

Polimorfizmi gena za glukokortikoidne receptore i rizik metaboličkoga sindroma u bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde

Šimunov, Bojana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:661897>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Bojana Šimunov

**Polimorfizmi gena za glukokortikoidne
receptore i rizik metaboličkoga
sindroma u bolesnika s
incidentalomom nadbubrežne žlijezde**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Bojana Šimunov

**Polimorfizmi gena za glukokortikoidne
receptore i rizik metaboličkoga
sindroma u bolesnika s
incidentalomom nadbubrežne žlijezde**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za endokrinologiju, Klinike za unutarnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Darko Kaštelan

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za endokrinologiju i Zavoda za tipizaciju tkiva i imunogenetiku KBC-a Zagreb te djelatnicima Odjela za medicinsku genetiku Sveučilišta u Torinu. Hvala mentoru na pomoći tijekom izrade disertacije. Zahvaljujem svom suprugu, roditeljima i bratu. Bez Vaše ljubavi i podrške ove disertacije ne bi bilo. Disertaciju posvećujem Mariji i Nikoli.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Incidentalomi nadbubrežne žlijezde	1
1.1.1. Definicija, epidemiologija	1
1.1.2. Etiologija i patogeneza	1
1.1.3. Dijagnostička obrada incidentaloma	5
1.1.4. Autonomna sekrecija kortizola.....	8
1.1.5. Bilateralni incidentalomi nadbubrežnih žlijezda	11
1.2. Metabolički sindrom	13
1.2.1. Definicija	13
1.2.2. Patogeneza i značaj.....	14
1.3. Glukokortikoidni receptor.....	17
1.3.1. Građa i uloga	17
1.3.2. Varijabilnost glukokortikoidnog receptora.....	18
1.3.3. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor.....	18
1.3.4. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor i metabolički sindrom..	20
1.3.5. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor u bolesnika s incidentalomom	21
2. HIPOTEZA.....	22
3. CILJEVI RADA	23
3.1. Opći cilj	23
3.2. Specifični ciljevi	24
4. ISPITANICI I METODE	25

4.1. Ispitanici	25
4.1.1. Uključni kriteriji	25
4.1.2. Isključni kriteriji	25
4.2. Klinička obrada ispitanika	25
4.3. Laboratorijska obrada ispitanika	26
4.4. Hormonski testovi	27
4.4.1 Prekonoćni deksametazonski test supresije	27
4.5. Kriteriji za dijagnozu pojedinih bolesti	27
4.5.1 Autonomna sekrecija kortizola	27
4.5.2. Metabolički sindrom	27
4.5.3. Hipertenzija	28
4.5.4. Šećerna bolest / intolerancija glukoze	28
4.5.5. Dislipidemija	28
4.5.6. Pretilost	28
4.6. Protokol po posjetama	29
4.7. Određivanje polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor	30
4.8. Statistička obrada podataka	31
4.9. Etička načela	31
5. REZULTATI	32
5.1. Opće karakteristike ispitanika	32
5.2. Učestalost polimorfizama i analiza povezanosti	34
5.3. Analiza podgrupa	38
5.3.1. Bolesnici s hipertenzijom	38
5.3.2. Bolesnici sa šećernom bolesti	39

5.3.3. Bolesnici s dislipidemijom	40
5.3.4. Pretili bolesnici	41
5.3.5. Bolesnici s metaboličkim sindromom	42
5.3.6 Bolesnici s autonomnom sekrecijom kortizola.....	43
5.3.7 Bolesnici s bilateralnim tumorima.....	45
5.3.8. Karakteristike bolesnika ovisno o vrijednosti kortizola u prekonócnom DTS	47
5.3.9. Karakteristike bolesnika ovisno o veličini tumora	49
5.4. Analiza povezanosti veličine tumora i vrijednosti kortizola u prekonócnom DTS	51
5.5. Analiza rizika metaboličkog sindroma u bolesnika s incidentalomom	52
5.6. Analiza rizika hipertenzije u bolesnika s incidentalomom.....	54
5.7. Analiza rizika šećerne bolesti u bolesnika s incidentalomom	56
5.8. Analiza rizika dislipidemije u bolesnika s incidentalomom.....	58
5.9. Analiza rizika pretilosti u bolesnika s incidentalomom.....	60
5.10. Analiza rizika autonomne sekrecije kortizola u bolesnika s incidentalomom...	62
6. RASPRAVA.....	64
7. ZAKLJUČAK.....	72
8. SAŽETAK.....	74
9. ABSTRACT	75
10. POPIS LITERATURE.....	76
11. ŽIVOTOPIS	90

POPIS KRATICA

A adenin

ACTH adrenokortikotropni hormon

ADA Američka udruga za dijabetes prema engl. „American Diabetes Asscoiation“

AHA Američka udruga za srce prema engl. „American Heart Asscoiation“

ASK autonomna sekrecija kortizola

BMI indeks tjelesne mase prema engl. „body mass index“

C citozin

cAMP-PKA ciklički 3'-5'- adenin monofosfat protein-kinaza A

CT kompjuterizirana tomografija

CTNNB1 katenin beta 1

DNK deoksiribonukleinska kiselina

G gvanin

GS α α -podjedinica stimulirajućeg G-proteina

GR glukokortikoidni receptor

GR α glukokortikoidni receptor α

GR β glukokortikoidni receptor β

GRE- elementi odgovora na glukokortikoide prema engl. „glucocorticoid response elements“

GUP glukoza u plazmi

HbA1c glikirani hemoglobin

HDL lipoprotein velike gustoće prema engl. „High Density Lipoprotein“

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti prema engl. „high performance liquid chromatography“

HU Houndsfieldove jedinice prema engl. „Houndsfield units“

IDF Međunarodna dijabetička federacija prema engl. „International Diabetes Federation“

IQR interkvartilni raspon

kB parovi kilobaza

LDL lipoprotein male gustoće prema engl. „Low Density Lipoprotein“

MAF učestalost minor alela prema engl. „Minor Allele Frequency“

MetS metabolički sindrom

MR magnetska rezonanca

mRNA glasnička ribonukleinska kiselina

NHLBI Nacionalni institut za srce, pluća i krv prema engl. „National Heart, Lung and Blood Institute“

PCR lančana reakcija polimeraze prema engl. „Polymerase Chain Reaction“

PKA protein-kinaza A

PRKACA α -katalitička podjedinica protein-kinaze A

RAP reninska aktivnost plazme

SD standardna devijacija

SMK slobodne masne kiseline

SNP jednonukelotidni polimorfizam prema engl. „single nucleotide polymorphism“

T timin

TA temperatura anealiranja u lančanoj reakciji polimeraze

VLDL lipoprotein vrlo male gustoće prema engl. „Very Low Density Lipoprotein“

POPIS SLIKA

Slika 1 Zone nadbubrežne žlijezde i pripadajući produkti	5
Slika 2 Prikaz obrade bolesnika s incidentalomom	7
Slika 3 Postupnik s bolesnicima s autonomnom sekrecijom kortizola.....	10
Slika 4 Patogeneza metaboličkog sindroma	15
Slika 5 Gen za glukokortikoidni receptor (NR3C1)	17

POPIS TABLICA

Tablica 1 Vrste tumora i učestalosti	4
Tablica 2 Komorbiditeti vezani uz autonomnu sekreciju kortizola.....	8
Tablica 3 Učinkovitost 1mg DTS u dijagnozi ASK prema(7)	9
Tablica 4 Kriteriji za dijagnozu metaboličkog sindroma	13
Tablica 5 PCR i početnice za pirosekvencioniranje	30
Tablica 6 Kliničke karakteristike ispitanika	33
Tablica 7 Usporedba učestalosti polimorfizama s referentom populacijom	34
Tablica 8 Analiza povezanosti polimorfizma BclII	35
Tablica 9 Analiza povezanosti polimorfizma N363S.....	36
Tablica 10 Analiza povezanosti polimorfizma ER22/23EK	37
Tablica 11 Karakteristike bolesnika s hipertenzijom	38
Tablica 12 Karakteristike bolesnika sa šećernom bolesti.....	39
Tablica 13 Karakteristike bolesnika s dislipidemijom	40
Tablica 14 Karakteristike pretilih bolesnika.....	41
Tablica 15 Karakteristike bolesnika s metaboličkim sindromom	42
Tablica 16 Karakteristike bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola.....	44
Tablica 17 Karakteristike bolesnika s bilateralnim tumorima.....	46
Tablica 18 Karakteristike bolesnika ovisno o vrijednosti kortizola u prekonocnom DTS	48
Tablica 19 Karakteristike bolesnika ovisno o veličini tumora	50
Tablica 20 Korelacija kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu i veličine tumora s kliničkim karakteristikama	51
Tablica 21 Univarijatna logistička regresija prediktora metaboličkog sindroma.....	52
Tablica 22 Multivarijatna logistička regresija za ishod metabolički sindrom.....	53
Tablica 23 Univarijatna logistička regresija prediktora hipertenzije.....	54
Tablica 24 Multivarijatna logistička regresija s ishodom hipertenzija.....	55
Tablica 25 Univarijatna logistička regresija prediktora šećerne bolesti.....	56
Tablica 26 Multivarijatna logistička regresija s ishodom šećerna bolest	57
Tablica 27 Univarijatna logistička regresija prediktora dislipidemije.....	58
Tablica 28 Multivarijatna logistička regresija s ishodom dislipidemija.....	59
Tablica 29 Univarijatna logistička regresija prediktora pretilosti	60

Tablica 30 Multivarijatna logistička regresija s ishodom pretilost.....	61
Tablica 31 Univarijatna logistička regresija prediktora autonomne sekrecije kortizola ...	62
Tablica 32 Multivarijatna logistička regresija s ishodom autonomne sekrecije kortizola	63

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Incidentalomi nadbubrežne žlijezde

1.1.1. Definicija, epidemiologija

Adrenalni incidentalomi su tumori nadbubrežnih žlijezda koji su otkriveni slučajno dijagnostičkom slikovnom obradom koja nije učinjena radi evaluacije funkcije i morfologije nadbubrežnih žlijezda (1). Incidentalomi su *per definitionem* slučajan nalaz. U najvećem broju slučajeva, radi se o nefunkcionalnim adenomima nadbubrežnih žlijezda, ali može se raditi i tumorima koji zahtijevaju daljnju obradu i terapiju npr. karcinom nadbubrežnih žlijezda, feokromocitom, hormonski-aktivan adenom ili metastaza. Po navedenoj definiciji, tumori nadbubrežnih žlijezda otkriveni u dijagnostičkoj obradi osoba s nasljednim sindromima koji uključuju tumore nadbubrežnih žlijezda nisu incidentalomi, kao ni tumori otkriveni tijekom obrade bolesnika s poznatom tumorskom bolesti („tumor staging“). Adrenalnim incidentalomima se dogovorno smatraju tek tumori veći od 1cm (1,2).

S razvojem slikovnih dijagnostičkih metoda i rastom njihove dostupnosti, rasla je i učestalost dijagnoze incidentaloma (3). U različitim serijama učestalost incidentaloma varirala je. Temeljem velikih obdukcijских serija govorimo o 2% (raspon 1.0 do 8.7%) (4–6). Češći su u žena (omjer 1.7:1), i u bijele rase (7). U radiološkim serijama, učestalost je iznosila oko 3% u dobi od 50 godina(8,9). Učestalost raste s dobi, pa adrenalni incidentalomi predstavljaju rijedak nalaz u mladih ljudi, a sa starenjem prevalencija raste te ih se nalazi i u do 10% ljudi starijih od 70 godina (1,8).

1.1.2. Etiologija i patogeneza

Adrenalni incidentalomi mogu biti porijeklom iz srži ili kore nadbubrežne žlijezde, ali mogu biti i ekstraadrenalog podrijetla, benigni ili maligni. Procijenjena

učestalost različitih tvorbi i njihove prirode (maligne ili benigne) varira ovisno o tome gledaju li se kirurške ili nekirurške serije. U Tablici 1 je prikazana etiologija i učestalost pojedinih vrsta incidentaloma, prema (2). Većina adrenalnih incidentaloma su nefunkcionalni adenomi (1,10).

Velik napredak u molekularnom razumijevanju patogeneze adrenalnih tumora postignut je u zadnjem desetljeću. Signalni put cAMP-protein kinaza A (cAMP-PKA) važan je u regulaciji razvoja adrenokortikalnih stanica. Adrenokortikotropni hormon (ACTH) se veže za ACTH-receptor (receptor vezan uz G protein, kodiran MCR2 genom) u adrenokortikalnoj stanici. Vezanjem liganda na receptor aktivira se adenililciklaza, sinteza cAMP i aktivacija protein-kinaze A (PKA). Smatra se da je abnormalno povišen signalni put cAMP-PKA ključni mehanizam u patogenezi većine benignih adrenokortikalnih lezija (11).

Autonomna sekrecija kortizola nalazi se u velikom broju adrenokortikalnih adenoma. Klinički značajnu nalazimo i u do 40% bolesnika. (7,12). Većinom se radi o ACTH-neovisnoj sekreciji kortizola iz adenoma. Ipak, u manjem dijelu slučajeva aberantna aktivacija receptora vezanih s G-proteinom predloženi su kao mehanizam autonomne sekrecije (13). Mutacije u beta-kateninu (CTNNB1) koje dovode do konstitutivne aktivacije signalnog puta Wnt čest su nalaz u kako benignim tako i malignim adrenalnim tumorima (14). Wnt signalni put smatra se važnim u embrionalnom razvoju adrenalne žlijezde (15). U studiji Bonnet i sur. od 100 kirurški odstranjenih adenoma, čak 36% imalo je CTNNB1 mutaciju (16). Također somatske aktivirajuće mutacije GNAS-a, koji kodira α -podjedinicu stimulirajućeg G-proteina (G α), nalaze se u 5-17% adrenalnih adenoma koji izlučuju kortizol (17,18). Od inaktivirajućih mutacija, opisane su mutacije PRKAR1A gena u tumorima nadbubrežnih žlijezda koji proizvode kortizol. PRKAR1A gen kodira regulatornu podjedinicu protein kinaze A (PKA) i inaktivirajuća mutacija dovodi do konstitutivne aktivacije cAMP-PKA signalnog puta. Iako su mutacije tog gena prvo opisane u Carneyevom kompleksu (19), rijetkom pedijatrijskom poremećaju, somatske mutacije PRKAR1A opisane su u sporadičnim adrenokortikalnim tumorima (19). Somatske aktivirajuće mutacije protein-kinaze A katalitičke podjedinice (PRKACA) implicirane su pak i do 50% adenoma sa slikom klinički manifestnog Cushingovog sindroma, ali ne i u adenomima koji proizvode manje kortizola (14,17,19). Mutacije PRKACA mogle bi

biti povezane s manjim adenomima ali višom razinom kortizola u odnosu na adenome bez mutacije PRKACA (17). Niža frekvencija tih mutacija u adenomima koji proizvode manje kortizola, mogla bi biti objašnjene zašto u tih pacijenata ne dolazi do progresije u manifestni Cushingov sindrom. Također, mutacije cikličke-nukleotid fosfodiesteraze opisane su u adenomima nadbubrežne žlijezde. To su enzimi koji razgrađuju cikličke nukleotide i time reguliraju razinu cAMP u stanici i signalni put PKA. Najčešće su opisivane mutacije PDE11A i PDE8B (20,21).

Tablica 1 Vrste tumora i učestalosti

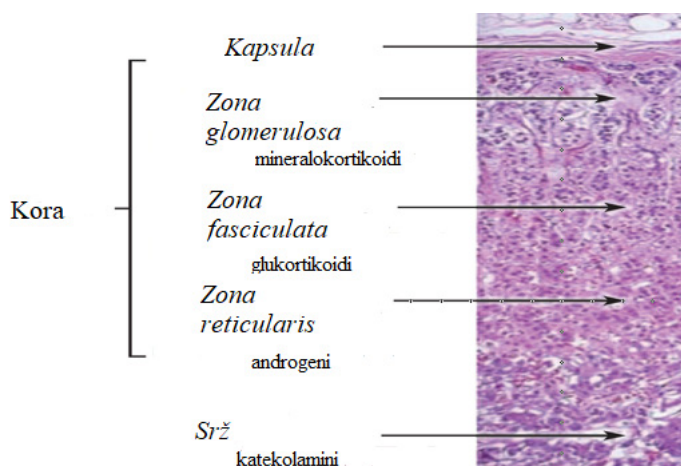
Vrsta tumora	Medijan (%)	Raspon (%)
Serije koje uključuje sve pacijente s tvorbom NŽ*		
Adenom	80	33-96
Nefunkcionalni	75	71-84
Autonomna sekrecija kortizola	12	1.0-29
Aldosteronom	2.5	1.6-3.3
Feokromocitom	7.0	1.5-14
Adrenokortikalni karcinom	8.0	1.2-11
Metastaze	5.0	0-18
Kirurške serije**		
Adenom	55	49-69
Nefunkcionalni	69	52-75
Autonomna sekrecija kortizola	10	1.0-15
Aldosteronom	6.0	2.0-7.0
Feokromocitom	10	11-23
Adrenokortikalni karcinom	11	1.2-12
Mijelolipom	8.0	7.0-15
Cista	5.0	4.0-22
Ganglioneurom	4.0	0-8.0
Metastaze	7.0	0-21
*prema (5,9,22) **prema (5,6,9,22–26)		
NŽ- nadbubrežna žlijezda		

1.1.3. Dijagnostička obrada incidentaloma

Prema trenutnim smjernicama(1,27), ključno je paralelno odgovoriti na dva pitanja: ima li tvorba maligni potencijal i je li funkcionalno aktivna.

Za razlikovanje benignih od malignih incidentaloma slikovna metoda prvog izbora je nativni CT (1,28). U dijagnostici se koristi činjenica da su adenomi nadbubrežne žlijezde dobro ograničene, homogene tvorbe, bogate mastima za razliku od malignih tvorbi, što daje tipične niske koeficijente apsorpcije na CT-u. (29) Vrijednost HU manja od 10 je visoko prediktivna za adenom i s velikom sigurnošću se može isključiti malignitet (30). Za tvorbe manje od 4cm, jasnih karakteristika adenoma na nativnom CT-u (<10HU), nije potrebna daljnja slikovna obrada niti slikovno praćenje (1,9). Ukoliko tvorba nema jasne radiološke karakteristike adenoma, daljnja slikovna obrada može uključivati kontrastni CT, MR ili pozitronsku emisijska tomografija s CT-om (PET-CT) obilježena s fluorodeoksiglukozom (FDG) ili se može učiniti kirurško liječenje, ovisno o pojedinom slučaju. Za tvorbe veće od 4cm preporučuje se detaljna obrada i individualizirana odluka multidisciplinarnog tima.

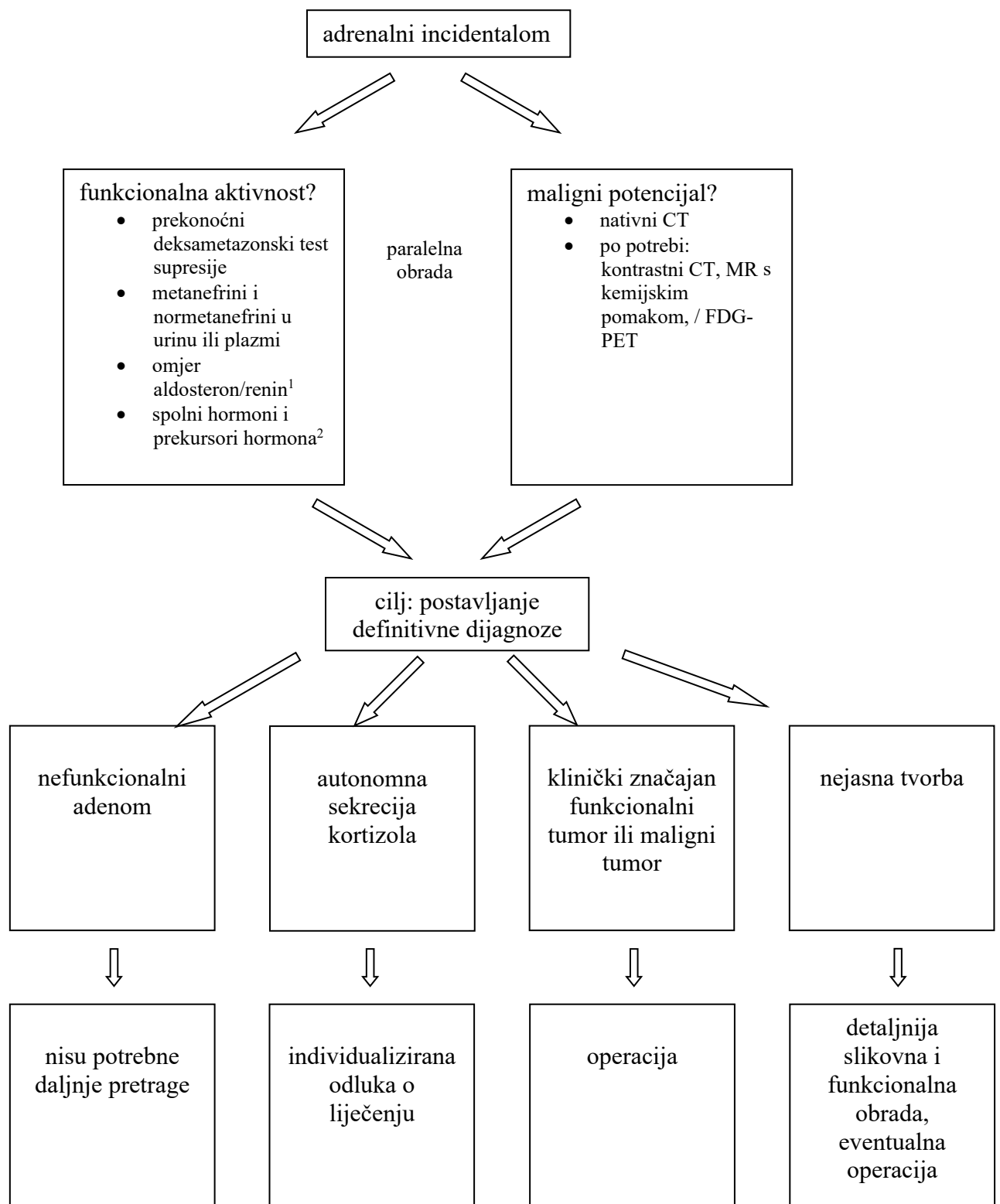
Paralelno s morfološkim karakteristika incidentaloma potrebno je procijeniti i funkcionalne karakteristike, tj. radi li se o sekretornom ili nesekretornom tumoru. Za procjenu funkcionalne aktivnosti važno je procijeniti aktivnost svih slojeva nadbubrežne žlijezde (Slika 1).



Slika 1 Zone nadbubrežne žlijezde i pripadajući produkti prema (31)

Za procjenu aktivnosti srži potrebno je učiniti metanefrine i normetanefrine u 24h urinu kako bi se isključio feokromocitom. Za procjenu aktivnosti *zone fasciculate* tj. glukokortikoidne aktivnosti važno je bolesnicima učiniti test supresije deksametazonom. Za procjenu aktivnosti *zone glomerulose* (mineralokortikoidi) i *zone reticularis* (androgeni) hormonski testovi se rade po indikaciji, to jest ako je prisutna hipertenzija (renin i aldosteron) ili virilizacija, hirzutizam, ginekomastija (spolni hormoni).

Zajedničkim pristupom morfologiji i funkciji, u većine bolesnika moguće je postaviti definitivnu dijagnozu prilikom same prezentacije bolesnika. Tijek obrade prikazan je shematski na Slici 2.



1) samo u bolesnika s hipertenzijom

2) samo u bolesnika s kliničkim znakovima viška spolnih hormona ili pri sumnji na adrenokortikalni karcinom

1.1.4. Autonomna sekrecija kortizola

Autonomna sekrecija kortizola noviji je naziv za ono što se ranije zvalo subklinički Cushingov sindrom (1,31). Radi se o bolesnicima u kojih ne postoji klinička slika hiperkortizolizma tj. Cushingovog sindroma već samo biokemijski višak kortizola u dijagnostičkim testovima koji ukazuje na poremećaj osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Poremećaj je opisao Ross još 1994. i dao mu ime (31). Daljnja istraživanja su pokazala kako s vremenom ne dolazi do progresije u manifestni Cushingov sindrom (5,23,32,33) i da se radi o značajno drugačijem poremećaju od Cushingova sindroma koji nosi ozbiljan morbiditet i mortalitet (34–36). S obzirom na navedeno, naziv poremećaja je promijenjen u autonomna sekrecija kortizola.

Iako u bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola ne dolazi do progresije u jasni Cushingov sindrom, dokazana je povezanost s drugim komorbiditetima (Tablica 2).

Tablica 2 Komorbiditeti vezani uz autonomnu sekreciju kortizola

Komorbiditet	Referenca
Arterijska hipertenzija	(32,37–40)
Šećerna bolest tip 2/ Intolerancija glukoze	(32,37–42)
Pretilost	(32,37,38)
Dislipidemija	(32,37–39)
Osteoporoza	(40–42)

Iz Tablice 2 je vidljivo da se većinom radi o komponentama metaboličkog sindroma, koja svaka posebno, ali i zajedno nose nepovoljnu prognozu zbog povišenog kardiovaskularnog rizika (43). Patogeneza metaboličkog sindroma u bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola nije posve jasna, ali ulogu igra inzulinska rezistencija, kao i u bolesnika bez adrenalnih incidentaloma, i posljedična hiperinzulinemija (44). Također, višak kortizola samostalno utječe na hipertrigliceridemiju neovisno o tjelesnoj težini (45). Novija istraživanja potvrđuju da autonomna sekrecija kortizola potiče akumulaciju visceralne masti što ima patogenetsku

ulogu u razvitku kardiovaskularnih komplikacija (46). Istraživanja su pokazala da autonomna sekrecija kortizola nosi dodatni kardiovaskularni rizik, neovisan o prisutnosti pojedinih faktora rizika (37,41,47,48) iz čega proizlazi dodatni interes za ovo ne tako rijetko stanje. Također, u istraživanju Patrove i sur. pokazan je viši mortalitet u skupini s autonomnom sekrecijom kortizola, koji nije bio pripisiv isključivo kardiovaskularnim smrtima (49). Trenutno smjernice naglašavaju individualizirani pristup pacijentu ovisan o komorbiditetima i dobi pacijenta.

Temelj dijagnostike autonomne sekrecije kortizola je prekonocni deksametazonski test supresije. Pacijent navečer u 23h popije 1mg deksametazona, a ujutro u 8h se određuje vrijednost kortizola u krvi. Test je praktičan jer ne zahtijeva hospitalizaciju i jednostavno se provodi, ali ima svoja ograničenja. Deksametazon se metabolizira preko citokroma 3A4 te svi lijekovi koji induciraju ili inhibiraju aktivnost citokroma 3A4 utječu na koncentraciju deksametazona, a time i na rezultat testa (7). Također, neka od stanja koja mogu utjecati na rezultate testa aktivacijom osi hipotalamus - hipofiza - nadbubrežna žlijezda su alkoholizam, depresija, morbidna pretilost i anoreksija (34). Iako je deksametazonski test temelj dijagnostike, ne postoji konsenzus svih društava o graničnim vrijednostima za dijagnozu autonomne sekrecije kortizola (1,4,50). U Tablici 3 su prikazane osjetljivosti i specifičnosti testa uz različite granične točke (engl. „*cut-off*“).

Tablica 3 Učinkovitost 1mg DTS u dijagnozi ASK prema(7)

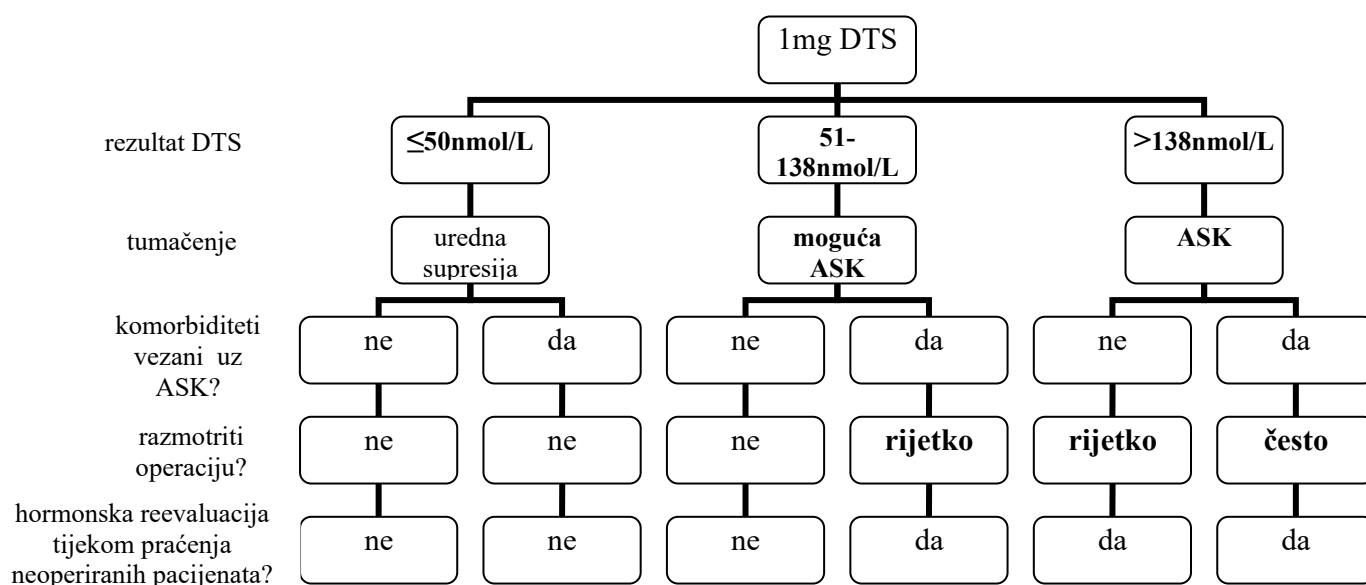
<i>Cut-off</i>	SE(%)	SP(%)
>50nmol/L	75-100	67-72
>83nmol/L	63	75
>138nmol/L	44-58	83-100

ASK - autonomna sekrecija kortizola DST - deksametazonski test supresije

SE - osjetljivost SP -specifičnost

Iz tablice je vidljivo da svaka granična točka ima različitu stopu osjetljivosti i specifičnosti. Ipak, trenutno se u najvećem broju europskih centara koriste smjernice prikazane na Slici 1 koje obuhvaćaju dvije granične vrijednosti navedene u Tablici 3.

Naime, kortizol nakon DTS viši od 138nmol/L kriterij je za jasnu autonomnu sekreciju kortizola. Kortizol nakon DTS viši od 50 nmol/L kriterij je za moguću autonomnu sekreciju kortizola (1). U evaluaciji stupnja autonomne sekrecije kortizola mogu se dopunski koristiti i druge pretrage: ACTH, slobodni kortizol u urinu , i kortizol u slini u 23h (1,7).



DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola

Slika 3 Postupnik s bolesnicima s autonomnom sekrecijom kortizola prema (1)

Po postavljenoj dijagnozi jasne autonomne sekrecije kortizola ili moguće autonomne sekrecije kortizola, daljnje liječenje ovisi o dobi i stanju bolesnika kao i o prisutnosti komorbiditeta. Unilateralnu adrenalektomiju treba razmotriti u bolesnika s komorbiditetima koji mogu biti povezani s autonomnom sekrecijom kortizola kao što su hipertenzija, šećerna bolest, osteoporoza ili pretilost (Slika 3). U odabiru modaliteta liječenja u obzir treba uzeti i preferencije bolesnika. Također, u bolesnika u kojih se planira adrenalektomija nužno je dokazati da se radi o ACTH neovisnom tumoru. U slučaju izbora konzervativnog liječenja (neoperativnog), indicirano je endokrinološko praćenje bolesnika uz periodičku hormonsku reevaluaciju. Zaključno, u odabiru metode liječenja bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola nužna je odluka multidisciplinarnog tima uz individualizaciju liječenja svakog pojedinog pacijenta.

1.1.5. Bilateralni incidentalomi nadbubrežnih žlijezda

Bolesnici s bilateralnim tumorima predstavljaju također izdvojenu skupinu unutar populacije bolesnika s adrenalnim incidentalomima. Naime, bilateralni incidentalomi se javljaju po literaturi u oko 15% bolesnika (8%-22%) s adrenalnim incidentalomima (51–53). Njihova učestalost jasno govori u prilog sustavnog uzroka jer se javljaju značajno češće nego što bi to bilo statistički vjerojatno za dva nezavisna događaja. S druge strane potvrđeni uzroci kao deficit 21-hidroksilaze, razmjerno su rijetki (54) i ne objašnjavaju većinu bolesnika s bilateralnim incidentalomima. Etiologija bilateralnih incidentaloma razlikuje se od one unilateralnih. Dvije velike studije koje su ukupno uključivale više od 1000 pacijenata navode metastaze, bilateralnu makronodularnu hiperplaziju i bilateralne adenome kao najčešće etiologije bilateralnih incidentaloma (51,55). Rijetki uzroci bilateralnih incidentaloma su bilateralni feokromocitomi, kongenitalna adrenalna hiperplazija, Cushingova bolest ili ektopično lučenje ACTH sa sekundarnom bilateralnom adrenalnom hiperplazijom (56). Nedavno je opisano i da mutacije gena za glukokortikoidni receptor mogu biti uzrok bilateralnih incidentaloma (57).

Osnovna obrada bolesnika s bilateralnim incidentalomima mora kao i u bolesnika s unilateralnim incidentalomom odgovoriti na pitanje radi li se o malignim lezijama i jesu li hormonski aktivne. Razlika je u tome što treba isključiti i adrenalnu insuficijenciju i specifično isključiti kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju. Naime destrukcija više od 90% adrenalnog tkiva, neovisno o etiologiji lezije, može dovesti do adrenalne insuficijencije. Oblici kongenitalne adrenalne hiperplazije koji se javljaju kasnije (tzv. „late onset“) često se dijagnosticiraju tek u odrasloj dobi npr. manjak 21-dehidroksilaze. Iz tog razloga bolesnicima s bilateralnim incidentalomima uputno je učiniti i mjerenje 17-hidroksiprogesterona (56). Ono što treba uvijek uzeti u obzir da nije nužna ista etiologija oba incidentaloma te treba svaki promatrati i zasebno.

U bolesnika s bilateralnim incidentalomima veća je učestalost autonomne sekrecije kortizola nego u bolesnika s unilateralnim tumorima (58,59). Posljedice autonomne sekrecije kortizola su veći kardiovaskularni rizik i nepovoljni ishodi (48). Pojedina istraživanja nisu našla razliku u učestalosti hipertenzije, dijabetesa i pretilosti u

bolesnika s bilateralnim u odnosu na unilateralne tumore, već samo razliku u osteoporotskim frakturama (60).

Zaključno, slično kao i u bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola, liječenje bolesnika s bilateralnim incidentalomima mora biti individualizirano i ovisno o komorbiditetima (1,56).

1.2. Metabolički sindrom

1.2.1. Definicija

Metabolički sindrom skup je rizičnih čimbenika za kardiovaskularne bolesti i šećernu bolest tip 2. Sam pojam sindroma govori da se ne radi o jednoj bolesti već o stanjima koja se češće pojavljuju zajedno. Komponente metaboličkog sindroma su arterijska hipertenzija, centralna pretilost, hipertrigliceridemija, snižena razina HDL kolesterola i povišena glukoza natašte (16). Iako se o metaboličkom sindromu pod tim imenom govori i piše zadnjih tridesetak godina, prva opažanja značajno su starija (61,62). Metaanalize pokazuju da bolesnici s metaboličkim sindromom imaju dvostruko veći rizik od nepovoljnih kardiovaskularnih ishoda te 1.5 puta veću opću smrtnost (63). U literaturi je prisutno nekoliko definicija metaboličkog sindroma koje se razlikuju u načinu definiranja i mjerenja centralne pretilosti. Prema kriterijima IDF i AHA/NHLBI (43): tri od pet navedenih stanja predstavljaju uvjet za dijagnozu metaboličkog sindroma (Tablica 4).

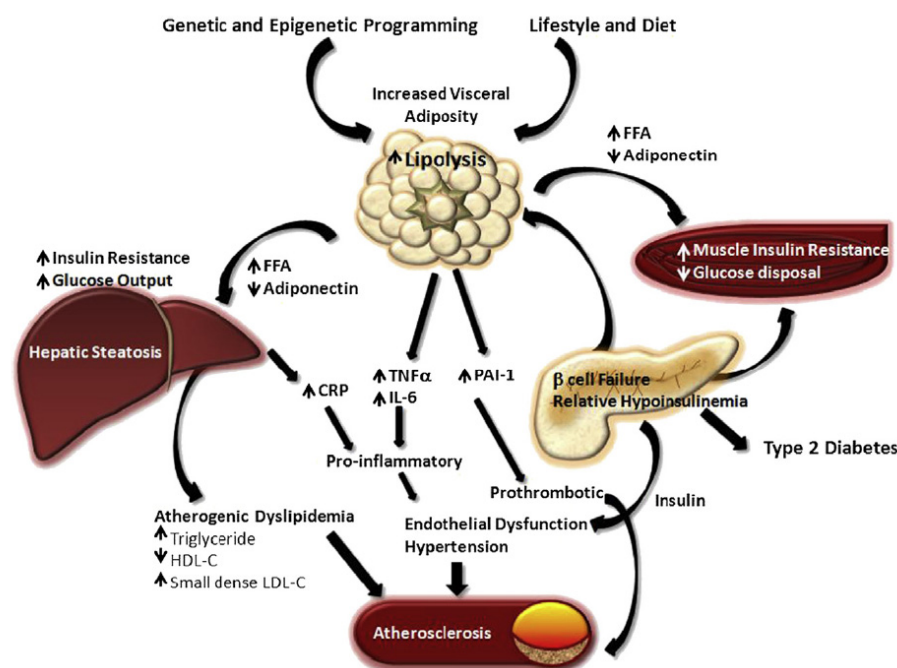
Tablica 4 Kriteriji za dijagnozu metaboličkog sindroma

Komponenta	vrijednost
povećan opseg struka	za europsku populaciju: >94cm za muškarce >80cm za žene
hipertrigliceridemija (ili uzimanje lijeka radi sniženja triglicerida)	$\geq 1.7 \text{ mmol/L}$
snižen HDL (ili uzimanje lijeka radi povišenja HDL)	$< 1 \text{ mmol/L}$ za muškarce $< 1.3 \text{ mmol/L}$ za žene
povišen krvni tlak (ii uzimanje antihipertenziva))	sistolički tlak $\geq 130 \text{ mmHg}$ i/ili dijastolički tlak $\geq 85 \text{ mmHg}$
povišena glukoza natašte (ili uzimanje hipoglikemika)	$> 5,6 \text{ mmol/L}$

1.2.2. Patogeneza i značaj

S porastom unosa kalorija i manjkom kretanja, uslijed sedentarnog životnog stila dolazi do pojave suficita unesene energije. Suvišna energija pohranjuje se kao masno tkivo. Svo masno tkivo nije isto - visceralna mast, u usporedbi s potkožnom, ima različiti genski izražaj i povezana je s inzulinskom rezistencijom, manjim česticama lipoproteina male gustoće (LDL) i lipoproteina visoke gustoće (HDL), ali zato brojnijim LDL i česticama lipoproteina vrlo male gustoće (VLDL) (64–66). Inzulinska rezistencija dovodi do nemogućnosti beta stanica da izluče dovoljne količine inzulina i do relativne inzulinopenije. To pak dovodi do pojačane aktivnosti hormon-ovisne lipaze i pojačane lipolize triglicerida iz adipocita što dovodi do povećane razine slobodnih masnih kiselina (SMK) (66). Prema portalnoj teoriji metaboličkog sindroma (Slika 3), SMK iz masnog tkiva dolaze do jetre gdje se pohranjuju kao trigliceridi.(67,68) Protok SMK u jetri stimulira hepatalnu produkciju VLDL-a što rezultira hipertrigliceridemijom. Izmjena triglicerida iz VLDL-a za estere kolesterola iz HDL-a rezultira bržim klirensom HDL-a. Suvišni trigliceridi se također ugrađuju u LDL, koji postaje atraktivniji za hepatalnu lipazu što pak dovodi do pojačane lipolize triglicerida i rezultira malim gustim LDL česticama (69). Male guste LDL čestice aterogeniji su podtip LDL-a i sklonije su taloženju u stijenkama arterija (70). Klinički se dislipidemija pretilosti vidi kao hipertrigliceridemija, uz snižen HDL i povišeni omjer malog gustog LDL-a u ukupnom LDL-u.

Povećani dotok SMK na periferiju također inhibira inzulinsku signalizaciju (Slika 4). Uz inzulinsku rezistenciju u jetri, i obilje SMK kao supstrata, glukoneogeneza je pojačana što dovodi do hiperglikemije. Mišićna pak inzulinska rezistencija dovodi do smanjenje utilizacije glukoze u miocitima. S vremenom beta-stanice se iscrpljuju uslijed pokušaja da kompenziraju povećanu potrebu za inulinom uslijed inzulinske rezistencije što posljedično vodi do dijabetesa tipa 2 (69). (Slika 4)



Slika 4 Patogeneza metaboličkog sindroma prema (70), uz dopuštenje Elsevier Inc
CRP-C-reaktivni protein,IL-6 interleukin 6, PAI-1 plazminogen aktivator inhibitor 1, TNF α faktor nekroze tumora α

Razvoj hipertenzije u metaboličkom sindromu je multifaktorijalan, barem dijelom vjerojatno uvjetovan endotelnom disfunkcijom. SMK generiraju reaktivne oblike kisika koji djeluju kao slobodni radikali i oštećuju endotel. Hiperinzulinemija aktivira simpatikus i inhibira sintazu dušikovog oksida, što sve uz adipocitokine doprinosi endotelnoj disfunkciji (71). Također, renin-angiotenzinski sustav pojačano je aktivan u pretilih (71).

Uz sve ranije navedeno ulogu u patogenezi metaboličkog sindroma imaju i adipokini kao i brojni genetski i epigenetski faktori. Zbog brojnih čimbenika koji sudjeluju u istoj, patogeneza samog sindroma nije još posve razjašnjena. Uz dislipidemiju, šećernu bolest tip 2 i hipertenziju, metabolički sindrom povezan je između ostalog i s nealkoholnom bolesti jetre (72) i sindromom policističnih jajnika(73), poremećajima u kojima je također prisutan metabolički disbalans, a u patogenezi kojih se nalazi i inzulinska rezistencija.

Značaj metaboličkog sindroma je u njegovoj učestalosti i riziku koji nosi. S obzirom na epidemiju debljine, podatci govore da je u populaciji starijoj od 40 godina prevalencija metaboličkog sindroma i do 40% (74). Procjene su da dijagnoza metaboličkog sindroma nosi dvostruko veći relativni rizik od kardiovaskularnih bolesti

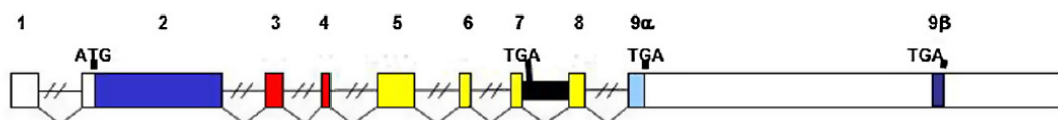
u idućih pet do deset godina te čak 5 puta veći relativni rizik od dijabetesa tip 2 u istom periodu (69). Samim time prevencija metaboličkog sindroma i što bolja terapija važan su cilj kako javnozdravstvenih politika, tako i pojedinih liječnika praktičara.

1.3. Glukokortikoidni receptor

1.3.1. Građa i uloga

Glukokortikoidi su steroidni hormoni podrijetlom iz kore nadbubrežne žlijezde. Sudjeluju u regulaciji brojnih procesa u organizmu: metaboličkoj homeostazi, upali, imunosti, razvoju i reprodukciji. U fiziološkim dozama koriste se kao nadomjesna terapija adrenalne insuficijencije. U suprafiziološkim, farmakološkim dozama glukokortikoidi suprimiraju ili preveniraju upalu i druge imunološki posredovane procese te predstavljaju jedne od najčešće korištenih lijekova u medicini. (75)

Učinak glukokortikoida posredovan je vezanjem na glukokortikoidni receptor (GR). Glukokortikoidni receptor ekspimiran je gotovo u svim stanicama tijela te sudjeluje u regulaciji razvoja, metabolizma, upale i imunskog sustava. Dio je obitelji nuklearnih receptora, ligand ovisnih transkripcijskih faktora. Gen za GR (NR3C1, MIM#138040) nalazi se na kratkom kraku kromosoma 5 (5q31Y23)(76). Veličine je 150kB i sastoji se od 9 eksona: nekoliko varijanti za nekodirajući prvi ekson i 8 protein-kodirajućih eksona: ekson 2 do eksona 9 (77)(Slika 5). Uz nekoliko varijanti za nekodirajući prvi ekson, alternativno izrezivanje (engl. *splicing*) moguće je na 3'-kraju gdje se mogu kristiti dvije varijante eksona 9, što dovodi do dvije izoforme glukokortikoidnog receptora α (GR α) i glukokortikoidnog receptora β (GR β). Uz varijante zbog izrezivanja, korištenje alternativnih start-kodona dovodi do translacijskih izoformi. Različite izoforme, kako translacijske tako i one nastale alternativnim izrezivanjem, mogu biti različito ekspimirane u tkivima što doprinosi varijabilnosti učinka glukokortikoida.



Slika 5 Gen za glukokortikoidni receptor (NR3C1, kromosom 5q31–32) modificirano prema (77)

Sam glukokortikoidni receptor modularni je protein koji se sastoji od N-terminalne transaktivacijske domene, središnje domene koja veže deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i C-terminalne domene koja veže ligand. U odsutnosti liganda, GR se nalazi u citoplazmi kao multimerni proteinski kompleks sa proteinima pratiteljima (engl. *chaperons*): HSP90, HSP23, FKBP51 i FKBP52. Nakon vezanja liganda, kompleks disocira i dolazi do translokacije receptora i liganda u jezgru. U jezgri GR ulazi u interakciju sa specifičnim DNK sekvencama- elementima odgovora na glukokortikoide (engl. *glucocorticoid response elements*, GRE) ili s drugim transkripcijskim faktorima i tako regulira transkripciju ciljnih gena (77).

1.3.2. Varijabilnost glukokortikoidnog receptora

Iz kliničke prakse dobro je poznata varijabilnost učinka glukokortikoida u terapijskim dozama. U zdravoj populaciji velika je i interindividualna raznolikost odgovora na glukokortikoide što je vidljivo iz različitog odgovora na deksametazonski test supresije (78). Doza potrebna za jednak terapijski učinak razlikuje se između pojedinih bolesnika, kao što se razlikuje i učestalost nuspojava na jednake doze (79). S druge strane, individualni odgovor na kortikosteroide razmjerno je konstantan (78). Varijabilnost terapijskog odgovora na kortikosteroide posredovana je, uz farmakokinetičku i farmakodinamsku varijabilnost, i varijabilnošću glukokortikoidnog receptora. Razlikujemo transkripcijsku, posttranskripcijsku i translacijsku varijabilnost, kao i gensku varijabilnost (77,80). Sve one dovode do različitih izoformi GR s različitim profilom genske ekspresije i regulacije (81).

1.3.3. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor

Različiti učinak kortizola može biti posljedica različite razine kortizola, ali i različitog odgovora tkiva na kortizol. Mutacije koje uzrokuju izrazitu jasnu osjetljivost (82) ili rezistenciju na kortizol (83,84) izrazito su rijetke. S druge strane polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor su česti. Polimorfizmi su trajna i simultana pojava dva ili više genotipa u jednoj populaciji. Polimorfizam se može odnositi na razliku u jednom nukleotidu tzv. SNP (prema eng „ single nucleotid polymorphism“) ili na

velike sekvence nukleotida (85). Baza podataka o polimorfizmima za glukokortikoidni receptor trenutno broji 35267 SNP u ljudskom genu za glukokortikoidni receptor, većinom u intronima i netranslatiranim regijama, s vrlo niskim učestalostima (86). Od toga broja SNP-a, istraživani su samo neki kod kojih je nađen biološki učinak. Polimorfizam pojedinih nukleotida unutar gena za glukokortikoidni receptor povezan je s povećanom ili smanjenom osjetljivošću na djelovanje glukokortikoida (87). Najčešće su istraživani ER22/23EK, N363S i BclI.

BclI polimorfizam (rs41423247) je C→G zamjena u intronu 2, 646 pb nizvodno od kraja eksona 2. Mehanizam djelovanja polimorfizma BclI je nepoznat (77). Dosadašnja istraživanja pokazala su da je polimorfizam BclI povezan s pojačanom osjetljivošću na djelovanje glukokortikoida što se očituje kao povećana abdominalna pretilost (88), viši tlak, jača supresija u deksametazonskom testu (89), a nađena je povezanost i s depresijom.(90)

N363S polimorfizam (rs56149945, ranije rs6195) je A→G zamjena koja rezultira zamjenom asparagina (N) serinom (S) u kodonu 363. Molekularni mehanizam djelovanja je nepoznat (77). N363S polimorfizam povezuje se s pojačanom osjetljivošću na glukokortikoide, smanjenim inzulinskim odgovorom na deksametazon i višim indeksom tjelesne mase (91).

ER22/23EK polimorfizam (rs6189+rs6190) su dva povezana polimorfizma u kodonima 22 i 23 gena za glukokortikoidni receptor. Zamjena GGA.GAG →GAA.AAG dovodi do jedne promjene u aminokiselini: glutaminska kiselina(E), arginin(R) mijenja se u glutaminska kiselina(E), lizin(K). Molekularni mehanizam djelovanja polimorfizma sastoji se u smanjenoj transaktivacijskoj sposobnosti. U GR mRNA kao translacijski start kodoni mogu se koristiti i AUG-1 i AUG-27, s time da glukokortikoidni receptor koji nastaje korištenjem AUG-27 (GR-B) ima veću sposobnost transaktivacije od glukokortikoidnog receptora koji nastaje korištenjem AUG-1 (GR-A) (92). Polimorfizam ER22/23EK dovodi do promjene u sekundarnoj strukturi mRNA glukokortikoidnog receptora koja rezultira promjenom ravnoteže korištenja kodona u korist AUG-1, što dovodi do prepisivanja manje aktivne receptorske izoforme, GR-A. Pokazana je smanjena transaktivacijska sposobnost nositelja polimorfizma, in vitro i ex vivo, dok je transrepresijska sposobnost nepromijenjena. (93). Nositelji ER22/23EK alela su relativno otporniji na učinke

glukokortikoida, što rezultira nižim vrijednostima LDL kolesterola, inzulina i nižom inzulinskom rezistencijom, tj. povoljnijim metaboličkim profilom (91,94). Nađena je i manja učestalost hipertenzije u nositelja polimorfizma ER22/23EK (95). Sam rizik kardiovaskularnih bolesti nije jasno povezan s navedenim najčešće istraživanim polimorfizmima (89,96).

1.3.4. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor i metabolički sindrom

Glukokortikoidi su hormoni koji sudjeluju u regulaciji metabolizma. Kortizol u fiziološkim uvjetima utječe na homeostazu glukoze u produženom gladovanju ili naporu- povećava glikogenolizu i jetrenu glukoneogenezu. Kortizol također djeluje katabolički na metabolizam masti i proteina. Kortizol direktno utječe na sintezu VLDL, SMK i aktivnost jetrene endotelne lipaze. Indirektno pak utječe na razinu lipida povećavajući inzulinsku rezistenciju. Sumarno, kortizol povećava razinu cirkulirajućeg VLDL i LDL, ali ne i HDL, s posljedičnim porastom triglicerida i ukupnog kolesterola. Također kortizol utječe na distribuciju masti, s predilekcijom za abdominalno nakupljanje masti (77). Iz kliničke prakse dobro je poznato da glukokortikoidi u terapijskim dozama dovode do inzulinske rezistencije i razvoja jatrogenog dijabetesa.

Iz svega navedenog je vidljivo da je djelovanje kortizola pospješuje nastanak metaboličkog sindroma. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor koji djeluju na osjetljivost na glukokortikoide bi posljedično tome mogli modulirati i razvoj ili tijek metaboličkog sindroma. Istraživanja su se fokusirala na polimorfizme ER22/23EK, N363S i BclI. Pojedina istraživanja našla su povezanost BclI polimorfizma i nekih od komponenata metaboličkog sindroma (88,97–99), dok druga nisu našla povezanost (100). Polimorfizam ER22/23EK pak povezan je s manjom učestalošću hipertenzije (95), kao i povoljnijim sastavom tijela tj. manje masnog tkiva (91). U nekoliko studija nađena je i povezanost polimorfizma N363S s pretilošću (101–103), ali isti rezultati nisu ponovljeni u drugim populacijama (98). Metaanalize nisu našle dokaze za značajnu povezanost polimorfizma N363S s pretilošću.(98)

1.3.5. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor u bolesnika s incidentalomom

Populacija bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde zanimljiva je za proučavanje polimorfizama GR iz više razloga. Glukokortikoidni receptor dio je povratne sprege adrenalne proizvodnje glukokortikoida. Budući da polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor utječu na osjetljivost na glukokortikoide, moguća je uloga u nastanku samih incidentaloma kao i modifikaciji metaboličkog odgovora (54). Istraživanja polimorfizama u selekcioniranoj populaciji s incidentalomom nisu brojna. Pokazana je veća učestalost komponenti metaboličkog sindroma u pacijentima s polimorfizmima BclI i N363S i incidentalomom nadbubrežne žlijezde, sukladno rezultatima u općoj populaciji (104). Novija istraživanja govore u prilog tezi da smanjena osjetljivost u nositelja BclI može biti uzrok nastanka incidentaloma(105). U pojedinim istraživanjima nađena je povećana učestalost BclI u pacijenata s incidentalomom(105), dok u drugima nema razlike (54).

Također, populacija bolesnika s incidentalomom predstavlja zanimljiv model za istraživanje koliko polimorfizmi utječu na osjetljivost bolesnika na djelovanje glukokortikoida. Naime po nekim istraživanjima oko 30% adrenalnih incidentaloma pokazuje neke odlike autonomne sekrecije kortizola (2) pa je zanimljivo vidjeti utječu li polimorfizmi na ishod dugotrajne izloženosti povišenim vrijednostima kortizola, tj. na fenotip bolesnika.

S obzirom na sve navedeno u bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde učestalost pojedinih polimorfizama bi mogla biti povezana s etiologijom samih incidentaloma, s učestalošću komponenata metaboličkog sindroma, a time i povećanim kardiovaskularnim rizikom te s eventualnim odgovorom na višak kortizola.

2. HIPOTEZA

Pojedini polimorfizmi (SNP) gena za glukokortikoidni receptor povezani su s koncentracijom kortizola u deksametazonskom testu (BcII) i rizikom metaboličkog sindroma (N363S, ER22/23EK) u bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Analizirati korelaciju između polimorfizma gena (SNP) za glukokortikoidni receptor i fenotipa bolesnika, što se prvenstveno odnosi na parametre metaboličkog sindroma te koncentracije kortizola u deksametazonskom testu u bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde kao mjere osjetljivosti na glukokortikoide.

3.2. Specifični ciljevi

1. Pokazati učestalost pojedinih polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor u populaciji bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde.
2. Ukazati na moguću ulogu polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor u riziku nastanka metaboličkoga sindroma u bolesnika s adrenalnim incidentalomom.
3. Ispitati povezanost pojedinih komponenti metaboličkog sindroma i polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor.
4. Ispitati povezanost pojedinih polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor i bilateralnih incidentaloma
5. Ispitati povezanost pojedinih polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor i autonomne sekrecije kortizola.
6. Ispitati koji su prediktori autonomne sekrecije kortizola u bolesnika s adrenalnim incidentalomom.
7. Analizirati podgrupe bolesnika ovisno o veličini tumora.
8. Analizirati podgrupu bolesnika s bilateralnim tumorima.
9. Ispitati povezanost veličine tumora i koncentraciju kortizola u prekonoćnom deksametazonskom testu.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

4.1.1. Uključni kriteriji

U istraživanje su uključeni bolesnici zaprimljeni radi dijagnostičke obrade prethodno verificiranog incidentaloma nadbubrežne žlijezde u Zavod za endokrinologiju Klinike za unutrašnje bolesti KBC-a Zagreb. Ispitanici su punoljetni bolesnici s incidentalomom nadbubrežnih žlijezda verificiranim kompjuteriziranom tomografijom ili magnetskom rezonancom. Svi potencijalni ispitanici dobili su obavijest za pacijenta i informirani pristanak, prethodno odobren od svih nadležnih etičkih povjerenstava te je proveden razgovor o istraživanju. Svi ispitanici dali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

4.1.2. Isključni kriteriji

Isključeni kriteriji bili su nemogućnost informiranog pristanka, feokromocitom, primarni hiperaldosteronizam, klinički Cushingov sindrom, adrenokortikalni karcinom, metastaze u nadbubrežnoj žlijezdi, uzimanje egzogenih glukokortikoida, radiološke karakteristike ne-adenoma (>10HU).

4.2. Klinička obrada ispitanika

Pri uključenju u istraživanje, uzeta je detaljna anamneza i status. Dobiveni podatci uključivali su visinu, težinu, krvni tlak, BMI, opseg struka i bokova, anamnestičke podatke o dijabetesu, hipertenziji, dislipidemiji i prethodnim kardiovaskularnim događajima. Krvni tlak mjereno je sukladno smjericama ESC i ESH iz 2013. godine (106). U opuštenom sjedećem položaju, na nedominantnoj ruci

pacijenta u razini srca, korišten je živin sfingomanometar. Zabilježen je prosjek 3 mjerenja. Opseg struka mjeren je kao najuže mjesto između pupka i ksifoidnog nastavka. Zabilježena je veličina tumora (CT ili MR) i radi li se o bilateralnom ili unilateralnom incidentalomu.

4.3. Laboratorijska obrada ispitanika

Tijekom redovite obrade bolesnika, iz krvi bolesnika ujutro natašte (12 sati) određena je glukoza, inzulin, lipidogram, kreatinin, urea, natrij, kalij, alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, gama-glutamilttransferaza, alkalna fosfataza i kompletna krvna slika. Korišteni su komercijalni dijagnostički testovi za određivanje: glukoza u plazmi (GUP), glikiranog hemoglobina (HbA1c) u dijabetičara, kalij u bolesnika s povišenim krvnim tlakom, kolesterola, triglicerida, lipoproteina velike gustoće (HDL), lipoproteini male gustoće (LDL). Od hormonskih analiza učinjen je adrenokortikotropni hormon (ACTH), kortizol u 24h urinu i vrijednost kortizola nakon prekonocnog deksametazonskog testa (1mg).

Svim pacijentima učinjeni su i metanefrini i normetanefrini u 24h urinu radi isključenja feokromocitoma. Pacijentima s hipertenzijom učinjeni su reninska aktivnost plazme (RAP) i aldosteron radi isključenja primarnog hiperaldosteronizma.

Uzeta je periferna krv radi izolacije leukocitne DNA (3ml krvi, dodatna epruveta, tijekom uobičajene dijagnostičke obrade). Prikupljeni uzorci čuvaju se do kraja istraživanja.

U analizama su korištene standardne preporučene metode,provedene prema uputi proizvođača, uz primjenu pravila dobre laboratorijske prakse. Analize su učinjene u laboratoriju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Za određivanje ACTH u plazmi, kortizola u plazmi i slobodnog kortizola u urinu učinjen je elektrokemiiluminiscentni test na Cobas E601 analizatoru (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). Aldosteron i RAP su određeni korištenjem radioimunoeseja (RIA, Sorin Biomedica, Italija). Metanefrini i normetanefrini određeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, (HPLC, Chromsystem, Grafelfing, Njemačka).

4.4. Hormonski testovi

4.4.1 Prekonoćni deksametazonski test supresije

Večer prije vađenja krvi bolesnik treba u 23h popiti 1mg deksametazona. Idući dan u 8h vadi se 5ml venske krvi radi određivanja kortizola.

4.5. Kriteriji za dijagnozu pojedinih bolesti

4.5.1 Autonomna sekrecija kortizola

Dijagnoza autonomne sekrecije kortizola postavljena je temeljem koncentracije kortizola u prekonoćnom deksametazonskom testu (1 mg) veće od 50nmol/L. (1)

4.5.2. Metabolički sindrom

Dijagnoza metaboličkog sindroma je postavljena na temelju preporuka IDF-a i AHA/NHLBI (43) prema kojima moraju biti pozitivna barem tri od navedenih uvjeta:

- povećan opseg struka (specifično za pojedine populacije- za Europljane $\geq 94\text{cm}$ u muškaraca ili $\geq 80\text{cm}$ u žena)
- koncentracija triglicerida $\geq 1,7\text{ mmol/L}$ (ili liječenje hipertrigliceridemije lijekovima)
- koncentracija HDL-a $< 1,0\text{ mmol/L}$ (muškarci) te $< 1,3\text{ mmol/L}$ (žene)
- povišen krvni tlak (ili terapija antihipertenzivima): sistolički $\geq 130\text{ mmHg}$ i/ili dijastolički $\geq 85\text{ mmHg}$
- koncentracija glukoze natašte $\geq 5,6\text{ mmol/L}$ (ili liječenje hiperglikemije lijekovima)

4.5.3. Hipertenzija

Arterijska hipertenzija definirana je kao sistolički tlak >140 mmHg i/ili dijastolički tlak >90 mmHg i/ili korištenje antihipertenzivnih lijekova (107). Krvni tlak je mjeran sukladno smjernicama ESC iz 2013.

4.5.4. Šećerna bolest / intolerancija glukoze

Šećerna bolest je definirana prema ADA kriterijima (108) kao razina glukoze u plazmi iznad $11,1$ mmol/L uz prisutne simptome (poliurija, polidipsija, neobjašnjiv gubitak na tjelesnoj masi) i/ili glukoza u plazmi natašte veća od 7 mmol/L i/ili glukoza u OGTT-u nakon 2 sata veća od $11,1$ mmol/L i/ili HbA1c veći od $6,5\%$.

Intolerancija glukoze definirana je kao intolerancija glukoze natašte (glukoza natašte od $5,6$ do $6,9$ mmol/L) i/ili intolerancija glukoze u oralnom testu opterećenja glukozom u kojem je glukoza nakon 2 sata od $7,8$ do 11 mol/L. Za procjenu inzulinske rezistencije korišten je HOMA indeks, koji izračunat na temelju formule: (glukoza x inzulini)/ $22,5$, vrijednost iznad $2,5$ je smatrana inzulinskom rezistencijom.

4.5.5. Dislipidemija

Dislipidemija je definirana kao snižena koncentracija HDL kolesterola ($<1,03$ mmol/L za muškarce i $<1,29$ mmol/l za žene) ili uzimanje lijekova za aterogenu dislipidemiju ili povišena koncentracija triglicerida ($\geq 1,69$ mmol/l) ili uzimanje lijekova za hipertrigliceridemiju (109).

4.5.6. Pretilost

Pretilost je definirana kao vrijednost indeksa tjelesne mase veća od 30kg/m^2 . Indeks tjelesne mase izračunan je kao kvocijent tjelesne mase u kilogramima i kvadrata visine u metrima.

4.6. Protokol po posjetama

1. posjeta:

- uzimanje informiranog pristanka, zaštita identiteta ispitanika-poznat gl.istraživaču
- anamneza i status (visina, težina, BMI, opseg struka i bokova, anamnestičke podatke o dijabetesu, hipertenziji, prethodnim kardiovaskularnim događajima, veličina tumora-CT/MR , bilateralni ili unilateralni incidentalom)
- uzimanje uzroka periferne krvi (inzulin, GUK, lipidogram, ACTH) , uzimanje uzorka krvi radi ekstrakcije leukocitne DNA (3ml). Pacijentima s hipertenzijom određena je i reninska aktivnost plazme i aldosteron.
- predaja prethodno skupljenog 24h urina radi određivanja kortizola u 24h urinu.
- davanje uputa za prekonoćni deksametazonski test. Večer prije 2.posjete potrebno je u 23h popiti 1mg deksametazona.

2. posjeta:

- uzimanje uzorka periferne krvi u 8h ujutro radi mjerenja vrijednosti kortizola nakon prekonoćnog deksametazonskog testa. Određivanje metanefrina i normetanefrina u skupljenom 24h urinu s HCl.

4.7. Određivanje polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor

Uzeta je periferna krv radi izolacije leukocitne DNA (3ml krvi, dodatna epruveta, tijekom uobičajene dijagnostičke obrade). Ekstrakcija leukocitne DNA učinjena je u Zavodu za tipizaciju tkiva KBC Zagreb. Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor određeni su Zavodu za medicinsku genetiku Sveučilišta u Torinu, Orbassano, Italija. Korištena je metoda lančane reakcije polimeraze, zatim pirosekvencioniranja. Korišten je laboratorijski kit za pirosekvencioniranje ((Qiagen, Hilden, Njemačka): BclI (rs41423247), N363S (rs56149945) i ER22/23EK (rs6189 and rs6190) na uređaju PyroMark Q96MA (Qiagen, Hilden, Njemačka) kako je opisano u Giordano i sur.(99) Početnice i uvjeti amplifikacije nalaze se u Tablici 5. Za usporedbu učestalosti je korištena referentna europska populacija iz projekta 1000 Genomes. (110)

Tablica 5 PCR i početnice za pirosekvencioniranje

SNP	Prednja početnica	Reverzna početnica	Početnica pirosekvencioniran	TA dužina	PCR amplifikat
ER23/23EK	Bio 5'-GAAGAAAACCCCAGCAGTGTG -3'	5'- GACGCAGAAACCTTCACAGTA GCT -3'	5'- GGTTTATAGAAGTCCATC A-3'	61°C 98bp	a
N363S	5'- ACAGCAGGATCAGAAGCCTA TTT -3'	Bio 5'- AGTTCAGAGTCCCCAGAGAAGT C -3'	5'- CCGTTGGTCCGAAA -3' 119bp	57°C	
BclI	5'- AGGTCTTGCTCACAGGGTCT TG -3'	Bio 5'- GAACTTGCAGGAACATTTGAAC G -3'	5'- AAGTAGACAAGTTATGTC TG -3'	58°C 128bp	
PCR: lančana reakcija polimeraze Bio: 5' biotin modifikacija PCR početnice potrebna za jednolančanu DNA u protokolu pirosekvencioniranja. TA: temperatura anealiranja u lančanoj reakciji polimeraze					

4.8. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program SPSS verzija 25 (Armonk, NY, USA, IBM Corp). Vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Kategorijske varijable prikazane su kao udjeli i postotci. Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. U slučaju normalne distribucije, kontinuirane varijable prikazane su kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD). U slučaju odstupanja od normalne raspodjele, korišten je medijan i interkvartilni raspon (IQR). U statističkoj analizi kategorijskih varijabli korišten je χ^2 test. U slučajevima s manje od 5 ishoda korišten je Fisherov egzaktni test. Za kontinuirane varijable se ovisno o distribuciji koristio parametrijski (t-test, ANOVA) odnosno neparametrijski (Mann-Whitney U, Wilcoxonov, Kruskal-Wallis) test usporedbe. U analizi korelacije, koeficijent korelacije od 0.25 do 0.5 označava slabu povezanost, dok koeficijent od 0.51 do 0.75 označava umjerenu do dobru povezanost, a od 0.76 do 1 izvrsnu povezanost.

4.9. Etička načela

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb kao i od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak. Identitet ispitanika je bio zaštićen. Svi podatci pohranjeni su i obrađivani u elektroničkom obliku. Od prvog uključenja u istraživanje svi podatci prikupljeni su pod šifrom.

5. REZULTATI

5.1. Opće karakteristike ispitanika

Ukupno su analizirana 103 bolesnika, 73 žene (70.9%) i 30 muškaraca (29.1%). Prosječna dob bila je 59.17 ± 10.31 godina. Hipertenziju je imalo 69.9% bolesnika, šećernu bolest 14.6% bolesnika te dislipidemiju 46.6% bolesnika. Pretilih je bilo 74.8%. Metabolički sindrom bio je prisutan u 57.3% bolesnika.

U 21.4% bolesnika radilo se o obostranom incidentalomu, u 41.7% o incidentalomu lijeve nadbubrežne žlijezde, a u 36.9% o incidentalomu desne žlijezde. U 50.5% bolesnika bila je prisutna autonomna sekrecija kortizola. Kliničke karakteristike ispitanika prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6 Kliničke karakteristike ispitanika

Karakteristika(n=103)		
Dob (godine)	59.17 ±10.31	
	N	%
Spol		
muškarci	30	29.1
žene	73	70.9
BMI (kg/m ²)	30.91±5.87	
Hipertenzija	72	69.9
Dislipidemija	48	46.6
Šećerna bolest	15	14.6
Pretilost	77	74.8
Metabolički sindrom	59	57.3
Autonomna sekrecija kortizola	52	50.5
Strana tumora		
lijeva	43	41.7
desna	38	36.9
obostrano	22	21.4
Veličina tumora (mm)	29 (21-38)	
Kortizol nakon prekonocnog DTS (nmol/L)	53 (35-78)	

DTS- deksametazonski test supresije BMI- indeks tjelesne mase

5.2. Učestalost polimorfizama i analiza povezanosti

Učestalost polimorfizma BclI bila je 60% što odgovara Minor alel frequency(MAF) 0.365. Učestalost ER22/23EK bila je 5.9% (MAF 0.03), dok je učestalost N363S iznosila 7.9% (MAF 0.0396). Polimorfizmi su bili u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Nije bilo značajne razlike u odnosu na referentnu europsku populaciju (110) u učestalosti polimorfizama BclI i ER22/23EK. Statistički značajno zastupljeniji bio je polimorfizam N363S. (Tablica 7).

Tablica 7 Usporedba učestalosti polimorfizama s referentom populacijom

Polimorfizam	refSNP	MAF % (n=103)	MAF kontrolne populacije 1000 Genomes EUR (NCBI Assay ID)	
BclI	rs41423247	36.5%	37.97%	$\chi^2=0.48$, p=0.48
ER22/23EK	rs6189	3%	2.98%	$\chi^2=0.01$, p=0.93
	rs6190		2.98%	
N363S	rs56149945	3.96%	1.79%	$\chi^2=12.05$, p<0.001

refSNP - referentni jednonukleotidni polimorfizam MAF-frekvencija minor alela

Povezanost polimorfizama i arterijske hipertenzije, dislipidemije, šećerne bolesti, metaboličkog sindroma, pretilosti, autonomne sekrecije kortizola i bilateralnih adenoma prikazana je u tablicama 8 do 10. Nije nađeno statistički značajne povezanosti navedenih stanja i polimorfizama N363S, BclI i ER22/23EK. U analizi polimorfizma BclI nedostajuća su bila 3 ispitanika, u analizi polimorfizma ER22/23EK 2 ispitanika, a u analizi polimorfizma N363S također 2 ispitanika.

Tablica 8 Analiza povezanosti polimorfizma BclI

	BclI			
	Divlji tip	Homo/heterozigot	p	χ^2
DM	7/40	8/60	0.568	0.33
Hipertenzija	29/40	40/60	0.537	0.38
Dislipidemija	15/40	31/60	0.164	1.94
Pretilost	33/39	41/56	0.188	1.73
MetS	23/40	33/40	0.805	0.06
ASK	19/40	32/60	0.327	0.568
Bilateralni tumori	10/40	12/60	0.554	0.350
BMI(kg/m ²)	30.27±5.14	31.20±6.38	0.452	
veličina tumora (mm)	30(21-38)	28.5(20-39.25)	0.522	
kortizol nakon prekonocnog DTS (nmol/L)	50(30.75- 80)	55.5(37.5-73)	0.880	

DM - šećerna bolest MetS -metabolički sindrom ASK - autonomna sekrecija kortizola

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije

Tablica 9 Analiza povezanosti polimorfizma N363S

	N363S		
	Divlji tip	Homo/heterozigot	p
DM	15/93	0/8	0.601*
Hipertenzija	63/93	7/8	0.429*
Dislipidemija	44/93	3/8	0.721*
Pretilost	68/88	7/8	0.681*
MetS	51/93	6/8	0.460*
ASK	46/93	5/8	0.715*
Bilateralni tumori	20/93	2/8	1.0
BMI (kg/m ²)	31.12±6.01	28.80±4.72	0.294
veličina tumora (mm)	28(20-38)	35(27-38.25)	0.240
kortizol nakon prekonocnog DTS (nmol/L)	50(33.5-75)	62(39.75-137.75)	0.330

DM - šećerna bolest MetS- metabolički sindrom ASK - autonomna sekrecija kortizola

BMI - indeks tjelesne mase DTS- deksametazonski test supresije

*korišten Fisherov egzaktni test.

Tablica 10 Analiza povezanosti polimorfizma ER22/23EK

	ER22/23EK		
	Divlji tip	Homo/heterozigot	p
DM	13/95	2/6	0.217*
Hipertenzija	64/95	6/6	0.173*
Dislipidemija	45/95	2/6	0.683*
Pretilost	70/90	5/6	1.0*
MetS	53/95	4/6	0.694*
ASK	48/95	3/6	0.980*
Bilateralni tumori	19/95	3/6	0.116*
BMI(kg/m ²)	30.65±5.67	34.84±8.72	0.094
veličina tumora (mm)	29(20.5-39.5)	29(21.5-33.25)	0.792
kortizol nakon prekonoćnog DTS (nmol/L)	53(35-78)	49.5(31-122)	0.768

DM - šećerna bolest MetS - metabolički sindrom ASK- autonomna sekrecija kortizola

BMI - indeks tjelesne mase DTS- deksametazonski test supresije

* korišten Fisherov egzaktni test.

5.3. Analiza podgrupa

5.3.1. Bolesnici s hipertenzijom

Bolesnici s hipertenzijom imali su statistički značajno viši BMI ($t_{96}=2.367$, $p=0.020$). Prosječni bolesnik s hipertenzijom imao je 3.04 kg/m^2 viši BMI od prosječnog bolesnika bez hipertenzije. Također, bolesnici s hipertenzijom imali su statistički značajno manje tumore ($p=0.003$). Statistički značajno viša je bila i vrijednost kortizola nakon prekonoćnog deksametazonskog testa ($p=0.028$). Rezultati su prikazani u Tablici 11.

Tablica 11 Karakteristike bolesnika s hipertenzijom

	Hipertenzivni bolesnici n=72	Normotenzivni bolesnici n=31	p
	N (%)		
Spol			0.989
muškarci	21(29.2)	9(29.0)	
žene	51 (69.8)	22(71.0)	
Dob (godine)	60.42±10.02	56.29±10.55	0.062
BMI (kg/m ²)	31.78±6.12	28.75±4.62	0.020
Veličina tumora (mm)	23.5(16-30.3)	31(24-40)	0.003
Kortizol nakon prekonoćnog DTS (nmol/L)	59(35.5-86.5)	47(28-64)	0.028
ASK	40(55.6)	12(38.7)	0.117
BclII	n=69	n=31	
	40 (58)	20(64.5)	0.537
N363S	n=70	n=31	
	7(10)	1(3.2)	0.429
ER22/23EK	n=70	n=31	
	6(8.6)	0	0.173

BMI - indeks tjelesne mase DTS- deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola

5.3.2. Bolesnici sa šećernom bolesti

Bolesnici sa šećernom bolesti imali su statistički značajno viši indeks tjelesne mase ($t_9=3.024$, $p=0.003$).). Prosječna razlika u BMI-u za bolesnike sa šećernom bolesti u odnosu na bolesnike bez šećerne bolesti iznosila je 4.92 kg/m^2 . Rezultati su prikazani u Tablici 12.

Tablica 12 Karakteristike bolesnika sa šećernom bolesti

	Bolesnici sa šećernom bolesti n=15	Bolesnici bez šećerne bolesti n=88	p
	N (%)		
Spol			0.698
muškarci	5(33.3)	25(28.4)	
žene	10(66.6)	63(71.6)	
Dob (godine)	63.0±7.69	58.52±10.59	0.120
BMI (kg/m ²)	35.14±7.75	30.21±5.23	0.003
Veličina tumora (mm)	28.5 (23.5-45.6)	29 (20-38)	0.348
Kortizol nakon prekonoćnog DTS (nmol/L)	56(40-72)	51.5(33.6-79.5)	0.698
ASK	8(53.3)	44(50.0)	0.811
BclI	n=15	n=85	
	52(61.2)	8(53.3)	0.568
N363S	n=15	n=86	
	0	8(9.3)	0.601
ER22/23EK	n=15	n=86	
	2(13.3)	4(4.7)	0.217

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola

5.3.3. Bolesnici s dislipidemijom

Bolesnici s dislipidemijom imali su statistički značajno veće tumore: medijan je iznosio 30.0mm (IQR25.0-41.0), dok je u grupi bolesnika bez dislipidemije medijan iznosio 26.0mm (IQR19.8-36.3), p=0.035. Rezultati su prikazani u Tablici 13.

Tablica 13 Karakteristike bolesnika s dislipidemijom

	Bolesnici s dislipidemijom n=48	Bolesnici bez dislipidemije n=55	p
	N (%)		
Spol			0.658
muškarci	15(31.2)	15(37.3)	
žene	33(68.8)	40(72.7)	
Dob (godine)	59.50±8.21	58.89±11.91	0.761
BMI (kg/m ²)	31.55±5.89	30.36±5.85	0.317
Veličina tumora (mm)	30.0(25.0-41.0)	26.0(19.8-36.3)	0.035
Kortizol nakon prekonočnog DTS (nmol/L)	57.5(39-83)	49(32-70)	0.177
ASK	27(56.3)	25(45.5)	0.274
BclII	n=46	n=54	
	31(67.4)	29(53.7)	0.164
N363S	n=47	n=54	
	3(6.4)	5(9.3)	0.721
ER22/23EK	n=47	n=54	
	2(4.3)	4(7.4)	0.683

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola

5.3.4. Pretili bolesnici

Nije nađeno značajnih razlika između pretilih i nepretilih bolesnika, izuzev indeksa tjelesne mase ($t_{96}=6.214, p<0.001$). Rezultati su prikazani u Tablici 14.

Tablica 14 Karakteristike pretilih bolesnika

	Pretili bolesnici n=77	Nepretili bolesnici n=21	p
	N (%)		
Spol			0.335
muškarci	21(27.3)	8(38.1)	
žene	56(72.7)	13(61.9)	
Dob (godine)	59.51±10.02	58.38±10.50	0.653
BMI (kg/m ²)	32.55±5.38	24.93±3.06	<0.001
Veličina tumora (mm)	30(22-39.5)	27.5(18.0-33.6)	0.142
Kortizol nakon prekonočnog DTS (nmol/L)	50(32.5-79)	57(41.5-77.5)	0.591
ASK	37(48.1)	12(57.1)	0.460
BclII	n=74	n=21	
	41(55.4)	15(71.4)	0.188
N363S	n=75	n=21	
	7(9.3)	1(4.8)	0.681
ER22/23EK	n=75	n=21	
	5(6.7)	1(4.8)	1.0

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola

5.3.5.Bolesnici s metaboličkim sindromom

Bolesnici s metaboličkim sindromom imali su značajno viši indeks tjelesne mase ($t_{96}=6.304$, $p<0.001$). Prosječna razlika iznosila je $6.37\text{kg}/\text{m}^2$. Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15 Karakteristike bolesnika s metaboličkim sindromom

	Bolesnici s MetS n=59	Bolesnici bez MetS n=44	p
	N (%)		
Spol			0.426
muškarci	19(32.2)	11(25.0)	
žene	40(67.8)	33(75.0)	
Dob (godine)	60.07±10.49	57.98±10.05	0.311
BMI (kg/m ²)	33.71±5.27	27.34±4.54	<0.001
Veličina tumora (mm)	30(24-40)	27(18-34)	0.071
Kortizol nakon prekonoćnog DTS (nmol/L)	59(35-87)	49(33.3-66)	0.267
ASK	32(54.2)	20(45.5)	0.378
BclI	n=56	n=44	
	33(58.9)	27(61.4)	0.805
N363S	n=57	n=44	
	6(10.5)	2(4.5)	0.460
ER22/23EK	n=57	n=44	
	4(7.0)	2(4.5)	0.694

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije MetS - metabolički sindrom ASK - autonomna sekrecija kortizola

5.3.6 Bolesnici s autonomnom sekrecijom kortizola

Bolesnici s autonomnom sekrecijom kortizola bili su značajno stariji od bolesnika bez autonomne sekrecije kortizola ($t_{101}=2.363$, $p=0.020$). Prosječna razlika u godinama iznosila je 4.696 godina. Također, imali su statistički značajno veće tumore: medijan je iznosio 36mm (IQR 27mm-45mm) prema 23mm (IQR 18mm-30.25mm) u bolesnika bez autonomne sekrecije kortizola ($U=551.5$, $p<0.001$). Rezultati su prikazani u Tablici 16.

Tablica 16 Karakteristike bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola

	Bolesnici s ASK n=52	Bolesnici bez ASK n=51	p
	N (%)		
Spol			0.711
muškarci	16(30.8)	14(27.5)	
žene	36(69.2)	37(72.5)	
Dob (godine)	61.5±10.06	56.8±10.10	0.020
BMI (kg/m ²)	30.81±5.68	31.03±6.11	0.854
Hipertenzija	40(76.9)	32(62.7)	0.117
Šećerna bolest	8(15.4)	7(13.7)	0.811
Dislipidemija	27(51.9)	21(41.2)	0.274
Pretilost	n=49	n=49	
	37(75.5)	40(81.6)	0.460
Metabolički sindrom	32(61.5)	27(52.9)	0.378
Bilateralni tumori	14(26.9)	8(15.7)	0.164
Veličina tumora (mm)	36(27-45)	23(18-30.25)	<0.001
Kortizol nakon prekonočnog DTS (nmol/L)	77.5(64.25-119.25)	35(25-42)	<0.001
BclI	n=51	n=49	
	32(62.7)	28(57.1)	0.568
N363S	n=51	n=50	
	5(9.8)	3(6.0)	0.715
ER22/23EK	n=51	n=50	
	3(5.9)	3(6.0)	1.0

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola

5.3.7 Bolesnici s bilateralnim tumorima

Bolesnici s bilateralnim tumorima imali su statistički značajno veće tumore medijan je iznosio 36.5mm (IQR 24.25mm -46.5mm) prema 28mm (IQR 20mm-36mm) u bolesnika s unilateralnim tumorima ($U=1131.5$, $p=0.031$). Statistički značajna bila je i razlika u koncentraciji kortizola nakon prekonocnog deksametazonskog testa supresije: medijan 68nmol/L(IQR 40nmol/L-119.5nmol/L) prema 49nmol/L (IQR 33nmol/L-71.5nmol/L) u bolesnika s unilateralnim incidentalomom ($U=1143$, $p=0.043$). Rezultati su prikazani u Tablici 17.

Tablica 17 Karakteristike bolesnika s bilateralnim tumorima

	Bolesnici s bilateralnim tumorima n=22	Bolesnici s unilateralnim tumorima n=81	p
	N (%)		
Spol			0.829
muškarci	6	24	
žene	16	57	
Dob (godine)	59.32±6.86	59.14±11.09	0.942
BMI (kg/m ²)	31.46±5.51	30.76±5.99	0.624
Hipertenzija	17(77.3)	55(67.9)	0.395
Šećerna bolest	3(13.6)	12(14.8)	0.889
Dislipidemija	11(50.0)	37(45.7)	0.719
Pretilost	n=22	n=76	
	19(86.4)	58(76.3)	0.389
Metabolički sindrom	13(59.1)	46(56.8)	0.847
ASK	14(63.6)	38(46.9)	0.164
Veličina tumora (mm)	36.5(24.25-46.5)	28(20-36)	0.031
Kortizol nakon prekonočnog DTS (nmol/L)	68(40-119.5)	49(33-71.5)	0.043
BclI	n=22	n=78	
	12(54.5)	48(61.5)	0.554
N363S	n=22	n=79	
	2(9.1)	6(7.6)	1.0
ER22/23EK	n=22	n=79	
	3(13.6)	3(3.8)	0.116

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola

5.3.8. Karakteristike bolesnika ovisno o vrijednosti kortizola u prekonocnom DTS

U analizi karakteristika bolesnika ovisno o vrijednosti kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu bolesnici su podijeljeni u tri grupe. U prvoj grupi nalaze se bolesnici s vrijednosti kortizola manjom ili jednakom 50nmol/L. U drugoj grupi nalaze se oni s vrijednosti kortizola između 50nmol/L i 138nmol/L (moguća autonomna sekrecija kortizola). U trećoj grupi nalaze se bolesnici s vrijednosti kortizola većom od 138nmol/L (jasna autonomna sekrecija kortizola). Nije nađeno statistički značajnih razlika između pojedinih grupa osim u veličini tumora. Učinjeno je i testiranje razlika između svake pojedine grupe, u svim ostalim karakteristikama osim veličine tumora nije nađeno razlike na razini značajnosti $p < 0,05$.

Veličina tumora značajno se razlikovala između grupa bolesnika ($p < 0.001$). Zbog toga je učinjena i dodatna *post hoc* analiza kojom je utvrđeno da postoji značajna razlika veličine tumora između prve i druge grupe ($p < 0.001$), kao i prve i treće grupe ($p < 0.001$), ali ne i između druge i treće grupe ($p = 0.234$).

Tablica 18 Karakteristike bolesnika ovisno o vrijednosti kortizola u prekonocnom DTS

Kortizol u prekonocnom DTS	≤50nmol/L	51-138nmol/L	>138nmol/L	p
	n=49	n=43	n=11	
Spol (M)	14(28.6)	13(30.2)	3(27.3)	0.975
Dob(godine)	56.9±10.23	60.67±10.36	63.45±8.34	0.073
BMI	30.89±6.18	30.50±5.73	32.51±5.23	0.607
Veličina tumora(mm)	22(18-29.75)	34.5(27-41.25)	46(35-59)	<0.001
	n(%)			
Hipertenzija	31(69.9)	31(72.1)	10(90.9)	0.180
Šećerna bolest	6(12.2)	7(16.3)	2(18.2)	0.807
Dislipidemija	20(40.8)	21(48.8)	7(63.6)	0.363
Pretilost	n=47	n=40	n=11	
	38(80.9)	28(70,0)	11(100)	0.087
MetS	26(53.1)	24(55.8)	9(81,8)	0.212
Bilateralni tumori	7(14.3)	10(23.3)	5(45.5)	0.069
BclI	n=47	n=43	n=10	
	28(59.6)	28(65.1)	4(40)	0.343
N363S	n=48	n=43	n=10	
	3(6.3)	3(7)	2(20)	0.327
ER22/23EK	n=48	n=43	n=10	
	3(6.3)	2(4.7)	1(10)	0.806

DTS - deksametazonski test supresije MetS - metabolički sindrom BMI - indeks tjelesne mase

5.3.9. Karakteristike bolesnika ovisno o veličini tumora

U analizi karakteristika bolesnika ovisno o veličini tumora bolesnici su podijeljeni u dvije skupine. U prvoj skupini su bolesnici s tumorom manjim od ili jednakim 25mm, u drugoj su skupini bolesnici s tumorima većim od 25mm. Rezultati su prikazani u Tablici 19. Bolesnici s većim tumorima imali su značajno češće hipertenziju ($\chi^2 = 9.151$, $p=0.002$), kao i dislipidemiju ($\chi^2 = 4.257$, $p=0.039$). Također, bolesnici s većim tumorima imali su značajno češće autonomnu sekreciju kortizola ($\chi^2 = 22.495$, $p<0.001$). Statistički značajna je bila i razlika između kortizola u prekonocnom DTS: medijan kortizola u bolesnika s manjim tumorima bio je 36nmol/L (IQR 25.5nmol/L-49nmol/L), dok je u bolesnika s većim tumorima medijan bio 65.5nmol/L (IQR 48.25nmol/L-110nmol/L), ($U=496.0$, $p<0.001$).

Tablica 19 Karakteristike bolesnika ovisno o veličini tumora

Veličina tumora	≤25mm n=41	>25mm n=60	p
	n (%)		
Spol			0.427
muškarci	10 (24.4)	19(31.7)	
žene	31(75.6)	41(68.3)	
Dob (godine)	58.85±10.73	59.37±9.99	0.806
BMI (kg/m ²)	30.24±6.32	31.50±5.51	0.303
	n(%)		
Hipertenzija	22(53.7)	49(81.7)	0.002
Šećerna bolest	6(14.6)	8(13.3)	0.853
Dislipidemija	14(34.1)	33(55)	0.039
Pretilost	n=39	n=58	
	30(76.9)	47(81.0)	0.624
Metabolički sindrom	21(51.2)	37(61.7)	0.297
ASK	9(22.0)	42(70.0)	<0.001
Bilateralni tumori	6(14.6)	16(26.7)	0.150
Kortizol nakon prekonočnog DTS (nmol/L)	36(25.5-49)	65.5(48.25-110)	<0.001
BclII	n=40	n=58	
	25(62.5)	33(56.9)	0.579
N363S	n=41	n=58	
	1(2.4)	7(12.1)	0.135
ER22/23EK	n=41	n=58	
	2(4.9)	4(6.9)	1.0

DTS - deksametazonski test supresije BMI - indeks tjelesne mase

5.4. Analiza povezanosti veličine tumora i vrijednosti kortizola u prekonocnom DTS

U analizi korelacije vrijednosti kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu kao mjere osjetljivosti na glukokortikoide pokazano je da postoji slaba korelacije koncentracije kortizola i dobi ispitanika ($\rho=0.218$, $p=0.027$). Nađena je i umjerena korelacija koncentracije kortizola u prekonocnom DTS i veličine tumora ($\rho=0.549$, $p<0.001$). Slaba statistički značajna korelacija ($\rho=0.229$, $p=0.024$) nađen je i između veličina tumora i indeksa tjelesne mase. Rezultati su prikazani u Tablici 20.

Tablica 20 Korelacija kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu i veličine tumora s kliničkim karakteristikama

		Dob	Opseg struka	BMI	Veličina tumora	Slobodni kortizol u urinu
Kortizol u prekonocnom DTS	ρ	0.218	0.008	-0.025	0.549	0.111
	p	0.027	0.946	0.808	<0.001	0.397
	N	103	67	98	101	60
Veličina tumora	ρ	-0.002	0.102	0.229	1	0.158
	p	0.984	0.421	0.024		0.228
	N	101	65	97	101	60

DTS - deksametazonski test supresije BMI - indeks tjelesne mase

5.5. Analiza rizika metaboličkog sindroma u bolesnika s incidentalomom

Učinjena je univarijatna logistička regresija s binarnim ishodom metaboličkog sindroma, rezultati su prikazani u Tablici 21. Nije nađeno značajne povezanosti metaboličkog sindroma i polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor. Statistički značajan prediktor metaboličkog sindroma u univarijatnoj analizi bio je indeks tjelesne mase (OR 1.365 (1.197-1.556), $p < 0.001$).

Varijable s vrijednosti $p < 0,25$ uvrštene su u multivarijatnu analizu. Multivarijatnom analizom nije nađeno dodatne značajne povezanosti (Tablica 22).

Tablica 21 Univarijatna logistička regresija prediktora metaboličkog sindroma

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Muški spol	0.354	0.446	0.631	0.427	1.425	0.595-3.415
Dob	0.020	0.020	1.038	0.308	1.020	0.982-1.060
Veličina tumora	0.027	0.017	1.012	0.099	1.028	0.995-1.062
BMI	0.311	0.067	21.658	<0.001	1.365	1.197-1.556
Kortizol u prekonoćnom DTS	0.005	0.004	1.899	0.168	1.005	0.998-1.012
Slobodni kortizol u urinu	-0.001	0.001	0.520	0.471	0.999	0.997-1.001
ASK	0.352	0.400	0.766	0.378	3.111	0.649-3.115
Bilateralni tumori	0.056	0.472	0.014	0.905	1.058	0.419-2.669
BclI	-0.102	0.412	0.061	0.805	0.903	0.403-2.025
ER22/23EK	0.461	0.890	0.268	0.605	1.585	0.277-9.075
N363S	0.904	0.843	1.152	0.283	2.471	0.474-12.885

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

Tablica 22 Multivarijatna logistička regresija za ishod metabolički sindrom

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Veličina tumora	-0.005	0.021	0.046	0.830	0.995	0.955-1.038
BMI	0.314	0.071	19.610	<0.001	1.369	1.191-1.573
Kortizol u prekonocnom DTS	0.005	0.005	1.273	0.259	1.005	0.996-1.015
Konstanta	-9.488	2.118	18.921	0	0	

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije OR- omjer šansi CI- interval pouzdanosti

5.6. Analiza rizika hipertenzije u bolesnika s incidentalomom

Učinjena je univarijatna logistička regresija s binarnim ishodom hipertenzije, rezultati su prikazani u Tablici 23. Nije nađeno značajne povezanosti metaboličkog sindroma i polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor. Statistički značajni prediktori hipertenzije u univarijatnoj analizi bili su indeks tjelesne mase (OR 1.11 (1.014-1.214), p=0.023) i veličina tumora (OR 1.046 (1.004-1.090), p=0.03).

Varijable s vrijednosti p < 0,25 uvrštene su u multivarijatnu analizu. Multivarijatnom analizom nije nađeno dodatne značajne povezanosti, Tablica 24.

Tablica 23 Univarijatna logistička regresija prediktora hipertenzije

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Muški spol	0.007	0.473	0	0.989	1.007	0.398-2.544
Dob	0.041	0.022	3.396	0.065	1.042	0.997-1.088
Veličina tumora	0.045	0.021	4.702	0.030	1.046	1.004-1.090
BMI	0.104	0.046	5.152	0.023	1.110	1.014-1.214
Kortizol u prekonoćnom DTS	0.011	0.006	3.232	0.072	1.011	0.999-1.022
Slobodni kortizol u urinu	-0.003	0.002	2.315	0.128	0.997	0.994-1.001
Šećerna bolest	-0.176	0.595	0.087	0.768	0.839	0.261-2.695
Dislipidemija	0.653	.443	2.173	0.140	1.922	0.806-4.582
ASK	0.68	0.438	2.425	0.119	1.979	0.838-4.674
Bilateralni tumori	0.058	0.511	0.013	0.910	1.060	0.389-2.887
BcII	-0.276	0.448	0.381	0.537	0.759	0.315-1.824
ER22/23EK	20.478	16408.7	0	0.999	78249 6634	0-∞
N363S	1.204	1.092	1.216	0.270	3.333	0.329-28.329

BMI -indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK -autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

Tablica 24 Multivarijatna logistička regresija s ishodom hipertenzija

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Dob	0.056	0.036	2.450	0.118	1.058	0.986-1.135
Veličina tumora	0.046	0.037	1.526	0.217	1.047	0.973-1.126
BMI	0.044	0.064	0.472	0.492	1.045	0.922-1.184
Kortizol u prekonoćnom DTS	0.000	0.007	0.004	0.948	1.000	0.986-1.015
Slobodni kortizol u urinu	-0.004	0.002	3.542	0.060	0.996	0.992-1.000
Dislipidemija	0.946	0.669	2.000	0.157	0.388	0.105-1.441
ASK	0.582	0.846	0.474	0.491	1.790	0.341-9.3958
Konstanta	-4.724	3.509	2.386	0.122	0.009	

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

5.7. Analiza rizika šećerne bolesti u bolesnika s incidentalomom

Učinjena je univarijatna logistička regresija s binarnim ishodom šećerne bolesti, rezultati su prikazani u Tablici 25. Nije nađeno značajne povezanosti šećerne bolesti i polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor. Statistički značajan prediktor šećerne bolesti u univarijantnoj analizi bio je indeks tjelesne mase (OR 1.144, 95% CI 1.036-1.264, p=0.008).

Varijable s vrijednosti p <0,25 uvrštene su u multivarijantnu analizu. Multivarijantnom analizom nije nađeno dodatne značajne povezanosti, Tablica 26.

Tablica 25 Univarijatna logistička regresija prediktora šećerne bolesti

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Muški spol	0.231	0.597	0.150	0.698	1.260	0.391-4.057
Dob	0.043	0.028	2.372	0.124	1.044	0.988-1.103
Veličina tumora	0.019	0.020	0.940	0.332	1.020	0.980-1.060
BMI	0.135	0.051	7.073	0.008	1.144	1.036-1.264
Kortizol u prekonocnom DTS	0.004	0.003	1.771	0.183	1.004	0.998-1.010
Slobodni kortizol u urinu	0.001	0.001	0.684	0.408	1.001	0.999-1.003
Hipertenzija	-0.176	0.595	0.087	0.768	0.839	0.261-2.695
Dislipidemija	0.316	0.560	0.318	0.573	1.371	0.458-4.111
ASK	0.134	0.560	0.057	0.811	1.143	0.382-3.423
Bilateralni tumori	0.212	0.637	0.111	0.739	1.236	0.355-4.308
BclI	-0.321	0.563	0.325	0.569	0.725	0.240-2.188
ER22/23EK	1.149	0.916	1.572	0.210	3.154	0.524-18.992
N363S	-19.554	14210.366	0.00	0.999	0	0

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK -autonomna sekrecija kortizola OR- omjer šansi CI - interval pouzdanosti

Tablica 26 Multivarijatna logistička regresija s ishodom šećerna bolest

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Dob	0.051	0.033	2.369	0.124	1.052	0.986-1.123
BMI	0.132	0.052	6.369	0.012	1.141	1.030-1.264
Kortizol u prekonoćnom DTS	0.002	0.003	0.447	0.504	1.002	0.996-1.009
ER22/23EK	0.992	1.053	0.888	0.346	2.697	0.343-21.221
Konstanta	-10.414	3.233	10.375	0.001	0.000	

BMI - indeks tjelesne mase DTS- deksametazonski test supresije ASK-autonomna sekrecija kortizola OR- omjer šansi CI- interval pouzdanosti

5.8. Analiza rizika dislipidemije u bolesnika s incidentalomom

Učinjena je univarijatna logistička regresija s binarnim ishodom dislipidemije, rezultati su prikazani u Tablici 27. Nije nađeno značajne povezanosti dislipidemije i polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor.

Varijable s vrijednosti $p < 0,25$ uvrštene su u multivarijatnu analizu. Učinjenom multivarijatnom analizom nije nađeno dodatne značajne povezanosti, Tablica 28.

Tablica 27 Univarijatna logistička regresija prediktora dislipidemije

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Muški spol	0.192	0.434	0.196	0.658	1.212	0.517-2.840
Dob	0.006	0.019	0.090	0.764	1.006	0.969-1.045
Veličina tumora	0.029	0.016	3.273	0.070	1.029	0.998-1.062
BMI	0.035	0.035	1.007	0.316	1.036	0.967-1.110
Kortizol u prekonocnom DTS	0.004	0.003	1.977	0.160	1.004	0.998-1.011
Slobodni kortizol u urinu	0.001	0.001	0.335	0.563	1.001	0.998-1.003
Šećerna bolest	0.316	0.560	0.318	0.573	1.371	0.458-4.111
Hipertenzija	0.653	0.443	2.173	0.140	1.922	0.806-4.582
ASK	0.434	0.397	1.190	0.275	1.543	0.708-3.362
Bilateralni tumori	0.178	0.467	0.145	0.703	1.194	0.479-2.981
BclII	0.578	0.416	1.923	0.165	1.782	0.788-4.030
ER22/23EK	-0.588	0.890	0.436	0.509	0.556	0.097-3.179
N363S	-0.403	0.759	0.282	0.595	0.668	0.151-2.959

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

Tablica 28 Multivarijatna logistička regresija s ishodom dislipidemija

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Bcll1	0.739	0.441	2.808	0.094	2.094	0.882-4.970
Hipertenzija	0.619	0.480	1.660	0.198	0.539	0.210-1.380
Veličina tumora	0.028	0.019	2.213	0.137	1.028	0.991-1.066
Kortizol u prekonoćnom DTS	0.001	0.004	0.089	0.765	1.001	0.994-1.008
Konstanta	-2.108	0.978	4.664	0.031	0.122	

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK -autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

5.9. Analiza rizika pretilosti u bolesnika s incidentalomom

Učinjena je univarijatna logistička regresija s binarnim ishodom pretilosti, rezultati su prikazani u Tablici 29. Nije nađeno značajne povezanosti dislipidemije i polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor.

Varijable s vrijednosti $p < 0,25$ uvrštene su u multivarijatnu analizu. Učinjenom multivarijatnom analizom nije nađeno dodatne značajne povezanosti, Tablica 30.

Tablica 29 Univarijatna logistička regresija prediktora pretilosti

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Muški spol	0.495	0.517	0.918	0.338	1.641	0.596-4.521
Dob	0.011	0.025	0.207	0.649	1.011	0.963-1.062
Veličina tumora	0.043	0.024	3.155	0.076	1.044	0.996-1.095
Kortizol u prekonoćnom DTS	0.005	0.005	0.910	0.340	1.005	0.995-1.014
Slobodni kortizol u urinu	0.001	0.002	0.295	0.587	1.001	0.998-1.004
Šećerna bolest	20.104	10742.023	0	0.999	538491	0-∞
Hipertenzija	0	0.545	0	1	1	0.344-2.910
Dislipidemija	0.210	0.496	0.178	0.673	1.233	0.466-3.263
ASK	-0.366	0.496	0.542	0.461	0.694	0.262-1.836
Bilateralni tumori	0.676	0.677	0.995	0.318	1.966	0.521-7.413
BcII	-0.699	0.537	1.697	0.193	0.497	0.174-1.423
ER22/23EK	0.357	1.124	0.101	0.751	1.429	0.158-12.942
N363S	0.722	1.099	0.432	0.511	2.059	0.239-17.742

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

Tablica 30 Multivarijatna logistička regresija s ishodom pretilost

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Veličina tumora	0.043	0.024	3.100	0.078	1.044	0.995-1.094
BclI	-0.601	0.551	1.192	0.275	0.548	0.186-1.613
Konstanta	1.035	1.158	0.798	0.372	2.814	

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazoni test supresije ASK - autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

5.10. Analiza rizika autonomne sekrecije kortizola u bolesnika s incidentalomom

Učinjena je univarijatna logistička regresija s ishodom autonomne sekrecije kortizola, rezultati su prikazani u Tablici 31. Nije nađeno značajne povezanosti autonomne sekrecije kortizola i polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor. Statistički značajan prediktor autonomne sekrecije kortizola u univarijatnoj analizi bila je veličina tumora (OR 1.108, 95%CI 1.055-1.162, $p < 0.001$). Značajan prediktor bila je i dob bolesnika (OR 1.048, 95% CI 1.006-1.091, $p = 0.023$)

Varijable s vrijednosti $p < 0,25$ uvrštene su u multivarijatnu analizu. Multivarijatnom analizom nije nađeno dodatne značajne povezanosti, Tablica 32.

Tablica 31 Univarijatna logistička regresija prediktora autonomne sekrecije kortizola

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Muški spol	0.161	0.434	0.137	0.711	0.851	0.363-1.995
Dob	0.047	0.021	5.161	0.023	1.048	1.006-1.091
Veličina tumora	0.102	0.025	17.199	<0.001	1.108	1.055-1.162
BMI	-0.006	0.035	0.035	0.852	0.994	0.928-1.063
Šećerna bolest	0.134	0.560	0.057	0.811	1.143	0.382-3.423
Dislipidemija	0.434	0.397	1.190	0.275	1.543	0.708-3.362
Hipertenzija	0.683	0.438	2.425	0.119	1.979	0.838-4.674
Bilateralni tumori	0.683	0.496	1.898	0.168	1.980	0.749-5.235
BcII	0.234	0.409	0.326	0.568	1.263	0.567-2.815
ER22/23EK	-0.021	0.842	0.001	0.980	0.979	0.188-5.099
N363S	0.532	0.759	0.492	0.483	1.703	0.385-7.541

BMI - indeks tjelesne mase DTS - deksametazonski test supresije ASK-autonomna sekrecija kortizola OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

Tablica 32 Multivarijatna logistička regresija s ishodom autonomne sekrecije kortizola

	B	standardna pogreška	Wald	p	OR	95% CI
Hipertenzija	0.029	0.591	0.003	0.959	1.029	0.343-3.087
Dob	0.053	0.024	4.713	0.030	1.054	1.005-1.106
Veličina tumora	0.107	0.027	15.301	<0.001	1.113	1.055-1.174
Bilateralni tumori	0.175	0.591	0.088	0.767	1.192	0.374-3.793
Konstanta	-6.553	1.848	12.570	<0.001	0.001	

BMI - indeks tjelesne mase OR - omjer šansi CI - interval pouzdanosti

6. RASPRAVA

Zbog razvoja tehnologije i sve češće uporabe slikovnih metoda kao što su magnetska rezonanca i kompjuterizirana tomografija, incidentalomi nadbubrežne žlijezde otkrivaju se u sve većeg broja pacijenata. Njihova učestalost dovela je do toga da su pojedini stručnjaci govorili o epidemiji, tzv. AIDS prema engl. Adrenal Incidentaloma Discovered Serendipitously (111). S porastom prosječne dobi stanovništva, rast će i prevalencija adrenalnih incidentaloma budući da se oni češće pojavljuju u starijoj dobi u kojoj prevalencija doseže i 10% (1). U ovom istraživanju u koje su bila uključena 103 bolesnika, prosječna dob ispitanika bila je 59.2 godine što odgovara podacima iz ranijih istraživanja (8). U ovom istraživanju bilo je više žena (70.9%), što je također sukladno ranijim istraživanjima (9,55).

Koliko god incidentalomi bili česti, i često dijagnosticirani, njihova patogeneza još nije posve razjašnjena. Hipoteza ovog istraživanja bila je da postoji povezanost polimorfizama gena za glukokortikoidni receptor i incidentaloma nadbubrežnih žlijezda. Temeljem ranijih istraživanja, polimorfizmi BclI i N363S povećavaju osjetljivost na glukokortikoide, a polimorfizam ER22/23EK smanjuje (77). Pojedina istraživanja pretpostavljala su patogenetsku ulogu polimorfizama u produkciji kortizola ili rastu tumora (54,105). Trementino i sur. izvjestili su o većoj učestalosti polimorfizma BclI u bolesnika s Cushingovim sindromom (112), ali u većim serijama ti rezultati nisu ponovljeni (113). Učestalost polimorfizma BclI u ovom istraživanju nije se značajno razlikovala od učestalosti u referentnoj europskoj populaciji, kao ni učestalost polimorfizma ER22/23EK. S druge strane, statistički značajno veća bila je učestalost polimorfizma N363S. Mehanizam djelovanja polimorfizma N363S nije poznat, ali istraživanja su pokazala da povećava osjetljivost na glukokortikoide (77,114). U pojedinim istraživanjima bio je povezan uz metabolički nepovoljniji fenotip, prvenstveno debljinu (91). U drugim pak istraživanjima nije nađeno povezanosti s debljinom (115,116). Metaanaliza Marti i sur. nije našla povezanosti N363S i debljine (117). U ovom istraživanju nije nađena povezanost N363S i pretilosti u bolesnika s

incidentalomom nadbubrežne žlijezde. Istraživanje Majnik i sur. (54), ukazalo je na veću učestalost polimorfizma N363S u bolesnika s bilateralnim, ali ne i unilateralnim incidentalomima. Njihov zaključak je bio da to ukazuje na moguću etiologiju polimorfizma N363S u patogenezi bilateralnih incidentaloma. U ovom istraživanju nije nađeno razlike u učestalosti polimorfizma N363S u bolesnika s bilateralnim i unilateralnim incidentalomima. Moguće tumačenje statistički značajne veće učestalosti N363S u ovom istraživanju je da se radi o razmjerno malom broju ispitanika s polimorfizmom te i male apsolutne promjene broja mogu dovesti do statističke značajnosti. Za definitivnu potvrdu povezanosti, nužan bi bio veći uzorak. Za eventualni dokaz kauzalnosti, bio bi potreban naravno i uvid u mehanizam djelovanja polimorfizma. S obzirom na navedeno, nije nađeno jasnih dokaza da polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor utječu na nastanak adrenalnih incidentaloma kako u bolesnika s unilateralnim tako i u bolesnika s bilateralnim incidentalomima.

Cilj studije bio je i ispitati povezanost pojedinog polimorfizma i fenotipa bolesnika s adrenalnim incidentalomom: metaboličkog sindroma i njegovih komponenata arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, dislipidemije i pretilosti. Također, analizirana je i povezanost polimorfizama BclI, ER22/23EK i N363S i autonomne sekrecije kortizola i prisutnosti bilateralnih adrenalnih tumora. Također je ispitana povezanost polimorfizama BclI, N363S i ER22/23EK i indeksa tjelesne mase, koncentracije kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu i veličine tumora. U ranijim istraživanjima, opisana je povezanost polimorfizama BclI i N363S s kardiovaskularnim rizikom u općoj populaciji (89,102). Međutim, bilo je istraživanja koja nisu našla nikakvu povezanost (115,116,118). Rezultati za polimorfizam ER22/23EK su proturječni kao i za polimorfizme BclI i N363S. Neke studije našle su povezanost polimorfizma ER22/23EK i viših vrijednosti kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu, bolje inzulinske osjetljivosti, manje tjelesne težine i boljeg metaboličkog profila (91,94,119). Druga pak istraživanja nisu ponovila te rezultate i nisu našla povezanosti (77). Istraživanja polimorfizama glukokortikoidnog receptora u populaciji s adrenalnim incidentalomima su malobrojna. Studija Tzanele i sur o povezanosti polimorfizma BclI s karakteristikama bolesnika kao što su arterijska hipertenzija, šećerna bolest, dislipidemija, pretilost i hormonalnim status nije našla

razlike između nositelja polimorfizma i divljeg tipa (120). S druge strane u istraživanju Morelli i suradnika je nađena slaba povezanost s hipertenzijom u nositelja i polimorfizma BclI i polimorfizma N363S (104) Suprotno tome, u ovom istraživanju nije nađena značajna povezanost između polimorfizma glukokortikoidnog receptora N363S, ER22/23EK i BclI i arterijske hipertenzije, pretilosti, šećerne bolesti i metaboličkog sindroma. Moguće je da je doprinos pojedinog polimorfizma premalen, a tek aditivni učinak koji su ispitivali Morelli i sur. ima statističku značajnost. U ovom istraživanju nije nađeno ni povezanosti između BclI, ER22/23EK i N363S i koncentracije kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu kao ni autonomne sekrecije kortizola u bolesnika s incidentalomom. Ti rezultati su sukladni objema ranije objavljenim studijama (104,120). Nije nađeno ni povezanosti s veličinom tumora koja je opisana u Tzanele i sur, koji navode da nositelji polimorfizma BclI imaju manje tumore. (120). U ovoj studiji nije nađemo povezanosti BclI, ER22/23EK i N363S niti s veličinom tumora niti s bilateralnim tumorima.

Učinjena je i multivarijatna analiza prediktora rizika metaboličkog sindroma u bolesnika s incidentalomom. Za pretpostaviti je bilo da ako polimorfizmi utječu na osjetljivost na djelovanje glukokortikoida, modificiraju njihov učinak u ciljnim tkivima i tako utječu na metaboličke procese da onda mijenjaju i rizik od razvitka metaboličkog sindroma. U istraživanju Moreire i sur. u bolesnika s Cushingovim sindromom polimorfizam BclI modulirao je fenotip bolesnika u uvjetima povišene koncentracije kortizola: bolesnici s polimorfizmom BclI imali su statistički značajno viši indeks tjelesne mase (121). Također, u istraživanju Giordana i sur. u bolesnika s Addisonovom bolesti na nadomjesnoj glukokortikoidnoj terapiji BclI polimorfizam bio je povezan s pretilošću, dislipidemijom i poremećenim metabolizmom glukoze (99) što direktno govori u prilog moduliranja odgovora na glukokortikoide. S druge strane, Trementino i sur. su pokazali da iako je BclI češći bolesnika s Cushingovom bolesti, genotip nema metaboličke reperkusije na fenotip (112). U ovom istraživanju učinjenom obradom polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor BclI, ER22/23EK i N363S nisu značajno povezani s rizikom metaboličkog sindroma, kako u univarijatnim modelima tako i u multivarijatnoj analizi. Ovi rezultati govore u prilog ranijim istraživanjima u bolesnika s incidentalomima u kojima nije nađena povezanost polimorfizama s

metaboličkim sindromom (104). Jedini statistički značajan prediktor u univarijatnoj i multivarijatnoj analizi rizika razvoja metaboličkog sindroma u bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde bio je indeks tjelesne mase. Učinjene su i analize rizika šećerne bolesti, u kojoj je također jedini signifikantni prediktor bio indeks tjelesne mase.

Uz analizu cjelokupne ispitivane populacije, učinjena je i analiza podgrupa gdje se izdvajaju bolesnici s hipertenzijom, bolesnici s bilateralnim tumorima i bolesnici s autonomnom sekrecijom kortizola. Bolesnici s hipertenzijom imali su značajno manje tumore ($p=0.003$) kao i značajno viši indeks tjelesne mase ($p=0.02$). Prevalencija hipertenzije u ispitanika iznosila je 69.9% što je sukladno ranijim istraživanjima (12,24). Također podgrupa bolesnika s hipertenzijom imala je značajno višu razinu kortizola u prekonoćnom DTS ($p=0.028$). Uz to, u univarijatnoj logističkoj regresiji kortizol u prekonoćnom DTS bio je na granici signifikantnosti kao prediktor hipertenzije ($p=0.072$, OR 1.011, 95%CI 0.999-1.022). Molekularna istraživanja ukazala su na podgrupu bolesnika s manjim tumorima, ali višim razinama kortizola u prekonoćnom deksametazonskom testu, to su bili oni bolesnici koji su nositelji PRKACA mutacije (17). Rezultati ovog istraživanja mogli bi se uklopiti u te spoznaje, da se radi o takvim pacijentima: s manjim, ali aktivnijim adenomima. Više razine kortizola mogu doprinijeti hipertenziji direktnim i indirektnim učincima kortizola (12,41). Istraživanje Arrude i sur. pokazalo je da prisutnost adrenalnih incidentaloma nosi veći rizik hipertenzije, te povećava stupanj hipertenzije. Također, bolesnici s hipertenzijom imali su više vrijednosti kortizola u prekonoćnom deksametazonskom testu (122). Ti rezultati sukladni su rezultatima ovog istraživanja.

Suprotno bolesnicima s hipertenzijom, u kojih imamo manje tumore, ali višu razinu kortizola u prekonoćnom deksametazonskom testu, u cjelokupnoj ispitivanoj populaciji, nađena je umjereno jaka statistički značajna korelacija između veličine tumora i koncentracije kortizola ($\rho=0.549$, $p<0.001$). Taj rezultat je sukladan multicentričnom istraživanju Olsena i sur. (123) koje je pokazalo korelaciju veličine tumora i više vrijednosti kortizola u prekonoćnom DTS. U ovom istraživanju nađena je i slaba, ali statistički značajna korelacija dobi i koncentracije kortizola u prekonoćnom deksametazonskom testu ($\rho=0.218$, $p=0.027$).

Bolesnici s autonomnom sekrecijom kortizola predstavljaju posebno zanimljivu podskupinu bolesnika s incidentalomom zbog nepovoljnih dugoročnih učinaka hiperkortizolizma: neželjenih kardiovaskularnih i metaboličkih ishoda (41). U ovom istraživanju prevalencija ASK bila je 50.5% što je više nego u većini ranih istraživanja iz devedestih i dvijetisućitih godina koja su navodila prevalencije 10-20%. (7,9,31,124). Naime, u ovom istraživanju korištene su zadnje smjernice Europskog endokrinološkog društva (1) u kojima se kao kriterij za autonomnu sekreciju kortizola navodi vrijednost kortizola u prekonocnom deksametazonskom test veća od 50nmol/L. Ilustracije radi, uz starije kriterije za autonomnu sekreciju kortizola (kortizol u prekonocnom DTS >82.9nmol/L uz sniženi ACTH ili povišeni slobodni kortizol u urinu) u ovom istraživanju prevalencija autonomne sekrecije bi bila 17.5%. U novijim istraživanjima koja koriste istu definiciju autonomne sekrecije kortizola prevalencije su usporedive s ovim istraživanjem (27,123,125,126). Bolesnici s autonomnom sekrecijom kortizola bili su značajno stariji od bolesnika bez autonomne sekrecije kortizola ($t_{101}=2.363$, $p=0.020$) što je sukladno podacima iz literature (33). Suprotno ranijim istraživanjima, koja su govorila za blagu povezanost sa ženskim spolom (7,127), nije nađena povezanost sa spolom. Ispitanici s autonomnom sekrecijom kortizola imali su značajno veće tumore (Tablica 16). Podatak da je veličina tumora statistički značajno veća ($p<0.001$) u skupini bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola također je u skladu s ranijim istraživanjima (123). Morelli i sur. pokazali su u retrospektivnoj multicentričnoj studiji povećani rizik razvoja ASK ako je adenom veći od 2.4cm (osjetljivost 73.3% i specifičnost 60.5%, $p=0.014$) (128). U ovoj analizi prediktora autonomne sekrecije kortizola statistički značajni bili su veličina tumora (OR 1.108, 95%CI 1.055-1.162, $p<0.001$). i dob (OR 1.048, 95% CI 1.006-1.091, $p=0.023$). U analizi bolesnika s autonomnom sekrecijom kortizola nije nađena povezanost s polimorfizmima N363S, ER22/23EK i BclI. Od ranije je poznato da autonomna sekrecija kortizola nosi viši rizik kardiovaskularnih komorbiditeta kao što su hipertenzija, šećerna bolest i pretilost (9,129), ali i kardiovaskularnog mortaliteta (130). U ovom istraživanju pacijenti s ASK imali su viši rizik metaboličkog sindroma, OR (3.111, 95%CI 0.946-10.227), ali nije dosegnuta statistička značajnost ($p=0.062$). Nije nađen ni statistički značajan rizik šećerne bolesti, dislipidemije ni pretilosti u bolesnika s adrenalnim incidentalomom i autonomnom sekrecijom kortizola. Nađen je trend za povišeni rizik hipertenzije u

bolesnika s ASK, ali bez statističke značajnosti. (OR 1.979, 95% CI 0.838-4.674, $p=0.119$). Mogući uzrok nedosezanja statističke značajnosti je nedovoljna snaga istraživanja za ovu podskupinu bolesnika. Većina prethodne literature ipak navodi povezanost s hipertenzijom (7,12,47). Sam mehanizam nije jasan, ali se vjerojatno radi i o direktnim učincima viška kortizola kao i o indirektnim učincima putem poremećaja metabolizma glukoze i porasta opsega struka. U prilog hiperkortizolizma kao značajnog uzročnog mehanizma hipertenzije u bolesnika s ASK govori i opsežan sustavni pregled i metaanaliza Iacobonea i sur. koja navodi da je kirurško liječenje ASK (unilateralna adrenaletomija) uspješnija od nekirurških metoda u liječenju hipertenzije u bolesnika s ASK (131). S obzirom na to da se radi o podskupini bolesnika za koje nema jasnih terapijskih smjernica, tema je vrijedna daljnjeg istraživanja.

S obzirom na to da trenutne smjernice (1) razlikuju normalnu supresiju kortizola nakon DTS, intermedijarni tip moguću autonomnu sekreciju kortizola (kortizol u prekonocnom DTS između 51 nmol/L i 138nmol/L) i jasnu autonomnu sekreciju kortizola (vrijednost kortizola nakon prekonocnog DTS viša od 138 nmol/L) učinjena je i analiza karakteristika bolesnika podijeljenih u te 3 skupine (Tablica 18). Nije nađeno značajnih razlika između sve tri skupine osim veličine tumora. Veličina tumora značajno se razlikovala između grupa bolesnika ($p<0.001$). Zanimljivo je da je nađena značajna razlika veličine tumora između prve i druge grupe ($p<0.001$), kao i prve i treće grupe ($p<0.001$), ali ne i između druge i treće grupe ($p= 0.234$) što upućuje na opravdanost promatranja bolesnika s jasnom i mogućom ASK kao cjeline. Mogući uzrok nenalaženja razlika je nedostatna snaga istraživanja za analizu podskupina. S druge strane, djelomični ispravak te limitacije istraživanja je što je uz kategorijsku varijablu autonomne sekrecije kortizola, sva obrada učinjena i za koncentraciju kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu kao kontinuiranu varijablu. Analiza koncentracije kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu kao kontinuirane varijable donosi dodatne informacije. Naime većina ranijih istraživanja analizirala je vrijednost kortizola u prekonocnom DTS kao kategorijsku varijablu s nekoliko mogućih vrijednosti (33,38). Novije pak spoznaje govore o kontinuumu rizika i naglasak stavljaju na karakteristike svakog pojedinog pacijenta (7,41). U ovom istraživanju nađena je povezanost koncentracije kortizola u prekonocnom DTS s hipertenzijom, kao i s

bilateralnim adenomima. Također je nađena korelacija vrijednosti kortizola nakon prekonocnog DTS s dobi i veličinom tumora.

U ranije navedenim analizama, veličina tumora bila je značajan prediktor i autonomne sekrecije kortizola ($p < 0.001$), ali i povezana s mogućim komorbiditetima: hipertenzijom ($p = 0.003$) i dislipidemijom ($p = 0.038$). Nađena je i umjerena korelacija veličine tumora i vrijednosti kortizola u deksametazonskom testu. Zbog svega navedenog učinjena je analiza karakteristika bolesnika podijeljenih u dvije skupine: one s tumorom manjim ili jednakim 25mm i one s tumorom većim od toga. Granica je odabrana temeljem literature (123). Također, ranije navedeno istraživanje Morelli i sur. (128) navelo je 2,4cm kao granicu nakon koje raste rizik ASK. Bolesnici s većim tumorima imali su značajno češće hipertenziju ($\chi^2 = 9.151$, $p = 0.002$), kao i dislipidemiju ($\chi^2 = 4.257$, $p = 0.039$). Također, bolesnici s većim tumorima imali su značajno češće autonomnu sekreciju kortizola ($\chi^2 = 22.495$, $p < 0.001$). Medijan kortizola u DTS u bolesnika s manjim tumorima bio je 36nmol/L (IQR 25.5nmol/L-49nmol/L), dok je u bolesnika s većim tumorima medijan bio 65.5nmol/L (IQR 48.25nmol/L-110nmol/L), ($U = 496.0$, $p < 0.001$). Rezultati su sukladni ranijim istraživanjima, a mogu se objasniti hipotezom da je za ostvarivanje učinka glukokortikoida potrebna određena masa tkiva.

Bolesnici s bilateralnim tumorima predstavljaju također izdvojenu skupinu unutar populacije bolesnika s adrenalnim incidentalomima. U ovom istraživanju učestalost bilateralnih tumora bila je 21% što je unutar očekivanog po literaturi (60,132) Kao što je ranije navedeno, polimorfizmi N363S, ER22/23EK i BclII nisu u ovom istraživanju bili povezani s bilateralnim incidentalomima. Također, pacijenti s bilateralni tumorima zbog potencijalnog sustavnog uzroka mogli bi imati i drugačiji metabolički profil. U pojedinim ranijim istraživanjima pokazana je veća učestalost hipertenzije i šećerne bolesti (133). S druge strane istraživanje Vassilatou i sur., nije našlo razlika u učestalosti hipertenzije, šećerne bolesti i dislipidemije (132). U ovom istraživanju to je potvrđeno, tj nije nađena statistički značajna povezanost bilateralnih tumora s hipertenzijom, metaboličkim sindromom, šećernom bolesti, dislipidemijom i autonomnom sekrecijom kortizola. S druge strane, u podskupini bolesnika s bilateralnim tumorima, veličina tumora bila je statistički značajno veća (za usporedbu je uzet veći tumor) kao i vrijednost kortizola u deksametazonskom testu.

Ograničenje ovog istraživanja je veličina uzorka i monocentričnost. Ograničenje je i nedostatak kontrolne skupine iz iste populacije. Umjesto vlastite kontrolne skupine, u analizi učestalosti polimorfizama korišteni su podaci iz referentne europske populacije (110). Prednost ovog istraživanja je da su istraživana 3 polimorfizma u bolesnika s incidentalomom, dok je u većini ranijih studija ispitivan je jedan ili eventualno dva polimorfizma. Prednost ovog istraživanja je i prospektivni dizajn i mali broj nedostajućih podataka. Također, pacijenti su uključivani sekvencionalno, bez iskrivljenja odabira, te su dobro zastupljene sve kliničke slike i sve veličine tumora. Nedostatak istraživanja je moguća nedovoljna statistička snaga za analizu manjih podgrupa. Također problematična je i snaga istraživanja u slučaju rijetkih događaja kao što je to učestalost polimorfizma ER22/23EK i N363S.

Zaključno, istraživanje nije pokazalo da polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor BclI, N363S i ER22/23EK imaju ulogu u patogenezi metaboličkog sindroma u osoba s incidentalomom nadburežne žlijezde. Isto tako nije utvrđena povezanost ispitivanih polimorfizama i nastanka adrenalnih incidentaloma.

7. ZAKLJUČAK

1. Učestalost polimorfizama BclI(rs41423247) i ER22/23EK(rs6189+rs6190) u bolesnika s incidentalomom ne razlikuje se u ovom istraživanju od učestalosti u općoj populaciji. Učestalost polimorfizma N363S(rs56149945) u bolesnika s incidentalomom u ovom istraživanju bila je statistički značajno viša od učestalosti u općoj populaciji.
2. Polimorfizmi BclI, N363S i ER22/23EK gena za glukokortikoidni receptor kod bolesnika s incidentalomom nadbubrežne žlijezde nisu povezani s rizikom nastanka metaboličkog sindroma kao niti pojedinih njegovih komponenti.
3. Nije nađena povezanost polimorfizama BclI, N363S i ER22/23EK i autonomne sekrecije kortizola, veličine tumora kao ni koncentracije kortizola u deksametazonskom testu.
4. Nije nađena povezanost polimorfizama BclI, N363S i ER22/23EK i bilateralnih tumora nadbubrežne žlijezde.
5. Dob bolesnika i veličina tumora prediktori su autonomne sekrecije kortizola u bolesnika s incidentalomom.
6. Nađena je umjerno jaka statistički značajna korelacija veličine tumora i koncentracije kortizola u deksametazonskom testu.
7. Podgrupa bolesnika s tumorima većima od 25mm imala je značajno višu koncentraciju kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu, kao i autonomnu sekreciju kortizola, hipertenziju i dislipidemiju.

8. Podgrupa bolesnika s hipertenzijom imala značajno višu razinu kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu, kao i značajno viši indeks tjelesne mase.
9. Bolesnici s bilateralnim tumorima imali su značajno višu vrijednost kortizola u prekonocnom deksametazonskom testu i veće tumore.

8. SAŽETAK

Istraživanja su pokazala da su adrenalni incidentalomi (AI) povezani s većom učestalošću arterijske hipertenzije (AH), pretilosti i šećerne bolesti (DM). Polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor (GR) povezani su s povećanom (BclI, N363S) ili smanjenom osjetljivošću (ER22/23EK). Svrha istraživanja bila je ispitati povezanost polimorfizama gena za GR i rizika metaboličkog sindroma (MetS) i njegovih komponenti u bolesnika s AI.

Uključeni su bolesnici s verificiranim AI. Evaluirana je prisutnost DM, AH, dislipidemije i pretilosti. Učinjen je prekonadni deksametazonski test supresije radi evaluacije autonomne sekrecije kortizola (ASK). Određeni su polimorfizmi BclI, N363S i ER22/23EK.

Analizirana su 103 bolesnika (M 29.1%, dob 59.17±10.31 godina). 69.9% bolesnika imalo je AH, 14.6% DM te dislipidemiju 46.6%. Pretilih je bilo 74.8%. MetS je imalo 57.3%, a ASK 50.5% bolesnika. U bolesnika s AI polimorfizam N363S je bio učestaliji nego u kontrolnoj populaciji ($\chi^2=12.05$, $p<0.001$), dok za polimorfizme BclI i ER22/23 nije bilo razlike ($\chi^2=0.48$, $p=0.48$, odnosno $\chi^2=0.01$, $p=0.93$). Nije nađeno razlika u komorbiditetima ili hormonskom statusu između nositelja polimorfizama i divljeg tipa.

Polimorfizmi BclI, N363S i ER22/23EK gena za GR kod bolesnika s AI nisu povezani s rizikom nastanka MetS kao niti njegovih komponenti: AH, DM, dislipidemije i pretilosti.

Ključne riječi: polimorfizmi gena za glukokortikoidni receptor, BclI, N363S, ER22/23EK, incidentalom nadbubrežne žlijezde, metabolički sindrom, autonomna sekrecija kortizola

9. ABSTRACT

GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND THE RISK OF METABOLIC SYNDROME IN PATIENTS WITH ADRENAL INCIDENTALOMA

Bojana Šimunov, 2020

Adrenal incidentalomas (AI) have been associated with an increased prevalence of arterial hypertension (AH), obesity, dyslipidemia and diabetes (DM). We aimed to investigate whether glucocorticoid receptor gene polymorphisms (BclI, N363S and ER22/23EK) were associated with the risk of metabolic syndrome (MetS) and its components in patients with AI.

Consecutive patients with AI were enrolled. The presence of DM, AH, dyslipidemia and obesity was assessed. 1mg- dexamethasone suppression test was performed to diagnose autonomous cortisol secretion (ACS). DNA samples were genotyped for polymorphisms BclI, N363S and ER22/23EK.

There were 103 patients (M 29.1%, aged 59.17 ± 10.31 yrs). 69.9% pts had AH, 14.6% DM, 46.6% dyslipidaemia and 74.8% were obese. MetS was diagnosed in 57.3% pts. ACS was found in 50.5% pts. In pts with AI polymorphism N363S was overrepresented ($\chi^2=12.05$, $p<0.001$). The frequency of BclI and ER22/23 was similar as in the control population ($\chi^2=0.48$, $p=0.48$ and $\chi^2=0.01$, $p=0.93$, respectively). We found no differences in comorbidities nor in hormonal status between wild type and polymorphism carriers.

In AI patients, GR polymorphisms BclI, N363S and ER22/23EK were not associated with the risk of MetS nor its components: AH, DM, obesity, and dyslipidaemia.

Key words: glucocorticoid receptor gene polymorphism, BclI, N363S, ER22/23EK, adrenal incidentaloma, metabolic syndrome, autonomous cortisol secretion

10. POPIS LITERATURE

1. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, i sur. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol*. 2016 p. G1–34.
2. Terzolo M, Stigliano A, Chiodini I, Loli P, Furlani L, Arnaldi G, i sur. AME position statement on adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol*. 2011 1;164(6):851–70.
3. Adrenal Incidentaloma | Endocrine Reviews | Oxford Academic [Internet]. [cited 2020 May 6]. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/advance-article/doi/10.1210/endrev/bnaa008/5817585>
4. Grumbach MM, Biller BMK, Braunstein GD, Campbell KK, Aidan Carney J, Godley PA, i sur Management of the clinically inapparent adrenal mass (“incidentaloma”). *Ann Intern Med*. 2003 ;138(5):424–9.
5. Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palù G, Boscaro M. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol*. 2003; 149(4):273–85.
6. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. The clinically inapparent adrenal mass: Update in diagnosis and management. *Endocr Rev*. 2004; 25(2):309–40.
7. Araujo-Castro M, Sampedro Núñez MA, Marazuela M. Autonomous cortisol secretion in adrenal incidentalomas. Vol. 64, *Endocrine*. 2019.
8. Bovio S, Cataldi A, Reimondo G, Sperone P, Novello S, Berruti A, i sur. Prevalence of adrenal incidentaloma in a contemporary computerized tomography series. *J Endocrinol Invest*. 2006 ;29(4):298–302.
9. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Ali A, i sur. A Survey on Adrenal Incidentaloma in Italy 1 . *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(2):637–44.
10. Kastelan D, Kraljevic I, Dusek T, Knezevic N, Solak M, Gardijan B, i sur. The clinical course of patients with adrenal incidentaloma: Is it time to reconsider the current recommendations? *Eur J Endocrinol*. 2015;173(2):275–82.
11. Kamilaris CDC, Stratakis CA. An update on adrenal endocrinology: significant

- discoveries in the last 10 years and where the field is heading in the next decade. *Hormones.*; 2018 (17).,479–90.
12. Di Dalmazi G, Pasquali R, Beuschlein F, Reincke M. Subclinical hypercortisolism: A state, a syndrome, or a disease? *Eur J Endocrinol.* 2015 ;61–71.
 13. Reznik Y, Lefebvre H, Rohmer V, Charbonnel B, Tabarin A, Rodien P, i sur. Aberrant adrenal sensitivity to multiple ligands in unilateral incidentaloma with subclinical autonomous cortisol hypersecretion: A prospective clinical study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 ;61(3):311–9.
 14. Bonnet-Serrano F, Bertherat J. Genetics of tumors of the adrenal cortex. *Endocr Rel Cancer.* 2018; (25) :131–52.
 15. Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, i sur. Targeted disruption β -catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development (Rome).* 2008;135(15):2593–602.
 16. Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, i sur. Wnt/ β -catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: A study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2).
 17. Ronchi CL, Di Dalmazi G, Faillot S, Sbiera S, Assié G, Weigand I, i sur. Genetic landscape of sporadic unilateral adrenocortical adenomas without PRKACA p.Leu206Arg mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101(9):3526–38.
 18. Sato Y, Maekawa S, Ishii R, Sanada M, Morikawa T, Shiraishi Y, i sur. Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing’s syndrome. *Science.* 2014;344(6186):917–20.
 19. Beuschlein F, Fassnacht M, Assié G, Calebiro D, Stratakis CA, Osswald A, i sur. Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal cushing’s syndrome. *N Engl J Med.* 2014;370(11):1019–28.
 20. Rothenbuhler A, Horvath A, Libé R, Faucz FR, Fratticci A, Raffin Sanson ML, i sur. Identification of novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (PDE8B), a cAMP-specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, in a

- cohort of patients with adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(2):195–9.
21. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, *i sur*. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet*. 2006;38(7):794–800.
 22. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev*. 1995;16(4):460–84.
 23. Cawood TJ, Hunt PJ, O’Shea D, Cole D, Soule S. Recommended evaluation of adrenal incidentalomas is costly, has high false-positive rates and confers a risk of fatal cancer that is similar to the risk of the adrenal lesion becoming malignant; time for a rethink? Vol. 161, *Eur J Endocrinol*. 2009; 513–27.
 24. Young WF. The incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med*. 2007; 356(6):601–10.
 25. Bernini G, Moretti A, Argenio G, Salvetti A. Primary aldosteronism in normokalemic patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol*. 2002;146(4):523–9.
 26. Lam KY, Lo CY. Metastatic tumours of the adrenal glands: A 30-year experience in a teaching hospital. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002 ;56(1):95–101.
 27. Hong AR, Kim JH, Park KS, Kim KY, Lee JH, Kong SH, *i sur*. Optimal follow-up strategies for adrenal incidentalomas: Reappraisal of the 2016 ESE-ENSAT guidelines in real clinical practice. *Eur J Endocrinol*. 2017; 177(6):475–83.
 28. Dinnes J, Bancos I, Di Ruffano LF, Chortis V, Davenport C, Bayliss S, *i sur*. Management of endocrine disease: Imaging for the diagnosis of malignancy in incidentally discovered adrenal masses: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2016;175: 51–64.
 29. Boland GWL, Lee MJ, Gazelle GS, Halpern EF, McNicholas MMJ, Mueller PR. Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: An analysis of the CT literature. *Am J Roentgenol*. 1998;171(1):201–4.
 30. Hamrahian AH, Ioachimescu AG, Remer EM, Motta-Ramirez G, Bogabathina H, Levin HS, *i sur*. Clinical utility of noncontrast computed tomography attenuation value (hounsfield units) to differentiate adrenal adenomas/hyperplasias from

- nonadenomas: Cleveland clinic experience. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(2):871–7.
31. Ross NS. Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1994;(23) 539–46.
 32. Terzolo M, Bovio S, Reimondo G, Pia A, Osella G, Borretta G, i sur. Subclinical Cushing's Syndrome in Adrenal Incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005.;34(2):423–39.
 33. Nieman LK. Update on subclinical Cushing's syndrome .*Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015.(25); 180–4.
 34. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Murad MH, Newell-Price J, Savage MO, i sur. Treatment of cushing's syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab;* 2015 (100): 2807–31.
 35. Dekkers OM, Horváth-Puho E, Jørgensen JOL, Cannegieter SC, Ehrenstein V, Vandembroucke JP, i sur. Multisystem morbidity and mortality in cushing's syndrome: A cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(6):2277–84.
 36. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.*; 2015.; (386): 913–27.
 37. Terzolo M, Bovio S, Pia A, Conton PA, Reimondo G, Dall'Asta C, i sur. Midnight serum cortisol as a marker of increased cardiovascular risk in patients with a clinically inapparent adrenal adenoma. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153(2):307–15.
 38. Tauchmanová L, Rossi R, Biondi B, Pulcrano M, Nuzzo V, Palmieri EA, i sur. Patients with subclinical Cushing's syndrome due to adrenal adenoma have increased cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(11):4872–8.
 39. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, Del Viscovo L, i sur. Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(4):1440–8.
 40. Morelli V, Masserini B, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Savoca C, Viti R, i sur. Subclinical hypercortisolism: Correlation between biochemical diagnostic criteria and clinical aspects. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010; 73(2):161–6.
 41. Di Dalmazi G, Vicennati V, Rinaldi E, Morselli-Labate AM, Giampalma E, Mosconi C, i sur. Progressively increased patterns of subclinical cortisol

- hypersecretion in adrenal incidentalomas differently predict major metabolic and cardiovascular outcomes: A large cross-sectional study. *Eur J Endocrinol.* 2012; 166(4):669–77.
42. Fernández-Real JM, Ricart Engel W, Simó R, Salinas I, Webb SM. Study of glucose tolerance in consecutive patients harbouring incidental adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998; 49(1):53–61.
 43. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity. *Circulation.* 2009. ;(120). 1640–5.
 44. Masserini B, Morelli V, Palmieri S, Eller-Vainicher C, Zhukouskaya V, Cairolì E, et al. Lipid abnormalities in patients with adrenal incidentalomas: Role of subclinical hypercortisolism and impaired glucose metabolism. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(6):623–8.
 45. Terzolo M, Pia A, Ali A, Osella G, Reimondo G, Bovio S, et al. Adrenal incidentaloma: A new cause of the metabolic syndrome? *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):998–1003.
 46. Yener S, Baris M, Peker A, Demir O, Ozgen B, Secil M. Autonomous cortisol secretion in adrenal incidentalomas and increased visceral fat accumulation during follow-up. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2017;87(5):425–32.
 47. Sbardella E, Minnetti M, D’Aluisio D, Rizza L, Di Giorgio MR, Vinci F, et al. Cardiovascular features of possible autonomous cortisol secretion in patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol.* 2018 May 1;178(5):501–11.
 48. Di Dalmazi G, Vicennati V, Garelli S, Casadio E, Rinaldi E, Giampalma E, et al. Cardiovascular events and mortality in patients with adrenal incidentalomas that are either non-secreting or associated with intermediate phenotype or subclinical Cushing’s syndrome: A 15-year retrospective study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(5):396–405.
 49. Patrova J, Kjellman M, Wahrenberg H, Falhammar H. Increased mortality in patients with adrenal incidentalomas and autonomous cortisol secretion: a 13-

- year retrospective study from one center. *Endocrine*. 2017; 58(2):267–75.
50. Zeiger MA, Thompson GB, Duh QY, Hamrahian AH, Angelos P, Elaraj D, i sur. American Association of Clinical Endocrinologists and American Association of Endocrine Surgeons Medical Guidelines for the Management of Adrenal Incidentalomas: Executive summary of recommendations. *Endocrine Practice*. American Association of Clinical Endocrinologists; 2009. (15). 450–3.
 51. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Gregianin M, Macri' C, i sur. Incidentally Discovered Adrenal Tumors: Endocrine and Scintigraphic Correlates 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(1):55–62.
 52. Osella G, Terzolo M, Borretta G, Magro G, Ali A, Piovesan A, i sur. Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(6):1532–9.
 53. Pasternak JD, Seib CD, Seiser N, Tyrell JB, Liu C, Cisco RM, i sur. Differences between bilateral adrenal incidentalomas and unilateral lesions. *JAMA Surg*. 2015;150(10):974–8.
 54. Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, i sur. Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(7):2796–9.
 55. Angeli A, Osella G, Ali A, Terzolo M. Adrenal Incidentaloma: An Overview of Clinical and Epidemiological Data from the National Italian Study Group. *Horm Res*. 1997; 47(4–6):279–83.
 56. Bourdeau I, El Ghorayeb N, Gagnon N, Lacroix A. Differential diagnosis, investigation and therapy of bilateral adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrin*. 2018.(179).57–67.
 57. Vitellius G, Trabado S, Hoeffel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, i sur. Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: Results of the French MUTA-GR Study. *Eur J Endocrinol*. 2018; 178(4):411–23.
 58. Vassilatou E, Vryonidou A, Ioannidis D, Paschou SA, Panagou M, Tzavara I. Bilateral adrenal incidentalomas differ from unilateral adrenal incidentalomas in subclinical cortisol hypersecretion but not in potential clinical implications. *Eur J*

- Endocrinol. 2014;171(1):37–45.
59. Vassiliadi DA, Ntali G, Stratigou T, Adali M, Tsagarakis S. Aberrant cortisol responses to physiological stimuli in patients presenting with bilateral adrenal incidentalomas. *Endocrine*. 2011;40(3):437–44.
 60. Morelli V, Palmieri S, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Cairoli E, Zhukouskaya V, et al. Bilateral and unilateral adrenal incidentalomas: biochemical and clinical characteristics. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(2):235–41.
 61. Rössner S. Eskil Kylin (1889-1975). *Obes Rev*. 2009; 10(3):362–362.
 62. Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E. The Metabolic Syndrome-from Insulin Resistance to Obesity and Diabetes., *Med Clin North Am*. 2011.; 855–73.
 63. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(14):1113–32.
 64. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: Association with metabolic risk factors in the framingham heart study. *Circulation*. 2007 Jul;116(1):39–48.
 65. Oda E. The metabolic syndrome as a concept of adipose tissue disease. Vol. 31, *Hypertension Research*. Nature Publishing Group; 2008. p. 1283–91.
 66. Neeland IJ, Ayers CR, Rohatgi AK, Turer AT, Berry JD, Das SR, et al. Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity*. 2013; 21(9)
 67. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients*. 2013; 5(4):1218–40.
 68. Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, et al. Abdominal Obesity: Role in the Pathophysiology of Metabolic Disease and Cardiovascular Risk. *Am J Med*.2010;120(2 SUPPL.):S3–8.
 69. Samson SL, Garber AJ. Metabolic syndrome., *Endocrinol Metabol Clin North Am*; 2014. (43)1–23.
 70. Nikolic D, Katsiki N, Montalto G, Isenovic ER, Mikhailidis DP, Rizzo M. Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: Clinical significance and therapeutic approaches. *Nutrients*. 2013; 5(3):928–48.

71. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, i sur.. Obesity-related hypertension: Pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment-a position paper of the the obesity society and the American society of hypertension. *Obesity*. 2013; 21(1):8–24.
72. Smits MM, Ioannou GN, Boyko EJ, Utzschneider KM. Non-alcoholic fatty liver disease as an independent manifestation of the metabolic syndrome: Results of a US national survey in three ethnic groups. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(4):664–70.
73. Kakoly NS, Khomami MB, Joham AE, Cooray SD, Misso ML, Norman RJ, i sur.. Ethnicity, obesity and the prevalence of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in PCOS: A systematic review and meta-regression. *Hum Reprod Update*. 2018;24(4):455–67.
74. Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *The Lancet*. 1995(20);20-5.
75. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med*. 1993; 119(12):1198–208.
76. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, i sur.. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. 1985;318(6047):635–41.
77. Koper JW, van Rossum EFC, van den Akker ELT. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*. 2014
78. Huizenga NATM, Koper JW, De Lange P, Pols HAP, Stolk RP, Grobbee DE, i sur.. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(1):47–54.
79. Lamberts SWJ, Huizenga ATM, De Lange P, De Jong FH, Koper JW. Clinical aspects of glucocorticoid sensitivity. *Steroids*; 1996;. 157–60.
80. Charmandari E, Chrousos GP, Kino T. Identification of natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutations or polymorphisms and their functional

- consequences at the hormone-receptor interaction level. *Methods Mol Biol.* 2009;590:33–60.
81. Riester A, Issler O, Spyroglou A, Rodrig SH, Chen A, Beuschlein F. ACTH-dependent regulation of MicroRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland. *Endocrinol* 2012;153(1):212–22.
 82. Newfield RS, Kalaitzoglou G, Licholai T, Chilton D, Ashraf J, Thompson EB, i sur.. Normocortisolemic Cushing's Syndrome Initially Presenting with Increased Glucocorticoid Receptor Numbers ¹. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(1):14–21.
 83. Arai K, Chrousos GP. Syndromes of glucocorticoid and mineralocorticoid resistance. *Steroids.* 1995 Jan; 60(1):173–9.
 84. Lamberts SWJ, Koper JW, Biemond P, Den Holder FH, De Jong FH. Cortisol receptor resistance: The variability of its clinical presentation and response to treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74(2):313–21.
 85. Polymorphism, Genetic - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2020 May 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68011110>
 86. nr3c1 - SNP - NCBI [Internet]. [cited 2015 Apr 2]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
 87. Green TL, Tung K, Lim D, Leventhal SM, Cho K, Greenhalgh DG. A novel human glucocorticoid receptor SNP results in increased transactivation potential. *Biochem Biophys Reports.* 2017; 9:140–5.
 88. van Rossum EFC, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, i sur.. Identification of the Bell polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003; 59(5):585–92.
 89. Yan Y-X, Dong J, Wu L-J, Shao S, Zhang J, Zhang L, i sur.. Associations between polymorphisms in the glucocorticoid-receptor gene and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J Epidemiol.* 2013; 23(5):389–95.
 90. Manenschijn L, Van Den Akker ELTT, Lamberts SWJJ, Van Rossum EFCC. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms: An overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1179(1):179–98.
 91. van Rossum EFC, Lamberts SWJ. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor

- gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.* 2004; 59:333–57.
92. Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19(9):331–9.
 93. Russcher H, Smit P, van den Akker ELT, van Rossum EFC, Brinkmann AO, de Jong FH, i sur.. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(10):5804–10.
 94. van Rossum EFC, Koper JW, Huizenga NATM, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL, Brinkmann AO, i sur.. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes.* 2002; 51(10):3128–34.
 95. Mora M, Sánchez L, Serra-Prat M, Palomera E, Blanco J, Aranda G, i sur.. Hormonal determinants and effect of ER22/23EK glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataró Ageing Study. *Age (Dordr).* 2012 ;34(3):553–61.
 96. van den Akker ELT, Koper JW, van Rossum EFC, Dekker MJH, Russcher H, de Jong FH, i sur.. Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med.* 2008; 168(1):33–9.
 97. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG. An association between a BclII restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J Mol Endocrinol.* 1992; 9(3):295–300.
 98. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, Chagnon YC, Gagnon J, Pérusse L, i sur.. Abdominal visceral fat is associated with a BclII restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res.* 1997; 5(3):186–92.
 99. Giordano R, Marzotti S, Berardelli R, Karamouzis I, Brozzetti A, D'Angelo V, i sur.. BclII polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased obesity, impaired glucose metabolism and dyslipidaemia in patients with Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012; 77(6):863–70.
 100. Syed AA, Halpin CG, Irving JAE, Unwin NC, White M, Bhopal RS, i sur.. A common intron 2 polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated

- with insulin resistance in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 68(6):879–84.
101. Di Blasio AM, van Rossum EFC, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podestà F, i sur.. 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.
 102. Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit 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):237–41.
 103. Cercato C, Halpern A, Frazzatto EST, Guazzelli IC, Villares SMF. Polimorfismo N363S do gene do receptor de glucocorticoide: Efeito sobre a adiposidade visceral medida pela tomografia computadorizada. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):288–92.
 104. Morelli V, Donadio F, Eller-Vainicher C, Cirello V, Olgiati L, Savoca C, i sur.. Role of glucocorticoid receptor polymorphism in adrenal incidentalomas. *Eur J Clin Invest*. 2010; 40(9):803–11.
 105. Damjanovic SS, Antic JA, Ilic BB, Cokic BB, Ivovic M, Ognjanovic SI, i sur.. Glucocorticoid receptor and molecular chaperones in the pathogenesis of adrenal incidentalomas: potential role of reduced sensitivity to glucocorticoids. *Mol Med*. 2012; 18:1456–65.
 106. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, i sur.. The task force for the management of arterial hypertension of the european society of hypertension (esh) and of the european society of cardiology (esc). *J Hypertens*. 2013 Jul;31(7):1281–357.
 107. Williams, Bryan; Mancia G, Spiering, Wilko; Rosei, Enrico Agabiti; Azizi, Michel; Burnier M, Clement, Denis L.; Coca, Antonio; de Simone G, Dominiczak, Anna; Kahan, Thomas; Mahfoud F, Redon, Josep; Ruilope, Luis; Zanchetti, Alberto; Kerins M, Kjeldsen, Sverre E.; Kreutz R, i sur.. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension | *European Heart Journal* | Oxford Academic [Internet]. Vol. 39, *European Heart Journal*. 2018 [cited 2020 Mar 4]. p. 3021–104. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/39/33/3021/5079119>

108. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, i sur.. Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2011; 34(6):1419–23.
109. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, i sur.. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J*. 2011;32(14):1769–818.
110. 1000 Genomes Browser [Internet]. [cited 2020 Jul 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/help/>
111. Griffing GT. A-I-D-S: The new endocrine epidemic. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79(6):1530–1.
112. 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.
113. Szappanos Á, Patócs A, Tőke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, i sur.. 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):636–43.
114. Jewell CM, Katen KS, Barber LM, Cannon C, Garantziotis S, Cidlowski JA. Healthy glucocorticoid receptor N363S carriers dysregulate gene expression associated with metabolic syndrome. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2016; 311(4):E741–8.
115. Echwald SM, Sørensen TIA, 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*. 2001;25(10):1563–5.
116. Koeijvoets KCMC, Van Rossum EFC, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Defesche JC, Kastelein JJP, i sur.. A functional polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relation to cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(10):4131–6.
117. Marti A, Ochoa MC, Sánchez-Villegas A, Martínez JA, Martínez-González MA, Hebebrand J, i sur.. Meta-analysis on the effect of the N363S polymorphism of

- the glucocorticoid receptor gene (GRL) on human obesity. *BMC Med Genet.* 2006; 7(1):50.
118. Syed AA, Irving JAE, Redfern CPF, Hall AG, Unwin NC, White M, i sur.. Low Prevalence of the N363S Polymorphism of the Glucocorticoid Receptor in South Asians Living in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jan 1;89(1):232–5.
 119. Bertalan R, Patócs A, Boyle B, Rig J, Rác K. The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy. *Gynecol Endocrinol.* 2009;25(6):379–82.
 120. Tzanela M, Mantzou E, Saltiki K, Tampourlou M, Kalogeris N, Hadjidakis D, i sur.. Clinical and biochemical impact of BCL1 polymorphic genotype of the glucocorticoid receptor gene in patients with adrenal incidentalomas. *J Endocrinol Invest.* 2012; 35(4):395–400.
 121. Moreira RPP, Bachega TASS, Machado MC, Mendonca BB, Bronstein MD, Villares Fragoso MCB. Modulatory effect of BclI GR gene polymorphisms on the obesity phenotype in Brazilian patients with Cushing’s disease. *Clinics (Sao Paulo).* 2013; 68(5):579–85.
 122. Arruda M, Mello Ribeiro Cavalari E, Pessoa De Paula M, Fernandes Cordeiro De Moraes F, Furtado Bilro G, Alves Coelho MC, i sur.. The presence of nonfunctioning adrenal incidentalomas increases arterial hypertension frequency and severity, and is associated with cortisol levels after dexamethasone suppression test. *J Hum Hypertens.* 2017 ; 32(1):3–11.
 123. Olsen H, Nordenström E, Bergenfelz A, Nyman U, Valdemarsson S, Palmqvist E. Subclinical hypercortisolism and CT appearance in adrenal incidentalomas: A multicenter study from Southern Sweden. *Endocrine.* 2012; 42(1):164–73.
 124. Libè R, Dall’Asta C, Barbeta L, Baccarelli A, Beck-Peccoz P, Ambrosi B. Long-term follow-up study of patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol.* 2002;147(4):489–94.
 125. Reimondo G, Puglisi S, Pia A, Terzolo M. Autonomous hypercortisolism: Definition and clinical implications. Vol. 44, *Minerva Endocrinologica.* Edizioni Minerva Medica; 2019.; 33–42.
 126. Debono M, Bradburn M, Bull M, Harrison B, Ross RJ, Newell-Price J. Cortisol

- as a Marker for Increased Mortality in Patients with Incidental Adrenocortical Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 ;99(12):4462–70.
127. Terzolo M, Pia A, Reimondo G. Subclinical Cushing's syndrome: definition and management. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012 ;76(1):12–8.
 128. Morelli V, Reimondo G, Giordano R, Della Casa S, Policola C, Palmieri S, i sur.. Long-term follow-up in adrenal incidentalomas: An Italian multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(3):827–34.
 129. Androulakis II, Kaltsas G, Piaditis G, Grossman AB. The clinical significance of adrenal incidentalomas. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41(5):552–60.
 130. Morelli V, Arosio M, Chiodini I. Cardiovascular mortality in patients with subclinical Cushing. *Ann Endocrinol (Paris).* 2018 ;79(3):149–52.
 131. Iacobone M, Citton M, Scarpa M, Viel G, Boscaro M, Nitti D. Systematic review of surgical treatment of subclinical Cushing's syndrome. *Br J Surg.* 2015; 102(4):318–30.
 132. Vassilatou E, Vryonidou A, Ioannidis D, Paschou SA, Panagou M, Tzavara I. Bilateral adrenal incidentalomas differ from unilateral adrenal incidentalomas in subclinical cortisol hypersecretion but not in potential clinical implications. *Eur J Endocrinol.* 2014; 171(1):37–45.
 133. Androulakis II, Kaltsas GA, Markou A, Tseniklidi E, Kafritsa P, Pappa T, i sur.. The functional status of incidentally discovered bilateral adrenal lesions. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;75(1):44–9.

11. ŽIVOTOPIS

Bojana Šimunov (r. Gardijan), rođena je 22. listopada 1987. u Zagrebu. Nakon završene V. gimnazije upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2006. godine. Diplomirala je 2012. Tijekom studija dobila je Dekanovu nagradu i Nagradu Zaklade Krmptić-Perović za najbolju studenticu generacije. Nakon odrađenog pripravničkog staža u Kliničkom bolničkom centru Zagreb položila je stručni ispit i stekla odobrenje za samostalni rad 2013.godine. Od 2014. zaposlena je kao specijalizant nefrologije pri Zavodu za nefrologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur. Tijekom specijalizacije usavršavala se i u Universitaets Klinikum Eppendorf, Hamburg. Od 2015. vanjski suradnik Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na predmetu Temelji liječničkog umijeća. Član je Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Hrvatskog liječničkog zbora, European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association i American Society of Nephrology. Autor više znanstvenih i stručnih publikacija. Udana, majka dvoje djece.