

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

Jadranka A. Antić

**ZNAČAJ POLIMORFIZAMA U GENIMA
ZA GLUKOKORTIKOIDNI I
ADRENOKORTIKOTROPNI RECEPTOR U
NASTANKU ADRENALNIH
INCIDENTALOMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

Jadranka A. Antic

**IMPORTANCE OF POLYMORPHISMS IN
GLUCOCORTICOID RECEPTOR AND
ADRENOCORTICOTROPIC RECEPTOR
GENES IN DEVELOPMENT OF ADRENAL
INCIDENTALOMAS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

1. Prof. dr Svetozar Damjanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Gordana Matić, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

1. Prof. dr Svetozar Damjanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Gordana Matić, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Svetislav Tatić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2015. godine

Zahvaljujem se :

Mentoru Prof. dr Svetozaru Damjanoviću na nesebičnoj i neizmernoj pomoći i podršci, kako pri izboru teme doktorske disertacije, tako i u svim fazama njene izrade, kao i na apsolutnom razumevanju.

Mentoru Prof. dr Gordani Matić na vrednim sugestijama, smernicama i pomoći tokom izrade disertacije, kao i na svesrdačnoj podršci u celokupnom radu.

Prof. dr Svetislavu Tatiću na dragocenim savetima i uspešnoj višegodišnjoj saradnji vezanoj za patohistologiju adrenalnih incidentaloma i izradu ove doktorske teze, kao i na stručnom i ličnom uvažavanju i podršci.

Prof. dr Veri Todorović na velikom doprinosu u dobijanju imunohistohemijskih podataka, neophodnih za celovito sagledavanje rezultata ovog istraživanja.

Svim zaposlenima na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS, kao i koleginicama iz Laboratorije za biohemiju IBISS na pruženoj pomoći i saradnji.

Mojim dragim koleginicama iz Laboratorije za genetičko ispitivanje Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS na svesrdačnoj, nesebičnoj pomoći i saradnji tokom celokupnog procesa izrade doktorske disertacije, kao i na podsticaju da ovu tezu privedem kraju.

Sa neizmernom ljubavlju i poštovanjem disertaciju posvećujem mojim roditeljima, koji nažalost nisu doživeli njen završetak, ali su mi životne pouke o trajnim ljudskim vrednostima, koje su mi ostavili u amanet, bile smernice ka ostvarenju davno postavljenog cilja.

Značaj polimorfizama u genima za glukokortikoidni i adrenokortikotropni receptor u nastanku adrenalnih incidentaloma

Rezime

UVOD: Glukokortikoidni hormoni (GC) ostvaruju svoje efekte vezivanjem za glukokortikoidni receptor (GR). Adrenokortikotropni hormon (ACTH) reguliše sintezu GC vezivanjem za ACTH receptor (ACTHR). Prisustvo polimorfizama u genu za GR (*BclI*, *N363S*, *ER22/23EK* and *A3669G*) i promotoru ACTHR može uticati na efekte glukokortikoida i predispoziciju za nastanak unilateralnih adrenalnih incidentaloma.

CILJ RADA: Utvrđivanje mogućeg uticaja funkcionalnih polimorfizama u genima za GR i ACTHR na predispoziciju za nastanak adrenalnih incidentaloma i osetljivost na GC i ispitivanje ekspresije GR u tumorskom, peritumorskom i zdravom adrenokortikalnom tkivu.

METODE: U ispitivanje je bilo uključeno 112 pacijenata i 100 zdravih dobrovoljaca, koji su podvrgnuti metaboličkom, genetičkom, biohemijskom i antropometrijskom testiranju. DNK je dobijena iz leukocita periferne krvi. Prisustvo polimorfizama je detektovano metodama PCR, RFLP i sekvenciranja DNK. Uzorci tkiva su analizirani imunohistohemijskom metodom.

REZULTATI: Prisustvo dužeg C alela *BclI* ($p<0.001$) polimorfizma i kraćeg G alela *A3669G* ($p<0.001$) polimorfizma GR gena su bili nezavisni prediktori adrenalnih incidentaloma. Pacijenti sa prisutnim C alelom *BclI* su imali veće tumore ($p=0.002$), a oni sa G alelom *A3669G* više vrednosti postdeksametazonskog kortizola ($p=0.025$). Istovremeno prisustvo oba alela je koreliralo sa manjim obimom struka ($p=0.002$), a višim baznim i postdeksametazonskog kortizolom ($p=0.024$). Smanjena ekspresija GR α i GR β izoformi zapažena je u tumorskom, a GR α u peritumorskom tkivu. Lokalizacija GR β je bila dominantno nukleusna.

ZAKLJUČAK: Prisustvo C alela *BclI* i G alela *A3669G* polimorfizmama gena za GR se nalaze u vezi sa nastankom unilateralnih adrenalnih incidentalomima, a njihovo zajedničko prisustvo dovodi do smanjene osetljivosti na GC. Stečena intraadenomatozna glukokortikoidna rezistencija može da dovede do disregulacije produkcije kortizola i rasta tumora u isto vreme, dok prirodna osetljivost na glukokortikoide najverovatnije modifikuje ove efekte.

Ključne reči: glukokortikoidni hormoni, glukokortikoidni receptor, adrenalni incidentaloni, polimorfizmi, glukokortikoidna rezistencija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika tumora

UDK broj: [575.22:577.175.5]:[616-006:612.45](043.3)

Importance of polymorphisms in glucocorticoid and adrenocorticotrophic receptor genes in development of adrenal incidentalomas

Abstract

INTRODUCTION: Glucocorticoid hormones (GCs) accomplish their effects through binding to glucocorticoid receptor (GR). Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) regulates synthesis of GCs through binding to ACTH receptor (ACTHR). Presence of common GR gene (*BclII*, *N363S*, *ER22/23EK* and *A3669G*) and ACTHR promoter polymorphisms can modulate GCs sensitivity.

OBJECTIVE: The aim of present study was to determine whether functional polymorphisms in GR and ACTHR genes influence susceptibility for unilateral adrenal incidentalomas and GC sensitivity, and to investigate GR expression in tumorous, peritumorous and normal adrenocortical tissue samples.

METHODS: The study included 112 patients with adrenal incidentalomas and 100 population-matched controls. All subjects underwent metabolic, genetic, biochemical and anthropometric testing. DNA was obtained from peripheral blood leucocytes. The polymorphisms were detected using PCR, RFLP and DNA sequencing. Tissue samples were studied by immunohistochemistry.

RESULTS: GR gene variant, C allele of *BclII* ($p<0.001$) and G allele of *A3669G* ($p<0.001$) polymorphisms were independent predictors of adrenal incidentalomas. Patients with present C allele had larger tumors ($p=0.002$), but those with G allele had higher postdexamethasone serum cortisol ($p=0.025$). Both allele carriers had lesser waist circumference ($p=0.002$), higher basal ($p=0.024$) and postdexamethasone cortisol concentrations. In tumorous tissues GR α and GR β isoforms had lower expression, but only GR α in peritumorous tissue. Localization of GR β was dominantly nuclear.

CONCLUSION: GR gene variants, larger C allele of *BclII* and minor *3669G* allele are associated with adrenal incidentalomas. Their concurrent presence in patients reduces GC sensitivity. The acquired tumorous GC resistance probably promote dysregulated cortisol production and tumor growth, but natural sensitivity to glucocorticoides maybe modifies these effects.

Key words: glucocorticoid hormones, glucocorticoid receptor, adrenocorticotrophic receptor, adrenal incidentalomas, polymorphisms, glucocorticoid resistance

Research area: Biology

Area of special interest: Genetics of tumors

UDK number: [575.22:577.175.5]:[616-006:612.45](043.3)

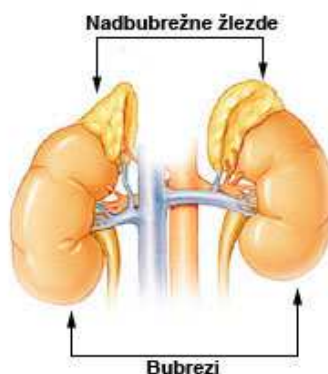
Sadržaj

Strana

1.	Uvod	1
1.1	Glukokortikoidni receptor	2
1.1.1.	Struktura gena za humani glukokortikoidni receptor	4
1.1.2.	Alternativno splajsovanje i korišćenja promotora	5
1.1.3.	Molekularna struktura humanog glukokortikoidnog receptora	7
1.1.4.	Alternativna inicijacija translacije glukokortikoidnog receptora	8
1.1.5.	Posttranslaciona modifikacija hGR	10
1.1.5.1.	Fosforilacija	10
1.1.5.2.	Ubikvitinacija	10
1.1.5.3.	Sumoilacija	11
1.1.5.4.	Acetilacija i metilacija	11
1.1.6.	Mehanizmi delovanja glukokortikoida	12
1.1.6.1.	Aktivacija i translacija glukokortikoidnog receptora	12
1.1.6.2.	Nukleusna aktivnost glukokortikoidnog receptora	13
1.1.7.	Adrenalni incidentalomi	15
1.1.8.	Polimorfizmi u genu za glukokortikoidni receptor	16
1.1.8.1.	<i>BcII</i> polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor	17
1.1.8.2.	<i>N363S</i> polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor	18
1.1.8.3.	<i>ER22/23EK</i> polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor	19
1.1.8.4.	<i>A3669G</i> polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor	20
1.2.	Adrenokortikotropni receptor	21
1.2.1.	Polimorfizam u promotoru gena za ACTH receptor	22
2.	Cilj rada	23
3.	Učesnici u studiji, materijal i metode	24
3.1.	Učesnici u studiji	24
3.2.	Izolovanje DNK iz uzoraka	25
3.3.	PCR metoda	25
3.4.	RFLP metoda	30
3.5.	Direktno sekvenciranje DNK	31
3.6.	Biohemijske metode	32
3.7.	Metode za određivanje metaboličkih parametara	32
3.8.	Antropometrijski parametri	33
3.9.	Imunohistohemijska metoda	33
3.10.	Statistička metoda	34
4.	Rezultati	35
4.1.	Distribucija učesnika studije u odnosu na kliničke karakteristike	35
4.2.	Genotipizacija	38
4.3.	Regionalna intracelularna distribucija glukokortikoidnog receptora	51
5.	Diskusija	54
6.	Zaključci	66
7.	Spisak citirane literature	68
8.	Spisak skraćenica korišćenih u tekstu	83

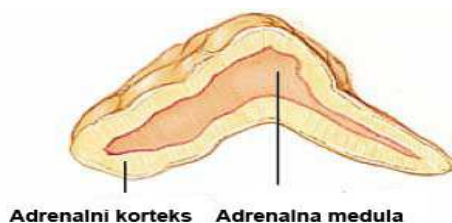
1. Uvod

Nadbubrežne žlezde su parni endokrini organi trouglastog oblika, smeštene u abdomenu na gornjem polu bubrega, koji putem sinteze kortikosteroidnih hormona i kateholamina vrše regulaciju ćelijskog odgovora na stres (Slika 1.1.).



Slika 1.1.: Lokacija nadbubrežnih žlezda.

Na poprečnom preseku nadbubrežne žlezde uočavaju se dve zone: adrenalna medula u centru žlezde i adrenalni korteks, koji je okružuje (Slika 1.2.).



Slika 1.2.: Poprečni presek nadbubrežne žlezde sa zonama adrenalnog korteksa i adrenalne medule.

U adrenalnoj meduli se odvija sinteza hormona katecholamina (adrenalin i noradrenalin).

Sinteza i sekrecija glukokortikoidnih hormona (glukokortikoidi), koji se ubrajaju u steroidne hormone, odvija se u kori nadbubrežnih žlezda (adrenalnom korteksu). Oni regulišu veliki broj fizioloških procesa u organizmu i igraju važnu ulogu u održavanju homeostaze u bazalnim i uslovima stresa. Delovanje glukokortikoida (GC) se na ćelijskom nivou odvija preko glukokortikoidnog receptora (GR). Zbog svoje lipofilnosti, glukokortikoidi prolaze kroz ćelijsku membranu putem slobodne difuzije, nakon čega u citoplazmi stupaju u interakciju sa glukokortikoidnim receptorom. U klasičnom mehanizmu negativne povratne sprege, ciljna tkiva glukokortikoida su hipotalamus i anteriorni deo hipofize, gde vrše inhibiciju produkcije i otpuštanja CRH (eng. *Corticotropin-releasing hormone*) i adrenokortikotropnog hormona (ACTH, eng. *Adrenocorticotropic hormone*) [1, 2], te na taj način ograničavaju magnitudu i trajanje skoka glukokortikoida.

1.1. Glukokortikoidni receptor

Glukokortikoidni receptor (NR3C1) je član familije nuklearnih receptora (The HUGO gene nomenclature committee, 2001). On je transkripcioni faktor koji se aktivira vezivanjem hormona. Receptor za koga nije vezan ligand prisutan je u citoplazmi kao multiproteinski kompleks. Aktivacija ligandom dovodi do strukturnih promena u receptoru, te se on premešta u nukleus i stupa u interakciju sa specifičnim sekvencama u okviru promotora ciljnih gena, koje se nazivaju GRE (eng. *Glucocorticoid Responsive Elements*). Receptor dalje stimuliše transkripciju ciljnih gena, ili vrši njenu represiju [3]. Ovaj mehanizam delovanja GR se naziva transaktivacija. Upravo su negativni efekti lečenja glukokortikoidima uglavnom posledica transaktivacije. Vezivanje GR za negativne GRE sekvence dovodi do transrepresije ciljnih gena. Drugi mehanizam delovanja GR je putem interakcije sa drugim transkripcionim faktorima kao što su AP1 i NFκB, te tako vrši represiju njihove transkripcione aktivnosti, koja rezultira inhibicijom proinflamatornih transkripcionih faktora. Ovi transrepresivni efekti GR su glavni mehanizmi koji se ubrajaju u antiinflamatorne efekte GC i objašnjavaju zašto se široko

primenjuju u lečenju inflamatornih i autoimunih bolesti [4]. Treći mehanizam delovanja GR obuhvata negenomsku aktivaciju [5]. Poznato je da glukokortikoidni receptor može da vrši inhibiciju inflamacije kako direktnim i indirektnim genomskim efektima, tako i negenomskim mehanizmima.

Glukokortikoidi se zbog svojih različitih efekata, kao i izraženog antiinflamatornog i imunosupresivnog delovanja, u medicini primenjuju za lečenje velikog broja obolenja, počevši od različitih dermatoloških bolesti, preko alergijskih stanja, astme, autoimunih bolesti, sepse do hematoloških malignih bolesti [6, 7, 8]. Efikasnost glukokortikoida u ublažavanju posledica inflamacije potiče od višestrukih efekata glukokortikoidnog receptora na brojne signalne puteve. Ali, to za posledicu može imati i neželjene efekte, kao što su zaostajanje u rastu kod dece, imunosupresija, hipertenzija, usporeno zarastanje rana, osteoporoza i različiti poremećaji metabolizma [6].

Imunosupresivno delovanje glukokortikoida se ogleda u inhibiciji gena koji kodiraju citokine od kojih je najvažniji IL-2. Manja produkcija citokina dovodi do redukcije proliferacije T ćelija [9]. Glukokortikoidi ne samo da redukuju proliferaciju T ćelija, već dovode i do glukokortikoidima indukovane apoptoze. Ovaj efekat je naročito uočljiv u nezrelim T ćelijama koje se još nalaze u timusu, ali se manifestuje i u perifernim T ćelijama. Tačan mehanizam koji dovodi do ovakvog delovanja glukokortikoida tek treba da bude razjašnjen. Oni takođe dovode do supresije humoralnog imuniteta, što smanjuje kako ekspanziju B ćelija, tako i sintezu antitela. Pošto su glukokortikoidi steroidi, oni putem regulacije transkripcionih faktora smanjuju i ekspresiju Fc receptora na makrofagima, što dovodi do smanjene fagocitoze.

Primarni mehanizam antiinflamatornog delovanja glukokortikoida je sinteza lipokortina-1 (aneksin-1). Lipokortin-1 vrši supresiju fosfolipaze A2, te se tako blokira produkcija eikozanoida. To znači da glukokortikoidi vrše supresiju imunog odgovora i dovode do inhibicije dva najvažnija proizvoda inflamacije prostaglandina i leukotriena. Takođe, slično nesteroidnim antiinflamatornim lekovima, glukokortikoidi vrše supresiju ekspresije ciklooksigenaza (COX-1 i COX-2), čime se pojačava antiinflamatorni efekat.

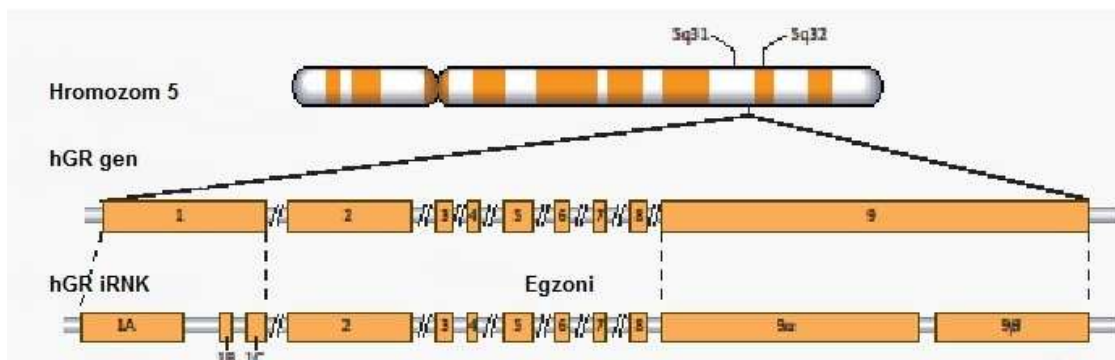
Može se reći da glukokortikoidi pripremaju i jačaju prirodni imuni sistem da brzo odgovori (proinflamatorno delovanje), ali i da vrši sistemsku represiju adaptivnog imunog sistema i potpomogne obnavljanje homeostaze (antiinflamatorno delovanje) [8].

Priroda i intenzitet ćelijskog odgovora na glukokortikoide zavise od nivoa hormona kojoj je izložena, kao i od koncentracije receptora u ćeliji. Takođe, mutacije ili polimorfizmi u hGR genu narušavaju jedan ili više molekularnih mehanizama njegovog delovanja, te tako dovode do izmenjene osetljivosti na glukokortikoide. Izmenjena tkivna osetljivost na glukokortikoide manifestuje se kao glukokortikoidna rezistencija ili glukokortikoidna hipersenzitivnost [10]. Dosadašnja istraživanja su potvrdila prisustvo velikog broja polimorfizama GR, ali malo njih su od funkcionalnog značaja. Upravo se ti polimorfizmi vezuju za izmenjenu osetljivost na glukokortikoide, a neki od njih i za promene u telesnom sastavu i metaboličkim parametrima, autoimune i kardiovaskularne bolesti.

1.1.1. Struktura gena za humani glukokortikoidni receptor

Gen za humani glukokortikoidni receptor smešten je na dužem kraku hromozoma 5, u okviru lokusa 5q31-32 i čine ga devet egzona, koji zauzimaju region od 110 kb (Slika 1.3.).

Egzon 1 se sastoji od 184 nukleotida i predstavlja 5' region koji se ne prevodi (5' NTR). Kodirajuća sekvenca se nalazi u regionu egzona 2 - 9. Egzon 2 (1197 bp) kodira veći deo N-terminusa receptora, uključujući i konstitutivni AF1 transaktivacioni domen. Dva cinkana prsta uključena u vezivanje DNK zasebno su kodirana egzonom 3 (167 bp) i egzonom 4 (117 bp). Ostalih pet egzona (egzoni 5, 6, 7, 8, 9 α ili 9 β) zajedno kodiraju ligand vezujući domen i ligand zavisani AF2, kao i 3' region koji se ne prevodi (3' NTR).



Slika 1.3.: Genomska lokalizacija i organizacija humanog glukokortikoidnog receptora (humani hromozom 5 i raspored 9 egzona gena za humani glukokortikoidni receptor). (Preuzeto i modificirano iz Rhen et al., N. Engl. J. Med., 2005).

Aktivnost gena za humani glukokortikoidni receptor (hGR), zavisno od tkivno specifične ekspresije, regulišu najmanje tri promotora. Analizom promotora gena za hGR utvrđeno je odsustvo TATA elemenata i CCAAT motiva. Umesto njih identifikovani su višestruki GC elementi, AP-1, AP-2, Sp1, CRE (eng. *cAMP responsive element*), Yin Yang1 (YY1), NF- κ B, kao i nekoliko vezivnih mesta za tkivno specifične transkripcione faktore. Treba imati u vidu da je GR konstitutivno eksprimiran u gotovo svim tipovima ćelija [11].

1.1.2. Alternativno splajsovanje i korišćenje promotora

Mada je GR produkt jednog gena, poznati su različiti GR proteini, nastali kao posledica alternativnog splajsovanja i mehanizma alternativne inicijacije translacije. Veliki broj funkcionalno različitih receptorskih podtipova podleže različitim posttranslacionim modifikacijama. Prisustvo različitih izoformi GR određuje individualni ćelijski odgovor na glukokortikoide.

Dosadašnje studije promotorskog dela hGR gena utvrdile su postojanje najmanje tri različita regulatorna regiona, od kojih svaki kontroliše posebnu izoformu egzona 1 (1A, 1B, 1C) [11, 12, 13]. Egzon 1C (184 bp) je identičan prvobitno okarakterisanom egzonu 1, koji je pod kontrolom promotora C. Uzvodno od promotora 1C nalazi se egzon 1B (77

bp), kontrolisan od strane promotora 1B, čija je veličina oko 1 kb. Mnogo dalje uzvodno (27 kb) od transkripcionog startnog mesta za egzon 1C, nalazi se egzon 1A (981 bp), koga reguliše promotor 1A (1075 bp). Na egzonu 1A zasebno postoje tri alternativna splajs mesta, čime je omogućen nastanak tri 1A transkripta: 1A1 (212 bp), 1A2 (383 bp) i 1A3 (981 bp). Svih pet varijanti egzona 1 (1A1, 1A2, 1A3, 1B, 1C) mogu da se vežu za isto akceptorsko mesto na egzonu 2, dajući transkripte koji sadrže različite 5' NTR.

Uprkos nedostatku direktnih dokaza da neka od izoformi egzona 1 kodira proteinsku informaciju, one zajedno sa svojim promotorima igraju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena za hGR, specifičnoj za određeni tip ćelija [12].

Najnovija istraživanja su pokazala da glukokortikoidni receptor izgleda nije samo intracelularni protein. Uočeno je da je GR vezan za ćelijsku membranu takođe produkt NR3C1 gena, sa najmanje 400 aminokiselina identičnih kao u klasičnom citosolnom receptoru. Najverovatnije da je alternativni egzon 1 uključen u membransku lokalizaciju GR, mada nije nađena tačna veza sa dobijenom proteinskom izoformom [14, 15, 16].

Alternativnim splajsovanjem egzona 9 nastaju α i β izoforma humanog glukokortikoidnog receptora. Na taj način se dobijaju dve iRNK koje kodiraju hGR α i hGR β , a koje su identične zaključno sa egzonom 8. Izoforma α ima molekulsku masu od 94 kDa i čini je 777 aminokiselina, dok je izoforma β sačinjena od 742 amino kiseline, a molekulska masa joj je 91 kDa. Obe izoforme su identične do 727. amino kiseline. Izoforma α sadrži još dodatnih 50, a izoforma β još 15 nehomologih amino kiseline [11, 12].

Funkcionalne analize su pokazale prisustvo bitnih razlika između dve receptorske izoforme. Izoforma α hGR vezuje klasične receptorske agoniste kortikosteroide, translocira se u nukleus nakon aktivacije ligandom, gde vrši modulaciju transkripcije ciljnih gena na hormon zavisani način.

Za razliku od toga, izoforma β hGR ne vezuje glukokortikoide i transkripciono je neaktivna. Njena povećana ekspresija je dokazana u generalizovanoj i tkivno specifičnoj glukokortikoidnoj rezistenciji, ali su novije studije pokazale da hGR β može da se veže za GRE, stvarajući heterodimer sa hGR α i interaguje sa Hsp90. Molekularna osnova dominantno negativnog efekta hGR β vezuje se za dve amino kiseline L733 i N734, u okviru 15 amino kiseline karakterističnih za hGR β . Iako se ne zna tačan mehanizam

putem koga hGR β igra inhibitornu ulogu preko ove dve amino kiseline, sadašnja hipoteza govori u prilog formiranja transkripciono neaktivnog GR β /GR α heterodimera [12].

Potvrđeno je prisustvo još jedne splajs varijante hGR, nazvane hGR γ , a njena zastupljenost iznosi 3.8-8.7% ukupnih GR transkripata. Ova izoforma se od ostalih razlikuje po inserciji tri baze, tj. jedne amino kiseline (arginin) između egzona 3 i 4, koji kodiraju DNK vezujući domen [11, 12].

Izoforma hGRP (ili hGR δ) nastaje kao rezultat alternativnog splajsovanja pri kome dolazi do gubitka egzona 8 i 9, što za posledicu ima nastanak skraćenog proteina od samo 676 amino kiselina. Prisustvo GRP potvrđeno je u ćelijama hematoloških tumora, koje su poticale od različitih donora, što ukazuje na njegovu široku rasprostranjenost. Zbog nedostatka egzona 8 i 9 za hGRP izoformu nije moguće vezivanje liganda. Kod ovih tumora je u visokom procentu potvrđeno i prisustvo izoforme hGRA kojoj nedostaju egzoni 5, 6 i 7, što rezultira velikom delecijom u LBD [11, 12, 17].

1.1.3. Molekularna struktura humanog glukokortikoidnog receptora

Humani glukokortikoidni receptor je modulatorni protein čiju molekularnu strukturu čine tri funkcionalna domena:

1. N – terminalni domen (amino terminalni domen, NTD) koga čine amino kiseline od 1. do 420., u okviru koga se nalazi transaktivacioni subdomen AF-1 ili τ 1
2. Centralni DNK vezujući domen (DBD), koji sadrži dva cinkana prsta preko kojih se vezuje za specifične GRE sekvence u promotorskom regionu ciljnih gena. DBD takođe sadrži i dimerizacioni i prvi nukleusni lokalizacioni signal (NLS1)
3. Karboksi terminalni ligand vezujući domen (LBD), koga formiraju amino kiseline 527 – 777. U okviru njega se nalazi drugi transaktivacioni subdomen AF-2 ili τ 2, drugi nukleusni lokalizacioni signal (NLS2) i sekvence važne za vezivanje sa proteinima toplotnog stresa i drugim transkripcionim faktorima, translokaciju u nukleus i dimerizaciju receptora

NTD se često naziva i imunogeni region pošto su njegova dužina i primarna sekvenca najvarijabilnije među receptorima za steroidne hormone. Za razliku od njega DBD i LBD imaju visoko konzervativnu strukturu među svim članovima subfamilije 3

nuklearnih receptora. LBD je sačinjen od 12 α heliksa i 4 β ploče, koji formiraju hidrofobni džep za vezivanje glukokortikoida, dok AF-2 subdomen stupa u interakciju sa koregulatorima na ligand zavisani način [18].

U odsustvu liganda glukokortikoidni receptor je transkripciono neaktivan i nalazi se predominantno u citoplazmi ćelija u kompleksu sa nekoliko proteina. Proteini vezani za glukokortikoidni receptor su šaperoni (Hsp90 i Hsp70 i p23), ko-šaperoni (Hip, Hop), imunofilini (FKBP59, Cyp40).

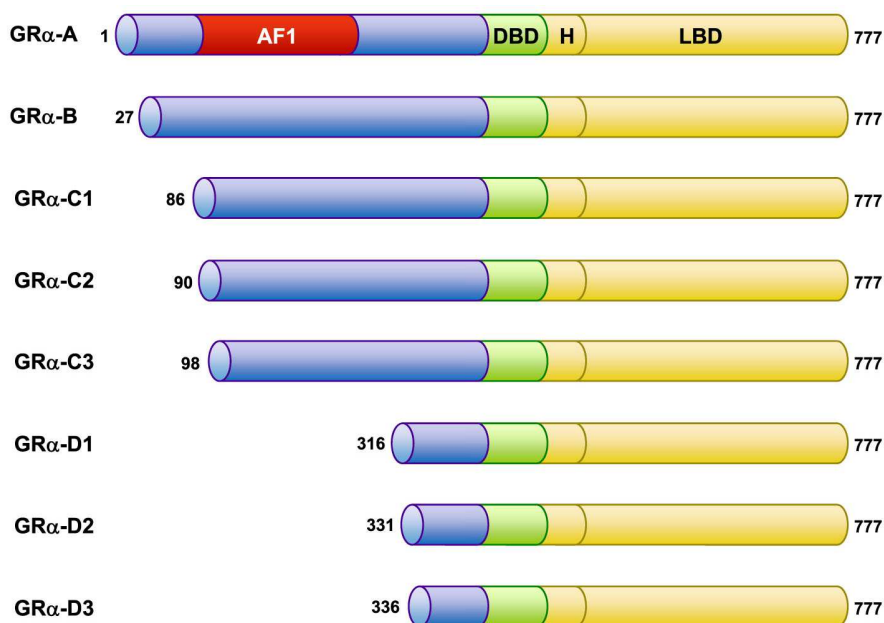
Nakon vezivanja hormona, netransformisani kompleks glukokortikoidnog receptora, Hsp90 i imunofilina prolazi kroz strukturne promene, što rezultira disocijacijom Hsp90/imunofilin kompleksa, translokacijom glukokortikoidnog receptora u nukleus i formiranjem receptorskog homodimera spremnog da preuzme transaktivacionu funkciju.

U okviru DNK vezujućeg domena receptorskog molekula prisutna su dva cinkana prsta. Svaki sadrži četiri ostatka cisteina stabilizovana koordinativnim vezama sa jonima cinka. Ovi regioni sa cinkanim prstima omogućuju homodimerima receptora da se vežu za palindromske GRE sekvence GGAACAnnnTGTTCT, koje čine dva dela od po 6 bp. Za svaki od ova dva dela se vezuje po jedna receptorska subjedinica. Razmak od 3 nukleotida je striktno potreban da bi došlo do dimerizacije GR na ovom elementu. Nakon toga, receptor stupa u komunikaciju sa bazalnom transkripcionom mašinerijom, radi započinjanja ili represije transkripcije ciljnih gena [2, 12, 19, 20].

1.1.4. Alternativna inicijacija translacije glukokortikoidnog receptora

Iako se dugo smatralo da svaki od dva različita transkripta, hGR α i hGR β , daje samo jedan protein, novija istraživanja su jasno pokazala da to nije tačno. Utvrđeno je da translacija hGR iRNK može da počne sa najmanje osam inicijacionih mesta, što dovodi do nastanka većeg broja izoformi GR α , nazvanih GR α -A do D (A, B, C1, C2, C3, D1, D2, i D3). Uzrok translacije hGR α iRNK u različite GR imunoreaktivne proteine, je šantovanje ribozoma sa alternativnih mesta za inicijaciju translacije smeštenih u egzonu 2. Translacija hGR počinje sa 5' kraja hGR iRNK, nakon prepoznavanja prvog start kodona, a završava se kada ribozom dođe do stop kodona na 3' kraju iRNK. Tako nastaje peptid koji ima punu dužinu (777 amino kiselina) i koji se sada naziva hGR α -A. Izoforma

hGR α -B nastaje kada bude preskočen prvi start kodon i translacija počne sa drugog inicijacionog mesta na poziciji 27. Tri otkrivene hGR α -C izoforme su produkt šantovanja ribozoma, kada translacija počinje sa pozicija 86, 90 i 98, što za posledicu ima nastanak izoformi hGR α -C1, hGR α -C2 i hGR α -C3. Šantovanje ribozoma je najverovatnije mehanizam kojim nastaju i D izoforme. Start kodon na mestu amino kiseline 316 daje hGR α -D1, na mestu 331 daje hGR α -D2, a na mestu 336 hGR α -D3 (Slika 1.4.). Naime, zbog formiranja strukture ukosnice u RNK, ribozomi mogu da preskoče delove RNK i započnu translaciju na alternativnim mestima. Svi poznati alternativni start kodoni smešteni su u N-terminalnom delu receptora. Tako nastaju hGR izoforme sa identičnim DBD i LBD, a različitim N-terminalnim regionima [11, 12, 13].



Slika 1.4.: Višestruke izoforme hGR α nastale alternativnom inicijacijom translacije. (Preuzeto i modifikovano iz Oakley et al., J. Allergy. Clin. Immunol., 2013).

Alternativna inicijacija translacije hGR se može smatrati fenomenom koji se prirodno javlja i koji je važan za regulaciju ekspresije ciljnih gena.

1.1.5. Posttranslaciona modifikacija hGR

Više od dvadeset godina posttranslaciona modifikacija hGR je predmet istraživanja. Razlog tome je činjenica da sve izoforme podleže nizu posttranslacionih modifikacija koje uključuju fosforilaciju, ubikvitinaciju i sumoilaciju [11, 12, 19]. Posttranslaciona modifikacija može da reguliše višestruke aspekte funkcije GR α izoforme, te na taj način ćelijama pruža dodatne mogućnosti za kontrolu odgovora na glukokortikoide [21].

1.1.5.1. Fosforilacija

Pod fiziološkim uslovima glukokortikoidni receptor je konstitutivno fosforilisan, ali takođe prelazi u agonistima indukovanu hiperfosforilaciju, koja zavisi i od ćelijskog ciklusa. Na GR miša je otkriveno osam fosforilacionih mesta. Većina njih su smeštena na serinima na N-terminusu, na pozicijama 122, 150, 212, 220, 234, 315, 412 i jedno na treoninu 159. Poređenje sekvenci GR miša, čoveka i pacova ukazalo je da je većina ovih mesta konzervativna među vrstama i da su to zaista glavna mesta fosforilacije. Smatra se da su za fosforilaciju receptora odgovorne mitogenom aktivirana proteinska kinaza (MAPK), ciklin zavisna kinaza (CDK), kinaza-3 glikogen sintaze (GSK-3) i N-terminalna kinaza c-Jun-a (JNK), od kojih svaka ima različitu specifičnost.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da GR prolazi kroz dinamičan proces fosforilacije i defosforilacije, kao odgovor na prisustvo liganda, varijacije ćelijskog ciklusa i/ili fiziološko stanje. Po analogiji sa kinazama, fosfataze su isto kritične za pravilno funkcionisanje receptora. Tako se, na primer, zna da proteinska fosfataza tipa 1 (PP1), tipa 2a (PP2a) i tipa 5 (PP5) regulišu premeštanje receptora iz nukleusa u citoplazmu [11, 12, 19].

1.1.5.2. Ubikvitinacija

Drugi važan proces posttranslacione modifikacije putem koga ćelije, vezivanjem velikog broja molekula ubikvitina, usmeravaju specifične proteine u proteazom radi degradacije, naziva se ubikvitinacija. Ubikvitin je visoko očuvan molekul od 76 amino

kiselina, rasprostranjen među svim eukariotima. Mnogobrojne *in vitro* studije su ukazale da je GR potencijalni supstrat za ubikvitinaciju. Analiza primarnih sekvenci glukokortikoidnog receptora čoveka, miša i pacova otkrila je prisustvo konzervativnog PEST motiva. Kada je K426 ovog GR PEST motiva mutiran u alanin, receptor postaje rezistentan na ligandom indukovanu degradaciju i dobija povećanu transkripcionu aktivnost. Ovo govori u prilog tvrdnji da je K426 ključan za degradaciju GR proteina, najverovatnije kao akceptorsko mesto za ubikvitin. Međutim, još nije potpuno razjašnjeno da li je zaista tako, te da li je jedino to mesto ključno [11, 12].

1.1.5.3. Sumoilacija

Mali modifikatorski protein sličan ubikvitinu – SUMO (eng. *small ubiquitin related modifier*) molekulske mase 11 kDa, može da uspostavi kovalentne veze sa lizinima u brojnim proteinima. Mada je SUMO sličan ubikvitinu po veličini i trodimenzionalnoj strukturi, funkcionalne posledice sumoilacije su drugačije. Modifikacije sa SUMO regulišu biološke efekte kao što su protein-protein interakcije, subcelularna lokalizacija, proteinska stabilnost i transkripcioni kapacitet. Novije *in vitro* studije ukazuju da je hGR ciljni protein za sumoilaciju, kao i da su tri lizina (K277, K293 i K703) identifikovana kao potencijalna akceptorska mesta za vezivanje SUMO. Mutacija sva tri lizina u arginine onemogućava sumoilaciju GR i povećava transkripcionu aktivnost receptora [11, 12].

1.1.5.4. Acetilacija i metilacija

Funkcija proteina može takođe biti regulisana acetilacijom i metilacijom. Iako nema mnogo dokaza da aktivnost GR može, na posttranslacionom nivou, biti izmenjena direktnom acetilacijom i metilacijom, poznate su činjenice koje govore u prilog tome. Aktivnost GR regulisana acetilacijom je najverovatnije posledica indirektnog efekta acetilacije Hsp90 [11, 12].

1.1.6. Mehanizmi delovanja glukokortikoida

Glukokortikoidni receptor se u odsustvu liganda (GC) nalazi u citoplazmi ćelija kao deo velikog multiproteinskog kompleksa, koji se sastoji od receptorskog polipeptida, dva molekula Hsp90 i nekoliko drugih proteina. Skorija istraživanja su ukazala da su Hsp90 i Hsp70 dovoljni za održavanje receptora u funkcionalnom stanju, ali da Hop, Hsp40, p23 i imunofilin kao što je FKBP51 imaju važnu ulogu košaperona koji optimizuju vezivanje Hsp90 i Hsp70 za hGR i formiranje heterokompleksa.

Molekularni šaperon Hsp70 ima ATP-aznu aktivnost i stupa u interakciju sa košaperonima Hsp40 i Hip. Hip igra važnu ulogu u regulaciji ATP-azne aktivnosti Hsp70, sprečava inhibiciju heterokompleksa BAG-1 i suprotstavlja se redukciji steroid vezujuće aktivnosti indukovanoj sa BAG-1. Hsp40 i Hip se vezuju za Hsp70, koji vezuje i košaperon Hop (eng. *Hsp organizing protein*) čija je molekulska masa 60 kDa. Hop deluje kao adaptorni protein koji vezuje i Hsp70 i dimer Hsp90. N-terminalni domen Hop interaguje sa C-terminusom, dok C-terminus Hop interaguje sa C-terminusom Hsp90.

Nakon formiranja intermedijarnog kompleksa, drugi košaperon BAG-1 se nalazi u kompeticiji sa Hop za vezivanje za ATP-azni domen Hsp70. Interakcija BAG-1 sa Hop dovodi do disocijacije Hsp70 mašinerije i Hop sa intermedijarnog kompleksa. Istovremeno Hsp90-GR kompleks se vezuje za veliki imunofilin i košaperon p23 i postaje zreo kompleks. Tako da zreli kompleks sadrži GR, dimer Hsp90, imunofilin i p23. Košaperon p23 se vezuje direktno za Hsp90 homodimer i ta reakcija zahteva ATP i temperaturno zavisnu konformacionu promenu Hsp90 [19, 20].

Najvažnija funkcija GR-Hsp kompleksa je da čuva receptor u transkripciono neaktivnom stanju, ali stanju koje ima visoki afinitet za vezivanje glukokortikoida.

1.1.6.1. Aktivacija i translokacija glukokortikoidnog receptora

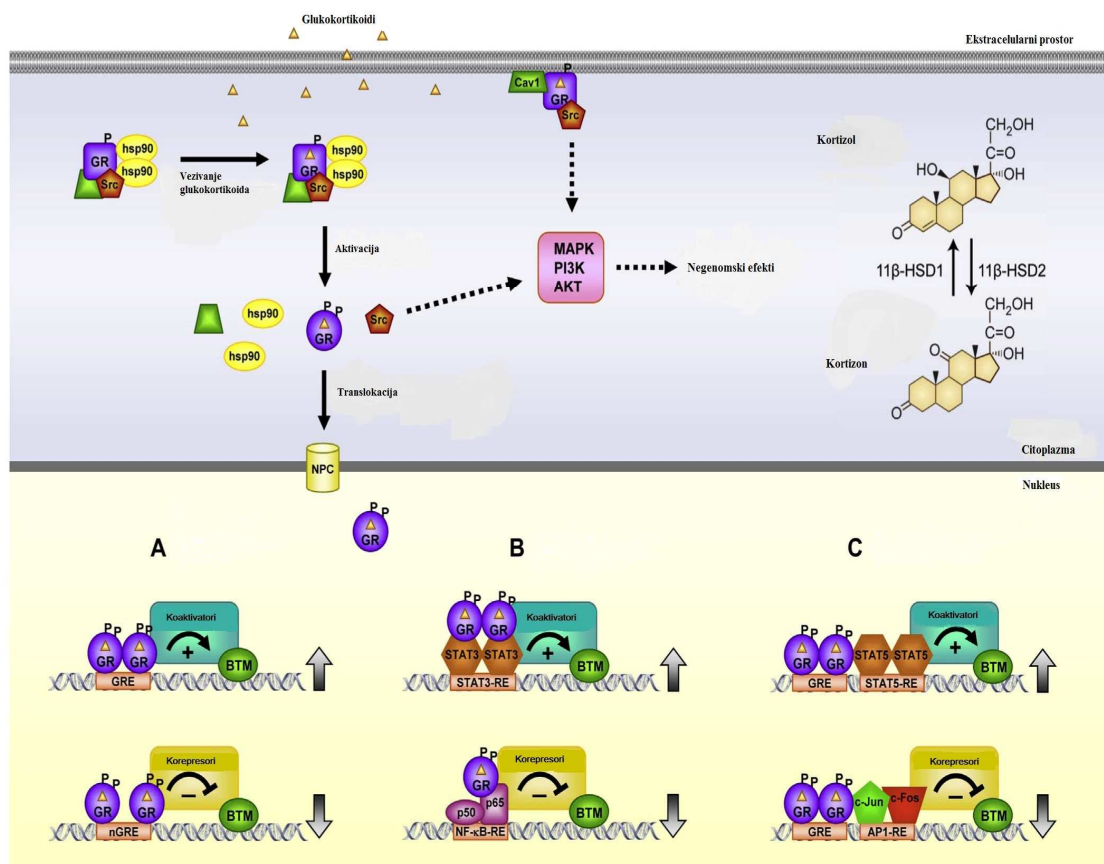
Glukokortikoidi su lipofilni steroidi, sposobni su da uđu u ćeliju slobodnom difuzijom kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane i da u citoplazmi stupe u interakciju sa glukokortikoidnim receptorom. Kada uđe u ćeliju molekul GC se vezuje za GR i dovodi do njegove aktivacije. Vezivanjem GC indukuju se konformacione promene u molekulu

GR koje imaju niz funkcionalnih posledica. Do tada delimično fosforilisan GR postaje hiperfosforilisan, uglavnom na pozicijama serina. Zatim, NLS1 koji se nalazi u DBD i NLS2 koji je u LBD receptora postaju demaskirani, zbog čega dolazi do kretanja GR ka nukleusu. Najverovatnije da je brzi nukleusni import GR posredovan sa NLS1, dok NLS2 verovatno posreduje u sporom nukleusnom importu GR. Jednosmerno kretanja je moguće samo ako se receptor veže za tzv. retrogradni sistem za kretanje, kao što je citoplazmatski dinein (motorni protein), preko TPR i imunofilina.

Velika je verovatnoća da prolin 634 u LBD receptora ima ulogu u stabilizaciji kompleksa receptor Hsp90 i u omogućavanju efikasne nukleusne translokacije. U fiziološkim uslovima u kojima je citoskelet intaktan GR koristi mašineriju za kretanje, kao što je citoplazmatski dinein, za svoj brzi transport u nukleus duž citoskeleta [13, 19, 20].

1.1.6.2. Nukleusna aktivnost glukokortikoidnog receptora

Humani glukokortikoidni receptor se u odsustvu liganda uglavnom nalazi u ćelijskoj citoplazmi u sklopu multiproteinskog kompleksa sa šaperonima i košaperonima. Vezivanjem hormona dolazi do alosterične transformacije glukokortikoidnog receptora, njegove disocijacije od Hsp90 i drugih proteina, demaskiranja NLS i fosforilacije na pet serinskih fosforilacionih mesta. U toj novoj konformaciji fosforilisani GR sa vezanim ligandom – glukokortikoidom se translocira u nukleus, gde se u formi homodimera vezuje za kratke palindromske DNK sekvence – GRE, koje se nalaze u promotorskom regionu ciljnih gena. Glukokortikoidni receptor za koji je vezan ligand može da reguliše transkripciju na tri načina: direktno – interakcijom sa DNK tj. GRE sekvencama, indirektno – interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima, ili direktnim vezivanjem za DNK i delovanjem u sadejstu sa susednim transkripcionim faktorima koji su već vezani za DNK (Slika 1.5.). Istraživanja su pokazala da je samo mali deo GRE zaista okupiran od strane receptora, a da se specifična mesta za vezivanje GR razlikuju u zavisnosti od vrste tkiva. Neki GRE su okupirani od strane GR i pri niskoj koncentraciji glukokortikoida (hipersenzitivnost), dok drugi zahtevaju velike doze liganda da bi došlo do vezivanja GR [21].



Slika 1.5.: GR signalni putevi: Glukokortikoidima aktivirani GR reguliše ekspresiju gena na tri načina: direktnim vezivanjem za DNK (A), interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima (B), ili direktnim vezivanjem za DNK i stupanjem u sadejstvo sa susednim transkripcionim faktorima vezanim za DNK (C). Negenomski mehanizmi delovanja GR ogledaju se u izmeni aktivnosti različitih kinaza. BTM (eng. Basal Transcription Machinery); PI3K (eng. Phosphoinositide 3-Kinase); STAT (eng. Signal Transducer and Activator of Transcription). (Preuzeto i modifikovano iz Oakley et al., *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2013).

Rezultat direktne interakcije izmedju GR i GRE je najčešće aktivacija transkripcije. Kada se aktivirani receptor veže za enhenser regione dolazi do modifikacije lokalnih hromatinskih struktura u stanje koje dopušta transkripciju, što je praćeno regrutovanjem transkripcionih faktora da bi se formirao preinicijacioni kompleks na promotoru.

Posledica indirektnog dejstva GR odnosno protein – protein interakcije sa drugim transkripcionim faktorima, kao što su aktivator protein AP-1 i nuklearni faktor NF- κ B, najčešće je represija transkripcije. Antiinflamatorni i imunosupresivni efekti GC su upravo rezultat indirektnog dejstva GR na transkripciju proinflamatornih gena tj. interakcije GR sa NF- κ B i AP-1.

Transkripciona aktivnost GR takođe zavisi od koaktivatora koji olakšavaju regrutovanje transkripcione mašinerije ili remodelovanje hromatina, a koji su regrutovani u promotorski region ciljnih gena preko AF-1 i AF-2 samog receptora.

Nakon toga dolazi do transkripcije DNK u iRNK. iRNK napušta nukleus i odlazi u citoplazmu gde dolazi do njene translacije u polipeptid, koji nakon pravilnog savijanja dobija stabilnu proteinsku konformaciju i može da vrši svoju biološku funkciju [11, 12, 21].

Negenomski mehanizmi delovanja glukokortikoidnog receptora se ogledaju u izmeni aktivnosti različitih kinaza.

1.1.7. Adrenalni incidentalomi

Tumori nadbubrežnih žlezda otkrivaju se kod 3-7% pacijenata koji se podvrgnu abdominalnoj ultrasonografiji ili kompjuterizovanoj tomografiji, iz drugih razloga. Kod čak 10% pacijenata koji pripadaju starijoj populaciji, tokom radioloških pregleda otkriva se prisustvo tumora nadbubrežnih žlezda. Pošto se radi o slučajno otkrivenim tumorima, podrazumeva se da kod tih pacijenata nisu postojali klinički simptomi i znaci, koji bi ukazali na postojanje adrenalnog tumora. Većinu ovih slučajno otkrivenih tumora nadbubrežnih žlezda (adrenalnih incidentaloma) čine nefunkcionalni, benigni adrenokortikalni adenomi. Ipak, blaže hormonske alteracije, kao i metaboličke abnormalnosti su često prisutne kod ovih pacijenata, ali ne i veće endokrine disfunkcije. Generalno prihvaćena preporuka po pitanju klinički nefunkcionalnih tumora, je da se operativno uklanjaju lezije veće od 6 cm, dok se tumori manji od 4 cm bez sumnjivih radioloških nalaza ne uklanjaju. Takođe, ranije studije su ukazale na činjenicu da su nefunkcionalni adrenalni adenomi češći kod pacijenata sa dijabetesom, dislipidemijom, gojaznošću i arterijskom hipertenzijom, kao i kod starijih osoba, ali i da su nešto

učestaliji u ženskoj populaciji. Mada se većina adrenokortikalnih tumora smatra nehipersekretornim adenomima, u 5-25% ovih tumora je prisutna autonomna sekrecija kortizola. Iz tog razloga se svi pacijenti kod kojih su dijagnostikovani adrenalni incidentalomi podvrgavaju detaljnim kliničkim i hormonskim ispitivanjima, kako bi se isključilo postojanje Kušing sindroma (eng. *Cushing syndrome*), primarnog aldosteronizma, feohromocitoma ili hiperandrogenizma [22, 23, 24].

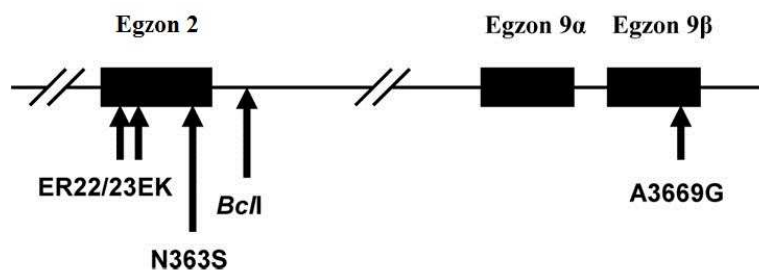
1.1.8. Polimorfizmi u genu za glukokortikoidni receptor

Genetički polimorfizmi su definisani kao varijacije u DNK koje su u ukupnoj populaciji zastupljene sa 1% ili više. Polimorfizmi u genu za hGR dovode se u vezu sa varijacijama u funkciji hGR (*Huizenga et al.*, 1998; *van Rossum et al.*, 2002; *van Rossum et al.*, 2003), te se smatra da genetičke alteracije u genu za hGR doprinose varijabilnosti individualnog odgovora na glukokortikoide [25, 26, 27].

Postojanje značajne individualne varijacije u osetljivosti na glukokortikoide odražava se na sve fiziološke funkcije koje regulišu glukokortikoidi, ali njena molekularna osnova još nije sasvim jasna. Brojna istraživanja su otkrila vezu između postojanja abdominalne gojaznosti, abnormalnosti u metabolizmu glukoze, insulina i lipida i hipertenzije kod ljudi. Kod osoba sa abdominalnom gojaznošću takođe su utvrđene abnormalnosti u regulaciji ose hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlezde (HPA) [28, 29, 30]. Pre gotovo tri decenije, nakon mnogih istaživanja, došlo se do zaključka da glukokortikoidna rezistencija može biti posledica promene u funkcionalnim karakteristikama glukokortikoidnog receptora.

Hipofiza stimuliše adrenalni korteks da produkuje i oslobađa kortizol, koji zatim preko centralno lokalizovanih GR pokreće negativnu povratnu spregu. Kada se kortizol veže za GR, uspostavlja se kontrola HPA ose. Regulacija HPA ose je strogo genetički kontrolisana. To ukazuje na postojanje genetičke kontrole abdominalne gojaznosti i njene povezanosti sa drugim metaboličkim poremećajima. Stoga, postoji razlog za verovanje da je osetljivost na poremećaje u aktivnosti HPA ose najverovatnije delimično genetički uslovljena [31].

U svetlu poznate činjenice da se efekti glukokortikoida na ciljna tkiva manifestuju putem glukokortikoidnog receptora, brojna istraživanja dovela su do velikog broja novootkrivenih polimorfizama u okviru gena za hGR, te ih je do danas registrovano čak 3016 [7]. Ali, mali broj ovih polimorfizama je zavređeo veću pažnju, pa su zbog postojanja veze sa promenama u osetljivosti na glukokortikoide četiri polimorfizma u okviru gena za hGR najviše izučavana. To su polimorfizmi *BclI*, *N363S*, *ER22/23EK* i *A3669G*. Takođe, prisustvo ovih polimorfizama se vezuje i za promene u telesnom sastavu, smanjenu gustinu kostiju, koronarnu bolest i promene u mišićnoj masi [30, 31, 33]. Polimorfizmi *ER22/23EK*, *N363S* i *A3669G* nalaze se u okviru egzona GR gena, dok je *BclI* intronski polimorfizam (Slika 1.6.).

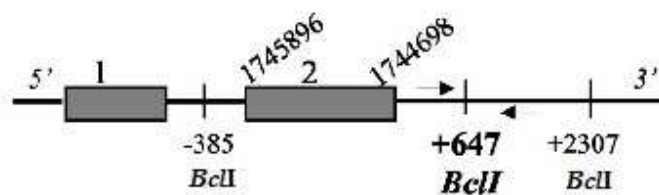


Slika 1.6.: Shematski prikaz lokacije *ER22/23EK*, *N363S*, *BclI* i *A3669G* polimorfizama. Pozicije polimorfizama u intronu 2 i egzonima 2 i 9β date su relativno u odnosu na njihovu udaljenost od veza egzon/intron.

1.1.8.1. *BclI* polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

Dostupan je značajan broj podataka koji ukazuju da postoji više polimorfizama u genu za hGR, koji su povezani sa povećanom osetljivošću na glukokortikoide. Jedan od njih je polimorfizam *BclI* (rs423247), lokalizovan u intronu 2 gena za hGR, 647 bp od veze egzon 2/intron 2 (Slika 1.7.) [28, 29, 30, 31]. Prisustvo ovog polimorfizma se dovodi u vezu sa povećanom osetljivošću na glukokortikoide. Ovaj polimorfizam je detektovan *Southern blot* metodom, kada su identifikovani fragmenti od 4.5 i 2.3 kb. Nešto kasnije, postojanje *BclI* polimorfizma potvrđeno je korišćenjem restrikcionog enzima *BclI* i

sekvenciranjem DNK, kada je i dokazana promena jednog nukleotida G u C [32, 33, 34]. U okviru gena za hGR postoje tri potencijalna restrikciona mesta za ovaj enzim, ali samo polimorfno mesto u intronu 2, 647 bp od veze egzon 2/intron 2, okarakterisano kao promena TGATCA u TCATCA, daje fragmente čije veličine odgovaraju onima koje su dobijene *Southern blot* metodom [32]. Prisustvo ovog polimorfizma u genu za hGR dovodi se u vezu sa postojanjem abdominalne gojaznosti, insulinske rezistencije, dislipidemije, povišenog arterijskog krvnog pritiska i povećane sekrecije kortizola kod testiranih pacijenata [28, 29, 30]. Ovakva klinička slika gotovo redovno se sreće i kod pacijenata sa metaboličkim sindromom [34, 35], za koje se takođe smatra da češće imaju tumore nadbubrežnih žlezda (adrenalne incidentalome), u odnosu na zdravu populaciju [22, 24].



Slika 1.7.: Shematski prikaz lokusa *BclI* polimorfizma. Predviđene pozicije *BclI* restrikcionih mesta u intronima 1 i 2 date su relativno u odnosu na egzon 2, čije su granice na hromozomu 5 takođe naznačene. (Preuzeto iz Fleury et al., *Gene. Clin. Chem.*, 2003).

Bez obzira na intronsku lokalizaciju *BclI* polimorfizma njegov funkcionalni značaj u regulaciji transkripcije time nije umanjen. Tim pre što je *BclI* polimorfizam lociran u intronu 2, koji se u genu za GR nalazi neposredno nakon egzona 2, koji je prvi kodirajući egzon u ovom genu.

1.1.8.2. N363S polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

Polimorfizam N363S (rs6195) u okviru egzona 2 gena za hGR, udaljen 1101 bp od veze intron 1/egzon 2, karakteriše zamena jednog nukleotida ATT u GTT u kodonu 363. Ova

zamena za posledicu ima promenu aminokiseline asparagin u serin, u okviru modulatornog regiona glukokortikoidnog receptora. Veći broj istraživanja je pokazao vezu prisustva *N363S* polimorfizma sa povećanom osetljivošću na glukokortikoide [26-31]. Brojne studije dovele su u vezu postojanje *N363S* polimorfizma sa povećanim ITM, pojavom koronarne bolesti i prisustvom centralne gojaznosti kod muškaraca evropskog porekla [36, 37, 38, 39]. Ali, nasuprot njima, nekoliko studija nije pokazalo vezu *N363S* polimorfizma sa izmenjenom osetljivošću na glukokortikoide, ili sa gojaznošću [40, 41].

Mada veza između prisustva *N363S* polimorfizma, gojaznosti i koronarne bolesti ukazuje da populacija sa velikom prevalencom gojaznosti, kao i drugih faktora rizika za koronarnu bolest, može imati veću učestalost 363S alela, dosadašnja istraživanja to nisu dokazala [42].

1.1.8.3. *ER22/23EK* polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

Polimorfizam *ER22/23EK* (rs6189 i rs6190) je smešten u transaktivacionom domenu, preciznije u egzonu 2 gena za GR, gde su u dva susedna kodona (kodon 22 i 23) identifikovani polimorfizmi jednog nukleotida (SNP). Pošto su ova dva polimorfizma u potpunosti povezana oni, zbog svoje bliske lokacije, mogu biti relevantni za tumačenje mehanizama izmenjenih efekata GR, te se zajedno izučavaju kao kombinovani polimorfizam [43].

U ranijim istraživanjima je utvrđeno da se *ER22/23EK* polimorfizam može dovesti u vezu sa relativnom rezistencijom na glukokortikoide, što se tokom testa supresije kortizola manifestuje manjom supresijom kortizola nakon oralne primene 1 mg deksametazona *in vivo*, kao i redukcijom transaktivacionog kapaciteta u eksperimentima transfekcije [26, 31].

U skladu sa relativnom sistemskom rezistencijom na glukokortikoide nađena je asocijacija između prisustva *ER22/23EK* polimorfizma i nižih vrednosti insulina, povećane osetljivosti na insulin, kao i nižih vrednosti ukupnog i LDL holesterola. Ovakav povoljniji metabolički profil može za posledicu imati manji rizik od dobijanja dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti, a kako raspoloživi rezultati govore i veću stopu preživljavanja [31, 44].

1.1.8.4. *A3669G* polimorfizam u genu za glukokortikoidni receptor

Efekti glukokortikoida se manifestuju putem funkcionalne izoforme glukokortikoidnog receptora GR α . Alternativna izoforma GR β ponaša se kao dominantno negativan inhibitor GR α i doprinosi glukokortikoidnoj rezistenciji. Pre nekoliko godina otkriven je polimorfizam jednog nukleotida *A3669G* (rs6198), u kome dolazi do zamene A u G (ATTTA→GTTTA), a koji se prirodno javlja na 3'NTR kraju egzona 9 β . Prisustvo ovog polimorfizma dovodi do povećane stabilnosti GR β iRNK i povećane ekspresije GR β proteina. Upravo povećana ekspresija GR β može dovesti do veće inhibicije GR α transkripcione aktivnosti, što za posledicu može imati neosetljivost na glukokortikoide [45].

Prisustvo ovog polimorfizma do sada je dovedeno u vezu sa reumatoidnim artritisom, ali i smanjenom centralnom gojaznošću kod žena i boljim lipidnim statusom kod muškaraca poreklom iz Evrope [45, 46]. Ovakvi rezultati nisu zapaženi kod drugih etničkih grupa. Takođe, nije uočen povoljan uticaj prisustva ovog polimorfizma na indeks telesne mase (ITM), visinu arterijskog krvnog pritiska, koncentraciju glukoze i insulina u krvi.

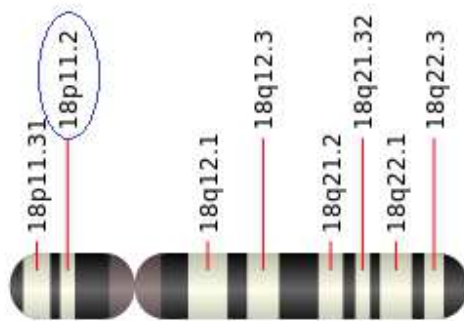
Poznato je da prisustvo AUUUA motiva na 3'NTR kraju smanjuje stabilnost iRNK, tako da se može zaključiti da postojanje *A3669G* polimorfizma dovodi do povećane stabilnosti GR β iRNK, a time i veće ekspresije GR β proteina.

Mada ovaj polimorfizam može biti prisutan u dužem GR α transkriptu (egzoni 1-9 α i 9 β), njegovi efekti na nivoe GR α nisu izučavani, ali mogu biti ublaženi ekspresijom kraćeg GR α transkripta (egzoni 1-9 α), koji ne sadrži polimorfizam, kao i činjenicom da u okviru dužeg GR α transkripta postoji trinaest AUUUA motiva, dok su u GR β transkriptu prisutna samo četiri. Prisustvo *A3669G* polimorfizma u jednom, ili oba alela može smanjiti osetljivost na endogene glukokortikoide i rezultovati fenotipom koji je zaštićen od nepoželjnih efekata glukokortikoida na distribuciju masnog tkiva, metabolizam glukoze i lipida, kao i arterijski krvni pritisak [47].

1.2. Adrenokortikotropni receptor

Humani adrenokortikotropni receptor (ACTHR) pripada superfamiliji receptora koji se vezuju za G protein. Adrenokortikotropni receptor ima važnu ulogu u regulaciji adrenalne sekrecije kortizola. Pošto se glukokortikoidi ne skladište u kori nadbubrežnih žlezda, regulacija sekrecije kortizola zavisi od adrenalne steroidogeneze. Glavni hormon koji reguliše sintezu glukokortikoida i androgena u nadbubrežnoj žlezdi u zoni fascikulata i zoni retikularis je adrenokortikotropni hormon, čija sinteza se odvija u prednjem režnju hipofize.

Hormon ACTH se vezuje za ACTH receptor, poznat i kao melanokortinski receptor 2 (MC2R). ACTH receptor se sastoji od 297 aminokiselina, a molekulska masa mu je 33 kDa. Gen za humani ACTH receptor nalazi se u okviru hromozoma 18, na poziciji 18p11.2 (Slika 2.1.) i čine ga dva egzona, od kojih prvi egzon nije kodirajući. Kompletan sekvenca ACTH receptora sadrži sedam hidrofobnih domena koji spadaju u transmembranske segmente [48] .



Slika 1.8.: Genomska lokalizacija humanog adrenokortikotropnog receptora na hromozomu 18.

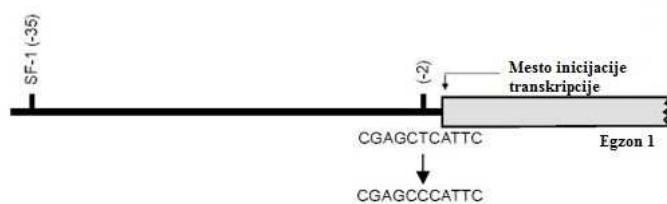
ACTH receptor je lokalizovan u okviru zone fascikulata adrenalnog korteksa. Vezivanje hormona ACTH za ovaj receptor stimuliše produkciju kortizola. Nakon vezivanja za svoj receptor ACTH aktivira put adenilat ciklaze (cAMP), nakon čega se aktivira protein kinaza A (PKA) [49]. Takođe je opisana i indukcija drugih signalnih

transdukcionih kaskada od strane ACTH, kao što je protein kinaza C [50], influks kalcijuma putem kalcijumskih kanala tipa T i put lipooksigenaze [51].

Zapažena je neuobičajena pojava u regulaciji gena za ACTHR, tačnije tzv. apregulacija iRNK za ACTHR od strane liganda za sam receptor, koja dovodi do prolongiranja poluživota iRNK [52]. Ovi *in vitro* nalazi bi mogli da objasne molekularnu osnovu klinički uočenog brzog pada adrenalnog odgovora na ACTH, nakon supresije endogenog ACTH, koji se popravlja par sati nakon egzogenog unosa ACTH [53]. Identifikovano je nekoliko mogućih CREs (eng. cAMP responsive elements) u promotoru gena za humani ACTH receptor, što ukazuje na moguće transdukционе efekte ACTH na transkripciju gena za ACTH receptor putem cAMP [54]. Ipak, direktni dokazi za ulogu CREs u regulaciji gena za ACTH receptor još nisu poznati.

1.2.1. Polimorfizam u promotoru gena za ACTH receptor

Poslednjih desetak godina opisano je prisustvo više polimorfizama u promotorskom regionu gena za humani ACTH receptor, ali za većinu njih fiziološki značaj još uvek nije dovoljno poznat. Ipak, za polimorfizam u promotorskom regionu gena za humani ACTH receptor, u okviru mesta za inicijaciju transkripcije, na poziciji -2 u odnosu na egzon 1, koji je definisan kao promena CTC u CCC, dostupno je više podataka (Slika 2.2.).



Slika 1.9.: Shematski prikaz pozicije polimorfizma u promotorskom regionu gena za humani ACTH receptor. Pozicija polimorfizma data je relativno u odnosu na njegovu udaljenost od egzona 1. (Preuzeto i modifikovano iz Slawik et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004).

Istraživanje ovog polimorfizma pružilo je *in vitro* dokaze za redukovanu promotorsku aktivnost polimorfnog ACTH receptora, zasnovane na eksperimentima transfekcije, kao i

in vivo dokaze na osnovu rezultata ACTH i CRH stimulacionih testova. Pošto je testiranje zdrave muške populacije sa područja južne Nemačke pokazalo značajno prisustvo ovog polimorfizma, istražena je mogućnost njegovog fiziološkog značaja na aktivaciju HPA ose. Rezultati istaživanja su pokazali da je kod osoba sa prisutnim polimorfizmom odgovor kortizola na ACTH stimulaciju bio slabiji. [55].

2. Cilj rada

Imajući u vidu ove činjenice, opredelili smo se da utvrdimo da li prisustvo funkcionalnih polimorfizama u genima za glukokortikoidi receptor i receptor za adrenokortikotropni hormon može uticati na povećanu osetljivost za nastanak unilateralnih adrenalnih incidentaloma.

U tu svrhu formirane su dve ciljne grupe ispitanika. Prvu ciljnu grupu su činili pacijenti sa slučajno otkrivenim tumorima kore nadbubrežnih žlezda, a drugu zdravi dobrovoljci.

Za detekciju polimorfizama korišćena je DNK dobijena iz leukocita periferne krvi pacijenata sa adrenalnim incidentalomima, DNK dobijena iz leukocita periferne krvi zdravih dobrovoljaca, kao i DNK dobijena iz dostupnih uzoraka tumorskog tkiva ispitivanih pacijenata.

Takođe su imunohistohemijskom metodom analizirani uzorci tkiva adrenokortikalnih adenoma i odgovarajućeg peritumorskog tkiva ispitivanih pacijenata, koji su bili dostupni nakon izvršenih hirurških tretmana, kao i kontrolne zdrave nadbubrežne žlezde, kako bi se stekao uvid u ekspresiju glukokortikoidnog receptora.

Kod obe ciljne grupe su praćeni osnovni metabolički, biohemijski i antropometrijski parametri, kako bi se utvrdilo eventualno postojanje veze između genotipa i fenotipa.

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem trebalo bi da doprinesu boljem upoznavanju molekularne osnove različite individualne osetljivosti na glukokortikoide u humanoj populaciji i pruže mogućnost boljeg razumevanja uzroka nastanka adrenalnih incidentaloma.

3. Učesnici u studiji, materijal i metode

3.1. Učesnici u studiji

Uzorci korišćeni u ovom istraživanju dobijeni su iz Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS. Istraživanje je odobrio Etički odbor KCS. Od svih učesnika u studiji dobijen je informisani pristanak za učestvovanje u istraživanju.

U studiju su uključeni pacijenti sa unilateralnim adrenalnim incidentalomima koji su na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS bili hospitalizovani u periodu 2006. – 2007. godine radi detaljnog kliničkog ispitivanja.

U studiju je bilo uključeno ukupno 212 ispitanika, od kojih su 112 bili pacijenti sa unilateralnim adrenalnim incidentalomima (83 žene, starost 25-80 godina), kao i 100 zdravih dobrovoljaca (65 žena, starost 28-76 godina). Svih pacijenata sa adrenalnim incidentalomima koji su bili uključeni u ovo istraživanje su imali unilateralne adrenokortikalne adenome.

Kriterijumi za uključivanje u studiju su bili:

- a) Slučajno otkrivanje adrenalnog tumora radiološkim pregledom zbog razloga koji nije u vezi sa sumnjom na postojanje adrenalnog tumora
- b) Odsustvo simptoma i znakova endokrino/neuroendokrinog obolenja i hipokalemije (≤ 3.5 mmol/L)
- c) Odsustvo abnormalnosti u vrednostima 17-hidroprogesterona, mineralokortikoida (PRA i aldosteron), androgenih hormona (ukupni testosteron, androstenedion i DHEA), ili koncentraciji kateholamina u dvadesetčetvoročasovnom urinu
- d) Radiološki potvrđeno odsustvo malignih promena

Prisustvo adrenalnog tumora je kod svih pacijenata potvrđeno tehnikama kompjuterizovane tomografije (CT), ili magnetne rezonance (MR).

Da bi se utvrdio ritam sekrecije kortizola tokom 24 h kod svih pacijenata su određene vrednosti kortizola u 09 h, 20 h i 24 h. Svim pacijentima su određene koncentracije ACTH u plazmi, a takođe su podvrgnuti i testu supresije sa 1 mg deksametazona preko noći.

Prisustvo adrenokortikalnih adenoma je potvrđeno i patohistološkom analizom kod 40 pacijenata koji su bili i hirurški tretirani. Tumorsko tkivo sa, ili bez peritumorskog tkiva je bilo dostupno za 32 od 40 pacijenata sa adrenokortikalnim adenomima.

Zdravi dobrovoljci koji su činili kontrolnu grupu bili su usaglašeni na osnovu starosti, pola i indeksa telesne mase sa pacijentima. Kontrolni subjekti su uključeni u studiju nakon što je kod svakog od njih ultrazvučnim pregledom potvrđeno odsustvo adrenalnog tumora.

Leukociti iz kojih je izolovana DNK dobijeni su iz venske krvi. Pet mililitara venske krvi uzeto je pravilnom venepunkcijom površinske vene nadlaktice, u sterilnu epruvetu sa antikoagulacionim sredstvom (0.129 M $C_6H_5O_7 \cdot Na_3 \cdot 2H_2O$).

Po pet mililitara venske krvi za određivanje osnovnih metaboličkih i biohemijskih parametara, takođe je dobijeno venepunkcijom površinske vene nadlaktice u epruvetu sa antikoagulacionim sredstvom (EDTA) i epruvetu koja nije sadržala nikakav reagens.

Osnovni antropometrijski parametri su određeni standardnim metodama, kako bi se izvršila korelacija sa genotipom.

3.2. Izolovanje DNK iz uzoraka

Za izolovanje DNK iz leukocita periferne krvi korišćen je komercijalni kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemačka). Postupak je izveden prema uputstvu proizvođača. Izolovanje DNK iz tkiva izvedeno je primenom standardne fenol-hloroform metode uz korišćenje proteinaze K.

Koncentracije dobijenih DNK određene su spektrofotometrijskom metodom na aparatu Gene Quant Pro (GE healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija).

3.3. PCR metoda

Da bi utvrdili moguće prisustvo polimorfizama *ER22/23EK*, *BclII*, *N363S* i *A3669G* u genu za hGR, kao i promotorskom regionu gena za humani ACTH receptor, urađene su PCR amplifikacije sa specifično dizajniranim PCR prajmerima (eng. *primers*), u aparatu

Thermocycler T3 Combi (Biometra, Goettingen, Nemačka). Svi prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa Primer 3 (v. 0.4.0.).

Za određivanje *ER22/23EK* polimorfizma dizajnirani su PCR prajmeri koji ograničavaju kodone 22 i 23 u egzonu 2 gena za hGR, čije su sekvence:

Direktan PCR prajmer: 5' – GATTCGGAGTTAACTAAAAG – 3'

Reverzni PCR prajmer: 5' – ATCCCAGGTCATTTCCCATC – 3'

PCR produkt veličine 482 bp amplifikovan je u volumenu od 25 µl koji je sadržao:

- 100 ng genomske DNK
- 1x Taq pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂)
- Po 0.5 µM svakog PCR prajmera
- 100 µM dNTP mešavine (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 1.5 mM MgCl₂
- 1 U Platinum Taq DNK polimeraze (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, SAD)
- Sterilnu redestilovanu vodu do 25 µl

PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima:

- Inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 5 min
- 29 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 30 s, anilinga na 58°C u trajanju od 30 s i ekstenzije na 72°C u trajanju od 1 min
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min

Na osnovu lokalizacije *BcII* polimorfizma u genu za hGR, dizajnirani su PCR prajmeri koji ograničavaju *BcII* polimorfno mesto na poziciji 647 bp od veze egzon 2/intron 2. Sekvence dizajniranih prajmera su:

Direktan PCR prajmer: 5' – AAATTGAAGCTTAACAATTTTGGC – 3'

Reverzni PCR prajmer: 5' – GCAGTGAACAGTGTACCAGACC – 3'

PCR produkt veličine 206 bp amplifikovan je u volumenu od 25 µl koji je sadržao:

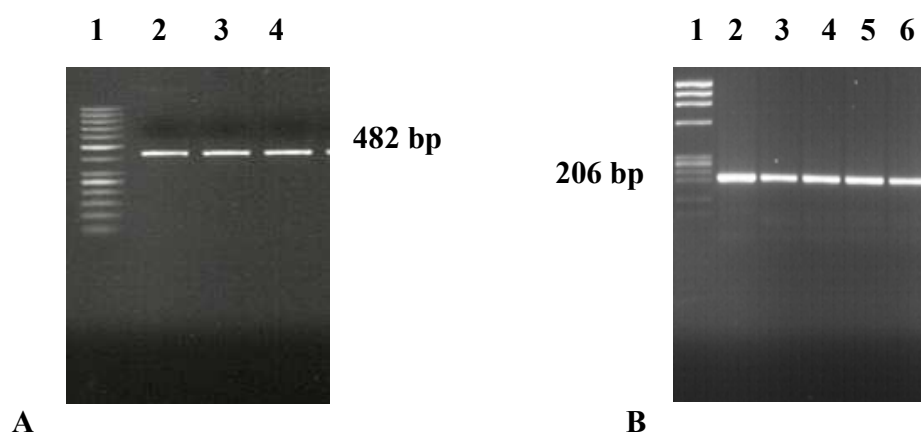
- 100 ng genomske DNK
- 1x Taq pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂)
- Po 0.5 µM svakog PCR prajmera
- 100 µM dNTP mešavine (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 1.5 mM MgCl₂

- 1 U Platinum Taq DNK polimeraze (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, SAD)
- Sterilnu redestilovanu vodu do 25 μ l

PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima:

- Inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 5 min
- 40 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 30 s, anilinga na 59°C u trajanju od 30 s i ekstenzije na 72°C u trajanju od 45 s
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min

Prisustvo PCR produkata je provereno na 2% agaroznom gelu u sistemu za horizontalnu elektroforezu Blue Marine 200 (Serva, Heidelberg, Nemačka), a njihova veličina je određena uz pomoć O'Gene Ruler 50 bp Ladder ready-to-use hromatografski prečišćenih fragmenata DNK (Thermo Scientific, Waltham, SAD) i fragmenata DNK virusa Φ X-174-RF dobijenih digestijom sa Hae III Digest (GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija), redom (Slika 4.1).



Slika 4.1.: **A** - PCR za ER22/23EK polimorfizam u genu za GR: 1 – O'Gene Ruler 50 bp Ladder ready-to-use, hromatografski prečišćeni fragmenti DNK veličina 50–1000 bp; 2-4 PCR produkti veličine 482 bp. **B** - PCR za BclI polimorfizam u genu za GR: 1 - fragmenti DNK virusa Φ X-174-RF dobijeni digestijom sa Hae III; 2-6 PCR produkti veličine 206 bp.

Za detekcije *N363S* polimorfizma u okviru egzona 2 hGR primenili smo alel-specifičnu PCR metodu. U tu svrhu su dizajnirani PCR prajmeri koji ograničavaju 363. kodon u okviru egzona 2 hGR, kao i specifični reverzni prajmeri koji se mogu vezati za DNK lanac samo ako je u njemu prisutan *N363S* polimorfizam, ili ako nema polimorfne promene u DNK. Sekvence ovih prajmera su:

Direktan PCR prajmer: 5' – CCAGTAATGTAACTGCCCC – 3'

Reverzni PCR prajmer: 5' – TTCGACCAGGGAAGTTCAGA – 3'

Reverzni 363M prajmer: 5' – ATCCTTGGCACCTATTCCAAC – 3'

Reverzni 363W prajmer: 5' – ATCCTTGGCACCTATTCCAAT – 3'

Na ovaj način su PCR amplifikacijom dobijeni osnovni produkt veličine 357 bp i kontrolni produkt veličine 306 bp. Za svaki uzorak su urađene dve PCR reakcije u volumenu od 25 µl, od kojih je svaka sadržala:

- 130 ng genomske DNK
- 1x Taq pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂)
- 0.5 µM direktnog PCR prajmera
- Po 0.5 µM reverznog i/ili reverznog 363M/363W PCR prajmera
- 100 µM dNTP mešavine (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 1 U Platinum Taq DNK polimeraze (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, SAD)
- Sterilnu redestilovanu vodu do 25 µl

PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima:

- Inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 min
- 35 ciklusa denaturacije na 95°C u trajanju od 1 min, anilinga na 64°C u trajanju od 1 min i ekstenzije na 72°C u trajanju od 1 min
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min

Za utvrđivanje prisustva *A3669G* polimorfizma, shodno njegovoj lokalizaciji u egzonu 9β gena za hGR, dizajnirani su specifični PCR prajmeri čije su sekvence:

Direktan PCR prajmer: 5' – AGTGTCTTTTACCTACGCA – 3'

Reverzni PCR prajmer: 5' – ATGTTTCTCCATATTTGGCA – 3'

PCR produkt veličine 172 bp amplifikovan je u volumenu od 25 µl, koji je sadržao:

- 150 ng genomske DNK

- 1x Taq pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂)
- Po 0.5 µM svakog PCR prajmera
- 100 µM dNTP mešavine (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 1 U Platinum Taq DNK polimeraze (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, SAD)
- Sterilnu redestilovanu vodu do 25 µl

PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima:

- Inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 min
- 29 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 30 s, anilinga na 53°C u trajanju od 30 s i ekstenzije na 72°C u trajanju od 1 min
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min

Da bi utvrdili postojanje ACTH polimorfizma u promotorskom regionu ACTH gena, takođe su dizajnirani odgovarajući PCR prajmeri sledećih sekvenci:

Direktan PCR prajmer: 5'–GCGCGCGCAGATCTAAGCAGGAACCTTCTGGG– 3'

Reverzni PCR prajmer: 5' – CGGGGTACCGGGATGACATTTATTCAAGG – 3'

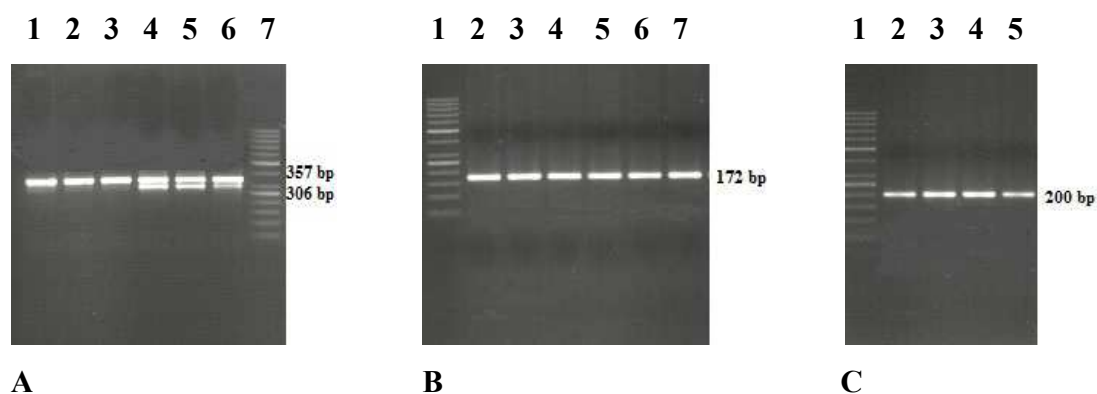
PCR produkt veličine 200 bp amplifikovan je u volumenu od 25 µl, koji je sadržao:

- 130 ng genomske DNK
- 1x Taq pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂)
- Po 0.5 µM svakog PCR prajmera
- 100 µM dNTP mešavine (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 1 U Platinum Taq DNK polimeraze (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, SAD)
- Sterilnu redestilovanu vodu do 25 µl

PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima:

- Inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 min
- 29 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 30 s, anilinga na 57°C u trajanju od 30 s i ekstenzije na 72°C u trajanju od 1 min
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min

Prisustvo PCR produkata za detekciju eventualnog postojanja polimorfizama *N363S* i *A3669G* u genu za hGR i promotorskog polimorfizma u genu za ACTH receptor provereno je, takođe, na 2% agaroznom gelu u sistemu za horizontalnu elektroforezu Blue Marine 200 (Serva, Heidelberg, Nemačka), a njihova veličina je bila određena uz pomoć O'Gene Ruler 50 bp Ladder ready-to-use hromatografski prečišćenih fragmenata DNK (Thermo Scientific, Waltham, SAD) (Slika 4.2).



Slika 4.2.: **A** – Alel-specifični PCR za *N363S* polimorfizam u genu za GR: 1-3 PCR produkti veličine 357 bp bez prisutnog polimorfizma *N363S*; 4-6 produkti veličine 306 i 357 bp sa prisutnim polimorfizmom *N363S*; 7 – O'Gene Ruler 50 bp Ladder ready-to-use, hromatografski prečišćeni fragmenti DNK veličina 50–1000 bp. **B** - PCR za *A3669G* polimorfizam u genu za GR: 1 – O'Gene Ruler 50 bp Ladder ready-to-use, hromatografski prečišćeni fragmenti DNK veličina 50–1000 bp; 2-7 PCR produkti veličine 172 bp. **C** - PCR za promotorski polimorfizam u genu za ACTH receptor: 1 – O'Gene Ruler 50 bp Ladder ready-to-use, hromatografski prečišćeni fragmenti DNK veličina 50–1000 bp; 2-5 PCR produkti veličine 200 bp.

3.4. RFLP metoda

RFLP metoda (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), iako se danas može smatrati delimično zastarelom, je bila prva metoda koja se koristila za profilisanje DNK, a zbog svoje pouzdanosti i relativno niske cene se i dalje široko primenjuje.

Sama tehnika RFLP analize podrazumeva fragmentisanje uzorka DNK pomoću odgovarajućeg restrikcionog enzima, koji prepoznaje i seče DNK na mestima gde je prisutna specifična kratka sekvenca, a sam proces se naziva restrikciona digestija. Dobijeni DNK fragmenti se, u zavisnosti od njihove dužine, razdvajaju tokom procesa elektroforeze na agaroznom gelu. Takođe, RFLP analiza pruža i mogućnost utvrđivanja da li su oba ili samo jedan alel polimorfni.

U ovom istraživanju RFLP metodom smo želeli da utvrdimo da li su ispitanici eventualni nosioci polimorfnih alela u *ER22/23EK*, i *BclI* polimorfizmima u GR genu, kao i genu za ACTHR.

3.5. Direktno sekvenciranje DNK

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

3.6. Biohemijske metode

Osnovni biohemijski parametri: glikemija, ukupni holesterol i trigliceridi određeni su iz seruma venske krvi sledećim metodama:

- *Glikemija* je određena na aparatu Beckman Glucose Auto-Analyser (Beckman, Fullerton, SAD) enzimskom metodom sa enzimom glukoznom oksidazom, korišćenjem komercijalnog kita prema uputstvu proizvođača (Randox, Crumlin, Velika Britanija).
- *Ukupni holesterol* je određen na aparatu Olympus AU 400 Biochemical Analyser enzimskom *end-point* metodom sa enzimom holesterolskom esterazom, korišćenjem komercijalnog kita prema uputstvu proizvođača (Randox, Crumlin, Velika Britanija).
- *Trigliceridi* su određeni na aparatu Olympus AU 400 Biochemical Analyser enzimskom metodom sa enzimom lipazom, korišćenjem komercijalnog kita prema uputstvu proizvođača (Randox, Crumlin, Velika Britanija).

3.7. Metode za određivanje metaboličkih parametara

Kod pacijenata sa adrenalnim incidentalomima i zdravih dobrovoljaca praćeni su sledeći metabolički parametri: kortizol, insulin i ACTH. Svi navedeni metabolički parametri određeni su iz seruma venske krvi radioimunološkom metodom (RIA).

Nivo kortizola u serumu je određen RIA metodom uz korišćenje komercijalnog kita CORT-CT2 (CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette Cedex, Francuska), prema uputstvu proizvođača. Minimalna koncentracija kortizola koju je bilo moguće detektovati iznosila je 4.6 nmol/L, intra i inter esej koeficijenti varijacije su bili 5.4% i 7.3%, redom.

Nivo insulina u serumu je određen RIA metodom uz korišćenje RIA Insulin (PEG) komercijalnog kita (INEP Dijagnostika, Beograd, Srbija), prema uputstvu proizvođača. Donji limit osetljivosti bio je 3.0 mU/L, a intra i inter esej koeficijenti varijacije su bili <10.0%.

Nivo ACTH u serumu je određen RIA metodom uz korišćenje ELSA-ACTH komercijalnog kita (CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette Cedex, Francuska), prema

uputstvu proizvođača. Osetljivost metode je bila 5 pg/mL, sa intra i inter esej koeficijentima varijacije u rasponu od 3.1% do 8.9%.

3.8. Antropometrijski parametri

Svakom učesniku istraživanja su pri ulasku u studiju određeni sledeći antropometrijski parametri : telesna težina (TT), Telesna visina (TV) i obim struka (OS). Takođe je za svakog učesnika izračunat indeks telesne mase (ITM, eng. *BMI*) i određena vrednost arterijskog krvnog pritiska (TA).

3.9. Imunohistohemijska metoda

Primena imunohistohemijske metode pruža mogućnost dobijanja dodatnih informacija u pogledu boljeg razumevanja distribucije i lokalizacije određenih biomarkera, kao i ekspresije pojedinih proteina u različitim tkivima. Upravo iz tog razloga je ova metoda primenjena i u našem istraživanju, kako bi se stekao uvid u ekspresiju glukokortikoidnog receptora u adrenokortikalnim adnomima i peritumorskom tkivu, kao i u zdravim humanim nadbubrežnim žlezdama.

Patohistološki uzorci dobijeni sečenjem 19 parafinskih kalupa adrenokortikalnih adenoma, kao i 13 parafinskih kalupa odgovarajućeg peritumorskog tkiva, podvrgnuti su imunohemijskoj analizi. Takođe je analizirano i 11 sveže zamrznutih, ili parafinskih uzoraka zdravog humanog adrenalnog tkiva, kao pozitivne imunohistohemijske kontrole. Imunoreaktivnost glukokortikoidnog receptora je određena korišćenjem poliklonskog antitela za GR dobijenog imunizacijom zeca (M-20; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD), koje prepoznaje N-terminus GR receptora (razblaženje 1:300) i streptavidin – biotin kompleks metodom uz primenu odgovarajućeg kita (DAKO – LSAB+/ Peroxidase Labeling Kit; DAKO, Kopenhagen, Danska).

Antitelo na GR receptor koje je korišćeno u ovom istraživanju prepoznaje kako α , tako i β izoformu humanog GR. Iz tog razloga je primenom iste tehnike imunobojenja određena imunoreaktivnost β izoforme GR, a u tu svrhu je korišćeno poliklonsko antitelo na GR β zeca (PA3-514; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD). Za imunohistohemijsku

analizu su korišćeni serijski preseći parafinskog kalupa svakog uzorka, debljine 5 μm . Nakon deparafinizacije, preseći su zagrevani na pari pod pritiskom u trajanju od 2 minuta, u citratnom puferu koncentracije 10 mmol/L (pH 6.0), kako bi se oslobodio epitop. Endogena peroksidazna aktivnost je blokirana tretiranjem preseka 0.3% rastvorom vodonik peroksida u metanolu. Zatim su preseći tkiva inkubirani u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi, sa antitelom koje prepoznaje glukokortikoidni receptor, isprani rastvorom PBS (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.4) (eng. *phosphate buffered saline*) i inkubirani sa biotinom obeleženim imunoglobulinima miša, zeca i koze u trajanju od 30 minuta. Kompleksi antigen-antitelo su vizuelizovani rastvorom 3,3'-diamino-benzidin supstrata (Liquid DAB-Substrate Chromogen Systems, ready-to-use, DAKO Cytomation; DAKO, Kopenhagen, Danska). Na kraju, ćelijski nukleusi su prebojeni Mayer hematoksilinom. Kao negativne kontrole su korišćeni kako izostavljanje primarnog antiseruma, tako i zamena prvog sloja antitela specifičnim polipeptidom za blokiranje (sc-1004P; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, SAD). Kvantifikacija nukleusne i citoplazmatske ekspresije GR je urađena primenom Analysis Pro 3.2 programa. Brojanje imunoreaktivnih ćelija je izvršeno u pet reprezentativnih zona na svakom uzorku adenoma, peritumorskog i zdravog tkiva kore nadbubrežne žlezde. Rezultati su prikazani kao broj pozitivnih na 1000 ćelija i kao intenzitet imunobojenja (slab 1+, umeren 2+ i jak 3+). Ukupan rezultat intenziteta imunobojenja je dobijen na osnovu procene 1000 ćelija za svaku od kategorija intenziteta. Pozitivnim su smatrane samo ćelije u kojima je bilo prisutno intenzivno imunobojenje nukleusa i citoplazme. Raspon izbrojanih ćelija u različitim zonama se kretao od 529 do 1086 u kortikalnim adenomima, 500 do 963 u peritumorskom tkivu i 1117 do 1403 u zdravoj kori nadbubrežne žlezde.

3.10. Statistička analiza

Za statističku analizu dobijenih rezultata korišćen je program *SPSS for Windows 13*. Dobijene vrednosti p manje od 0.05 smatrane su statistički značajnim. Takođe je korišćen i *HOMA-IR* (eng. *Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance*) model za izračunavanje insulinske rezistencije [56]. U zavisnosti od tipa varijabli korišćenih u

komparacijama, razlike između grupa su određene Pearson χ^2 testom ili *one-way* analizom varijanse. Samo su komparacije ekspresije GR između različitih uzoraka tkiva (adrenokortikalni adenomi, peritumorsko i zdravo tkivo nadbubrežnih žlezda) dobijeni *Kruskal - Wallis* testom. Za proveru odstupanja od Hardy-Vajnberg (eng. *Hardy-Weinberg*) principa primenjen je χ^2 test korišćenjem dobijenih učestalosti genotipova tokom istraživanja i očekivanih učestalosti genotipova dobijenih primenom Hardy-Vajnberg principa. Procene relativnog rizika za nastanak adrenokortikalnog tumora, kao i ORs (eng. *Odd Ratios*) izračunate su sa 95% CIs (eng. *Confidence Intervals*), te na osnovu toga izražene sa donjim i gornjim granicama. Za sve polimorfizme, osim za *BclII*, ORs su izračunati iz odnosa nosilaca manjeg alela kod pacijenata i kontrolnih subjekata. Tamo gde je učestalost bila 0, dodata je minimalna pozitivna vrednost (1) u sve četiri ćelije 2 x 2 tabele, te izračunat OR i 95% CI nakon ovih operacija. Haplotipovi za pacijente i kontrolne subjekte su određeni korišćenjem programa *Phase* (verzija 2.1, Matthew Stephens Lab, University of Chicago, Chicago, SAD) [57].

4. Rezultati

4.1. Distribucija učesnika studije u odnosu na kliničke karakteristike

Tokom našeg istraživanja je praćen veći broj parametara, kako kod pacijenata, tako i kod kontrolnih subjekata te su dobijeni rezultati podeljeni po grupama i statistički analizirani.

Rezultati dobijeni određivanjem antropometrijskih karakteristika kod obe grupe ispitanika sa standardnim devijacijama i statističkom značajnošću prikazani su u tabeli 1.

Rezultati dobijeni određivanjem biohemijskih i metaboličkih parametara za obe ispitivane grupe sa standardnim devijacijama i statističkom značajnošću su prikazani u tabeli 2.

Tabela 1: Rezultati dobijeni određivanjem antropometrijskih karakteristika kod obe grupe ispitanika sa standardnim devijacijama i statističkom značajnošću.

Parametar	Pacijenti (%)	Zdravi dobrovoljci (%)	p
Br. učesnika	112	100	
Starost (godine)	53.4 ± 9.9	52.3 ± 9.4	0.398
Žene (%)	83 (74.1)	65 (65)	0.228
ITM (kg/m ²)	27.5 ± 4.4	27.1 ± 4.4	0.370
OS (cm)	90.0 ± 12.9	88.0 ± 12.0	0.260
≥88 cm za žene i ≥102 cm za muškarce (%)	50 (44.6)	26 (26)	0.006
Sistolni TA (mmHg)	146.9 ± 36.1	128.3 ± 14.4	<0.0001
Dijastolni TA (mmHg)	89.4 ± 18.3	81.0 ± 8.5	<0.0001
Sistolni TA ≥140 mmHg i/ili Dijastolni TA ≥90 mmHg (%)	50 (44.6)	18 (18)	<0.0001

Tabela 2: Rezultati dobijeni određivanjem biohemijskih i metaboličkih parametara kod obe grupe ispitanika sa standardnim devijacijama i statističkom značajnošću.

Parametar	Pacijenti (%)	Zdravi dobrovoljci (%)	p
Broj učesnika	112	100	
Glukoza			
>6.1 mmol/L (%)	13 (11.6)	7 (7)	0.118
Holesterol (mmol/L)	5.8 ± 1.5	5.7 ± 1.2	0.429
Trigliceridi (mmol/L)	1.8 ± 0.8	1.6 ± 1.0	0.081
Holesterol ≥5.2 mmol/L i/ili Trigliceridi ≥1.8 mmol/L (%)	68 (60.7)	64 (64)	0.885
Bazni insulin (mU/L)	16.5 ± 10.4	14.9 ± 5.0	0.182
HOMA-IR	4.1 ± 4.6	3.3 ± 1.4	0.074
Bazni kortizol (nmol/L)	416.3 ± 166.2	400.4 ± 146.7	0.473
Post-Deks kortizol (nmol/L)	72.4 ± 67.1	33.6 ± 16.1	<0.0001

Dobijeni rezultati nisu pokazali prisustvo statistički značajne razlike u obimu struka između pacijenata i kontrolnih subjekata, ali se može zapaziti da su vrednosti veće od 88 cm kod žena i 102 cm kod muškarca bile su znatno češće u grupi pacijenata. Oni su takođe imali i više vrednosti arterijskog krvnog pritiska i glikemije, ali ne i HOMA-IR indeksa.

U okviru rezultata dobijenih ovim istraživanjem takođe nije uočena značajna razlika u vrednostima jutarnjeg kortizola između dve grupe ispitanika, ali su postdeksametazonske vrednosti kortizola bile značajno niže kod kontrolnih subjekata. U grupi pacijenata je uočena pozitivna korelacija vrednosti baznog kortizola i insulina ($r=0.19$; $p=0.043$), dok je postdeksametazonski (Post-Deks) kortizol bio u negativnoj korelaciji sa obimom struka ($r=-0.32$; $p=0.001$).

Rezultati su pokazali da je kod ispitivanih pacijenata visina sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska bila u korelaciji sa vrednostima ITM ($r=0.22$; $p=0.019$ i $r=0.21$; $p=0.022$) i vrednostima obima struka ($r=0.22$; $p=0.020$ i $r=0.23$ i $p=0.017$), a da su vrednosti glukoze bile u korelaciji sa baznim insulinom ($r=0.33$; $p<0.001$).

Za kontrolnu grupu su dobijeni rezultati pokazali da su vrednosti baznog kortizola bile u korelaciji sa vrednostima glukoze ($r=0.31$; $p=0.002$) i vrednostima ACTH ($r=0.30$; $p=0.037$), dok su koncentracije postdeksametazonskog kortizola bile u korelaciji sa vrednostima sistolnog arterijskog krvnog pritiska ($r=0.26$; $p=0.013$) i starošću ($r=-0.43$; $p=0.027$).

Takođe su u grupi kontrolnih subjekata, kao i u grupi pacijenata, vrednosti sistolnog i dijastolnog arterijskog krvnog pritiska bile u korelaciji sa ITM ($r=0.20$; $p=0.049$ i $r=0.22$; $p=0.031$) i vrednostima obima struka ($r=0.26$; $p=0.010$ i $r=0.28$; $p=0.006$).

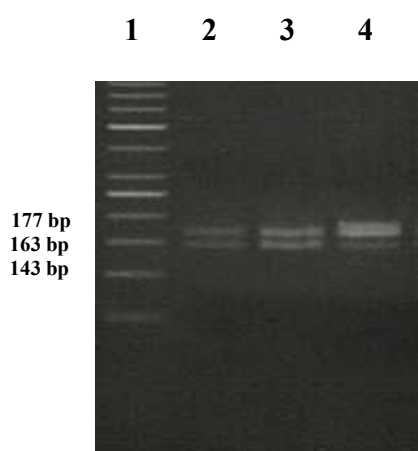
4.2. Genotipizacija

PCR produkti dobijeni nakon PCR amplifikacija specifičnih za tri ispitivana polimorfizama podvrgnuti su digestiji sa odgovarajućim restriktionim enzimima.

Nakon PCR amplifikacije sa specifičnim prajmerima za detekciju *ER22/23EK* polimorfizma i DNK dobijenom iz leukocita periferne krvi, dobijeni su PCR produkti veličine 482 bp. Po 10 µl PCR produkata je podvrgnuto digestiji sa 4 U *MnII*

restrikcionog enzima (Thermo Scientific, Waltham, SAD), na 37°C u trajanju od 16 h. Ovaj restrikcioni enzim prepoznaje sekvencu 5'...CCTC(N)₇↓...3', koja je prisutna u egzonu 2 gena za hGR. Dobijeni fragmenti su razdvojeni na 2% agaroznom gelu. Digestija PCR produkata dala je fragmente sledećih veličina (Slika 5.1.):

- 143 bp i 163 bp kod osoba koje nemaju prisutan ER22/23EK polimorfizam
- 142 bp, 163 bp i 177 bp kod heterozigotnih nosilaca ER22/23EK polimorfizma



Slika 5.1.: RFLP za PCR fragmente ER22/23EK: 1 - O'Gene Ruler 50 bp Ladder ready-to-use, hromatografski prečišćeni fragmenti DNK veličina 50–1000 bp.; 2 i 3 subjekti koji nemaju prisutan ER22/23EK polimorfizam; 4 - heterozigotni nosilac ER22/23EK polimorfizma.

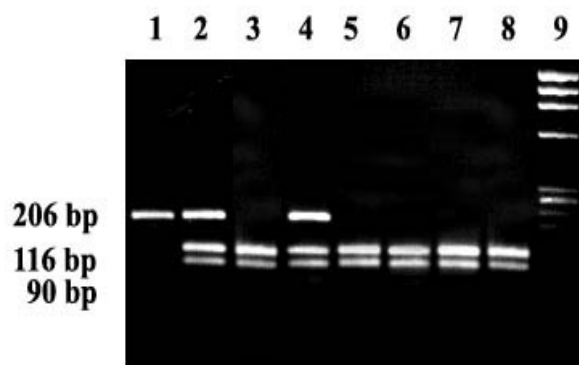
PCR amplifikacijom sa specifičnim prajmerima za detekciju *Bcl*I polimorfizma i DNK dobijenom iz leukocita periferne krvi, dobijeni su PCR produkti veličine 206 bp.

Po 10 µl PCR produkata podvrgnuto je digestiji sa 4 U *Bcl*I restrikcionog enzima (Thermo Scientific, Waltham, SAD), na 55°C u trajanju od 16 h. Ovaj restrikcioni enzim prepoznaje sekvencu 5'...T↓GATCA...3', koja je prisutna u intronu 2 gena za GR.

Dobijeni fragmenti razdvojeni su na 2% agaroznom gelu. Digestija PCR produkata dala je fragmente sledećih veličina (Slika 5.2.):

- 90 bp i 116 bp kod homozigota za kraći G alel *Bcl*I polimorfizam

- 90 bp, 116 bp i 206 bp kod osoba sa prisutnim kraćim G i dužim C alelom *BclI* polimorfizma
- 206 bp kod homozigota za duži C alel *BclI* polimorfizma



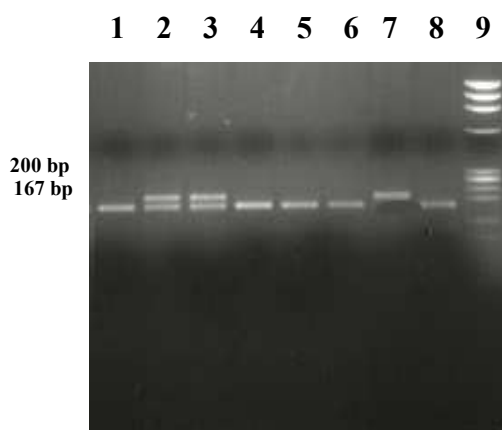
Slika 5.2.: RFLP za PCR fragmente BclI: 1- homozigot za C alel BclI polimorfizma; 2 i 4 nosioci G i C alela BclI polimorfizma; 3 i 5-8 homozigoti za G alel BclI polimorfizma; 9-fragmenti DNK virusa ΦX-174-RF dobijeni digestijom sa Hae III.

PCR amplifikacija sa prajmerima specifičnim za detekciju mogućeg prisustva promotorskog polimorfizma u genu za ACTH receptor dala je fragmente veličine 200 bp. Po 10 µl PCR produkata podvrgnuto je digestiji sa 4 U *SacI* restrikcionog enzima (Thermo Scientific, Waltham, SAD), na 37°C u trajanju od 16 h, a dobijeni fragmenti su razdvojeni na 2% agaroznom gelu. Ovaj restrikcioni enzim prepoznaje sekvencu 5' ...GAGCT↓C...3', koja je prisutna u promotorskom regionu gena za ACTH receptor.

Dobijeni fragmenti razdvojeni su na 2% agaroznom gelu. Digestija PCR produkata dala je fragmente sledećih veličina (Slika 5.3.) [55]:

- 167 bp kod osoba koje nemaju promotorski polimorfizam u genu za ACTH receptor
- 200 bp, 167 bp i 33 bp kod heterozigotnih nosilaca promotorskog polimorfizma u genu za ACTH receptor

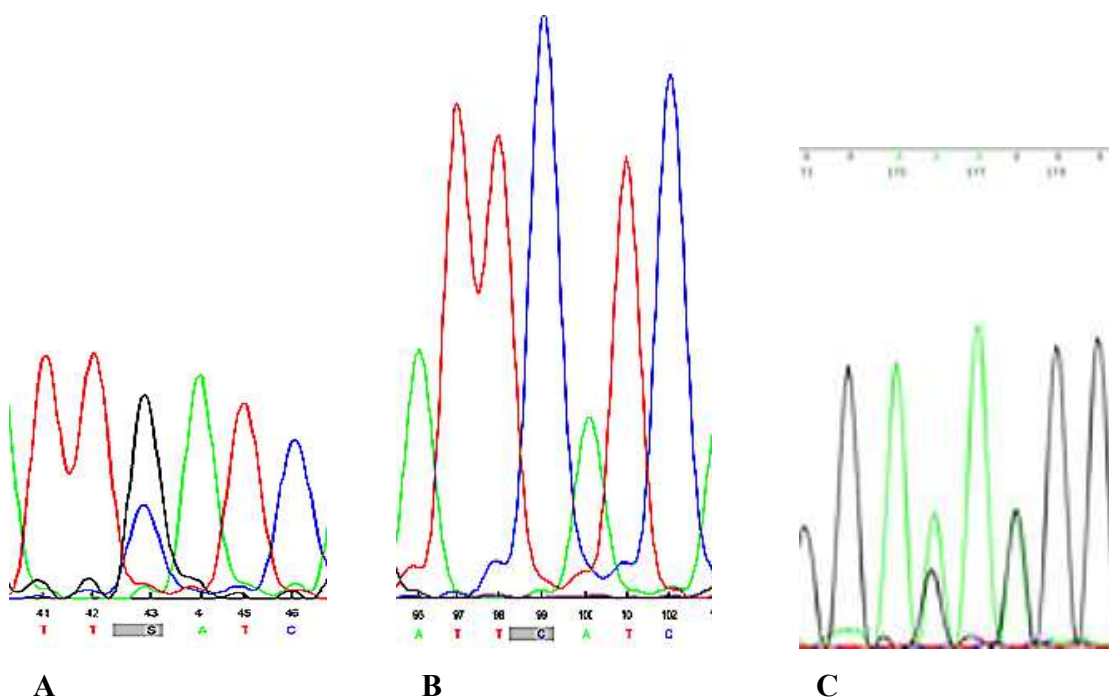
- 200 bp kod homozigotnih nosilaca promotorskog polimorfizma u genu za ACTH receptor



Slika 5.3.: RFLP za PCR fragmente ACTH polimorfizma: 1, 4-6 i 8-subjekti koji nemaju promotorski polimorfizam u genu za ACTH; 2 i 3 heterozigotni nosioci polimorfizma; 7-homozigotni nosilac promotorskog polimorfizma u genu za ACTH receptor; 9-fragmenti DNK virusa Φ X-174-RF dobijeni digestijom sa Hae III.

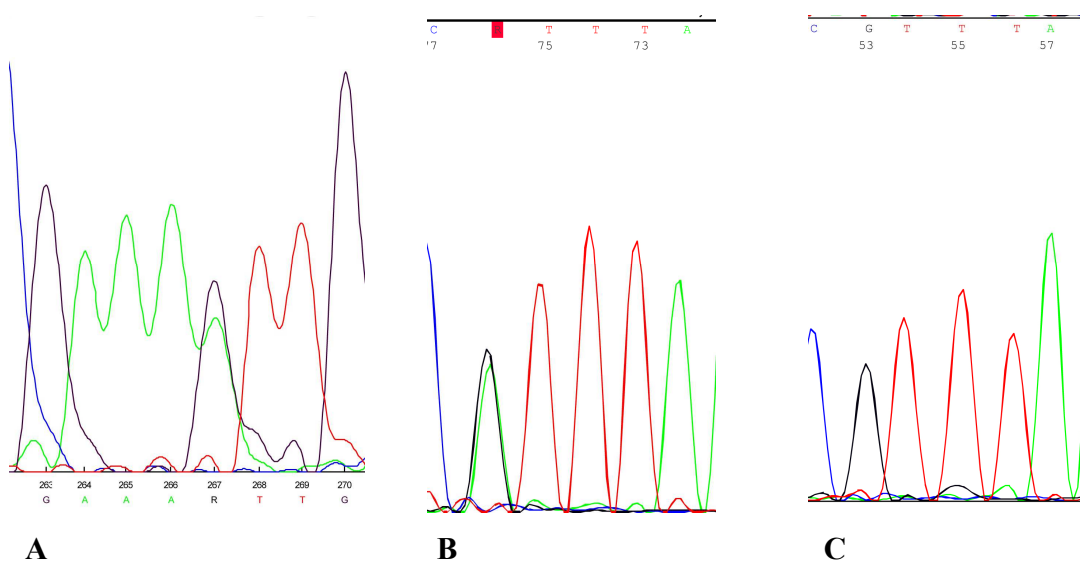
Kako bi rezultati dobijeni RFLP analizama i alel-specifičnom PCR reakcijom, za svih pet ispitivanih polimorfizama bili potvrđeni, primenjena je metoda direktnog sekvenciranja PCR amplifikata u oba pravca.

Dobijene sekvence koje ilustruju prisustvo dužeg C alela *Bcl*I polimorfizma u hetero i homozigotnom obliku, kao i *ER22/23EK* polimorfizam u heterozigotnom obliku prikazane su na slici 5.4., dok prisustvo homozigotnih nosilaca *ER22/23EK* polimorfizma nije nađeno u ispitivanim grupama.



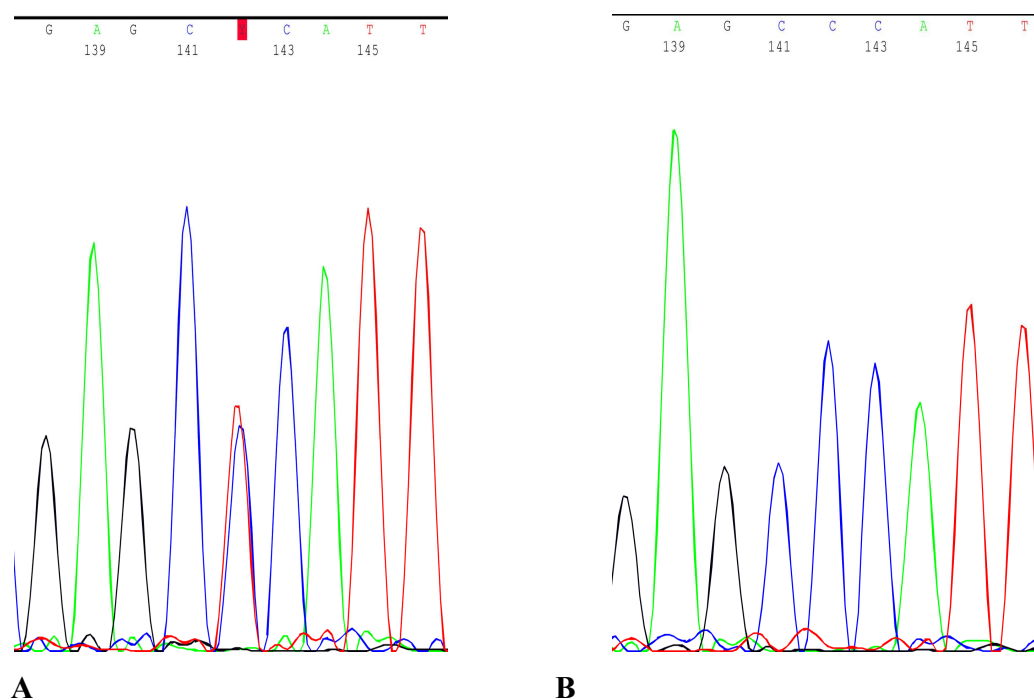
Slika 5.4.: Rezultati dobijeni sekvenciranjem DNK u delu gena za hGR gde je moguće prisustvo dužeg C alela *Bcl*I polimorfizma; **A** – C alel *Bcl*I polimorfizma prisutan u heterozigotnom obliku, S označava G/C, **B** – C alel *Bcl*I polimorfizma prisutan u homozigotnom obliku, **C** – *ER22/23EK* polimorfizam prisutan u heterozigotnom obliku.

Kako bi se potvrdilo prisustvo *N363S* i *A3669G* polimorfizama u genu za humani glukokortikoidni receptor odgovarajući PCR amplifikati su takođe direktno sekvencirani, a dobijeni rezultati koji ilustruju heterozigotno prisustvo *N363S* polimorfizma, kao i heterozigotno i homozigotno prisustvo *A3669G* polimorfizma su prikazani na slici 5.5. Nije nađeno prisustvo homozigotnih nosilaca *N363S* polimorfizma u obe ispitivane grupe.



Slika 5.5.: Rezultati dobijeni sekvenciranjem DNK u delu gena za hGR gde je moguće prisustvo *N363S* i *A3669G* polimorfizama; **A** – *N363S* polimorfizam prisutan u heterozigotnom obliku, R označava A/G, **B** – *A3669G* polimorfizam prisutan u heterozigotnom obliku, R označava A/G, **C** – *A3669G* polimorfizam prisutan u homozigotnom obliku.

Direktnim sekvenciranjem PCR produkata potvrđeni su i rezultati heterozigotnog i homozigotnog prisustva promotorskog polimorfizma u genu za humani ACTH receptor (Slika 5.6.).



*Slika 5.6.: Rezultati dobijeni sekvenciranjem DNK u promotorskom delu gena za hACTHR gde je moguće prisustvo polimorfizma; **A** – Promotorski ACTHR polimorfizam prisutan u heterozigotnom obliku, **Y** označava T/C, **B** – Promotorski ACTHR polimorfizam prisutan u homozigotnom obliku.*

Nakon genetičke analize DNK pripadnika obe grupe ispitanika, određene su učestalosti ispitivanih polimorfizama u okviru gena za glukokortikoidni i ACTH receptor (Tabela 3).

Tabela 3: Učestalosti ispitivanih polimorfizama u okviru gena za glukokortikoidni receptor i promotorskog regiona gena za ACTH receptor kod pacijenata i kontrolnih subjekata sa statističkom značajnošću.

Polimorfizmi	Pacijenti (%)	Kontrole (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
Broj ispitanika	112	100		
<i>BclII</i> (TGA→TCA)				
GG	46 (41.1)	66 (66.0)	Referentni	
GC	55 (49.1)	30 (30.0)	2.2 (1.3-4.0)	0.005
CC	11 (9.8)	4 (4.0)	2.6 (0.8-8.4)	0.110
Nosioci alela C	66 (58.9)	34 (34.0)	2.9 (1.7-5.1)	<0.001
<i>N363S</i> (ATT→ GTT)				
AA	104 (92.9)	95 (95.0)	Referentni	
AG	8 (7.1)	5 (5.0)	1.48 (0.4-4.6)	0.509
<i>ER22/23EK</i> (GAGAGG→GAAAAG)				
GG	109 (97.3)	99 (99.0)	Referentni	
AA	3 (2.7)	1 (1.0)	2.7 (0-3-26.8)	0.385
<i>A3669G</i> (Egzon 9β)				
AA	68 (60.7)	83 (83.0)	Referentni	
AG	41 (36.6)	17 (17.0)	2.8 (1.4-5.3)	0.002
GG	3 (2.7)	0 (0.0)	3.7 (0.4-87.8)	0.217
Nosioci alela G	44 (39.3)	17 (17.0)	3.0 (1.6-5.7)	0.001
ACTHR promotorski polimorfizam (CTC→ CCC)				
TT	97 (86.6)	88 (88.0)	Referentni	
TC	14(12.5)	12 (12.0)	1.1 0.5-2.5)	0.783
CC	1 (0.9)	0 (0.0)	1.8 0.1-51.0)	0.627
Nosioci alela C	15 (13.4)	12 (12.0)	1.1 (0.5-2.5)	0.783

Rezultati dobijeni genotipizacijom obe grupe ispitanika za svih pet ispitivanih polimorfizama pokazuju značajno povećanu učestalost nosilaca dužeg C alela *BclI* polimorfizma, kao i bitno povećano prisustvo kraćeg alela *A3669G* polimorfizma u grupi pacijenata, nego u kontrolnoj grupi. Takođe je utvrđeno da se ova dva alela u okviru gena za glukokortikoidni receptor nalaze u linkidž disekvilibrirumu (eng. *linkage disequilibrium*) ($D'=0.172$).

Nakon urađene statističke obrade dobijenih rezultata nije zabeležena razlika u učestalosti *N363S* i *ER22/23EK* polimorfizama u genu za hGR između dve testirane grupe. Takođe, nije bilo razlike u učestalosti polomorfizma u okviru promotorskog regiona gena za ACTH receptor između grupe pacijenata i kontrolnih subjekata.

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

Na osnovu dobijenih rezultata vezanih za prisustvo ispitivanih polimorfizama u genu za hGR, za obe testirane grupe odredili smo tačne haplotipove i njihovu učestalost (Tabela 4).

Tabela 4: Prisutni haplotipovi i njihova učestalost kod pacijenata i kontrolnih subjekata, dobijeni na osnovu prisustva ispitivanih polimorfizama u genu za hGR

	<i>ER22/23EK</i> rs6189	<i>N363S</i> rs6195	<i>BclI</i> rs41423247	<i>A3669G</i> rs6198	Učestalost (%)	haplotipa
	rs6190				Pacijenti	Kontrole
Referentni	GG	A	G	A	48.2	72.1
Haplotip 1	GG	A	C	A	28.1	17.0
Haplotip 2	GG	A	G	G	13.7	5.6
Haplotip 3	GG	G	G	A	2.5	2.2
Haplotip 4	GG	A	C	G	5.3	2.3
Haplotip 5	GG	G	G	G	0.9	0.3
Haplotip 6	AA	A	G	G	0.7	0.3
Haplotip 7	AA	A	G	A	0.6	0.2

Dobijeni rezultati su pokazali da su se učestalosti haplotipova značajno razlikovale između dve testirane grupe ($p=0.01$). Sve učestalosti alela su bile u Hardy-Vajnberg ekvilibrijumu.

S obzirom da je homozigotno prisustvo polimorfizama u genima za glukokortikoidni i ACTH receptor nađeno kod malog broja ispitivanih subjekata, oni su pridruženi heterozigotnim nosiocima, kako bi se izvršilo poređenje grupe ispitanika koji su nosioci polimorfizama, sa grupom ispitanika kod kojih nije detektovano prisustvo polimorfizama.

Iz prikazanih rezultata se može videti da je u okviru grupe pacijenata zabeležena je povećana učestalost *BcII* i *A3669G* polimorfizama u genu za glukokortikoidni receptor u odnosu na kontrolnu grupu. Čak 66 pacijenata su bili nosioci dućeg C alela *BcII* polimorfizma, a njih 44 su imali kraći G alel *A3669G* polimorfizma. Praćenje većeg broja parametara kod ispitanika omogućilo je da se uoči da efekti prisustva ovih polimorfizama za posledicu imaju postojanje određenih kliničkih karakteristika pacijenata, koje mogu biti u vezi sa pojavom adrenalnih incidentaloma. Te karakteristike obuhvataju kako antropometrijske, tako i biohemijske i metaboličke parametre (Tabela 5).

Tabela 5: Kliničke karakteristike pacijenata sa prisutnim BclII i A3669G polimorfizmima u genu za hGR, vezane za povećani rizik za nastanak adrenalnih incidentaloma sa standardnim devijacijama i statističkom značajnošću.

	<i>BclII</i> aleli			<i>A3669G</i> aleli		
	C (n=66)	G (n=101)	<i>p</i>	A (n=109)	G (n=44)	<i>p</i>
ITM (kg/m ²)	27.1±4.1	27.9±4.5	0.366	28.1±4.5	26.4±4.1	0.042
OS (cm)	88.1±12.3	92.0±12.8	0.135	91.8±12.9	87.3±12.4	0.082
Sistolni TA (mmHg)	146.1±39.4	146.5±29.4	0.950	151.4±39.5	139.5±28.8	0.092
Dijastolni TA (mmHg)	90.2±20.4	86.7±14.4	0.327	91.0±19.5	85.8±15.9	0.147
Veličina tumora (mm)	40.6±18.1	31.1±10.6	0.002	36.2±17.0	37.9±16.7	0.607
Glukoza (mmol/L)	5.4±2.0	5.5±2.1	0.785	5.7±2.5	4.8±0.7	0.031
Ukupni holesterol (mmol/L)	5.7±1.5	6.0±1.5	0.239	5.8±1.5	5.8±1.6	0.893
Trigliceridi (mmol/L)	1.7±0.7	1.8±1.0	0.637	1.8±0.8	1.7±0.9	0.450
ACTH (pg/mL)	21.2±24.9	23.3±30.2	0.692	25.8±32.3	16.6±14.4	0.082
Kortizol Bazni (nmol/L)	419.3±166.2	413.6±169.5	0.862	385.8±156.7	449.1±177.4	0.099
Post-Deks (nmol/L)	80.7±76.8	60.8±48.1	0.129	61.0±52.8	90.2±81.6	0.025

Dobijeni rezultati su pokazali da su nosioci C alela u *BclI* polimorfizmu imali veće tumore nadbubražnih žlezda. Međutim, istovremeno prisustvo i kraćeg G alela *A3669G* polimorfizma kod određenog broja ovih ispitanika, umanjivalo je efekat C alelske varijante *BclI* polimorfizma na veličinu tumora.

Takođe je uočeno da su pacijenti sa prisutnim kraćim G alelom *A3669G* polimorfizma imali niže vrednosti ITM i glukoze, a više koncentracije kortizola nakon testa supresije deksametazonom, u odnosu na testirane ispitanike koji nisu bili nosioci ovog alela, što ukazuje na smanjenu osetljivost na glukokortikoide.

Treba napomenuti da su kod pacijenata sa prisutnim kraćim G alelom *A3669G* polimorfizma takođe uočene i povećana koncentracija baznog kortizola, kao i manje vrednosti obima struka, ali dobijeni rezultati nisu dostigli statističku značajnost.

Kod 21 pacijenta sa adrenokortikalnim adenomom je zabeleženo istovremeno prisustvo dužeg C alela *BclI* polimorfizma i kraćeg G alela u okviru polimorfizma *A3669G*. Takva vezana, konkurentna alelska varijanta dovela je do ispoljavanja određenih, specifičnih metaboličkih i antropometrijskih karakterističnih u ovoj grupi ispitanika (Tabela 6).

Tabela 6: Povezanost prisustva C alela BclI polimorfizma i G alela A3669G polimorfizma glukokortikoidnog receptora kod pacijenata sa tumorima nadbubrežnih žlezda (rezultati su prikazani sa standardnim devijacijama i statističkom značajnošću).

	Konkurentno prisustvo C alela u BclI i G alela u A3669G polimorfizmu		
	Nosioci C i G alela (n=21)	Subjekti bez C i G alela (n=91)	<i>p</i>
ITM (kg/m²)	25.3±3.7	28.1±4.4	0.010
OS (cm)	84.0±12.3	91.5±12.7	0.020
Krvni pritisak (mmHg)			
Sistolni	136.8±32.5	149.2±36.6	0.159
Dijastolni	86.1±17.3	89.7±18.5	0.434
Najveći dijametar tumora (mm)	41.7±20.3	36.2±15.7	0.177
Glukoza (mmol/L)	4.7±0.9	5.6±2.2	0.095
Ukupni holesterol (mmol/L)	5.7±.7	5.8±1.5	0.839
Trigliceridi (mmol)	1.8±0.8	1.8±0.8	0.964
ACTH (pg/mL)	14.8±7.4	24.0±29.5	0.148
Kortizol			
Bazni (nmol/L)	489.9±187.5	399.3±157.2	0.024
Post-Deks (nmol/L)	124.5±103.6	60.2±48.7	<0.001

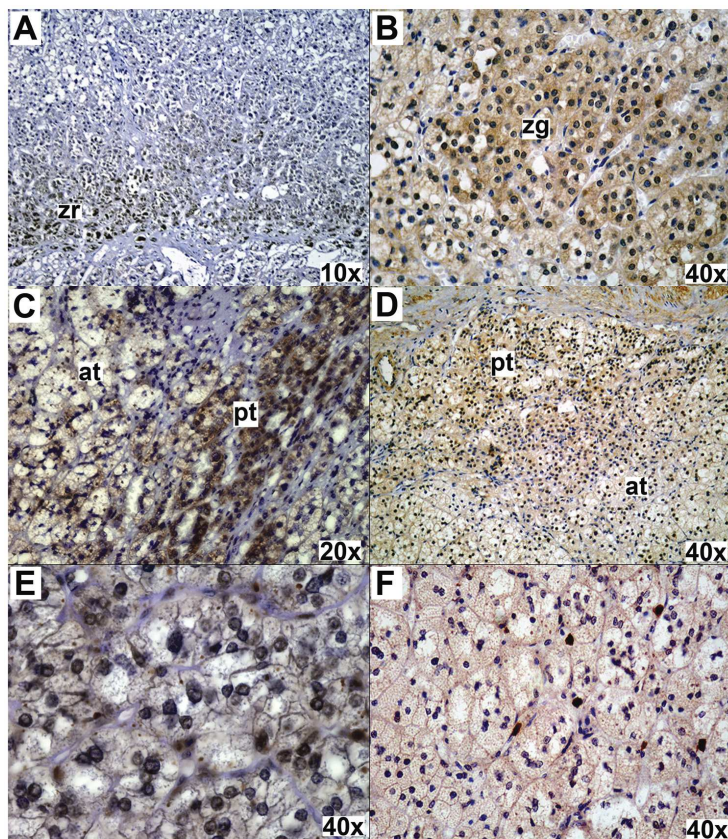
Iz dobijenih rezultata se jasno može videti da su pacijenti kod kojih je istovremeno bilo zabeleženo prisustvo G alela A3669G i C alela BclI polimorfizma imali značajno veće koncentracije baznog kortizola i kortizola nakon testa supresije deksametazonom, dok promena u vrednostima ACTH nije uočena. Takođe su kod njih bile prisutne i manje

vrednosti obima struka i ITM, u poređenju sa subjektima bez prisustva ove kombinacije polimorfizama glukokortikoidnog receptora. Koncentracija kortizola nakon testa supresije deksametazonom je kod nosilaca ova oba polimorfizma bila u negativnoj korelaciji sa ITM ($r=-0.64$; $p=0.002$), obimom struka ($r=-0.63$; $p=0.003$) i ACTH koncentracijom ($r=-0.43$; $p=0.049$). Za razliku od toga, vrednost glikemije je bila u korelaciji sa ITM i obimom struka ($r=0.44$; $p=0.047$ za oba), sistolnim i dijastolnim arterijskim krvnim pritiskom ($r=0.50$; $p=0.022$ i $r=0.57$; $p=0.007$) i baznim insulinom ($r=0.44$; $p=0.048$). Bazni insulin je bio u pozitivnoj vezi sa koncentracijom kortizola nakon testa supresije deksametazonom ($r=0.28$; $p=0.009$) i glikemijom ($r=0.32$; $p=0.003$).

Nasuprot tome, kod pacijenata koji nisu bili nosioci ova dva polimorfna alela, zabeležena je samo korelacija vrednosti sistolnog arterijskog krvnog pritiska sa glikemijom ($r=0.28$; $p=0.009$).

4.3. Regionalna i intracelularna distribucija glukokortikoidnog receptora

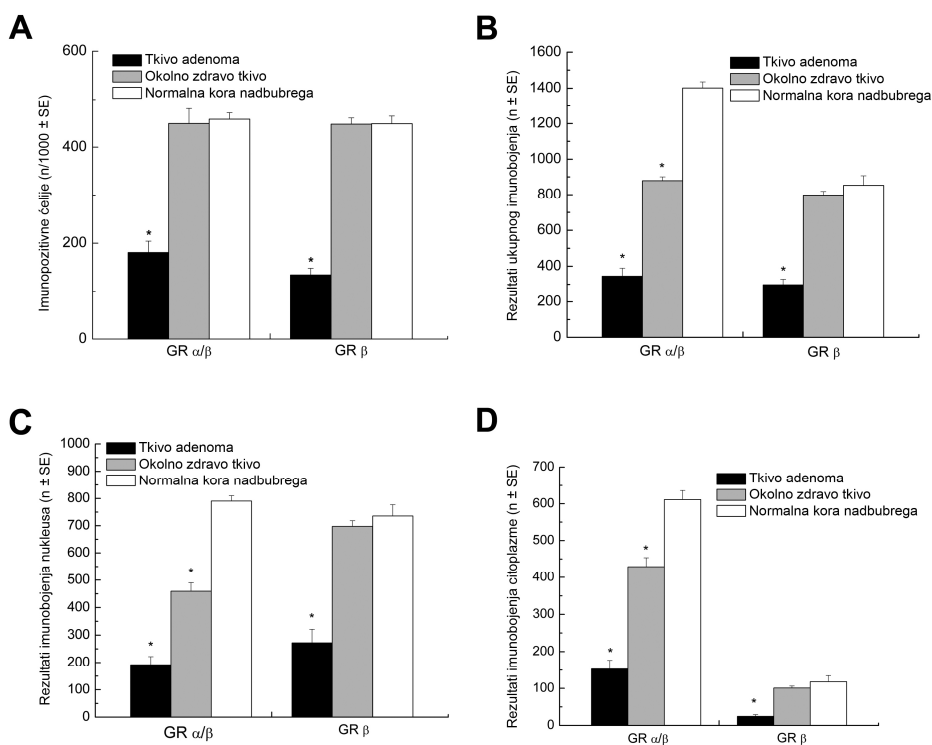
Na pregledanim preparatima je uočena umerena ekspresija GR u kori zdrave nadbubrežne žlezde, sa najjačim bojenjem u zoni retikularis (Slika 5.7.A), uz primenu antitela koje prepoznaje obe izoforme GR proteina (anti GR α/β), kao i u zoni glomeruloza, kada je korišćeno anti-GR β antitelo (Slika 5.7.B). Imunoreaktivnost za obe izoforme GR je bila prisutna kako u tkivu adrenokortikalnih adenoma, tako i u odgovarajućem peritumorskom tkivu (Slika 5.7.C, F). Takođe je uočeno prisustvo imunoreaktivnosti u tumorskom i peritumorskom tkivu pri primeni anti GR β antitela (Slika 5.7.D). U tkivu adenoma kore nadbubrežne žlezde je pri korišćenju anti GR α/β antitela zabeleženo fokalno i slabo bojenje (Slika 5.7.E).



Slika 5.7.: Rezultati imunohistohemijske analize: A - Ekspresija GR u zdravom adrenalnom korteksu nakon primene anti GR α/β antitela; B - Ekspresija GR β u zdravom adrenalnom korteksu; C - Ekspresija GR u tumorskom i peritumorskom tkivu nakon korišćenja anti GR α/β antitela; D - Ekspresija GR β u tumorskom i peritumorskom tkivu; E i F - ekspresija GR u adenomatoznom tkivu dobijena nakon primene anti GR α/β i anti GR β antitela, redom.

Ćelijska lokalizacija GR na pregledanim preparatima je bila nukleusna i citoplazmatska. Broj ćelija koje su se obojile je bio značajno manji u tkivu adrenalnih adenoma, nego u zdravom adrenalnom korteksu (Slika 5.8.A). Ukupan rezultat imunobojenja za GR je bio smanjen u pregledanim adenomima kore nadbubrežnih žlezda, u poređenju sa kontrolnim adrenalnim korteksom, ili peritumorskim tkivom, bez obzira koje antitelo je korišćeno (Slika 5.8.B). Ovakav rezultat je u skladu sa smanjenom ekspresijom α i β izoforme proteina glukokortikoidnog receptora u ovim tumorima.

Smanjenje ukupnog imunobojenja u peritumorskom tkivu je dobijeno primenom anti-GR α/β antitela, ali ne i sa anti-GR β , što ukazuje na smanjenu ekspresiju samo GR α izoforme u peritumorskom tkivu. Ovo je potvrđeno i redukovanim nukleusnim (slika 5.8.C) i citoplazmatskim (Slika 5.8.D) bojenjem, koje prati sličan obrazac ukupnog rezultata imunobojenja. Sve to ukazuje na smanjenu ekspresiju α i β izoforme GR u tumorskom tkivu, dok je u peritumorskom tkivu bila smanjena samo ekspresija GR α . Takođe je uočena i dominantno nukleusna lokalizacija GR β izoforme u svim pregledanim tkivima.



Slika 5.8.: Regionalna i subcelularna distribucija GR: **A** - Manji broj ćelija je bio obojen u adenomatoznom tkivu u poređenju sa korom zdrave nadbubrežne žlezde. Slični rezultati su dobijeni korišćenjem anti-GR α/β , ili anti-GR β antitela; **B** - Ukupan rezultat imunobojenja je redukovao u adenomatoznom tkivu u poređenju sa zdravim, ili peritumorskim tkivom, bez obzira na korišćeno antitelo. Smanjeno imunobojenje u peritumorskom tkivu je zapaženo samo nakon korišćenja anti-GR α/β antitela; Nukleusno - **C** i citoplazmatsko - **D** bojenje prati sličan obrazac ukupnog rezultata imunobojenja.

5. Diskusija

Na osnovu do sada objavljenih rezultata poznato je da ekspresija hGR postoji u svim tipovima ćelija, ali se nivoi proteina i iRNK za glukokortikoidni receptor značajno razlikuju u zavisnosti od tkiva [58-60]. Ranije studije su pokazale da je postojanje različitih genetičkih varijanti NR3C1 povezano sa različitom osetljivošću na glukokortikoide [25, 61-63], a poremećena regulacija HPA ose dovodi se u vezu sa nekoliko metaboličkih, kardiovaskularnih, psihosomatskih i psihijatrijskih poremećaja [28, 64-66]. Jedno od najnovijih istraživanja pokazalo je da polimorfne forme GR gena imaju uticaj na funkciju promotora, te da mogu biti odgovorne za pojavu depresije, anksioznosti i astme, kao i intenzitet ispoljavanja napada kod ovih bolesti [67]. Sve to ukazuje na mogućnost postojanja kompleksne veze NR3C1 haplotipova i mnogih bolesti, kao i da je gen koji kodira GR protein važan regulator biohemijskih i molekularnih mehanizama uključenih u promene glukokortikoidnog receptora.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da prisustvo varijanti glukokortikoidnog receptora koje su u našoj populaciji povezane sa nastankom adrenalnih incidentaloma, takođe dovodi do redukovane osetljivosti na glukokortikoide. U tom kontekstu je potrebno napomenuti da se genotipovi GR i ACTHR ispitivanih tumorskih tkiva i odgovarajućih konstitutivnih DNK nisu razlikovali.

Pristup lečenju pacijenata sa adrenalnim incidentalomima može biti prilično kompleksan, zbog dileme da li odabрати konzervativno ili operativno lečenje. Taj problem nije trivijalan, jer je prisustvo adrenalne mase češće u starijoj populaciji i obično se radi o benignim tumorima, a zdravstvena ugroženost pacijenata sa kortikalnim adenomima je još uvek nedovoljno razjašnjena [24]. Sa jedne strane, ovi pacijenti ne pokazuju znake povećane ekspresije kortizola, jer nikakva klinička sumnja za postojanje obolenja nadbubrežnih žlezda nije dovela do slučajne detekcije adrenokortikalnog tumora. Sa druge strane, prisustvo arterijske hipertenzije, gojaznosti, neregulisane hiperglikemije i dislipidemije, ozbiljno ugrožava zdravlje pacijenata sa adrenalnim incidentalomima i daje osnovu za nastanak metaboličkog sindroma. Upravo iz tog razloga je formulisana alternativna hipoteza da su adrenalni incidentalomi zapravo neprepoznata manifestacija metaboličkog sindroma. Takođe je zapažen proliferativni efekat insulina na ćelijske linije

adrenalnih tumora, bez efekta na sintezu kortizola. Takav nalaz je doveo do pretpostavke da hiperinsulinemija može imati patogenu ulogu u nastanku adrenalnih incidentaloma [68]. Ipak, još uvek nije sasvim jasno da li insulin može da izazove adrenalni rast i na drugim eksperimentalnim modelima i da paralelno stimuliše sintezu kortizola.

Većinu pacijenata u ovoj studiji su činile žene u šestoj deceniji života. Mada su pacijenti i kontrolni subjekti imali slične vrednosti jutarnjeg kortizola, baznog insulina i ITM, samo je kod pacijenata bio prisutan višak visceralnog masnog tkiva, povećane vrednosti glikemije i arterijskog krvnog pritiska, što govori u prilog postojanja insulinske rezistencije i metaboličkog sindroma [69, 70]. Veza između delovanja kortizola, količine visceralnog masnog tkiva, insulinske rezistencije i hipertenzije u običnoj gojaznosti, koja može biti posledica izloženosti hroničnom stresu, je već ranije pokazana [71, 72].

Povećana količina visceralnog masnog tkiva kod pacijenata iz ove studije mogla bi se dovesti u vezu sa aktivnošću 11 β - hidroksisteroid dehidrogenaze tip 1 (11 β -HSD1) koja prevodi neaktivne 11 - keto steroide u cirkulaciji u aktivne glukokortikoide, čime povećava lokalnu aktivnost GC. U rezultatima jednog ranijeg istraživanja na transgenim miševima je povećana ekspresija GR α povezana sa prekomernom ekspresijom 11 β -HSD1 u svim adipoznim tkivima i povećanom količinom visceralnog masnog tkiva [73].

Povišen arterijski krvni pritisak u grupi pacijenata u ovom istraživanju mogao bi biti posledica povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina, ili drugih adipokina iz visceralnog masnog tkiva u cirkulaciji, a kao posledica insulinske rezistencije [74].

Činjenica je da glukokortikoidi igraju ključnu ulogu u regulaciji mase adipoznog tkiva putem efekata na proliferaciju preadipocita i/ili diferencijaciju i metabolizam lipida kod zrelih adipocita. Ipak, prisutni su značajni dokazi za različitu osetljivost na efekte glukokortikoida u odnosu na pol. Studije na eksperimentalnim životinjama su pokazale da uprkos prisustva viših koncentracija glukokortikoida u cirkulaciji, njihovi efekti su manje naglašeni kod ženki nego kod mužjaka [75]. Takođe je pokazano i prisustvo sadejstva između efekata glukokortikoida i androgena, a postojanje antagonizma između efekata glukokortikoida i estrogena [76].

U ispitivanoj grupi pacijenata su zabeležene i više vrednosti kortizola nakon testa supresije deksametazonom, a duži C alel *BcII*, ili kraći G alel *A3669G* polimorfizma u genu za glukokortikoidni receptor, su bili u vezi sa nastankom adrenalnih incidentaloma.

Prisustvo dužeg C alela *BclI* je takođe uticalo i na veličinu tumora, dok je postojanje kraćeg alela *A3669G* polimorfizma smanjivalo sposobnost deksametazona da suprimuje kortizol, što govori u prilog efekta ovog polimorfizma na osetljivost na glukokortikoide. Osim povećanog prisustva ova dva polimorfizma kod pacijenata sa adrenalnim incidentalomim, pokazana je i njihova povezanost sa antropometrijskim, endokrinim i metaboličkim karakteristikama pacijenata. Prisustvo dužeg C alela *BclI* polimorfizma u ovoj grupi je za posledicu imalo i pojačanu glukokortikoidnu rezistenciju, te su pacijenti nosioci oba polimorfna alela imali više koncentracije jutarnjeg i postdeksametazonskog kortizola, slične vrednosti ACTH, niže vrednosti ITM, kao i manje obime struka nego pacijenti koji nisu bili nosioci. Sasvim je moguće da su više koncentracije kortizola kod ovih pacijenata rezultat uzajamnog delovanja autonomne sekrecije kortizola iz adrenalnog tumora i genotipa HPA ose, koji se istovremeno dovodi u vezu i sa smanjenom osetljivošću na glukokortikoide.

U mnogim dosadašnjim studijama se određeni polimorfizmi gena za hGR dovode u vezu sa izmenjenom osetljivošću na glukokortikoide, a zapažene su i promene u metaboličkim parametrima i odgovoru HPA ose na fiziološki stres.

Ranije studije povezale su *BclI* polimorfizam sa prisustvom metaboličkih faktora rizika i metaboličkog sindroma [33, 34, 77], kao i sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (*van Rossum et al.* 2003; *Di Blasio et al.* 2003) [27, 78]. U više studija je zabeleženo da osobe kod kojih je prisutan duži C alel *BclI* polimorfizma glukokortikoidnog receptora imaju više visceralnog masnog tkiva, povećane vrednosti sistolnog arterijskog krvnog pritiska, povišene koncentracije kortizola nakon standardnog obroka, kao i manju mogućnost da se kod starijih učesnika ispitivanja izvrši supresija sekrecije kortizola sa 0.25 mg i 1.0 mg deksametazona. Još je studija iz 1992. godine na grupi gojaznih žena u predmenopauzi, koje nisu imale dijabetes, pokazala vezu između prisustva dužeg alela *BclI* polimorfizma i povišenog nivoa insulina [79]. Istraživanje iz 1997. godine urađeno na porodicama iz Kvebeka, Kanada, je takođe pokazalo da je prisustvo dužeg alela *BclI* polimorfizma povezano sa postojanjem povećanog abdominalnog visceralnog masnog tkiva kod oba pola, nezavisno od njihove ukupne telesne mase masnog tkiva. Takođe je u prosečnoj populaciji sredovečnih nekušingoidnih muškaraca prisustvo ovog alela *BclI* polimorfizma dovedeno u vezu sa postojanjem

povećanih vrednosti ITM i sistolnog arterijskog krvnog pritiska. Nasuprot tome, prisustvo kraćeg G alela se dovodi u vezu sa nižim koncentracijama kortizola nakon supresije deksametazonom, tendencijom ka manjoj telesnoj masi kod odraslih osoba, višim vrednostima arterijskog krvnog pritiska i nepovoljnim lipidnim profilom kod gojaznih osoba, kao i povećanom osetljivošću kostiju na glukokortikoide kod pacijenata sa adrenalnim incidentalomima, ali i kod osoba sa endogenim porastom glukokortikoida [27, 78-83].

Dosadašnja istraživanja na polju hGR gena u porodicama kod čijih članova je uočena povećana učestalost pojave arterijske hipertenzije, pokazala su da je duži alel *BclI* polimorfizma vrlo često prisutan kod osoba koje nose veliki nasledan rizik za dobijanje povišenog arterijskog krvnog pritiska. Distribucija genotipova je ukazala da je prisustvo upravo ovog alela *BclI* polimorfizma vezano za nasleđivanje povećanog rizika za nastanak arterijske hipertenzije, dok se u porodicama kod čijih je članova bio prisutan kraći alel beležio normalan arterijski krvni pritisak [84]. Nedavno istraživanje koje je obuhvatilo pripadnike kineske Han populacije je pokazalo da homozigotni nosioci kraćeg G alela *BclI* polimorfizma imaju veće vrednosti ITM i sistolnog arterijskog krvnog pritiska, a niže vrednosti glukoze i triglicerida, u poređenju sa nosiocima C alela [85].

Najnovija istraživanja su pokazala da nosioci C alela *BclI* polimorfizma koji su imali veoma stresne životne situacije, veliki broj traumatskih događaja, a lošu društvenu podršku, imaju veoma visok rizik da razviju PTSP (posttraumatski stresni poremećaj; eng. *Posttraumatic Stress Disorder - PTSD*) [86, 87]. Takođe su *Bachmann et al.* još ranije prijavili da je kod pacijenata sa PTSP koji su bili homozigotni nosioci dužeg alela *BclI* polimorfizma postojao teži oblik ove bolesti, ali i da su oni imali bolji odgovor na tretman glukokortikoidima [88].

U poslednjih desetak godina više studija je pokazalo vezu između *BclI* polimorfizma i depresije. Prisustvo dužeg alela *BclI* polimorfizma je bilo učestalije kod pacijenata sa depresijom. Kod žena u predmenopauzi sa depresijom nađena je veća učestalost homozigotnih nosilaca dužeg alela *BclI* polimorfizma, ali su one imale i povećan WHR (eng. *Waist-hip ratio*), što se može smatrati posledicom povećane osetljivosti na GC. Takođe je pokazano da depresivni nosioci dužeg alela *BclI* polimorfizma imaju više nivoa ACTH, kao i lošiji odgovor na tretman antidepresivima [89-91].

Objavljen je veći broj studija o ulozi *BclI* polimorfizma u gojznosti, autoimunim i inflamatornim bolestima. Pored povećane osetljivosti na glukokortikoide, nekoliko studija opisuje vezu sa prisustvom abdominalne gojznosti. Međutim, neke od tih studija daju kontradiktorne rezultate. Naime, pokazano je da je kod pripadnika mlađe populacije, nosilaca dužeg alela *BclI* polimorfizma prisutan povećan ITM, WHR i abdominalna gojznost [33, 81, 92, 93]. Druga studija je pokazala da nosioci dužeg alela koji pripadaju starijoj generaciji imaju manji ITM [27]. Ovakvi naizgled suprotni rezultati mogli bi se objasniti činjenicom da je u starijoj populaciji ITM snižen usled mišićne atrofije, pošto se ukupna masa masnog tkiva nije razlikovala između nosilaca dužeg C alela *BclI* polimorfizma i onih kod kojih nije prisutan. Ipak, u nekoliko drugih studija nije pronađena povezanost ovog polimorfizma sa gojznošću [30, 79, 94]. U studiji *Panarrelli et al.* nije nađena veza sa ITM, ali je utvrđena povećana osetljivost *in vivo* na budesonid kod homozigotnih nosilaca C alela *BclI* polimorfizma, što je ukazalo na povećanu osetljivost na glukokortikoide [31]. Studija *Weaver et al.* takođe nije našla vezu sa gojznošću, ali su kod gojznih nosilaca C alela *BclI* polimorfizma nađene povećane vrednosti insulina, što ide u prilog pretpostavke o povećanoj osetljivosti na GC [79]. Opisana je i veza sa hipertenzijom [84], ali ne i sa faktorima rizika za kardiovaskularne bolesti kao što su ukupan i LDL holesterol i trigliceridi, mada su kod nosilaca C alela *BclI* polimorfizma zapažene povećane vrednosti holesterola [78]. Takođe, nedavno istraživanje koje je obuhvatilo pacijentkinje sa sindromom policističnih ovarijuma je dalo rezultate koji su u suprotnosti sa do sada poznatim literaturnim podacima, gde je zabeležena pozitivna veza između prisustva dužeg alela *BclI* polimorfizma i smanjene insulinske rezistencije [95], ali se takav rezultat najverovatnije može pripisati malom broju ispitanika.

Nekoliko studija je opisalo vezu između prisustva *BclI* polimorfizma i autoimunih bolesti. Kod pacijenata sa oftalmopatijom Grejvs (eng. *Graves*) nađena je korelacija između prisustva *BclI* polimorfizma i ATA (eng. *American Thyroid Association*) stadijuma koji označava meru težine oftalmopatije kod pacijenata obolelih od ove bolesti [96, 97]. Pokazano je da je duži alel *BclI* polimorfizma bio učestaliji kod pacijenata sa ATA stadijumom I-II (blaži oblik oftalmopatije), u poređenju sa pacijentima sa ATA stadijumom III-IV (težak oblik oftalmopatije). Ovakav nalaz može se objasniti

povećanom osetljivošću na GC, a time i povećanom supresijom imunih i antiinflamatornih reakcija. U radu *Decorti et al.* takođe je nađena povećana učestalost dužeg alela kod pacijenata sa Kronovom bolešću (eng. *Crohn*) u poređenju sa zdravim kontrolama, ali ne i kod pacijenata sa ulcerativnim kolitisom [98]. Studija *De Iudicibus et al.* [99] potvrdila je ove rezultate, ali je i pokazala da pacijenti sa ovom alelskom varijantom imaju bolji odgovor na terapiju glukokortikoidima.

Dosadašnja istraživanja su pokazala ili nepostojanje veze između reumatoidnog artritisa i *BclI* polimorfizma [100, 101], ili postojanje veze između prisustva kraćeg G alela *BclI* polimorfizma i smanjene predispozicije za nastanak ove bolesti [102].

Istraživanja su pokazala i vezu između *BclI* polimorfizma i cistične fibroze i karcinoma kože. Studija *Corvol et al.* pokazala je vezu između progresije plućne bolesti i prisustva dužeg alela *BclI* polimorfizma kod pacijenata sa cističnom fibrozom, koja je možda posredovana izmenjenom podložnošću inflamaciji [103].

U studiji *Patel et al.* ispitivani su efekti *BclI* polimorfizma na nastanak karcinoma kože kod pacijenata koji koriste GC. Pokazano je da nosioci dužeg alela *BclI* polimorfizma koji kontinuirano koriste veće doze GC imaju povećan rizik od nastanka karcinoma skvamoznih ćelija (SCC) [104].

Na raznolikost rezultata dobijenih u svim ovim studijama mogle su da utiču veličine ispitivanih grupa, kao i etnička pripadnost ispitanika, čime bi donekle mogle da se objasne razlike u rezultatima, a često i njihova potpuna suprotnost. Zbog toga su neophodna dalja istraživanja kako bi se potvrdilo postojanje veze između prisustva polimorfizama GR receptora i nekih od navedenih bolesti, te tako razjasnili dosadašnji suprotni rezultati.

U do sada objavljenim rezultatima istraživanja je pokazano da se G alel *A3669G* polimorfizma u okviru AUUUA motiva na 3'NTR egzona 9β glukokortikoidnog receptora, može dovesti u vezu sa povoljnijim metaboličkim profilom nosilaca, zbog veće stabilnosti GRβ iRNK, kao i povećane sinteze same GRβ izoforme, što antagonizuje delovanje GRα. Smanjenje odgovora na glukokortikoide redukcijom funkcionalnih GRα moglo bi, prema objavljenim rezultatima, uticati na promenu balansa depozita masnog tkiva u pravcu estrogenom prouzrokovane necentralne distribucije, što je i moguće objašnjenje veze između prisustva G alela i smanjene centralne gojaznosti kod ispitivanih

žena iz evropske populacije. Povoljniji lipidni profil je uočen kod evropskih muškaraca nosilaca jednog, ili oba *G* alela u *A3669G* polimorfizmu. Činjenica da je ovo zapaženo uprkos nedostatka veze ovog alela sa depozitima masnog tkiva kod muškaraca, ukazuje da njegov efekat na metabolizam lipida može biti ispoljen nezavisno od efekta na masne naslage [45, 47, 105]. Dostupni rezultati istraživanja *A3669G* polimorfizma pokazuju da je njegova učestalost u opštoj populaciji kavkaskog porekla oko 15%, ali i postojanje znatnih razlika u drugim etničkim grupama. U istraživanju koje je obuhvatilo muškarce nosioce ovog alela zabeležena je povećana sekrecija ACTH nakon socijalnog stresa i testa supresije deksametazonom [106]. Rezultati nedavne studije na pedijatrijskim pacijentima sa kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom su pokazali prisustvo nepovoljnog lipidnog profila kod nosilaca *G* alela [86], što je u saglasnosti sa rezultatima takođe novog istraživanja na velikoj grupi starijih ispitanika nosilaca *G* alela u *A3669G* polimorfizmu kod kojih su zabeležene povišene vrednosti parametara inflamacije [107].

Takođe je prisustvo *G* alela u *A3669G* polimorfizmu dovedeno u vezu sa većom učestalošću reumatoidnog artritisa, što bi moglo da ukazuje na smanjenu imunosupresiju kod nosilaca ovog polimorfizma [46], ali kasnije studije na većim grupama ispitanika nisu potvrdile ove nalaze [100]

Efekti glukokortikoida na inflamaciju se uglavnom ostvaruju transrepresionim putem. *Ex vivo* eksperimenti su pokazali smanjenu glukokortikoidnu transrepresiju kod nosilaca *G* alela *A3669G* polimorfizma, dok glukokortikoidna transaktivacija ciljnih gena nije bila bitnije izmenjena [107]. Pošto aterosklerozu karakteriše izražena inflamatorna komponenta [108], veza između prisustva *G* alela *A3669G* polimorfizma i pojave kardiovaskularnih bolesti takođe može biti rezultat manje glukokortikoidima posredovane imunosupresije [109]. Tome u prilog govori i podatak da je ovaj polimorfizam u vezi sa povećanim vrednostima C-reaktivnog proteina (CRP) i IL-6 (interleukin 6), koji su važni markeri kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze [110]. Upravo ovakvi rezultati mogu pružiti novi uvid u razumevanje inflamatorne patogeneze u kardiovaskularnim bolestima, te pomoći u otkrivanju rizičnih grupa pacijenata.

Ispitivanje učestalosti *A3669G* polimorfizma kod pacijenata obolelih od mijeloproliferativnih bolesti pokazalo je da je njegova zastupljenost kod pacijenata obolelih od policitemije vera čak 55%, a kod obolelih od primarne mijelofibroze 35%,

dok je samo 6% kod obolelih od esencijalne trombocitemije. Ovakvi rezultati ukazuju da bi izmenjena GR signalizacija mogla da bude mehanizam koji dovodi do nastanka eritrocitoze u sindromima koji su posledica hronične izloženosti pacijenata velikim dozama glukokortikoida, pacijenata sa policitemijom vera, a možda i drugih idiopatskih oblika eritrocitoze [111].

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na funkcionalni značaj C alela *BcII* polimorfizma u linkidž disekvilbrijumu sa drugim varijantama gena za glukokortikoidni receptor. Naime, izgleda da prisustvo dužeg C alela *BcII* polimorfizma pojačava efekte kraćeg G alela *A3669G* polimorfizma na osetljivost na glukokortikoide [112]. Iako *BcII* polimorfizam nije lociran u kodirajućem, regulatornom ili splajs regionu hGR gena, njegova važnost time nije umanjena. Moguće je da njegovo prisustvo može da prouzrokuje funkcionalno važne promene u delu gena u blizini, uključujući i promotorski region, što bi eventualno moglo da izazove promene u ekspresiji hGR. Mada je *BcII* polimorfizam smešten u intronu, njegov efekat na aktivnost GR gena možda može biti indirektan preko selektivnih efekata na represorska, ili enhenserska mesta u promotoru ovog gena, što bi kao posledicu moglo da ima smanjenu, ili povećanu osetljivosti na glukokortikoide [31].

Tokom analize rezultata dobijenih u ovom istraživanju nisu uočene razlike u prisustvu promotorskog ACTHR polimorfizma, kao ni *N363S* i *ER22/23EK* polimorfizama u genu za glukokortikoidni receptor, između pacijenata sa adrenalnim incidentalomima i kontrolnih subjekata. Ipak, uočeno je da je prisustvo *ER22/23EK* polimorfizma bilo u vezi sa postojanjem neosetljivosti na glukokortikoide, što je i ranije zapaženo [31].

Potrebno je ipak napomenuti da se prema dostupnim rezultatima ranijih istraživanja polimorfizam *N363S* javlja u opštoj evropskoj populaciji sa učestalošću od oko 3-7%, te da se za razliku od *ER22/23EK* polimorfizma dovodi u vezu sa pojačanom funkcijom glukokortikoidnog receptora, što za posledicu ima znatno veći transaktivacioni kapacitet [25, 36, 38, 41, 113]. Takođe je uočeno da centralna gojaznost kod muškaraca može biti metabolička posledica prisustva ovog polimorfizma [38]. Studija rađena 2007. godine je pokazala da prisustvo *N363S* varijante u humanim ćelijskim linijama dovodi do jedinstvenog profila genske ekspresije, što bi moglo da govori u prilog eventualnog značaja ovog polimorfizma u nastanku određenih bolesti u humanoj populaciji [114]. Čak

je u jednoj studiji kod deset nosilaca G alela u ovom polimorfizmu uočena povećana salivatorna sekrecija kortizola nakon socijalnog stresa. Međutim, pošto je testiranje obavljeno na malom broju ispitanika ovi rezultati se moraju posmatrati samo kao preliminarni. Naročito ako se ima u vidu da su svi ispitanici kod kojih je zabeležen ovakav rezultat bili muškog pola, dok kod četrnaest ispitanika sa istim genotipom, ali ženskog pola gotovo da nije zabeležen nikakav odgovor u sekreciji kortizola na socijalni stres [35]. Ispitivanje populacije stanovništva južnoazijskog porekla u Velikoj Britaniji pokazalo je izuzetno malu učestalost G alela *N363S* polimorfizma, od svega 0.3%. Razlog za takav rezultat mogao bi da leži u sličnoj učestalosti ovog alela kod njihovih predaka, kao i u drugačijoj dužini preživljavanja, ili reproduktivnom uspehu nosilaca [42]. Ipak, ovakva istraživanja govore u prilog postojanja značajne razlike u aktivaciji HPA ose među polovima i etničkim grupama, kao i nakon izlaganja socijalnom stresu. Mada je polimorfizam *N363S* smešten u transaktivacionom domenu (AF-1) koji stupa u interakciju sa brojnim transkripcionim faktorima, a fosforilacija serina je važna za vezivanje glukokortikoidnog receptora za DNK, nije dokazan uticaj zamene A → G na funkciju glukokortikoidnog receptora *in vitro* [36, 40, 41, 115, 116].

Polimorfizam ER22/23EK koji rezultuje promenom arginina u lizin (R23K) vezuje se za smanjenu transkripcionu aktivnost GR i smanjenu ekspresiju endogenih gena u poređenju sa GR bez ove promene (*van Rossum et al.*, 2002; *Russcher et al.*, 2005) [31, 117]. U novijim istraživanjima je pokazano da prisustvo ER22/23EK polimorfizma olakšava ekspresiju GR α -A, ali da nema efekta na ekspresiju GR α -B translacione izoforme [38]. Pošto su druge studije pokazale da je GR α -A izoforma transkripciono manje aktivna u poređenju sa GR α -B [3], ovaj podatak ukazuje da je relativna neaktivnost ER22/23EK posledica sniženih nivoa GR α -B, i da ovaj polimorfizam može da bude u korelaciji sa glukokortikoidnom neosetljivošću.

Iako se ER22/23EK polimorfizam ne dovodi u vezu sa razlikama u odgovoru na egzogene glukokortikoide u akutnoj limfoblastnoj leukemiji [118], pokazano je da odrasli nosioci ovog polimorfizma imaju smanjenu incidencu dijabetesa tip 2, kao i manji rizik za dobijanje kardiovaskularnih obolenja (*van Rossum et al.*, 2004) [43]. To bi značilo da nosioci ER22/23EK polimorfizma imaju bolji metabolički profil, zahvaljujući relativnoj neosetljivosti na endogene glukokortikoide.

Takođe je potvrđeno da nosioci ER22/23EK polimorfizma pokazuju značajno brži klinički odgovor na terapiju antidepresivima, kao i trend ka boljim kognitivnim funkcijama tokom trajanja depresije [119, 120]. Izučavan je i uticaj tri NR3C1 polimorfizma na odgovor sekrecije kortizola tokom psihosocijalnog stresa, ali je mali broj subjekata sa ER22/23EK polimorfizmom bio dostupan za testiranje njegovog uticaja na reaktivnost HPA ose [35].

U velikoj grupi holandskih pacijenata sa familijarnom hiperholesterolemijom koji su bili nosioci ER22/23EK polimorfizma, a za koje se znalo da imaju veoma visok rizik za dobijanje kardiovaskularne bolesti, uočena je modifikacija rizika u odnosu na pol, sa tendencijom koja je kod muškaraca pokazivala protektivnu ulogu, dok je kod žena bio blago povećan rizik za dobijanje kardiovaskularne bolesti [44]. Zapažanje da je u zdravoj holandskoj populaciji učestalost nosilaca ER22/23EK polimorfizma bila veća kod najstarijih članova, govorilo je u prilog efekta preživljavanja. Ovaj koncept je bio osnažen pronalaženjem veze sa dugovečnošću u još jednoj studiji starijih zdravih muškaraca, u kojoj je 19.2% ispitanika koji nisu bili nosioci ovog polimorfizma umrlo tokom četvorogodišnjeg perioda praćenja, dok niko od nosilaca ER22/23EK polimorfizma nije preminuo tokom istog perioda. Upravo u toj populaciji muškaraca su takođe izmerene niže vrednosti CRP kod nosilaca ER22/23EK polimorfizma, a uočen je i trend ka nižim vrednostima ukupnog i LDL holesterola. Ovakvi nalazi su bili u skladu sa ranije uočenim povoljnim kardiovaskularnim profilom u odnosu na metaboličke faktore rizika i inflamaciju [43]. Nasuprot tome, dve godine kasnije objavljena je studija u kojoj je određena učestalost više polimorfizama u genu za GR u grupi učesnika starijih od 85 godina. Utvrđeno je da su nosioci ER22/23EK polimorfizma imali znatno više vrednosti glikoziranog hemoglobina (HbA1c) od učesnika koji nisu bili nosioci. Takođe je uočen trend da nosioci ovog polimorfizma imaju više vrednosti CRP. Ovakvi, sasvim suprotni rezultati, mogli bi se eventualno objasniti razlikom u starosti ispitanika, kao i lažno pozitivnim nalazima [30].

Studije na mlađim osobama pokazale su razlike u antropometrijskim parametrima i telesnom sastavu među nosiocima ER22/23EK polimorfizma i onih kod kojih on nije bio prisutan. Utvrđeno je da su muškarci nosioci ovog polimorfizma imali veću telesnu visinu od onih koji nisu bili nosioci [121]. Ova asocijacija ER22/23EK polimorfizma sa

većom visinom potvrđena je i u prethodno navedenoj studiji. Zanimljivo je da je i studija na prevremeno rođenoj deci pokazala da su deca nosioci ER22/23EK polimorfizma pokazala potpuno dostizanje normalnog rasta u periodu između starosti od tri meseca do godinu dana. Čak je uočeno da su prevremeno rođena deca nosioci ER22/23EK polimorfizma nakon prve godine života imala veću telesnu visinu od onih koji nisu bili nosioci. Takođe je uočeno da su nosioci ovog polimorfizma imali niže vrednosti insulina [122]. Ovakvi nalazi donekle potkrepljuju koncept da nosioci ER22/23EK polimorfizma mogu biti relativno rezistentni na centralne i sistemske efekte glukokortikoida.

Nisu nađene nikakve asocijacije vezane za prisustvo ER22/23EK polimorfizma i ITM, ili ukupnu masu masnog tkiva, ali je utvrđeno da su muškarci nosioci ovog polimorfizma imali veću mišićnu masu, kao i veću mišićnu snagu. Iako kod žena nisu nađene nikakve razlike vezane za ITM uočena je tendencija ka manjem obimu struka kod žena nosilaca ovog polimorfizma [45]. Ovaj podatak je utoliko značajniji, pošto bi se moglo očekivati da blago smanjeni efekat glukokortikoida u abdominalnom regionu rezultuje manjim obimom struka.

Dobro je poznato da glukokortikoidi vrše represiju imunog sistema putem različitih mehanizama i da se široko primenjuju za tretman mnogih autoimunih bolesti. Zbog toga je izučavana povezanost ER22/23EK polimorfizma i nekoliko autoimunih i inflamatornih obolenja. Pokazano je da je postojanje ovog polimorfizma u vezi sa prisustvom agresivnijeg oblika multiple skleroze kod obolelih pacijenata, što je za posledicu imalo destruktivniji tok bolesti [122]. Za razliku od toga, nije uočena veza između prisustva ovog polimorfizma i oftalmopatije Grejvs (eng. *Graves*), inflamatornih bolesti creva i reumatoidnog artritisa [96, 98, 99, 100]. Zato se može reći da je dokaz da se ER22/23EK polimorfizam može dovesti u vezu sa autoimunim i inflamatornim bolestima prilično ograničen.

Studije *in vitro* su pokazale da ER22/23EK polimorfizam dovodi do redukcije transaktivacionog kapaciteta [31]. Ali, nisu nađene promene u transrepresionoj aktivnosti, koja je uglavnom uključena u imuni sistem i inflamaciju, vezane za ER22/23EK polimorfizam. Interesantan je podatak da je 80% nosilaca ovog polimorfizma imalo povećan rizik od perzistentnog prisustva bakterije *Staphylococcus aureus* u nosnoj šupljini. Teoretski posmatrano, blago povećan nivo kortizola kod nosilaca ovog

polimorfizma mogao je dovesti do povećane transrepresije, a time i do povećane supresije imunog sistema [124].

Utvrđena je i veza između povećanih nivoa kortizola i demencije. Visok nivo kortizola dovodi se u vezu sa bržim padom kognitivnih funkcija kako kod zdravih starijih osoba, tako i kod pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti (eng. *Alzheimer's disease*). Relativna rezistencija na glukokortikoide kao posledica prisustva ER22/23EK polimorfizma, mogla bi da bude od velikog značaja u smanjivanju rizika za nastanak demencije usled starenja. Ova pretpostavka je i potvrđena u velikoj studiji na holandskoj populaciji starijoj od 55 godina, kada je pokazano da su nosioci ER22/23EK polimorfizma pokazivali manju progresiju subkortikalnih lezija [125].

U poslednje vreme objavljeno je više studija vezanih za postojanje veze između prisustva ER22/23EK polimorfizma i depresije. Kod nemačkih pacijenata obolelih od depresije, koji su bili nosioci ovog polimorfizma, uočen je veći rizik za ponovni nastanak depresije, ali i brži odgovor na terapiju antidepresivnim lekovima [126]. Još jedno istraživanje je pokazalo veću učestalost ER22/23EK polimorfizma kod švedskih pacijenata obolelih od depresije [120]. Ali, nije utvrđena veza između prisustva ER22/23EK polimorfizma i bipolarnog poremećaja [127].

U pregledanim tumorskim tkivima u našoj studiji uočena je smanjena imunoreaktivnost za glukokortikoidni receptor, kao i nukleusna lokalizacija GR β . Ovakav rezultat bi mogao da ukazuje na aktivnu ulogu GR β u smanjivanju GR α transkripcione aktivnosti [47]. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su veoma slični sa rezultatima zabeleženim u ranijim studijama o lokalizaciji glukokortikoidnog receptora u kori zdravih nadbubrežnih žlezda kod različitih vrsta [128-132]. Ali, takođe su u saglasnosti i sa rezultatima istraživanja koja su pokazala nedostatak GR iRNK i mesta za vezivanje deksametazona, kao i smanjenu ekspresiju GR proteina u adrenokortikalnim adenomima sa prisutnom sekrecijom kortizola, kao i u bilateralnoj adrenalnoj hiperplaziji [133, 134, 135].

Treba imati u vidu da je u ranijim istraživanjima koja su obuhvalila benigne adrenokortikalne adenome sa prisutnom sekrecijom kortizola i adrenokortikalne karcinome opisana povećana ekspresija glukokortikoidnog receptora [136, 137], što može biti odraz drugačije patogeneze ovih tumora.

Prisustvo glukokortikoidne rezistencije kod klinički nefunkcionalnih adrenokortikalnih adenoma je možda konstitutivne prirode, mada je takav nalaz moguć i u normalnom adrenalnom korteksu.

Nameće se činjenica da se uočeni efekat C alela *BclI* polimorfizma na veličinu tumora ne može ostvariti preko tumorskog glukokortikoidnog receptora, dok se efekat G alela *A3669G* polimorfizma gena za glukokortikoidni receptor na osjetljivost na glukokortikoide može registrovati i u tumorskom i u netumorskom tkivu. Buduća istraživanja treba da pokažu da li je gubitak osjetljivosti na glukokortikoide primarni događaj u patogenezi adrenalnih incidentaloma [135], kao i da eventualno ukažu na nove činjenice vezane za patogenezu ovih tumora.

6. Zaključci

Nakon detaljne analize svih rezultata dobijenih tokom ovog istraživanja može se izvesti nekoliko zaključaka:

- Genska varijanta glukokortikoidnog receptora sa prisutnim dužim C alelom *BclI* polimorfizma u intronu 2 i kraćim G alelom *A3669G* polimorfizma u okviru egzona 9 β , je u vezi sa nastankom unilateralnih adrenalnih incidentaloma.
- Istovremeno prisustvo dužeg C alela *BclI* polimorfizma i kraćeg G alela *A3669G* polimorfizma dovodi do smanjuje osjetljivosti na glukokortikoide. Ovako stečena intraadenomatozna glukokortikoidna rezistencija može da dovede do disregulacije produkcije kortizola i rasta tumora u isto vreme, dok prirodna osjetljivost na glukokortikoide najverovatnije modifikuje ove efekte.
- Kod nosilaca dužeg C alela *BclI* polimorfizma adrenokortikalni tumori su bili veće veličine, ali je prisustvo kraćeg G alela *A3669G* polimorfizma kod određenog broja ispitanika umanjivalo efekat C alelske varijante *BclI* polimorfizma na veličinu tumora.
- Pacijenti sa prisutnom kraćim G alelom *A3669G* polimorfizma su imali niže vrednosti glukoze, postdeksametazonskog kortizola i ITM u odnosu na ispitanike kod kojih nije bila prisutna ova varijanta alela, što govori u prilog postojanja smanjene osjetljivosti na glukokortikoide.

- Imunohistohemijska analiza je pokazala smanjenu ekspresiju GR α i GR β proteinske izoforme u adenomima kore nadbubrežnih žlezda, u poređenju sa korom zdravih nadbubrežnih žlezda, dok je u peritumorskom tkivu bila samo smanjena ekspresija GR α izoforme, što je u saglasnosti sa do sada poznatim podacima.
- Dominantno nukleusna lokalizacija GR β izoforme u svim pregledanim tkivima može da ukaže na njenu aktivnu ulogu u smanjivanju GR α transkripcione aktivnosti.
- Potvrđeni su rezultati ranijih istraživanja da se adrenalni incidentalomi češće javljaju u nešto starijem životnom dobu i to više kod osoba ženskog pola. Čak 74.1% ispitivanih pacijenata sa adrenalnim incidentalomima su činile žene, a većina njih su bile u šestoj deceniji života.
- Kao rezultat kompleksnosti interakcija neuroendokrinog i imunološkog sistema, samo jedan događaj koji dovede do promene u aktivnosti glukokortikoidnog receptora ne može biti odgovoran za nastanak bolesti, ali veći broj udruženih faktora može doprineti njenoj progresiji.

7. Spisak citirane literature

1. Chrousos GP, Kino T, Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* 2005, 2005; 304: pe 48.
2. Charmandari E, Kino T, Chrousos GP, Glucocorticoids and their actions: an Introduction. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1024: 1-8.
3. Yudit MR, Cidlowski JA, Molecular identification and characterization of A and B forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, 2001; 15 (7): 1093-1103.
4. McKay LI, Cidlowski JA, Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*, 1999; 20 (4): 435-459.
5. Cato AC, Nestl A, Mink S, Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002, 2002; 138: RE9.
6. Rhen T, Cidlowski JA, Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, 2005; 353 (16): 1711-23.
7. Koper JW, van Rossum EFC, van den Akker ELT, Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*, 2014; 92: 62-73.
8. Busillo JM, Cidlowski JA, The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab*, 2013; 24 (3): 109-119.
9. Leung DY, Bloow JW, Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111 (1): 3-22; quiz 23.
10. Charmandari E, Chrousos GP, Kino T, Identification of natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutations or polymorphisms and their functional consequences at the receptor interaction level. *Methods Mol Biol*, 2009; 590: 33-60.
11. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA, Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006; 102 (1-5):11-21.
12. Zhou J, Cidlowski JA, The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses, *Steroids*, 2005; 70 (5-7): 407-417.

13. Yudit MR, Cidlowski JA, The glucocorticoid receptor coding diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol*, 2002; 16 (8): 1718-1726.
14. Turner JD, Vernocchi S, Schmitz S, Muller CP, Role of the 5'-untranslated regions in post-transcriptional regulation of the human glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, 2014; 1839 (11): 1051-1061.
15. Strechl C, Gaber T, Lowenberg M, Hommes DW, Verhaar AP, Schellmann S, Hahne M, Fangradt M, Wagegg M, Hoff P, Scheffold A, Spies CM, Burmester GR, Buttgerie TF, Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum*, 2011; 63 (12): 3779-3788.
16. Vernocchi S, Battello N, Schmitz S, Revets D, Billing AM, Turner JD, Muller CP, Membrane glucocorticoid receptor activation induces proteomic changes aligning with classical glucocorticoid effects. *Mol Cell Proteomics*, 2013; 12 (7): 1764-1779.
17. Moalli PA, Pillay S, Krett NL, Rosen ST, Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human myeloma cells. *Cancer Res*, 1993; 53 (17): 3877-3879.
18. Kumar R, Thompson EB, Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005; 94 (5): 383-394.
19. Pratt WB, Toft DO, Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews*, 1997; 18 (3): 306-360.
20. Whitesell L, Lindquist SL, Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nature Review Cancer*, 2005; 5 (10): 761-772.
21. Oakly RH, Cidlowski JA, The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2013; 132 (5): 1033-1044.
22. Stratakis CA, Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in simphony. *Trends in Endocrinol Metab*, 2003; 14 (9): 404-410.
23. Brunt LM, Jeffrey MD, Moley F, Adrenal incidentaloma. *World J Surg*, 2001; 25 (7): 905-913.
24. Terzolo M, Pia A, Ali A, Osella G, Reimondo G, Bóvió s, Daffara F, Procopio M, Paccotti P, Borretta G, Angeli A, Adrenal incidentaloma: A new cause of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87 (3): 998-1003.

25. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HAP, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SWJ, A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids *in vivo*. *J Clin Endocrinol metab*, 1998; 83 (1): 144-151.
26. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW, A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene which decreases sensitivity to glucocorticoids *in vivo*, associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*, 2002; 51 (10): 3128-3134.
27. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW, Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids *in vivo* and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf.)*, 2003; 59 (5): 585-592.
28. Bjorntorp P, Rosmond R, The metabolic syndrome - a neuroendocrine disorder?. *Br J Nutr*, 2000; 83 Supplement 1: S49-57.
29. Ruscher H, Smit P, van den Akker, van Rossum EFC, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SWJ, Koper JW, Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90 (10): 5804-5810.
30. Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Westendorp RGJ, van Hemst, Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus study. *Biogerontology*, 2006; 7 (4): 231-238.
31. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH, et al, Glucocorticoid receptor polymorphisms, skin vasoconstriction, an other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83 (6): 1846-1852.
32. Fleury I, Beaulieu P, Primeau M, Labuda D, Sinnett D, Krajcinovic M, Characterization of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. *Clin Chem*, 2003; 49 (9): 1528-1531.
33. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, Lindell K, et al,

- A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the HPA axis. *Obes Res*, 2000; 8 (3): 211-218.
34. Rosmond R, The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome. *Obes Res*, 2002; 10 (10): 1078-1086.
 35. Wüst S, van Rossum EFC, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH, Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89 (2): 565-573.
 36. Lin RC, Wang WY, Morris BJ, High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case-control study. *BMJ*, 1999; 319 (7221): 1337-1338.
 37. Lin RC, Wang XL, Morris BJ, Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension*, 2003; 41 (3): 404-407.
 38. Dobson MG, Redfern CPF, Unwin N, Weaver JU, The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men, and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86 (5): 2270-2274.
 39. Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Tinisit J, Velho G, The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003; 59 (2): 237-241.
 40. Rosmond R, Bouchard C, Bjorntorp P, Tsp509I polymorphism in exon 2 of the glucocorticoid receptor gene in relation to obesity and cortisol secretion: cohort study. *BMJ*, 2001; 322 (7287): 652-653.
 41. Echwald SM, Sorrensen TI, Andersen T, Pedersen O, The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001; 25 (10): 1563-1565.
 42. Syed AA, Irving JA, Redfern CP, Hall AG, Unwin NC, White M, Bhopal RS, Alberti KG, Weaver JU, Low prevalence of the N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor in South Asians living in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89 (1): 232-235.
 43. van Rossum EFC, Felders RA, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL,

- Ester W, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, Pols HA, Koper JW, Lamberts SWJ, Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med*, 2004; 117 (3): 158-162.
44. Koeijvoets KC, van Rossum EFC, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Defesche JC, Kastelein JJ, Lamberts SWJ, Sijbrands EJ, A functional polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relation to cardiovascular diseases risk in familial hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91 (10): 4131-4136.
 45. Syed AA, Irving JAE, Redfern CPF, Hall AG, Unwin NC, White M, Bhopal RS, Weaver JU, Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G in exon 9 β with reduced central adiposity in women. *Obesity*, 2006; 14 (5): 759-764.
 46. DeRijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD, A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2001; 28 (11): 2383-2388.
 47. Schaaf MJ, Cidlowski JA, AUUUA motifs in the 3'UTR of the human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*, 2002; 67 (7): 627-636.
 48. Dieudonne M, Ramesh KV, Modeling the interactions between MC2R and ACTH models from human. *J Biomol Struct Dyn*, 2015; 33 (4): 770-788.
 49. Buckley DI, Ramachandran J, Characterization of corticotropin receptors on adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78 (12): 7431-7435.
 50. Arola J, Heikkila P, Voutilainen R, Kahri AI, Protein kinase C signal transduction pathway in ACTH-induced growth effect of rat adrenocortical cells in primary culture. *J Endocrinol*, 1994; 141 (2): 285-293.
 51. Yamazaki T, Kimoto T, Higuchi K, Ohta Y, Kawato S, Kominamis S, Calcium ion as a second messenger for *o*-nitrophenylsulfanyl-adrenocortico-tropin (NPS-ACTH) and ACTH in bovine adrenal steroidogenesis. *Endocrinology*, 1998; 139 (12): 4765-4771.
 52. Penhoat A, Jaillard C, Saez JM, Corticotropin positively regulates its own receptors

- and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86 (13): 4978-4981.
53. Axelrod L, Perioperative management of patients treated with glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2003; 32 (2): 367-383.
 54. Naville D, Jaillard C, Barjhoux L, Durand P, Begeot M, Genomic structure and promoter characterization of the human ACTH receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 230 (1): 7-12.
 55. Slawik M, Reisch N, Zwermann O, Maser-Gluth C, Stahl M, Klink A, Reincke M, Beuschlein F, Characterization of an adrenocorticotropin (ACTH) receptor promoter polymorphism leading to decreased adrenal responsiveness to ACTH. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89 (7): 3131-3137.
 56. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC, Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in men. *Diabetologia*, 1985; 28 (7): 412-419.
 57. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P, A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, 2001; 68 (4): 978-989.
 58. DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER, Glucocorticoid receptor variants: Clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002; 81 (2): 103-122.
 59. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP, Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*, 1996; 17 (3): 245-261.
 60. Reichardt HM, Shutz G, Glucocorticoid signalling-multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*, 1998; 146 (1-2): 1-6.
 61. Stevens A, Ray DW, Zeggini E, John S, Richards HL, Griffiths CE, Donn R, Glucocorticoid sensitivity is determined by a specific glucocorticoid receptor haplotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89 (2): 892-897.
 62. Bray PJ, Cotton RG, Variants of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat*, 2003; 21 (6): 557-568.
 63. Karl M, Lamberts SWJ, Koper JW, Katz DA, Huizenga NATM, Kino T,

- Haddad BR, Hughes MR, Chrousos GP, Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant – negative glucocorticoid receptor mutation. *Proc Assoc Am Physicians* 1996; 108 (4): 296-307.
64. Holsboer F, Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 2001; 62 (1-2): 77-91.
65. Parker AJ, Wessely S, Cleare AJ, The neuroendocrinology of chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. *Psychol Med* 2001; 31 (8): 1331-1345.
66. Yehuda R. Sensitization of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis in posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 821: 57-75.
67. Panek M, Pietras T, Szemraj J, Kuna P, Association analysis of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) haplotypes (ER22/23EK, N363S, BclI) with mood and anxiety disorders in patients with asthma. *Ther Med*, 2014; 8 (2): 662-670.
68. Reincke M, Fassnacht M, Vath S, Mora P, Allolio B, Adrenal Incidentalomas a manifestation of the metabolic syndrome? *Endocr Res*, 1996; 22 (4): 757-761.
69. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, Del Viscovo L, Nuzzo V, Lombardi G, Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85 (4): 1440-1448.
70. Terzzolo M, Bovio S, Pia A, Conton PA, Reimondo G, Dall'Asta C, Bemporad D, Angeli A, Opocher G, Mannelli M, Ambrosio B, Mantero F, Midnight serum cortisol as a marker of increased cardiovascular risk in patients with a clinically inapparent adrenal adenoma. *Eur J Endocrinol*, 2005; 153 (2): 307-315.
71. Rosmond R, Dallman MF, Bjorntorp P, Stress-related cortisol secretion in men: relationship with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83 (6): 1853-1859.
72. Bjorntorp P, Holm G, Rosmond R, Hypothalamic arousal, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Med*, 1999; 16 (5): 373-383.
73. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev*, 2004; 25 (5): 831-866.

74. Peppa M, Maria Krania M, Raptis SA, Hypertension and other morbidities with Cushing's syndrome associated with corticosteroids: a review. *Integr Blood Press Control*, 2011; 4: 7-16.
75. Da Silva JA, Larbre JP, Seed MP, Cutolo M, Vilaggio B, Scott DL, Willoughby DA, Sex differences in inflammation induced cartilage damage in rodents. The influence of sex steroids. *J Rheumatol*, 1994; 21 (2): 330-337.
76. Da Silva JA, Peers SH, Perretti M, Willoughby DA, Sex steroids affect glucocorticoid response to chronic inflammation and to interleukin-1. *J Endocrinol*, 1993; 136 (3): 389-397.
77. Ukkola O, Rosmond R, Tremblay A, Bouchard C, Glucocorticoid receptor BclI variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long – term overfeeding. *Atherosclerosis*, 2001; 157 (1): 221-224.
78. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SW, The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003; 59 (1): 68-74.
79. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG, An association between a *BclI* restriction length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinemia in obese women. *J Mol Endocrinol*, 1992; 9 (3): 295-300.
80. Rosmond R, Chagnon YC, Chagnon M, Perusse L, Bouchard C, Bjorntorp P, A polymorphism in the 5'-flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism*, 2000; 49 (9): 1197-1199.
81. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, et al, Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res*, 1997; 5 (3): 186-192.
82. Szappanos A, Patocs A, Toke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Liko I, Racz K, Toth m, BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009; 71 (5): 636-643.
83. Morelli V, Donadio F, Eller-Vainicher C, Cirello V, Olgiati L, Savoca C, Cairoli E,

- Salcuni AS, Beck-Peccoz P, Chiodini I, Role of glucocorticoid receptor polymorphism in adrenal incidentalomas. *Eur J Clin Invest*, 2010; 40 (9): 803-811.
84. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson RH, Connor JM, Lever AF, Fraser R, Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corner approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens*, 1992; 10 (5): 473-82.
 85. Yan YX, Dong J, Wu LJ, Shao S, Zhang J, Zhang L, Wang W, He Y, Liu YQ, Association between polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J Epidemiol*, 2013; 23 (5): 389-395.
 86. Moreira RPP, Gomes LG, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TASS, Influence of the A3669G glucocorticoid receptor gene polymorphism on the metabolic profile of pediatric patients with congenital adrenal hyperplasia. *Int J Endocrinol*, 2014; Article ID 594710.
 87. Lian Y, Xiao J, Wang Q, Ning L, Guan S, Ge H, Li F, Liu J, The relationship between glucocorticoid receptor polymorphisms, stressful life events, social support, and post-traumatic stress disorder. *BMC Psychiatry*, 2014; 14 (232): 1-10.
 88. Bachmann AW, Sedgley TL, Jackson RV, Gibson JN, Young RM, Torpy DJ, Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 2005; 30 (3): 297-306.
 89. Brouwer JP, Appelhof BC, van Rossum EF, Koper JW, Fliers E, Huyser J, Schene AH, Tijssen JG, Van Dyck R, Lamberts SW, Wiersinga WM, Hoogendijk WJ, Prediction of treatment response by HPA-axis and glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 2006; 31 (10): 1154-1163.
 90. Galecka E, Szemraj J, Bienkiewicz M, Majsterek I, Przybyłowska-Sygut K, Galecki P, Lewinski A, Single nucleotide polymorphisms of NR3C1 gene and recurrent depressive disorder in population of Poland. *Mol Biol Rep*, 2013; 40 (2): 1693-1699.
 91. Reuter M, Markett S, Melcher M, Montag C, Interaction of the cholinergic system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a risk factor for depression: evidence from a genetic association study. *Neuroreport*, 2012; 23 (12): 717-720.

92. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Despres JP, Drapeau V, Perusse L, Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphisms in young females. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88 (7): 3141-3145.
93. Ukkola O, Perusse L, Chagnon YC, Despres JP, Bouchard C, Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001; 25 (9): 1332-1339.
94. Clement K, Philipi A, Jury C, Pidival R, Hager J, Demenais F, Basdevant A, Guy-Grand B, Frougel P, Candidate gene approach of familial morbid obesity: linkage analysis of the glucocorticoid receptor gene. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996; 20 (6): 507-512.
95. Rosa Maciel GA, Moreira RPP, Bugano DDG, Hayashida SAY, Marcondes JAM, Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TASS, Baracat EC, Association of glucocorticoid receptor polymorphisms with clinical and metabolic profiles in polycystic ovary syndrome. *Clinics*, 2014; 69 (3): 179-184.
96. Boyle B, Koranyi K, Patocs A, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, Racz K, Balazs C, Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves ophthalmopathy. *Br J Ophthalmol*, 2008; 92 (1): 131-134.
97. Werner SC, Modification of the classification of the eye changes of Graves disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992; 10: 473-482.
98. Decorti G, De Iudicibus S, Stocco G, Martelossi S, Drigo I, Bartolli F, Ventura A, Glucocorticoid receptor polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2006; 55 (7): 1053-1054.
99. De Iudicibus S, Stocco G, Martelossi S, Drigo I, Norbedo S, Lionetti P, Pozzi E, Barbarino A, Decorti G, Bartoli F, Ventura A, Association of BclII polymorphism of the glucocorticoid receptor gene locus with response to glucocorticoids in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2007; 56 (9): 1319-1320.
100. Donn R, Payne D, Ray D, Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007; 67 (3): 342-345.
101. Lee EB, Kim JY, Lee YJ, Song YW, Glucocorticoid receptor polymorphisms in

- Korean patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2005; 64 (3): 503-504.
102. van Oosten MJM et al., Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene which modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2010; 12 (4): R159..
 103. Corvol H, Nathan N, Charlier C, Chadelat K, Le Rouzic P, Tabary O, Fauroux B, Henrion-Caude A, Feingold J, Boelle PY, Clement A, Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with progression of lung disease in young patients with cystic fibrosis. *Respir Res*, 2007; 8: 88.
 104. Patel AS, Karagas MR, Perry AE, Spencer SK, Nelson HH, Gene-drug interaction at the glucocorticoid receptor increases risk of squamous cell skin cancer. *J Invest Dermatol*, 2007; 127 (8): 1868-1870.
 105. Trementino L, Appolloni G, Concettoni C, Cardinaletti M, Boscaro M, Arnaldi G, Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G with decreased risk of developing diabetes in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2012; 166 (1): 35-42.
 106. Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH, Wust S, Sex specific association between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress. *Biol Psychiatry*, 2007; 62 (8): 863-869.
 107. van den Akker EL, Russcher H, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Hokken A, Pols HA, Koper WJ, Lamberts SW, Glucocorticoid receptor polymorphisms affects transrepression but not transactivation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91 (7): 2800-2803.
 108. Hansson GK, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352 (16): 1685-1695.
 109. Koeijvoets KC, van den Net JB, van Rossum EF, Steyerberg EW, Defesche JC, Kastelein JJ, Lamberts SW, Sijbrands EJ, Two commom haplotypes of the glucocorticoid receptor gene are associated with increased susceptibility to cardiovascular disease in men with familial hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008; 93 (12): 4902-4908.
 110. van den Akker EL, Koper JW, van Rossum EF, Dekker MJ, Russer H, de Jong FH,

- Uitterlinden AG, Hofman A, Pols HA, Witteman JC, Lamberts SW, Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med*, 2008; 168 (1): 33-39.
111. Varricchio L, Masselli E, Alfani E, Battistini A, Migliaccio G, Vannucchi AM, Zhang W, Rondelli D, Godbold J, Ghinassi B, Whitsett C, Hoffman R, Migliaccio AR, The dominant negative β isoform of the glucocorticoid receptor is uniquely expressed in erythroid cells expanded from polycythemia vera patients. *Blood*, 2011; 118 (2): 425-436.
 112. Damjanovic SS, Antic JA, Ilic BB, Beleslin Cokic B, Iovic M, Ognjanovic SI, Isailovic TV, Popovic BM, Bozic IB, Tatic S, Matic G, Todorovic VN, Paunovic I, Glucocorticoid receptor and molecular chaperones in the pathogenesis of adrenal incidentalomas: potential role of reduced sensitivity to glucocorticoides. *Mol Med*, 2012; 18: 1456-1465.
 113. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW, Koper JW, Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90 (10): 5804-5810.
 114. Jewell CM, Cidlowski JA, Molecular evidence for a link between the N363S glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92 (8): 3268-3277.
 115. Koper JW, Stolk RP, De lange P, Huizenga NATM, Molijn GJ, Pols HAP, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann HO, Lamberts SW, Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Human Genet*, 1997; 99 (5): 663-668.
 116. de Lange P, Koper JW, Huizenga NA, Brinkmann AO, de Jong FH, Karl M, Chrousos GP, Lamberts SW, Differential hormone-dependent transcriptional activation and repression by naturally occurring human glucocorticoid receptor variants. *Mol Endocrinol*, 1997; 11 (8): 1156-1164.
 117. Russcher H, van Rossum EFC, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW, Koper JW, Increased expression of the glucocorticoid receptor gene - A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Mol Endocrinol*, 2005, 19 (7):

1687-1696.

118. Tissing WJ, Meijerink JP, de Boer ML, Brinkhof B, van Rossum EFC, van Wering ER, Koper JW, Sonneveld DP, Pieters R, Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2005; 11 (16): 6050- 6056.
119. van Rossum EFC, Lamberts SWJ, Glucocorticoid resistance syndrome: A diagnostic and therapeutic approach. *Best Pract res Clin Endocrinol Metab*, 2006; 20 (4): 611-26.
120. van West D, Van Den Eede F, Del-Favero J, Souery D, Norrbanc K, Van Duijn C, Sluijs S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Deboutte D, Van Broeckhoven C, Claes S, Glucocorticoid receptor gene-based SNP analysis in patients with recurrent major depression. *Neuropsychopharmacology*, 2006; 31 (3): 620-627.
121. Van Rossum EFC, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van De Waal HA, Kemper HC, Lamberts SWJ, The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89 (8): 4004-9.
122. Finken MJ, Meulenbelt I, Dekker FW, Frölich M, Romijn JA, Slagboom PE, Wit JM, Dutch POPS-19 Collaborative Study Group, The 23E variant of the R23K polymorphism in the glucocorticoid receptor gene protects against postnatal growth failure and insulin resistance after preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92 (12): 4777-82.
123. van Winsen LM, Hooper-van Veen T, van Rossum EFC, Koper JW, Borkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, Glucocorticoid receptor gene polymorphism associated with more aggressive diseases phenotype in MS. *J Neuroimmunol*, 2007; 186 (1-2): 150-5.
124. van den Akker ELT, Nouwen JL, Melles DC, van Rossum EFC, Koper JW, Uitterlinden AG, Hofman A, Verbrugh HA, Pols HA, Lamberts SW, van Belkum A, *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *J Infect Dis*, 2006; 194 (6): 814-818.
125. van Rossum EFC, de Jong FJ, Koper JW, Uitterlinden AG, Prins ND, van Dijk EJ, Koudstaal PJ, Hofman A, Lamberts SW, Breteler MM, Glucocorticoid receptor

- variant and risk of dementia and white matter lesions. *Neurobiol Aging*, 2008; 29 (5): 716-23.
126. van Rossum EFC, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Solyakina D, Lamberts SW, Holsboer F, Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry*, 2006; 59 (8): 681-8.
 127. Maneneschijn L, van den Akker ELT, Lamberts SWJ, van Rossum EFC, Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci*, 2009; 1179: 179-198.
 128. Loose DS, Do YS, Chen TL, Feldman D, Demonstration of glucocorticoid receptor in the adrenal cortex: evidence for a direct dexamethasone suppressive effect on the rat adrenal gland. *Endocrinology*, 1980; 107 (1): 137-146.
 129. Yang K, Challis JR, Fetal and adult sheep adrenal cortical cells contain glucocorticoid receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 162 (2): 604-611.
 130. Root B, Abrassart J, Myers DA, Monau T, Dursay CA, Expression and distribution of glucocorticoid receptors in the ovine fetal adrenal cortex: effect of long-term hypoxia. *Reprod Sci*, 2008; 15 (5): 517-528.
 131. Jiang X, Wang J, Luo T, Li Q, Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its feed-backregulation in serotonin transporter knock-out mice. *Psychoneuroendocrinology*, 2009; 34 (3): 317-331.
 132. Paust HJ, Loeper S, Else T, Bamberger AM, Papadopoulos G, Pankoke D, Saeger W, Bamberger CM, Expression of the glucocorticoid receptor in the human adrenal cortex. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2006; 114 (1): 6-10.
 133. Kontula K, Pomoell UM, Gonsalus GL, Pelkonen R, Glucocorticoid receptors and responsiveness of normal and neoplastic human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985; 60 (2): 283-289.
 134. Bourdeau I, Lacroix A, Schuch W, Caron P, Antakly T, Stratakis CA, Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88 (8): 3931-3937.
 135. Bouligand J, Delemer B, Hecart AC, Meduri G, Vienchareun S, Amazit L, Trabado

- S, Feve B, Guiochon-Mantel A, Yong J, Lombes M, Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *PloS One*, 2010; 5 (10): e13563.
136. Boyle B, Butz H, Liko I, Zalatnai A, Toth M, Feldman K, Horanyi J, Igaz P, Racz K, Patocs A, Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids*, 2010; 75 (10): 695-700.
137. Tacon LJ, Soon PS, Gill AJ, Chou AS, Clarkson A, Bothing J, Stalberg PL, Skogseid BM, Robinson BG, Sidhu SB, Clifton-Bligh RJ, The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94 (11): 4591-4599.

8. Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

GC - Glukokortikoidni hormoni (glukokortikoidi)

GR – Glukokortikoidni receptor

NR3C1 - Glukokortikoidni receptor (HUGO nomenklatura)

hGR – Humani glukokortikoidni receptor

GREs – Specifične sekvence u okviru promotora ciljnih gena (eng. *glucocorticoid responsive elements*)

CRH - Kortikotropin-oslobađajući hormon (eng. *corticotropin-releasing hormon*)

ACTH - Adrenokortikotropni hormon (eng. *adrenocorticotropic hormon*)

ACTHR - Adrenokortikotropni receptor

CREs - Specifične sekvence u okviru promotora ciljnih gena (eng. *cAMP responsive elements*)

NTR – Region koji se ne prevodi

NTD – Amino terminalni domen

AP1 - Transkripcioni faktor

NFκB - Transkripcioni faktor

IL-1 - Interleukin 1

IL-6 - Interleukin 6

COX-1 - Ciklooksigenaza 1

COX-2 - Ciklooksigenaza 2

NTR - Netranslatirajući region

AF1- Prvi transaktivacioni subdomen

AF2 – Drugi transaktivacioni subdomen

DBD – DNK vezujući domen

LBD – Ligand vezujući domen

iRNK - Informaciona ribonukleinska kiselina

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

NLS1 – Prvi nuklearni lokalizacioni signal

NLS2 – Drugi nuklearni lokalizacioni signal

Hsp90 - Šaperon-protein toplothog stresa od 90 kDa

Hsp70 - Šaperon-protein toplothog stresa od 70 kDa
Hsp40 - Šaperon-protein toplothog stresa od 40 kDa
p23 - Košaperon-protein toplothog stresa od 23 kDa
Hip - Košaperon (eng. *Hsc70-interacting protein*)
Hop - Košaperon (eng. *Hsp-organising protein*)
MAPK – Mitogenom aktivirana proteinska kinaza
CDK – Ciklin zavisna kinaza
GSK-3 – Kinaza-3 glikogen sintaze
JNK – N-terminalna kinaza c-Jun-a
FKBP59 - Imunofilin
FKBP51 - Imunofilin
Cyp40 - Imunofilin
PP1 – Proteinska fosfataza tipa 1
PP2a – Proteinska fosfataza tipa 2a
PP5 – Proteinska fosfataza tipa 5
PEST - Konzervativni motiv
SUMO – Mali modificovani protein sličan ubikvitinu (eng. *small ubiquitin related modifier*)
BAG-1 - Molekularni regulator šaperona iz BAG porodice (eng. *BAG family molecular chaperon regulator 1*)
ATP - Adenozin trifosfat
cAMP - Ciklični adenozin monofosfat
PKA - Protein kinaza A
TRP - Tetratrikopeptidni ponovak (eng. *tetratricopeptide repeat*)
BTM - Bazalna transkripciona mašinerija (eng. *basal transcription machinery*)
PI3K - Fosfoinozimid 3-kinaza (eng. *phosphoinositide 3-kinase*)
STAT - Aktivator transkripcije i transdukcije signala (eng. *signal transducer and activation of transcription*)
HPA – Osa hipotalamus – hipofiza – nadbubrežne žlezde
TT – Telesna težina
TV – Telesna visina

OS – Obim struka

OK – Obim kukova

ITM – Indeks telesne mase (eng. *BMI*)

WHR – Odnos obima struka i kukova (eng. *Waist to Hip Ratio*)

TA – Arterijski krvni pritisak

HOMA-IR - Model za izračunavanje insulinske rezistencije (eng. *homeostasis model assesment-insulin resistance*)

LDL - Holesterol male gustine

CRP - C-reaktivni protein

DHEA - Didehidroepiandrosteron

PRA - Aktivnost renina u plazmi (eng. *plasma renin activity*)

CT - Kompjuterizovana tomografija

MR - Magnetna rezonanca

PBS - Puferski rastvor pH 7.4 u čiji sastav ulaze 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄ i 1.8 mmol/L KH₂PO₄ (eng. *phosphate buffered saline*)

PCR – eng. *Polymerase Chain Reaction*

RFLP – eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*

ATA – eng. *American Thyroid Association*

SCC – Karcinom skvamoznih ćelija

PTSP – Posttraumatski stresni poremećaj (eng. *Posttraumaric Stress Disorder-PTSD*)

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јадранка Антић

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај полиморфизама у генима за глукокортикоидни и адренкортикотропни

рецептор у настанку адреналних инциденталом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07.04.2015.

Јадранка Антић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јадранка Антић

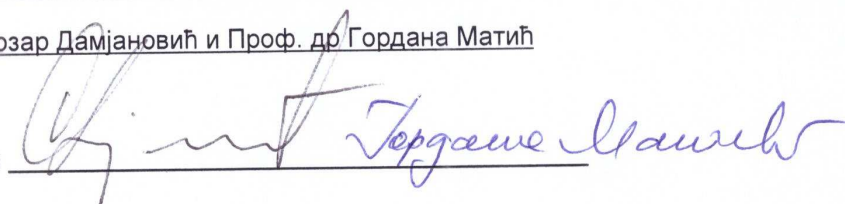
Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада Значај полиморфизама у генима за глукокортикоидни и
адренкортикотропни рецептор у настанку адреналних инциденталом

Ментор Проф. Др Светозар Дамјановић и Проф. др Гордана Матић

Потписани/а



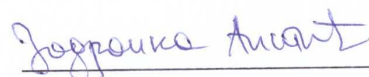
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 07.04.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Значај полиморфизама у генима за глукокортикоидни и

адренкортикотропни рецептор у настанку адреналних инциденталома

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

- 1. Ауторство
- 2. Ауторство - некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
- 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
- 5. Ауторство – без прераде
- 6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 07.04.2015.

