkután zsírsejtek K/D	7 nap	1000 nM	19741	15465	4276	0.21	2130	2146
humán abdominálisomentális zsírsejtek K/D	7 nap	1000 nM	19741	15954	3787	0.19	2091	1696
humán epidermáliskeratinociták K/D	24 óra	100 nM	12625	11500	1125	0.08	656	469
GermanLandrace malac hippokampuszszöve K/D	3 óra	60 µg/kg	16764	14361	2403	0.14	1156	1247
GermanLandrace malac hipotalamusz szöve K/D	3 óra	60 µg/kg	16764	14103	2661	0.15	1311	1350

5.3.1. Globális génexpresszió-változás vizsgálata GC-hatás célszöveteiben és az ehhez kapcsolódó Wnt-út vonal eltérések

A GC-hatásra eltérően expresszáldó gének kapcsán génkészlet-dúsulási vizsgálatokat végeztünk, ezek során a Wnt-út vonal szignifikáns eltéréseit tapasztaltuk minden szövettípus esetén (természetesen más biológiai folyamatok érintettsége mellett). A Wnt-jelátvitelben részt vevő gének részletes elemzése rámutatott arra is, hogy jelentős részük eltérően expresszáldott GC-túlsúly esetén (7. táblázat).

7. táblázat: A glukokortikoid-túlsúly hatására a Wnt-út vonalon eltérően expresszáldó gének aránya és az ehhez kapcsolódó érintett biológiai folyamatok száma. *: a Wnt-út vonal eltérően expresszáldó génjei/ a Wnt-út vonal összes tagja (151 gén), a KEGG génkészlet szerint (hsa04310); **: a szignifikáns gének számát illetően ebben a csoportban megengedtük a $p=0.05$ vágóértéket annak érdekében, hogy növeljük a génszámot, mivel a génkészletdúsulási elemzéshez a $p<0.05$ esetében a 7 gén kevésnek bizonyult), K/D: kontroll, illetve dexametazonnal kezelt

A GC-célszövet típusa	Eltérően expresszáldó gének száma	Wnt-út vonal eltérően expresszáldó génjei*	Érintett biológiai folyamatok száma	A Wnt-út vonalhoz köthető, érintett biológiai folyamatok száma
csontszövet biopszia CS betegektől műtét előtt, illetve 3 hónappal műtét után	1258	14/151	312	4
humán oszteoblaszt sejtek K/D	5343	52/151	1573	11
humán oszteoblaszt-szerű sejtek csont explantátumból K/D	6809	53/151	1164	6
humán szinovialisfibroblasztok K/D	10**	8/151	880	41

humán abdominális szubkután zsírsejtek K/D	4276	37/151	2644	16
humán abdominális omentális zsírsejtek K/D	3787	32/151	2422	6
humán epidermális keratinociták K/D	1125	13/151	1753	7
7 hetes, fajtisza German Landrace malac hippokampusz szöve K/D	2403	34/151	1913	10
7 hetes, fajtisza German Landrace malac hipotalamusz szöve K/D	2661	33/151	1850	11

5.3.2. Szövetspecifikus target-predikció GC-termelő mellékveseszövetekben

A kortizol-termelő mellékveseszövetekben szövetspecifikus target-predikciós elemzést végeztünk. Kiválasztottuk a Wnt-út vonal azon elemeit, amelyek megfeleltek az alábbi feltételeknek:

- expressziójuk negatívan korrelált a target miRNS-ekkel
- a target predikciós algoritmusok során is kiválasztásra kerültek

Ezzel a megközelítéssel négy olyan gént azonosítottunk, amelyeket nagy valószínűséggel a GC-túlsúly hatására eltérően expresszáló dmiRNS-ek szabályoznak (8. táblázat).

8. táblázat: A glukokortikoid-túlsúly hatására kórosan kifejeződő miRNS-ek által szabályozott gének

miRNS	Gén jele	Gén neve	logFC	p-érték	GSE14922 Probe ID
miR-375	SFRP4	Secreted frizzled related protein 4	1.3979	0.0077694	A_23_P215328
miR-576	APC	Adenomatous polyposis coli	-2.1794	0.0278861	A_23_P70213

miR-576	NFAT5	Nuclearfactor of activated T-cells 5	-1.0592	0.0343637	A_23_P359647
miR-375	CTBP2	C-terminalbinding protein 2	0.9465	0.037437	A_23_P63897

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Hiperkortizolizmus laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott új módszer beállítása és klinikai tesztelése

A nyál kortizol- és kortizonszintjeinek referenciatartományát, illetve Cushing-szindrómában alkalmazható határértékeit számos tanulmányban igyekeztek már meghatározni (102–108). Ha figyelembe vesszük az általunk is alkalmazott mérési módszert (LC-MS/MS), a saját eredményeinket négy másik tanulmány eredményeivel volt szükséges összevetni, amelyeknek értékeit a 9. táblázat foglalja össze; a legkorábbi adatok 2015-ben, míg a legfrissebbek 2020-ban jelentek meg.

9. táblázat: LC-MS módszerrel éjszakai nyálban mért kortizol- és kortizonszintek referenciatartományainak felső határa

Szerző	Megjelenés éve	Referenciatartomány felső határa		Hivatkozás
		Kortizol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Kortizon (ng/ml)	
Antonelli	2015	0.09	4.68	(105)
Mészáros	2018	0.185	10.1 (*12.3)	
Raff	2019	0.08	4.32	(108)
Bäcklund	2020	0.13	4.86	(107)
Ponzetto	2020	0.097	4.85	(106)

A táblázat adatait elemezve feltűnő lehet, hogy a referenciatartományunk felső értékei jóval magasabbak, mint a másik négy tanulmányban. Ennek az oka érthetővé válik, ha áttanulmányozzuk a cikkek módszertanát. A négy tanulmány közül kettő esetében csak egészséges, referenciapopulációnak tekinthető személyek mintájának a mérése történt, a referenciatartomány meghatározásakor a 2,5 és a 97,5 percentilis közötti értékeket vették figyelembe. A másik két tanulmány esetén is hasonló módon történt a referenciatartomány meghatározása, amelyet később Cushing-szindrómás betegek mintáinak mérésekor alkalmaztak. Természetesen a referenciapopulációban mért értékek a mi munkánk során is jóval alacsonyabbnak bizonyultak és teljes mértékben

elkülönültek azon betegek eredményeitől, akiknél aktív Cushing-szindrómát diagnosztizáltak a mintavétel idején. Tapasztalatunk szerint nem ezen két csoport elkülönítése jelent gondot (sem a klinikai tünetek, sem laborvizsgálati eredmények tekintetében), hanem azoknak a betegeknek a diagnosztizálása, akiknek a tünetei (társult betegségeik miatt) nehezen elkülöníthetők a Cushing-szindróma tüneteitől, illetve kezelt Cushing-szindrómás betegek követése során annak az időpontnak a meghatározása, amikor az addig gyógyultnak tekintett betegnél újra valamilyen terápiás beavatkozás válik szükségessé.

A célunk olyan referenciaértékek meghatározása volt, amelynél mind a vizsgálat szenzitivitása, mind pedig a specificitása a lehető legmagasabb. A kortizolszint „cut-off” értékét így 0,18 µg/dl-ben (5,1 nmol/l) határoztuk meg, ennél a határértéknél a vizsgálat szenzitivitása 95%, a specificitása 94,5%. A 0,1µg/dl körüli határértékek szenzitivitása ugyan 100%, de specificitásuk 80% alatti, a Bäcklund és társai által ajánlott 0,13 µg/dl-es értéknél sem éri el a 90%-ot.

Ugyanezt mondható el a 4,7 ng/ml körüli éjszakai kortizonszintekkel kapcsolatban is, amelyet három tanulmányban is megjelöltek a referenciatartomány felső határaként. Ennél az értéknél a vizsgálat szenzitivitása 100%, a specificitás azonban a 80%-ot sem éri el; a Raff és társai által ajánlott 4,32 ng/ml-es értékhez pedig 75% alatti specificitás tartozik. A ROC-analízis szerint a kortizonszint-vizsgálatnak a legjobb diagnosztikus értéke két határértéknél található: az egyik érték a 10,1 ng/ml (28 nmol/l), a másik a 12,35 ng/ml (34,3 nmol/l). A 10,1 ng/ml-es értékhez 91,7%-os szenzitivitás és 96,6%-os specificitás, míg a 12,35 ng/ml-es értékhez 90%-os szenzitivitás és 98,3%-os specificitás tartozik. Ezért azokban a betegcsoportokban, ahol kimagasló specificitásra van szükség (pl. obezitás, PCOS-gyanú), megfontolandó a magasabb, 12,35 ng/ml-es referenciaérték használata, egyéb esetekben a 10,1 ng/ml-es határérték kiválóan alkalmazható.

Összehasonlítva az immunoassay teszt és az LC-MS/MS teszt diagnosztikus képességeit, elmondható, hogy az immunoassay teszt is kiválóan jelzi a hiperkortizolémias állapotokat. Jelentős eltérés a két teszt eredményeit illetően csak az alacsony tartományokban, az egészséges populációban volt tapasztalható, de ennek nincs jelentősége a hétköznapi gyakorlat során, hiszen itt nem az alacsony értékek a kórosak, hanem a magasak. Az immunoassay teszttel kapcsolatban az általunk is

referenciaértéknek tekintett 4,1 µg/dl-es érték használatát kellett újragondolni. A teszt a mi adataink szerint a legjobb diagnosztikus képességét 2,64 µg/dl (7,28 nmol/l) értéknél éri el, ez nagyon közel van a gyártó által a 95-ös percentiliséhez megadott 2,74 µg/dl-es (7,56 nmol/l) értékhez. Immunoassay teszt használata esetén tehát nem a 97,5-ös percentilis értékhez megadott 4,1 µg/dl használata ajánlott, hanem a 95-ös percentiliséhez megadott 2,74 µg/dl érték.

6.2. Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS-mintázatának analízise

6.2.1. A GC-túlsúly hatására eltérően expresszálódó miRNS-ek és a Wnt-út vonal kapcsolata

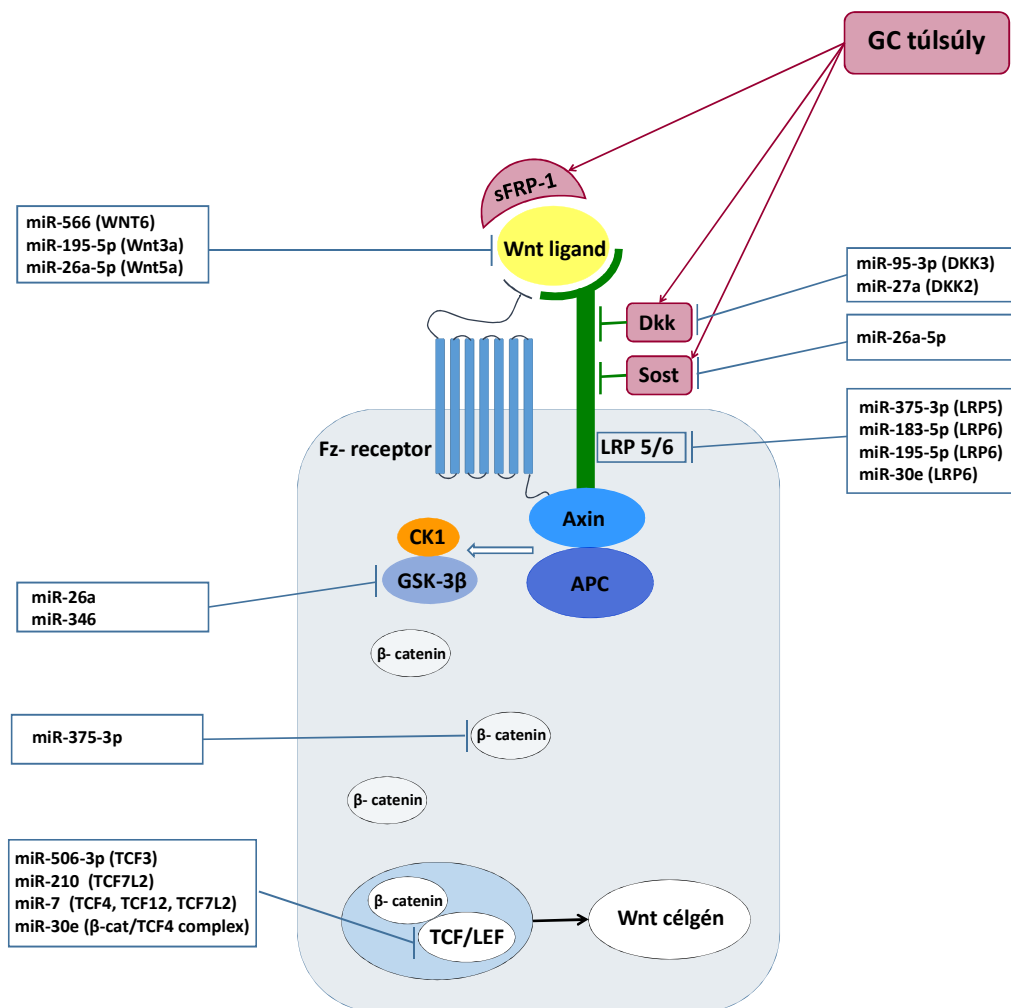
A miRNS-ek expressziós mintázata jellegzetes a különböző sejttípusokra nézve, mégis vannak olyan miRNS-ek, amelyek bizonyos állapotok biomarkereiként is használhatóak. A GC-túlsúly különböző módon befolyásolja az egyes molekulák működését, a miRNS-ek expresszióját is. Az *in vitro* kísérleteink során nyert adatok azt bizonyítják, hogy a GC-túlsúly minden általunk vizsgált sejt működését jelentősen befolyásolja. A GC-hatásra eltérően expresszálódó miRNS-ek hasonló jelátviteli mechanizmusok működését befolyásolják, amelyek közül a Wnt-út vonal érintettsége tűnik a leglényegesebbnek.

Az eltérően expresszálódó miRNS-eknek a Wnt-út vonalra gyakorolt hatását számos különböző sejttípusban, szövettípusban leírták már. A szakirodalomban fellelhető adatok alapján a kísérleteinkben azonosított miRNS-ek többféle módon befolyásolják a Wnt-út vonal működését: egyesek közülük a receptorokhoz kötődő ligandokra vagy a koreceptorok működésére, mások a β-catenin folyamatos degradálásáért felelős enzimkomplexre, megint mások a jelátviteli út vonalra gátló hatású fehérjékre fejtik ki hatásukat (10. táblázat).

10. táblázat: a kísérleteinkben azonosított, eltérően expresszáldómiRNS-ek hatása a Wnt-útvonala elemeire szakirodalmi adatok alapján

miRNS	Hatása a Wnt-útvonala	
mellékveseszövet	célzott gén	hivatkozás
hsa-miR-375-3p	LRP5 and β -catenin	(109)
hsa-miR-566	WNT6	(110)
hsa-miR-95-3p	DKK3	(111)
hsa-miR-506-3p	TCF3	(112)
hsa-miR-210-3p	wnt7b and fzd5, Sclerostin	(113,114)
HeLa sejtek		
hsa-miR-183-5p	LRP6, Dkk-3	(115,116)
hsa-miR-195-5p	LRP6, WNT3A	(117,118)
hsa-miR-26a-5p	SOSTDC1*, Wnt5a, GSK3 β	(119–121)
hsa-miR-30e-3p	LRP6	(122)
hsa-miR-335-3p	RUNX2	(123)
hsa-miR-572	útvonala-elemzés**	(124)
hsa-miR-622	útvonala-elemzés**	(125)
hsa-miR-95-3p	DKK3	(111)
H295R sejtek		
miR-331-5p	nincs adat	
miR-7-1-3p	TCF4, TCF12, TCF7L2	(126)
miR-27a-3p	DKK2	(127)
miR-346	GSK3 β	(128)
miR-376a-3p	útvonala-elemzés**	(129)
miR-668-3p	nincs adat	

Ha a táblázatban szereplő adatokkal kiegészítjük a bevezető részben szereplő, a Wnt-útvonala működését szemléltető ábrát, egy sokkal komplexebb (és talán szemléletesebb) ábrát kapunk, amely összegzi az általunk eltérően expresszáldómiRNS-eknek a Wnt-útvonala különböző komponenseire gyakorolt sokrétű hatását.



6. ábra: A kísérleteinkben azonosított, eltérően expresszálódó miRNS-eknek a Wnt-útvonál komponenseire gyakorolt hatása (109–116,119,121–138).

Az adatok összegzése során arra a következtetésre jutottunk, hogy a kísérleteinkben eltérően expresszálódott miRNS-eknek és a Wnt-útvonálnak a kapcsolata a következő három biológiai folyamat kapcsán bizonyítottan tekinthető: sejtek proliferációja és differenciációja, daganatok kialakulása (tumorigenézis), illetve a csontrendszer homeosztázisa.

6.2.1.1. Sejtek proliferációja és differenciációja

A kísérletünk során a miR-506-3p expressziója magasabb volt Cushing-szindrómás betegek mellékveséjében, mint a kontrollként szolgáló egészséges mellékvesékben.

Neurális őssejtekben ennek a miRNS-nek a magasabb expressziója összefüggésben volt a sejtek fokozott differenciációjával és csökkent proliferációjával; a folyamat a Wnt/ β -catenin útvonalhoz kötődik és a TCF3 szabályozásán keresztül valósul meg (112). A bőr papilláris sejteiben a miR-195-5p befolyásolja az LRP6 fehérje expresszióját, ezáltal a szőrtüszők kialakulását, végső soron pedig a megfelelő szőrzet megjelenését (117). Periodontálisligamentum-sejtekben a miR-195-5p megnövekedett expressziója jelentősen gátolja a sejtek elköteleződését oszteoid irányba a WNT3A fehérje működésének befolyásolása révén (118). A GC-túlsúly hatására felülexpresszázó miR-195-5p hozzájárulhat tehát a Cushing-szindrómában tapasztalható haj- és szőrhiányhoz, valamint a csonttömeg csökkenéséhez.

6.2.1.2. Daganatok kialakulása

A Cushing-szindrómás betegek mellékvesekéreg-mintáiban a miR-566 szintjének alulexpresszióját tapasztalhattuk a normál mellékveseszövetekhez képest. A miR-566 alulexpressziója emlőkarcinómás betegekben a tumor nagyobb méretéhez, előrehaladottabb stádiumához és a nyirokrendszeri metasztázisok nagyobb számához volt köthető (110). A miR-566 a WNT6-hoz kötődve gátolja meg a Wnt-útvonal működését és az emlődaganatok malignus progresszióját (110). A miR-95-3p felülexpressziója prosztata-karcinómás betegekben a DKK3 gátlása révén a rosszindulatú sejtek fokozott proliferációjához, migrációjához, ezáltal metasztázisok kialakulásához köthető (111). Vastagbél karcinómákból származó szövetmintákban a miR-183-5p felülexpresszióját igazolták normál szövetmintákhoz képest; az útvonal-elemzések a Wnt-útvonal érintettségét, illetve a Wnt-útvonal révén aktiválódó célgénnek alulműködését bizonyították (135,136).

6.2.1.3. Csontrendszer homeosztázisa

A csontok képződésében szerepet játszó folyamatokat a GC-túlsúly súlyosan károsítja; különböző kísérletek számos olyan miRNS-t azonosítottak, amelyek fontos szerepet töltenek be ezen folyamatok során.

Egér eredetű oszteoblaszt-sejtvonalon (MC3T3-E1) a miR-375-3p gátolta az oszteogenetikus folyamatokat azáltal, hogy apoptotikus folyamatot indított be a sejtekben, emellett befolyásolta az LRP5 és a β -catenin szintjét (109). A csontképződési folyamatokat a miR-26a-5p szintén negatívan befolyásolta: megakadályozta az

adipocita-eredetű mezenchimális őssejtek csontképződési irányba történő elköteleződését a WNT5a expressziójának gátlása révén (120). Csontvelő-eredetű mezenchimális őssejtekben a miR-210-3p felülexpressziója az oszteogén irányba történő elköteleződéssel, illetve az adipociták gátlásával volt összhangban; a miR-210-3p-t felülexpresszázó sejtekben a Wnt-útvonal fehérjéi: LRP5, GSK-3 β , β -catenin és TCF4 jelentősen emelkedett mennyiségben voltak jelen (113). Egy másik kísérletben ugyanennek a miRNS-nek a fokozott expressziója a Wnt-útvonal egyik inhibitorának, a szklerosztinnak az alulműködéséhez, illetve a mezenchimális őssejtek fokozott migrációjához volt köthető (114). Az *in vitro* kísérletek eredményeivel összhangban, posztmenopauzális osteoporózisban szenvedő nőbetegektől nyert csontvelő-mintákban a miR-210-3p csökkent expressziója igazolódott (130); Cushing-szindrómás betegek éksontjából nyert mintákban a miR-26a-5p felülexpresszált volt nemfunkcionális hipofízis adenómás betegek mintáihoz viszonyítva (139).

6.3. A GC-túlsúly hatása a glükokortikoid-termelő, illetve a GC-túlsúly által befolyásolt szövetekre

6.3.1. A GC-túlsúly hatása a mellékveseszövetre

A mellékvesekéreg-szöveteken és a két sejtvonalon végzett kísérlet során nyilvánvalóvá vált, hogy a GC-túlsúly nem csak a célszervekre és -szövetekre van hatással, hanem magára kortizol-termelő mellékvesekéregre is; a hatás a miRNS-ek különböző expressziója és az általuk befolyásolt jelátviteli folyamatok révén is igazolható volt. Természetesen a hatás sokkal kifejezettebb a célszervek szintjén: míg a GC-termelő sejtekben és szövetekben az eltérően expresszálandó gének aránya 4-8% közötti, addig a célszervekben és -szövetekben ez az arány 10-20%. A miRNS-ek megváltozott expressziója befolyásolhatja a GR-k működését, ezáltal a cirkadián ritmust is (140). A mellékvesének saját perifériás cirkadián órája van, amely szoros kapcsolatban van a szteroidogenezissel(141), ez megmagyarázhatja a GC-túlsúly során nem csak a célszervekben, hanem a mellékvesekéregben is tapasztalható génexpressziósváltozásokat. Továbbá, a GC-termelő szövetek génexpressziós változásai

a kortizol-túlsúly miatt fellépő negatív feed-back szabályozásnak is részei, eszközei lehetnek.

6.3.2. A GC-túlsúly hatása a célsejtekre és –szövetekre

Ahhoz, hogy megértsük a Wnt-útvonal szerepét a GC-túlműködés során, tanulmányoztuk a rendelkezésre álló szakirodalmi adatokat, amelyekben Cushing-szindrómás betegektől származó csontszövetmintákban, illetve dexametazonnal kezelt szinoviális eredetű fibroblasztokban, szubkután és omentális zsírszövetben, bőrben és neurális sejtekben követték nyomon a GC-k hatását. A GC-k által szabályozott transzkriptómák aránya célszövetenként jelentősen különbözött: a bőrben viszonylag kevés gén (6,3%) szabályozása volt GC-hatáshoz köthető, míg a zsírszövetben, az agyban és a perifériás vérben található mononukleáris sejtekben ez az arány jóval nagyobb, 10-20% közötti volt (38,81,142,143). A májban a GC-k által kiváltott transzkripciós változások a géneknek több mint 30%-át érintik (144).

Három szempont szerint vizsgáltuk a Wnt-útvonal szerepét a teljes transzkriptóma-változások tekintetében: (i) a teljes génexpressziós profil génkészlet-dúsulási elemzése, (ii) hat különböző kísérlet során a hasonló változást mutató gének génkészlet-dúsulási elemzése és (iii) az egyedi Wnt-útvonalak elemzése. Mindhárom megközelítésben a GC-hatás a Wnt-útvonal szignifikáns változásait idézte elő.

A teljes transzkriptóma-adatok arra utalnak, hogy a mellékvesekéregben a GC-túlsúly hatással van a Wnt-útvonal működésére. Mind a miRNS-ből nyert, mind pedig a génexpressziós adatok azt mutatták, hogy a mellékvesekéregben a miR-375 és a miR-506 expressziós változásai befolyásolták a Wnt-útvonal bizonyos fehérjéit kódoló géneknek (*SFRP4*, *APC*, *NFAT5* és *CTBP2*) az expresszióját.

A hiperkortizolémiás betegektől származó mellékveseszövetekben a Wnt-útvonal nem volt olyan mértékben érintett, mint a HeLa-, illetve a H295R-sejtekben. A mellékveseszövetekben a Wnt-útvonalnál erőteljesebb volt a *Biotinmetabolism*, *Long-termdepression*, *Insulinsignalingpathway* és az *Adipocytokinesignalingpathway* érintettsége. A Cushing-szindróma több, jellegzetes tünete is ezeknek az útvonalaknak a túlműködéséhez kapcsolódik: obezitás, inzulin-rezisztencia, depresszió, fáradékonyság, ingerlékenység, álmatlanság, száraz bőr és a szőrzet kihullása (145,146). A betegektől

származó szövetekben és a tenyésztett sejtekben kapott eltérő eredmények arra intenek minket, hogy az *in vitro* sejtes kísérletek esetében soha nem állnak rendelkezésünkre olyan komplex körülmények, mint az élő szervezetből származó szövetminták, illetve az *in vivo* kísérletek során, tehát az eredmények értékelésénél nagyon körültekintően kell levonni a következtetéseket.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkám során igyekeztem olyan markereket keresni, amelyek hasznos segítséget nyújthatnak a hiperkortizolizmus minél korábbi és minél pontosabb diagnózisában.

Eredményeinket az alábbi pontokban foglalhatom össze:

1. Az általunk fejlesztett LC-MS/MS módszerrel kis mennyiségű kortizol és kortizon egyidejűleg kimutatható gyakorlatilag bármilyen biológiai folyadékából.

2. Nagyszámú biológiai mintán történt összehasonlító mérések azt bizonyították, hogy a rutin eljárásban használt immunoassay (megfelelő döntési határértékek megválasztása mellett) ugyanolyan magas hatékonyságú (éjszakai nyálminták mérése esetén) a Cushing-szindróma diagnózisában, mint az LC-MS/MS módszer.

3. Kortizol-túlsúlynak kitett mellékvesekéreg-szöveten, valamint két különböző sejtvonalon (HeLa és H295R) végzett kísérleteink során 19, eltérően expresszáldó miRNS-t azonosítottunk

- mellékvesekéreg-szövetben felülexpresszált volt a *hsa-miR-95-3p* és a *hsa-miR-506-3p*, míg alulexpresszált a *hsa-miR-375-3p*, *hsa-miR-566* és a *hsa-miR-210-3p* jelenléte
- HeLa sejtekben felülexpresszált volt a *hsa-miR-183-5p*, *hsa-miR-195-5p*, *hsa-miR-26a-5p*, *hsa-miR-335-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-622* és a *hsa-miR-95-3p* jelenléte, alulexpresszált csak a *hsa-miR-30e-3p* volt
- H295R sejtekben felülexpresszált volt *amiR-331-5p*, *miR-27a-3p*, *miR-346*, *miR-376a-3p*, míg alulexpresszált a *miR-7-1-3p* és a *miR-668-3p* jelenléte

4. Mindössze egy olyan miRNS volt, a *hsa-miR-95-3p*, amely két kísérletben közös volt (a mellékvesekéreg-szövetekben és a HeLa sejtekben). Ennek ellenére, a miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak 19,5% a (15 útvonal) közös volt. A közös útvonalak közül az egyik legjelentősebb mértékben befolyásolt a Wnt/ β -catenin útvonal volt.

5. A szakirodalomban fellelhető, a GC-túlsúly hatására különböző szövetekben történő génexpressziós változások (egységes kritériumok szerinti)újraelemzése arra mutatott rá, hogy mind a GC-termelő, mind pedig a GC-hatásnak kitett szövetekben történnek génexpressziós változások, de ezek mértéke eltérő: a GC-termelő szövetekben a gének 4-8%-a, míg a célszövetekben 10-20%-a mutatott eltérő expressziót.

6. A GC-hatásnak kitett célszövetek génkészlet-dúsulási elemzése a Wnt-út vonal jelentős változásait igazolták minden egyes vizsgált szövettípusban (csontszövet biopszia CS-betegtől, humán oszteoblaszt sejtek, humán oszteoblaszt-szerű sejtek csont explantátumból, humán szinoviális fibroblasztok, humán abdominális subkután és omentális zsírsejtek, humán epidermális keratinociták valamint German Landrace malac hippocampus- és hipotalamusz-szövetei).

7. Target-predikciós elemzések során négy olyan, a Wnt-út vonalhoz tartozó gént azonosítottunk, amelyet nagy valószínűséggel a GC-túlsúly hatására a mellékvesekéreg szövetben eltérően expresszáló dmiRNS-ek szabályoznak: SFRP4 és CTBP2 (a miR-375 szabályozása alatt) és az APC és NFAT5 (a miR-576 szabályozása alatt).

8. ÖSSZEFOGLALÓ

A kortizol-túltermelés klinikai tünetei sokfélék, viszont nem specifikusak, így az endogén eredetű kortizol-túltermelés napjainkban sem kerül időben felismerésre. A hiperkortizolémia hatásai sokszor évekkel a kortizol-túltermelés megszűnése után is jelen vannak a pácienseknél, ezért fontos a kórállapot felismerése a manifeszt tünetek megjelenése előtt.

A munkánk során célul tűztük ki: i.) már meglévő laboratóriumi módszerek tökéletesítését, ii.) kortizol-túlsúlynak kitett mellékveseszövetben és sejtvonalakban eltérően expresszáldómiRNS-ek, valamint az általuk szabályozott jelátviteli útvonalak tanulmányozását, iii.) szakirodalomban fellelhető adatok *in silico* elemzését, GC-túlsúlynak kitett szövetek génexpressziósújraelemzését.

Az általunk fejlesztett LC-MS/MS módszerrel egyidejűleg, pontosan mérhető nyálkörtizol és -kortizon koncentráció (számszerűsítési határ: 0,05 ng/ml). Az LC-MS/MS és az ECLIA módszerrel mért nyálkörtizol-koncentrációk összehasonlítása arra mutatott rá, hogy megfelelő döntési határérték megválasztása mellett mindkét módszer diagnosztikus ereje kiváló ($AUC_{LC-MS/MS} = 0,987$ vs. $AUC_{ECLIA} = 0,985$).

A kortizol-túlsúlynak kitett mellékveseszövetek, valamint a GC-hatásnak kitett HeLa, valamint H295R sejtek adatait elemezve a három kísérletben összesen 19 eltérően expresszáldómiRNS-t azonosítottunk, amelyek közül csak egy, a *hsa-miR-95-3p* mutatott két kísérlet során is felülexpressziót (mellékveseszövet és HeLa sejtek). A miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak 19,5%- a (15 útvonal) közös volt, az egyik legjelentősebb mértékben befolyásolt útvonal a Wnt/ β -catenin útvonal.

A szakirodalomban közölt és elérhető adatbázisokban található GC-termelő és GC-célszövetekkel kapcsolatos kísérletek adatainak újraelemzése, a glükokortikoid-hatásra történő génexpressziós változások vizsgálata arra mutatott rá, hogy a GC-túlsúly a GC-termelő szövetek génexpresszióját is befolyásolja, bár kisebb mértékben, mint a célszövetekét (4-8% vs. 10-20%). Mind a GC-termelő, mind a GC-hatásnak kitett célszövetekben a Wnt/ β -catenin útvonal jelentős érintettsége volt bizonyítható. A target-predikciós elemzések során négy olyan, a Wnt-útvonalhoz tartozó gént azonosítottunk, a melyeket nagy valószínűséggel a miR-375 (SFRP4 és CTBP2), illetve a miR-576 (APC és NFAT5) szabályoznak.

9. SUMMARY

Clinical symptoms of cortisol overproduction are diverse and are not specific, so even today endogenous cortisol overproduction is not recognized in time. The effects of hypercortisolemia are often present in patients years after the cessation of cortisol overproduction, so it is important to recognize the condition before manifest symptoms appear.

My aims were: i.) to improve existing laboratory methods, ii.) to study differentially expressed miRNAs in adrenal tissue and cell lines exposed to cortisol excess, as well as the signaling pathways regulated by them, iii.) to perform *in silico* analysis of data found in the literature, gene expression reanalysis of tissues exposed to GC excess and tissue-specific target prediction in GC-producing adrenal adenomas.

With the LC-MS/MS method developed by us, salivary cortisol and cortisone concentration can be accurately measured simultaneously (quantification limit: 0.05 ng/ml). Comparison of salivary cortisol concentrations measured by LC-MS/MS and the ECLIA method showed that the diagnostic power of both methods is very high ($AUC_{LC-MS/MS} = 0,987$ vs. $AUC_{ECLIA} = 0,985$).

Analyzing the data of adrenal tissue exposed to cortisol excess, as well as HeLa and H295R cells exposed to GCs, we identified a total of 19 differentially expressed miRNAs in the three experiments, of which only one miRNA, hsa-miR-95-3p, was the one that was commonly overexpressed in two experiments (adrenal tissue and HeLa cells). However, 19.5% of the signaling pathways affected by miRNAs (15 pathways) were common and one of the most significantly affected pathways was the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

A reanalysis of the data from the experiments related to GC-producing and GC-target tissues found in the literature and the examination of gene expression changes due to GC effect showed that GC excess affects the gene expression of GC-producing tissues, although to a lesser extent than that of the target tissues (4-8% vs. 10-20%). A significant involvement of the Wnt/ β -catenin pathway could be demonstrated in both GC-producing and GC-exposed target tissues. During the target prediction analyses,

we identified four genes belonging to the Wnt pathway that are most likely regulated by miR-375 (SFRP4 and CTBP2) and miR-576 (APC and NFAT5).

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Barnett R. Cushing's syndrome. *The Lancet*. 2016. augusztus;388(10045):649.
2. Lanzino G, Maartens NF, Laws ER. Cushing's Case XLV: Minnie G. *J Neurosurg*. 2002. július;97(1):231–4.
3. Medvei VC. The history of Cushing's disease: a controversial tale. *J R Soc Med*. 1991. június;84(6):363–6.
4. Guaraldi F, Salvatori R. Cushing Syndrome: Maybe Not So Uncommon of an Endocrine Disease. *J Am Board Fam Med*. 2012. március 1.;25(2):199–208.
5. Catargi B, Rigalleau V, Poussin A, Ronci-Chaix N, Bex V, Vergnot V, és mtsai. Occult Cushing's Syndrome in Type-2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003. december 1.;88(12):5808–13.
6. Tiryakioglu O, Ugurlu S, Yalin S, Yirmibescik S, Caglar E, Yetkin DO, és mtsai. Screening for Cushing's Syndrome in Obese Patients. *Clinics*. 2010. január;65(1):9–13.
7. Chiodini I, Mascia ML, Muscarella S, Battista C, Minisola S, Arosio M, és mtsai. Subclinical Hypercortisolism among Outpatients Referred for Osteoporosis. *Ann Intern Med*. 2007. október 16.;147(8):541.
8. Mebrahtu TF, Morgan AW, Keeley A, Baxter PD, Stewart PM, Pujades-Rodriguez M. Dose Dependency of Iatrogenic Glucocorticoid Excess and Adrenal Insufficiency and Mortality: A Cohort Study in England. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019. szeptember 1.;104(9):3757–67.
9. Overman RA, Toliver JC, Yeh JY, Gourlay ML, Deal CL. United States Adults Meeting 2010 American College of Rheumatology Criteria for Treatment and Prevention of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: US Adults Meeting ACR Guidelines for GIO. *Arthritis Care Res*. 2014. november;66(11):1644–52.

10. Schernthaner-Reiter MH, Siess C, Micko A, Zauner C, Wolfsberger S, Scheuba C, és mtsai. Acute and Life-threatening Complications in Cushing Syndrome: Prevalence, Predictors, and Mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021. április 23.;106(5):e2035–46.
11. Amodru V, Ferriere A, Tabarin A, Castinetti F, Tsagarakis S, Toth M, és mtsai. Cushing's syndrome in the elderly: data from the European Registry on Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2023. április 5.;188(4):395–406.
12. Quax RA, Manenschijn L, Koper JW, Hazes JM, Lamberts SWJ, Van Rossum EFC, és mtsai. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2013. november;9(11):670–86.
13. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385–96.
14. Matsumoto Y, Otsuka F, Takano M, Mukai T, Yamanaka R, Takeda M, és mtsai. Estrogen and glucocorticoid regulate osteoblast differentiation through the interaction of bone morphogenetic protein-2 and tumor necrosis factor-alpha in C2C12 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;325(1–2):118–27.
15. Grugan KD, Ma C, Singhal S, Krett NL, Rosen ST. Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008. június;110(3–5):244–54.
16. Ramshanker N, Aagaard M, Hjortebjerg R, Voss TS, Møller N, Jørgensen JOL, és mtsai. Effects of Prednisolone on Serum and Tissue Fluid IGF-I Receptor Activation and Post-Receptor Signaling in Humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017. november 1.;102(11):4031–40.
17. Ronchetti S, Migliorati G, Riccardi C. GILZ as a Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Front Endocrinol.* 2015;6:170.

18. Mak W, Shao X, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H. Biphasic glucocorticoid-dependent regulation of Wnt expression and its inhibitors in mature osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int.* 2009;85(6):538–45.
19. Ling J, Kumar R. Crosstalk between NFκB and glucocorticoid signaling: a potential target of breast cancer therapy. *Cancer Lett.* 2012. szeptember 28.;322(2):119–26.
20. Smith TG, Clark SK, Katz DE, Reznick RH, Phillips RK. Adrenal masses are associated with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum.* 2000;43(12):1739–42.
21. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. március 1.;5(3):a015081–a015081.
22. Iacomino G. miRNAs: The Road from Bench to Bedside. *Genes.* 2023. január 25.;14(2):314.
23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, és mtsai. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 2002. november 26.;99(24):15524–9.
24. Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer.* 2007;6(1):60.
25. Bimpaki EI, Iliopoulos D, Moraitis A, Stratakis CA. MicroRNA signature in massive macronodular adrenocortical disease and implications for adrenocortical tumourigenesis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010. június;72(6):744–51.
26. Wang S, Li Y, Liang Y, Dong J, He Y, Zhang L, és mtsai. Expression of miR-18a and miR-34c in circulating monocytes associated with vulnerability to type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *J Cell Mol Med.* 2017. december;21(12):3372–80.

27. Ojha R, Nandani R, Pandey RK, Mishra A, Prajapati VK. Emerging role of circulating microRNA in the diagnosis of human infectious diseases. *J Cell Physiol.* 2019. február;234(2):1030–43.
28. Salvi V, Gianello V, Tiberio L, Sozzani S, Bosisio D. Cytokine Targeting by miRNAs in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2019. január 29.;10:15.
29. Robertson S, Diver LA, Alvarez-Madrazo S, Livie C, Ejaz A, Fraser R, és mtsai. Regulation of Corticosteroidogenic Genes by MicroRNAs. *Int J Endocrinol.* 2017. augusztus 9.;2017:1–11.
30. Robertson S, MacKenzie SM, Alvarez-Madrazo S, Diver LA, Lin J, Stewart PM, és mtsai. MicroRNA-24 Is a Novel Regulator of Aldosterone and Cortisol Production in the Human Adrenal Cortex. *Hypertension.* 2013. szeptember;62(3):572–8.
31. Nusrin S, Tong SKH, Chaturvedi G, Wu RSS, Giesy JP, Kong RYC. Regulation of CYP11B1 and CYP11B2 steroidogenic genes by hypoxia-inducible miR-10b in H295R cells. *Mar Pollut Bull.* 2014. augusztus;85(2):344–51.
32. Han Y, Staab-Weijnitz CA, Xiong G, Maser E. Identification of microRNAs as a potential novel regulatory mechanism in HSD11B1 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013. január;133:129–39.
33. Xu J, Wang R, Liu Y, Liu D, Jiang H, Pan F. FKBP5 and specific microRNAs via glucocorticoid receptor in the basolateral amygdala involved in the susceptibility to depressive disorder in early adolescent stressed rats. *J Psychiatr Res.* 2017. december;95:102–13.
34. Laxman N, Rubin CJ, Mallmin H, Nilsson O, Tellgren-Roth C, Kindmark A. Second generation sequencing of microRNA in Human Bone Cells treated with Parathyroid Hormone or Dexamethasone. *Bone.* 2016. március;84:181–8.
35. Shi C, Huang P, Kang H, Hu B, Qi J, Jiang M, és mtsai. Glucocorticoid inhibits cell proliferation in differentiating osteoblasts by microRNA-199a targeting of WNT signaling. *J Mol Endocrinol.* 2015. június;54(3):325–37.

36. Wang F, Chung P, Lin C, Chen M, Ke H, Chang Y, és mtsai. MicroRNA-29a Protects Against Glucocorticoid-Induced Bone Loss and Fragility in Rats by Orchestrating Bone Acquisition and Resorption. *Arthritis Rheum.* 2013. június;65(6):1530–40.
37. Belaya Z, Khandaeva P, Nonn L, Nikitin A, Solodovnikov A, Sitkin I, és mtsai. Circulating Plasma microRNA to Differentiate Cushing’s Disease From Ectopic ACTH Syndrome. *Front Endocrinol.* 2020. június 5.;11:331.
38. Chantzichristos D, Svensson PA, Garner T, Glad CA, Walker BR, Bergthorsdottir R, és mtsai. Identification of human glucocorticoid response markers using integrated multi-omic analysis from a randomized crossover trial. *eLife.* 2021. április 6.;10:e62236.
39. Tóth M, Grossman A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: lessons from Cushing’s syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013. július;79(1):1–11.
40. Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine.* 2012. április;41(2):183–90.
41. Komori T. Glucocorticoid Signaling and Bone Biology. *Horm Metab Res.* 2016. november 21.;48(11):755–63.
42. Espina B, Liang M, Russell RGG, Hulley PA. Regulation of bim in glucocorticoid-mediated osteoblast apoptosis. *J Cell Physiol.* 2008. május;215(2):488–96.
43. Chang JK, Li CJ, Liao HJ, Wang CK, Wang GJ, Ho ML. Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology.* 2009. április 28.;258(2–3):148–56.
44. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein RS, Manolagas SC. Glucocorticoids and Tumor Necrosis Factor α Increase Oxidative Stress and Suppress Wnt Protein Signaling in Osteoblasts. *J Biol Chem.* 2011. december;286(52):44326–35.

45. Sivagurunathan S, Muir MM, Brennan TC, Seale JP, Mason RS. Influence of Glucocorticoids on Human Osteoclast Generation and Activity. *J Bone Miner Res.* 2004. december 20.;20(3):390–8.
46. Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, és mtsai. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest.* 2002. április 15.;109(8):1041–8.
47. Wang FS, Lin CL, Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Huang YT, és mtsai. Secreted Frizzled-Related Protein 1 Modulates Glucocorticoid Attenuation of Osteogenic Activities and Bone Mass. *Endocrinology.* 2005. május;146(5):2415–23.
48. Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. április;329(1):177–81.
49. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman SR, Suc-Royer I, Vayssière B, és mtsai. Deletion of a Single Allele of the Dkk1 Gene Leads to an Increase in Bone Formation and Bone Mass. *J Bone Miner Res.* 2006. május 8.;21(6):934–45.
50. Sato AY, Cregor M, Delgado-Calle J, Condon KW, Allen MR, Peacock M, és mtsai. Protection From Glucocorticoid-Induced Osteoporosis by Anti-Catabolic Signaling in the Absence of Sost/Sclerostin: ANTI-CATABOLIC SIGNALING PROTECTS SOST^{-/-} MICE FROM GC-INDUCED OSTEOPOROSIS. *J Bone Miner Res.* 2016. október;31(10):1791–802.
51. Brabnikova Maresova K, Pavelka K, Stepan JJ. Acute Effects of Glucocorticoids on Serum Markers of Osteoclasts, Osteoblasts, and Osteocytes. *Calcif Tissue Int.* 2013. április;92(4):354–61.
52. van Lierop AH, van der Eerden AW, Hamdy NAT, Hermus AR, den Heijer M, Papapoulos SE. Circulating Sclerostin Levels Are Decreased in Patients with Endogenous Hypercortisolism and Increase after Treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012. október;97(10):E1953–7.

53. Jackson A, Vayssière B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S, és mtsai. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone*. 2005. április;36(4):585–98.
54. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin Stimulates Osteocyte Support of Osteoclast Activity by a RANKL-Dependent Pathway. Carvalho DP de, szerkesztő. *PLoS ONE*. 2011. október 4.;6(10):e25900.
55. Fujita K ichi, Janz S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer*. 2007;6(1):71.
56. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, és mtsai. Peroxisome-proliferator-activated receptor γ suppresses Wnt/ β -catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J*. 2003. december 15.;376(3):607–13.
57. Liu J, Farmer SR. Regulating the Balance between Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and β -Catenin Signaling during Adipogenesis. *J Biol Chem*. 2004. október;279(43):45020–7.
58. Abdallah BM. Marrow adipocytes inhibit the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts via suppressing BMP-signaling. *J Biomed Sci*. 2017. december;24(1):11.
59. Muruganandan S, Sinal CJ. The impact of bone marrow adipocytes on osteoblast and osteoclast differentiation: Impact of Bone Marrow Adipocytes on Osteoblast and Osteoclast Differentiation. *IUBMB Life*. 2014. március;66(3):147–55.
60. Longo KA, Kennell JA, Ochocinska MJ, Ross SE, Wright WS, MacDougald OA. Wnt Signaling Protects 3T3-L1 Preadipocytes from Apoptosis through Induction of Insulin-like Growth Factors. *J Biol Chem*. 2002. október;277(41):38239–44.
61. Geer EB, Shen W, Gallagher D, Punyanitya M, Looker HC, Post KD, és mtsai. MRI Assessment of Lean and Adipose Tissue Distribution in Female Patients with Cushing's Disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010. június 9.;no-no.

62. Pickering RT, Lee MJ, Karastergiou K, Gower A, Fried SK. Depot Dependent Effects of Dexamethasone on Gene Expression in Human Omental and Abdominal Subcutaneous Adipose Tissues from Obese Women. Alemany M, szerkesztő. PLOS ONE. 2016. december 22.;11(12):e0167337.
63. Xiao X, Li H, Yang J, Qi X, Zu X, Yang J, és mtsai. Wnt/ β -catenin signaling pathway and lipolysis enzymes participate in methylprednisolone induced fat differential distribution between subcutaneous and visceral adipose tissue. Steroids. 2014. június;84:30–5.
64. Pedersen SB, Jønler M, Richelsen B. Characterization of regional and gender differences in glucocorticoid receptors and lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. J Clin Endocrinol Metab. 1994. június;78(6):1354–9.
65. García-Eguren G, Giró O, Romero M del M, Grasa M, Hanzu FA. Chronic hypercortisolism causes more persistent visceral adiposity than HFD-induced obesity. J Endocrinol. 2019. augusztus;242(2):65–77.
66. Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. Metabolism. 2015. január;64(1):131–45.
67. Chen ZL, Shao WJ, Xu F, Liu L, Lin BS, Wei XH, és mtsai. Acute Wnt pathway activation positively regulates leptin gene expression in mature adipocytes. Cell Signal. 2015. március;27(3):587–97.
68. Benzler J, Ganjam GK, Krüger M, Pinkenburg O, Kutschke M, Stöhr S, és mtsai. Hypothalamic glycogen synthase kinase 3 β has a central role in the regulation of food intake and glucose metabolism. Biochem J. 2012. október 1.;447(1):175–84.
69. Benzler J, Andrews ZB, Pracht C, Stöhr S, Shepherd PR, Grattan DR, és mtsai. Hypothalamic WNT Signalling Is Impaired During Obesity and Reinstated by Leptin Treatment in Male Mice. Endocrinology. 2013. december 1.;154(12):4737–45.

70. Wang FS, Lian WS, Weng WT, Sun YC, Ke HJ, Chen YS, és mtsai. Neuropeptide Y mediates glucocorticoid-induced osteoporosis and marrow adiposity in mice. *Osteoporos Int.* 2016. szeptember;27(9):2777–89.
71. Andela CD, van Haalen FM, Ragnarsson O, Papakokkinou E, Johannsson G, Santos A, és mtsai. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Cushing's syndrome causes irreversible effects on the human brain: a systematic review of structural and functional magnetic resonance imaging studies. *Eur J Endocrinol.* 2015. július;173(1):R1–14.
72. Matrisciano F, Busceti CL, Bucci D, Orlando R, Caruso A, Molinaro G, és mtsai. Induction of the Wnt Antagonist Dickkopf-1 Is Involved in Stress-Induced Hippocampal Damage. Ferreira S, szerkesztő. *PLoS ONE.* 2011. január 27.;6(1):e16447.
73. Kobayashi N, Machida T, Takahashi T, Takatsu H, Shinkai T, Abe K, és mtsai. Elevation by Oxidative Stress and Aging of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activity in Rats and Its Prevention by Vitamin E. *J Clin Biochem Nutr.* 2009;45(2):207–13.
74. Moors M, Bose R, Johansson-Haque K, Edoff K, Okret S, Ceccatelli S. Dickkopf 1 Mediates Glucocorticoid-Induced Changes in Human Neural Progenitor Cell Proliferation and Differentiation. *Toxicol Sci.* 2012. február;125(2):488–95.
75. Bose R, Moors M, Tofighi R, Cascante A, Hermanson O, Ceccatelli S. Glucocorticoids induce long-lasting effects in neural stem cells resulting in senescence-related alterations. *Cell Death Dis.* 2010. november;1(11):e92–e92.
76. Crudo A, Suderman M, Moisiadis VG, Petropoulos S, Kostaki A, Hallett M, és mtsai. Glucocorticoid Programming of the Fetal Male Hippocampal Epigenome. *Endocrinology.* 2013. március 1.;154(3):1168–80.
77. Slominski A. A nervous breakdown in the skin: stress and the epidermal barrier. *J Clin Invest.* 2007. november 1.;117(11):3166–9.

78. Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, és mtsai. Cortisol Synthesis in Epidermis Is Induced by IL-1 and Tissue Injury. *J Biol Chem*. 2011. március;286(12):10265–75.
79. Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, Zmijewski M, és mtsai. Steroidogenesis in the skin: Implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013. szeptember;137:107–23.
80. Schoepe S, Schacke H, May E, Asadullah K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp Dermatol*. 2006. június;15(6):406–20.
81. Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, és mtsai. Novel Genomic Effects of Glucocorticoids in Epidermal Keratinocytes. *J Biol Chem*. 2007. február;282(6):4021–34.
82. Valassi E, Santos A, Yaneva M, Tóth M, Strasburger CJ, Chanson P, és mtsai. The European Registry on Cushing's syndrome: 2-year experience. Baseline demographic and clinical characteristics. *Eur J Endocrinol*. 2011. szeptember;165(3):383–92.
83. Broder MS, Chang E, Cherepanov D, Neary MP, Ludlam WH. Identification of Potential Markers for Cushing Disease. *Endocr Pract*. 2016. május;22(5):567–74.
84. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development. *Dev Cell*. 2002. május;2(5):643–53.
85. Wang KY, Yamada S, Izumi H, Tsukamoto M, Nakashima T, Tasaki T, és mtsai. Critical in vivo roles of WNT10A in wound healing by regulating collagen expression/synthesis in WNT10A-deficient mice. Dettman RW, szerkesztő. *PLOS ONE*. 2018. március 29.;13(3):e0195156.
86. Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, és mtsai. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*. 2007. május;447(7142):316–20.

87. Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, és mtsai. Molecular Pathogenesis of Chronic Wounds. *Am J Pathol.* 2005. július;167(1):59–69.
88. Jozic I, Vukelic S, Stojadinovic O, Liang L, Ramirez HA, Pastar I, és mtsai. Stress Signals, Mediated by Membranous Glucocorticoid Receptor, Activate PLC/PKC/GSK-3 β / β -catenin Pathway to Inhibit Wound Closure. *J Invest Dermatol.* 2017. május;137(5):1144–54.
89. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, és mtsai. The Diagnosis of Cushing’s Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008. május 1.;93(5):1526–40.
90. Rubinstein G, Osswald A, Hoster E, Losa M, Elenkova A, Zacharieva S, és mtsai. Time to Diagnosis in Cushing’s Syndrome: A Meta-Analysis Based on 5367 Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020. március 1.;105(3):e12–22.
91. Valassi E, Franz H, Brue T, Feelders RA, Netea-Maier R, Tsagarakis S, és mtsai. Diagnostic tests for Cushing’s syndrome differ from published guidelines: data from ERCUSYN. *Eur J Endocrinol.* 2017. május;176(5):613–24.
92. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, és mtsai. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary.* 2011. június;14(2):112–24.
93. Lekva T, Ueland T, Bøyum H, Evang JA, Godang K, Bollerslev J. TXNIP is highly regulated in bone biopsies from patients with endogenous Cushing’s syndrome and related to bone turnover. *Eur J Endocrinol.* 2012. június;166(6):1039–48.
94. Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, és mtsai. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer.* 2009. szeptember;16(3):895–906.
95. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE64826>.

96. Grundberg E, Adoue V, Kwan T, Ge B, Duan QL, Lam KCL, és mtsai. Global Analysis of the Impact of Environmental Perturbation on cis-Regulation of Gene Expression. Gibson G, szerkesztő. PLoS Genet. 2011. január 20.;7(1):e1001279.
97. Grundberg E, Brändström H, Lam KCL, Gurd S, Ge B, Harmsen E, és mtsai. Systematic assessment of the human osteoblast transcriptome in resting and induced primary cells. *Physiol Genomics*. 2008. május;33(3):301–11.
98. Hardy R, Juarez M, Naylor A, Tu J, Rabbitt EH, Filer A, és mtsai. Synovial DKK1 expression is regulated by local glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R226.
99. Murani E, Trakooljul N, Hadlich F, Ponsuksili S, Wimmers K. Brain Transcriptome Responses to Dexamethasone Depending on Dose and Sex Reveal Factors Contributing to Sex-Specific Vulnerability to Stress-Induced Disorders. *Neuroendocrinology*. 2022;112(3):235–51.
100. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, és mtsai. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res*. 2012. július 1.;40(W1):W498–504.
101. FDA Bioanalytical Method Validation [Internet]. Elérhető: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
102. Aardal E, Holm AC. Cortisol in Saliva - Reference Ranges and Relation to Cortisol in Serum. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 1995 [idézi 2022. szeptember 1.];33(12). Elérhető: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm.1995.33.12.927/html>
103. Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin Biochem*. 2009. augusztus;42(12):1205–17.
104. Gagnon N, Fréchette I, Mallet PL, Dubé J, Houde G, Fink GD. Establishment of reference intervals for the salivary cortisol circadian cycle, by

- electrochemiluminescence (ECLIA), in healthy adults. *Clin Biochem.* 2018. április;54:56–60.
105. Antonelli G, Ceccato F, Artusi C, Marinova M, Plebani M. Salivary cortisol and cortisone by LC–MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing’s syndrome. *Clin Chim Acta.* 2015. december;451:247–51.
 106. Ponzetto F, Settanni F, Parasiliti-Caprino M, Rumbolo F, Nonnato A, Ricciardo M, és mtsai. Reference ranges of late-night salivary cortisol and cortisone measured by LC–MS/MS and accuracy for the diagnosis of Cushing’s syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2020. december;43(12):1797–806.
 107. Bäcklund N, Brattsand G, Israelsson M, Ragnarsson O, Burman P, Edén Engström B, és mtsai. Reference intervals of salivary cortisol and cortisone and their diagnostic accuracy in Cushing’s syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2020. június;182(6):569–82.
 108. Raff H, Phillips JM. Bedtime Salivary Cortisol and Cortisone by LC-MS/MS in Healthy Adult Subjects: Evaluation of Sampling Time. *J Endocr Soc.* 2019. augusztus 1.;3(8):1631–40.
 109. Sun T, Li CT, Xiong L, Ning Z, Leung F, Peng S, és mtsai. miR-375-3p negatively regulates osteogenesis by targeting and decreasing the expression levels of LRP5 and β -catenin. *PloS One.* 2017;12(2):e0171281.
 110. Zhao MC, Zhang MM, Li T, Tao ZH, Du YQ, Wang LP, és mtsai. MiR-566 protects the malignant progression of breast cancer by negatively regulating WNT6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020. 0;24(11):6185–94.
 111. Xi M, Cheng L, Hua W, Zhou YL, Gao QL, Yang JX, és mtsai. MicroRNA-95-3p promoted the development of prostatic cancer via regulating DKK3 and activating Wnt/ β -catenin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019. 0;23(3):1002–11.
 112. Wang Y, Jiaqi C, Zhaoying C, Huimin C. MicroRNA-506-3p regulates neural stem cell proliferation and differentiation through targeting TCF3. *Gene.* 2016. november;593(1):193–200.

113. Li X, Peng B, Zhu X, Wang P, Sun K, Lei X, és mtsai. MiR-210-3p inhibits osteogenic differentiation and promotes adipogenic differentiation correlated with Wnt signaling in ER α -deficient rBMSCs. *J Cell Physiol.* 2019. december;234(12):23475–84.
114. Hu B, Li Y, Wang M, Zhu Y, Zhou Y, Sui B, és mtsai. Functional reconstruction of critical-sized load-bearing bone defects using a Sclerostin-targeting miR-210-3p-based construct to enhance osteogenic activity. *Acta Biomater.* 2018. augusztus;76:275–82.
115. Chen C, Xiang H, Peng Y lin, Peng J, Jiang S wen. Mature miR-183, negatively regulated by transcription factor GATA3, promotes 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting LRP6. *Cell Signal.* 2014. június;26(6):1155–65.
116. Ueno K, Hirata H, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, és mtsai. microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2013. április;108(8):1659–67.
117. Zhu N, Huang K, Liu Y, Zhang H, Lin E, Zeng Y, és mtsai. miR-195-5p Regulates Hair Follicle Inductivity of Dermal Papilla Cells by Suppressing Wnt/ β -Catenin Activation. *BioMed Res Int.* 2018;2018:1–13.
118. Chang M, Lin H, Fu H, Wang B, Han G, Fan M. MicroRNA-195-5p Regulates Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Loading. *J Cell Physiol.* 2017. december;232(12):3762–74.
119. Sun L, Li Z, Xue H, Ma T, Ren C, Li M, és mtsai. MiR-26a promotes fracture healing of nonunion rats possibly by targeting SOSTDC1 and further activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2019. október;460(1–2):165–73.
120. Li S, Hu C, Li J, Liu L, Jing W, Tang W, és mtsai. Effect of miR-26a-5p on the Wnt/Ca(2+) Pathway and Osteogenic Differentiation of Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Calcif Tissue Int.* 2016. augusztus;99(2):174–86.

121. Su X, Liao L, Shuai Y, Jing H, Liu S, Zhou H, és mtsai. MiR-26a functions oppositely in osteogenic differentiation of BMSCs and ADSCs depending on distinct activation and roles of Wnt and BMP signaling pathway. *Cell Death Dis.* 2015. augusztus;6(8):e1851–e1851.
122. Wang J, Guan X, Guo F, Zhou J, Chang A, Sun B, és mtsai. miR-30e reciprocally regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts by directly targeting low-density lipoprotein receptor-related protein 6. *Cell Death Dis.* 2013. október;4(10):e845–e845.
123. Tomé M, López-Romero P, Albo C, Sepúlveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, és mtsai. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2011. június;18(6):985–95.
124. Sánchez-Jiménez C, Carrascoso I, Barrero J, Izquierdo JM. Identification of a set of miRNAs differentially expressed in transiently TIA-depleted HeLa cells by genome-wide profiling. *BMC Mol Biol.* 2013. december;14(1):4.
125. Geng Y, Deng L, Su D, Xiao J, Ge D, Bao Y, és mtsai. Identification of crucial microRNAs and genes in hypoxia-induced human lung adenocarcinoma cells. *OncoTargets Ther.* 2016;9:4605–16.
126. Adusumilli L, Facchinello N, Teh C, Busolin G, Le MT, Yang H, és mtsai. miR-7 Controls the Dopaminergic/Oligodendroglial Fate through Wnt/ β -catenin Signaling Regulation. *Cells.* 2020. március 13.;9(3):711.
127. Tao H, Wang L, Zhou J, Pang P, Cai S, Li J, és mtsai. The transcription factor ccaat/enhancer binding protein β (C/EBP β) and miR-27a regulate the expression of porcine Dickkopf2 (DKK2). *Sci Rep.* 2015. december;5(1):17972.
128. Wang Q, Cai J, Cai X hua, Chen L. miR-346 Regulates Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Targeting the Wnt/ β -Catenin Pathway. Shi XM, szerkesztő. *PLoS ONE.* 2013. szeptember 4.;8(9):e72266.

129. Singh A, Willems E, Singh A, Ong IM, Verma AK. Ultraviolet radiation-induced differential microRNA expression in the skin of hairless SKH1 mice, a widely used mouse model for dermatology research. *Oncotarget*. 2016. december 20.;7(51):84924–37.
130. Gu H, Wu L, Chen H, Huang Z, Xu J, Zhou K, és mtsai. Identification of differentially expressed microRNAs in the bone marrow of osteoporosis patients. *Am J Transl Res*. 2019;11(5):2940–54.
131. Liu J, Li H, Sun L, Shen S, Zhou Q, Yuan Y, és mtsai. Epigenetic Alternations of MicroRNAs and DNA Methylation Contribute to Liver Metastasis of Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci*. 2019. június;64(6):1523–34.
132. Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, és mtsai. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: Profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. *BMC Genomics*. 2010. december;11(1):320.
133. Dong L, Deng J, Sun ZM, Pan AP, Xiang XJ, Zhang L, és mtsai. Interference with the β -catenin gene in gastric cancer induces changes to the miRNA expression profile. *Tumor Biol*. 2015. szeptember;36(9):6973–83.
134. Pettiette MT, Zhang S, Moretti AJ, Kim SJ, Naqvi AR, Nares S. MicroRNA Expression Profiles in External Cervical Resorption. *J Endod*. 2019. szeptember;45(9):1106-1113.e2.
135. Wang G, Zhou J, Lu F, Qiu L, Xu L, Yang X, és mtsai. Downregulation of microRNA-183-5p inhibits the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by inactivating the reticulocalbin-2/Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep [Internet]*. 2019. március 19. [idézi 2022. augusztus 19.]; Elérhető: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10059>
136. Falzone L, Scola L, Zanghì A, Biondi A, Di Cataldo A, Libra M, és mtsai. Integrated analysis of colorectal cancer microRNA datasets: identification of

- microRNAs associated with tumor development. *Aging*. 2018. május 18.;10(5):1000–14.
137. Liao Y, Lönnnerdal B. Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation. *Cell Mol Life Sci*. 2010. szeptember;67(17):2969–78.
138. Cui Y, Luan J, Li H, Zhou X, Han J. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *Chang Z, szerkesztő. FEBS Lett*. 2016. január;590(1):185–92.
139. Belaya ZE, Grebennikova TA, Melnichenko GA, Nikitin AG, Solodovnikov AG, Brovkina OI, és mtsai. Effects of endogenous hypercortisolism on bone mRNA and microRNA expression in humans. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2018. január;29(1):211–21.
140. Smith SS, Dole NS, Franceschetti T, Hrdlicka HC, Delany AM. MicroRNA-433 Dampens Glucocorticoid Receptor Signaling, Impacting Circadian Rhythm and Osteoblastic Gene Expression. *J Biol Chem*. 2016. október;291(41):21717–28.
141. Son GH, Chung S, Choe HK, Kim HD, Baik SM, Lee H, és mtsai. Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20970–5.
142. Donn R, Berry A, Stevens A, Farrow S, Betts J, Stevens R, és mtsai. Use of gene expression profiling to identify a novel glucocorticoid sensitivity determining gene, BMPRII. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007. február;21(2):402–14.
143. Carter BS, Meng F, Thompson RC. Glucocorticoid treatment of astrocytes results in temporally dynamic transcriptome regulation and astrocyte-enriched mRNA changes in vitro. *Physiol Genomics*. 2012;44(24):1188–200.
144. Murani E, Trakooljul N, Hadlich F, Ponsuksili S, Wimmers K. Transcriptome Responses to Dexamethasone Depending on Dose and Glucocorticoid Receptor Sensitivity in the Liver. *Front Genet*. 2019;10:559.

145. Ceccato F, Boscaro M. Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis. High Blood Press Cardiovasc Prev. 2016. szeptember;23(3):209–15.
146. Sonino N, Fallo F, Fava GA. Psychosomatic aspects of Cushing's syndrome. Rev Endocr Metab Disord. 2010. június;11(2):95–104.

11. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Mészáros K, Karvaly G, Márta Z, Magda B, Tóke J, Szücs N, Tóth M, Rácz K, Patócs A. Diagnostic performance of a newly developed salivary cortisol and cortisone measurement using an LC-MS/MS method with simple and rapid sample preparation.

J Endocrinol Invest. 2018 Mar;41(3):315-323.

2. Mészáros K, Patócs A. Glucocorticoids Influencing Wnt/ β -Catenin Pathway; Multiple Sites, Heterogeneous Effects. Molecules. 2020 Mar 25;25(7):1489.

3. Butz H, Mészáros K, Likó I, Patócs A. Wnt-Signaling Regulated by Glucocorticoid-Induced miRNAs. Int J Mol Sci. 2021 Oct 29;22(21):11778. (megosztott első szerzős közlemény)

12. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Vásárhelyi B, **Mészáros K**, Karvaly G, Patócs A.[Focusingontissuebiomarkers. Estrogensaskeyplayers in theimmuneresponse and autoimmunity].Orv Hetil. 2015 Dec 20;156(51):2070-6.
2. Márta Z, Bobály B, Fekete J, Magda B, Imre T, **Mészáros KV**, Szabó PT.Pushingquantitationlimits in micro UHPLC-MS/MS analysis of steroidhormonesbysampledilutionusinghighvolumeinjection.J PharmBiomedAnal. 2016 Sep 10;129:135-141.
- 3.Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, Tóth EA, **Mészáros K**, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A.Celcycledependent RRM2 mayserveasproliferation marker and pharmaceuticaltarget in adrenocorticalcancer.Am J CancerRes. 2016 Sep 1;6(9):2041-2053.
4. Karvaly G, **Mészáros K**, Kovács K, Patócs A, Sipák Z, Vásárhelyi B.Lookingbeyondlinearregression and Bland-Altman plots: a comparison of theclinical performance of 25-hydroxyvitamin D tests.ClinChemLabMed. 2017 Mar 1;55(3):385-393.
- 5.Kovács K, Vásárhelyi B, **Mészáros K**, Patócs A, Karvaly G.[The biological and clinicalrelevance of estrogenmetabolome].Orv Hetil. 2017 Jun;158(24):929-937.
6. Magda B, Dobi Z, **Mészáros K**, Szabó É, Márta Z, Imre T, Szabó PT.Chargedderivatization and on-linesolidphaseextractiontomeasureextremelylowcortisol and cortisonelevels in human salivawithliquidchromatography-tandem massspectrometry.J PharmBiomedAnal. 2017 Jun 5;140:223-231.

7. Karvaly G, Molnár-Világos G, Kovács K, **Mészáros K**, Patócs A, Vásárhelyi B. Evaluation of the Analytical and Clinical Concordance of 25-Hydroxyvitamin D Levels in Dried Blood Spots, Dried Serum Spots, and Serum as Potential Biorepository Specimens. *Biopreserv Biobank*. 2017 Aug;15(4):285-292.

8. Szappanos Á, **Mészáros K**, Nagy Z, Kövesdi A, Likó I, Kiss E, Tóth M, Patócs A. [Extraadrenal glucocorticoids synthesis]. *Orv Hetil*. 2018 Feb;159(7):260-268.

9. Doleschall M, Török D, **Mészáros K**, Luczay A, Halász Z, Németh K, Szücs N, Kiss R, Tőke J, Sólyom J, Fekete G, Patócs A, Igaz P, Tóth M. [Steroid 21-hydroxylase deficiency, the most frequent cause of congenital adrenal hyperplasia]. *Orv Hetil*. 2018 Feb;159(7):269-277.

10. Márta Z, Bobály B, Fekete J, Magda B, Imre T, **Mészáros KV**, Bálint M, Szabó PT. Simultaneous determination of thirteen different steroid hormones using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Feb 20;150:258-267.

11. Karvaly G, Kovács K, **Mészáros K**, Kocsis I, Patócs A, Vásárhelyi B. The comprehensive characterization of adrenocortical steroidogenesis using two-dimensional ultra-performance liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 May 10;153:274-283.

12. Hujber Z, Horváth G, Petővári G, Krencz I, Dankó T, **Mészáros K**, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyén A. GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Nov 7;37(1):271.

13. Petővári G, Hujber Z, Krencz I, Dankó T, Nagy N, Tóth F, Raffay R, **Mészáros K**, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A. Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int*. 2018 Dec 19;18:211.

14. Sarkadi B, **Mészáros K**, Krencz I, Canu L, Krokker L, Zakarias S, Barna G, Sebestyén A, Papay J, Hujber Z, Butz H, Darvasi O, Igaz P, Doczi J, Luconi M, Chinopoulos C, Patocs A. Glutaminases as a Novel Target for SDHB-Associated Pheochromocytomas/Paragangliomas. *Cancers* (Basel). 2020 Mar 5;12(3):599.

15. Csibi N, Brubel R, Dobó N, **Mészáros KV**, Molvarec A, Lukovich P, Rigó J, Bokor AZ. Gamma-Synuclein Levels Are Elevated in Peritoneal Fluid of Patients with Endometriosis. *MedSciMonit*. 2020 May 12;26:e922137.

16. Szabó B, Németh K, **Mészáros K**, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Rajnai H, Krencz I, Karászi K, Krokker L, Patócs A, Butz H. Demethylation Status of Somatic DNA Extracted From Pituitary Neuroendocrine Tumors Indicates Proliferative Behavior. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Jun 1;105(6):dgaa156.

17. Saskői É, Hujber Z, Nyíró G, Likó I, Mátyási B, Petóvári G, **Mészáros K**, Kovács AL, Patthy L, Supekar S, Fan H, Sváb G, Tretter L, Sarkar A, Nazir A, Sebestyén A, Patócs A, Mehta A, Takács-Vellai K. The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new *Caenorhabditis elegans* model. *Dis Model Mech*. 2020 Oct 15;13(10):dmm044925.

18. Krokker L, Szabó B, Németh K, Tóháti R, Sarkadi B, **Mészáros K**, Patócs A, Butz H. Three Dimensional Cell Culturing for Modeling Adrenal and Pituitary Tumors. *Pathol Oncol Res*. 2021 Apr 21;27:640676.

19. Németh K, **Mészáros K**, Szabó B, Butz H, Arányi T, Szabó PT. A relative quantitation method for measuring DNA methylation and hydroxymethylation using guanines as an internal standard. *Anal Methods*. 2021 Oct 14;13(39):4614-4622.

20. Szabó B, Németh K, **Mészáros K**, Krokker L, Likó I, Saskői É, Németh K, Szabó PT, Szücs N, Czirják S, Szalóki G, Patócs A, Butz

H. Aspirin Mediates Its Antitumoral Effect Through Inhibiting PTTG1 in Pituitary Adenoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 Nov 23;107(11):3066-3079.

21. Krencz I, Vetlényi E, Dankó T, Petóvári G, Moldvai D, Sztankovics D, Raffay R, **Mészáros K**, Sebestyén E, Végső G, Pápay J, Sebestyén A. Metabolic Adaptation as Potential Target in Papillary Renal Cell Carcinomas Based on Their In Situ Metabolic Characteristics. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 13;23(18):10587.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Amikor az ember egy munka végéhez ér, hálával és jóérzéssel gondol vissza már mögötte lévő útra és számba veszi mindazokat a személyeket és körülményeket, akik és amelyek segítségére voltak a munkája során.

Így elsősorban hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Patócs Attilának, akinek a tapasztalata és iránymutatása nélkül nem érhettem volna célhoz. És- bár hivatalosan ő nem támvezetőm-, nagyon köszönöm Dr. Butz Henriett segítségét, aki bármikor készségesen és türelemmel válaszolt a kérdéseimre és számos hasznos tanácsot adott.

Hálás vagyok az egykori II. számú Belgyógyászati Klinikán belül működő Izotóp Laboratórium dolgozóira, az épületben működő kutatócsoportokért, a közeli belgyógyászati osztályokon dolgozó kollégák inspiráló jelenlétéért. Mindez egy olyan különleges atmoszférát jelentett, amely nem mindenkor adatik meg az életünk során, de amelynek megélése egész életre szóló élményt jelent.

Vannak olyan emberek, akikkel (bár nem egy munkahelyen dolgozunk), a munkánk során kapcsolatba kerültünk és a kapcsolatok nem maradtak meg a munkahelyi kapcsolatok szintjén. Nagyon hálás vagyok, hogy megismerhettem Dr. Sebestyén Annát, ő számomra akutatónő, aki egy nagycsalád igazgatása mellett a munkájában is sikeressé tudott válni. Örülök, hogy ismerhetem Dr. Juhász Emesét is, akinek az őszinte véleményem mindig iránymutató volt számomra.

És ott van a családom... bár ők maradtak a felsorolásban utoljára, nélkülük nem hogy dolgozni, de élni sem szeretnék. Számomra ők tökéletesek, nem azért, mert egyenként tökéletesek lennének (lennék), hanem azért, mert összetartozunk.

Egy biztos: egyedül nem sikerült volna. És hálás vagyok minden mozzanatért, körülményért, lehetőségért és leginkább az emberi kapcsolatokért, amelyek segítettek abban, hogy eddig eljussak.

„Ne várj nagy dolgot életedbe’./ Kis hópehelyek az örömök./ Szitáló, halk szíromcsodák./ Rajtuk át Isten szól: jövök.” (Reményik Sándor)