

48111

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

GLİKOKORTİKOİD DEĞİŞİMİ İLE  
GLİKOKORTİKOİD RESEPTÖR REGÜLASYONU  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞİŞİK HASTALIK  
GRUPLARINDA ARAŞTIRILMASI

( Doktora Tezi )

Uzm. Tıbbi Bio. Mehmet GÜVEN

48111

Danışman : Prof. Dr. Gönül SULTUYBEK

İstanbul - 1996

## İÇİNDEKİLER

Giriş ve Genel Bilgiler	1
Amaç	28
Materyal ve Yöntemler	29
Bulgular	32
Tartışma	51
Özet	58
Summary	59
Kaynaklar	60

Öğrencilik hayatım boyunca araştırmacı tavrı ve bilimsel kişiliği ile bana daima örnek olan, çalışmam süresince bilgi ve deneyiminden yararlandığım, değerli hocam Prof.Dr. Gönül SULTUYBEK'e,

Üniversite eğitimimde büyük emeği geçen, Sayın hocam Prof.Dr. Asım CENAN'I'ye,

Vakaların temininde ve değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen İ.Ü. Cerrahpařa Tıp Fakóltesi, Endokrinoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Hüsrev HATEM'I'ye ve İ.Ü. Tıp Fakóltesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Endokrinoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof.Dr. Nurin SAKA'ya,

Tezimin alışmaları sırasında yardımlarını gördüğüm tüm bölüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmam süresince bana her türlü konuda yardımcı olan eşim Gülgün GÜVEN'e teşekkür ederim.

## GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Somatik hücreler, yaşam süreçleri boyunca davranışlarını etkileyen birçok hücre dışı sinyallere (eksternal sinyal) maruz kalırlar. Sinyalizasyon moleküllerinin (ligand) çoğu hücre membranında yerleşmiş bulunan reseptörlerle birleşerek, hücre içindeki bazı moleküler olayları başlatırlar. İnsülin, büyüme hormonu (GH), glukagon, parathormon bu tip sinyalleri oluştururlar. Bu hormonların etkileştikleri reseptörlerde " Protein hormon reseptörleri " denir.

Sinyalizasyon moleküllerinin belirli bir kısmı ( Steroid ve Tiroid hormonlar ) ise hücre membranını geçerek direkt olarak hücre içindeki reseptörle birleşip kromatin seviyesinde gen ekspresyonunun aktivasyonuna veya inhibisyonuna sebep olurlar. Bu tip hormonların etkileştikleri reseptörlerde "Steroid hormon reseptörleri (SHR)' veya Nükleer Reseptörler " denir.

Nükleer reseptör, transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanırlar. Glikokortikoidler, östrojenler, progesterinler, androjenler, mineralokortikoidler, tiroid hormonu, vitamin D ve retinoik asid gibi doğal ligandların yanında 'ksenobiotik' ligandlar diye adlandırılan ve karsinogenezle ilgisi olan dioksin ve peroksisom gibi ligandlarda SHR'lere bağlanırlar ( 46, 170).

### 1- Steroid Hormonların Sentezi

Bütün steroidler, biyolojik membranların yapısında ve fonksiyonunda önemli bir yeri olan kolesterolden sentezlenirler. Steroid hormon sentezinin primer organları gonatlar, adrenal korteks ve hamile kadınlarda plasentadır. Steroid hormonlar beş sınıfa ayrılır :

a) **Progesteron** : Hamilelik sırasındaki olayları düzenler.

b) **Glikokortikoidler ( Kortizol ve Kortikosteron )** : Glikoneogenezi sağlar ve inflamatuvar olayları baskılar.

c) **Mineralokortikoidler (Aldosteron)** :  $Na^+$ ,  $Cl^-$  ve  $HCO_3^-$  in böbrekten reabsorpsiyonunun sağlanmasıyla ion balansını düzenler.

d) **Androjen (Androstenedion ve Testesteron )** : Erkek seksüel gelişimini sağlar ve erkek seks özelliklerini devam ettirir.

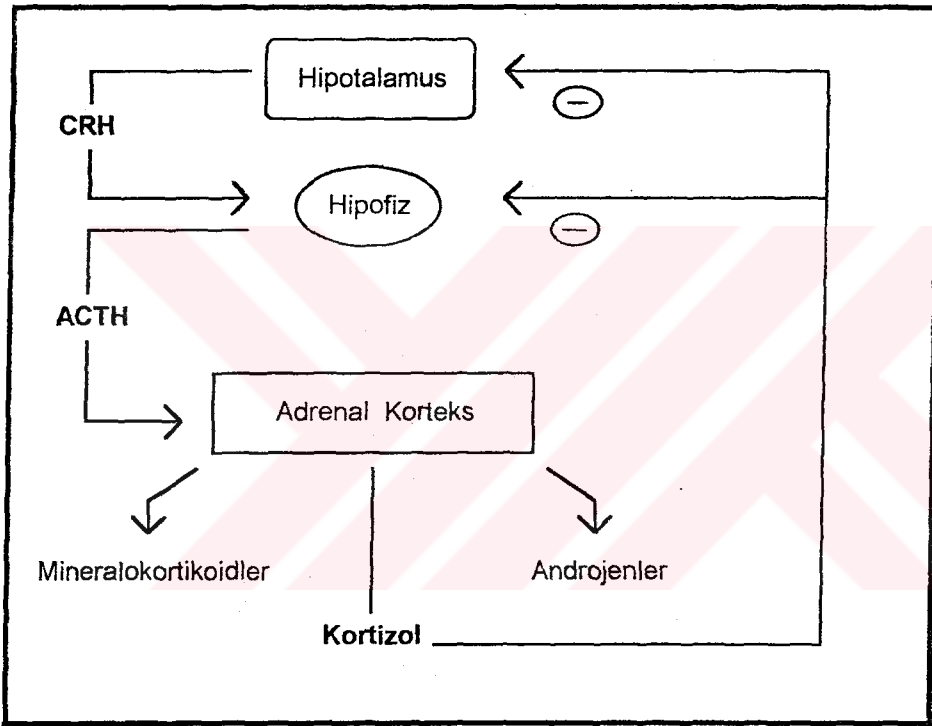
e) **Östrojenler (Östron ve Östadiol )** : Seks hormonlarıdır ve dişilik özelliklerinin gelişmesinde rol oynarlar.

Steroid hormonların genel bir özelliği sentezden hemen sonra salındıkları için depolanmamalarıdır. Bundan dolayı dolaşımdaki bir hormonun miktarının ayarlanması sentez sırasında kontrol edilir. Bu kontrol beyinden gelen sinyaller ile yapılır (7, 96).

## 2- Glikokortikoid Sentezinin Regülasyonu

Kandaki glikokortikoid hormon düzeyi, gün içinde değişen nöral ve hormonal sinyallerle kontrol edilir.

Glikokortikoidlerin miktarı hipofiz ön lobundan salgılanan adrenokortikotrop hormon ( ACTH ) ile kontrol edilir. ACTH'un sentez ve sekresyonu ise hipotalamustan salgılanan kortikotropin salgılatıcı hormon ( CRH ) ile uyarılır. Vazopresin ( VP ) ve katekolaminler de ACTH sekresyonunu uyarabilir. Kortizol hipotalamustan CRH, hipofizden de ACTH sentezini inhibe eder. Hipotalamus, hipofiz ve adrenal korteks arasında geçen bu sisteme Hipotalamik-Hipofizer-Adrenal ( HHA ) sistem denir ( Şekil 1 ).



Şekil 1 : Hipotalamik-Hipofizer-Adrenal ( HHA ) sistem.

Hipotalamusun paraventricüler nükleusundan CRH ve VP sekresyonu hem nöral hem de hormonal kontrol altındadır. Hipoglisemi, hipoksi, ağrı, ateş, kanama, yaralanma ve diğer stres durumları CRH ve VP sekresyonunu uyarırken, glikokortikoidler bu sekresyonunu inhibe eder.

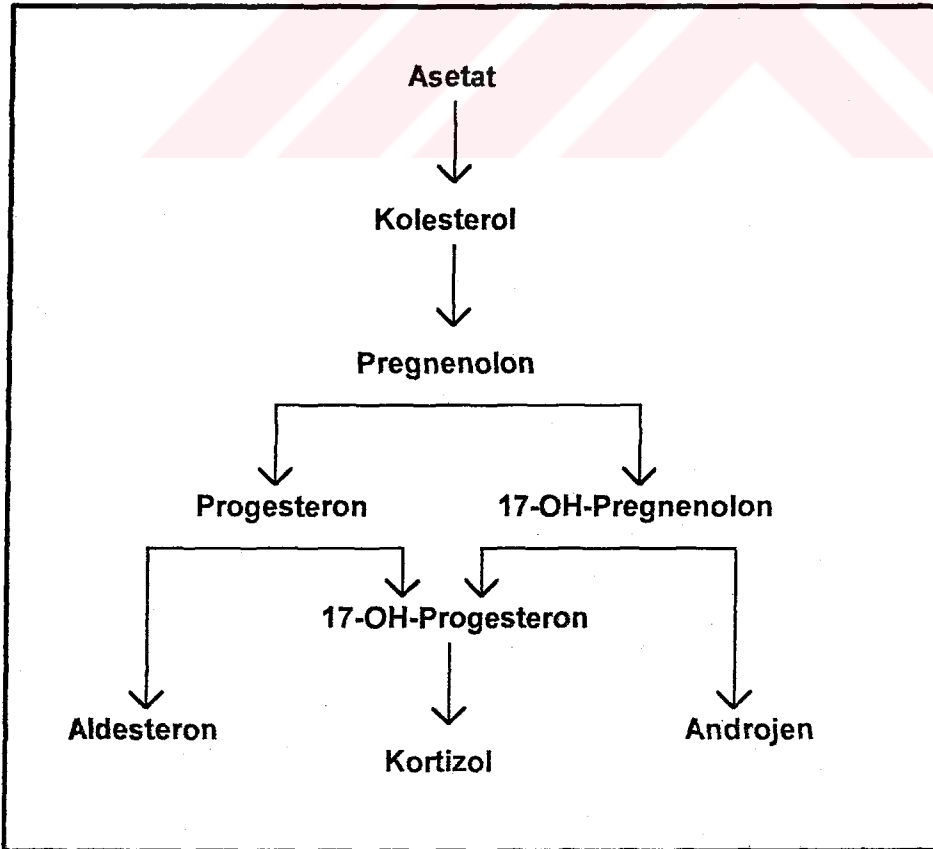
HHA sistemin kontrolünde, perifer veya beyinden salgılanan sitokinlerin de rolü vardır. Sitokinler HHA sistemi uyararak immün yanıtı baskırlar. İnterlökin-1 ( IL-1 ), IL-6 ve tümör nekroz faktör ( TNF ), HHA sistemi aktive ederler. IL-1 hem CRH hem de VP sekresyonunu uyarır. İlave olarak, IL-1 direkt olarak hipofizden ACTH, adrenalde de glikokortikoid sekresyonunu uyarır.

Glikokortikoidler ACTH sekresyonunu direkt olarak, CRH ile VP sekresyonunu ise indirekt olarak inhibe ederler. Orta dereceli streslerde inhibisyon hızlı ( dakikalar ve saatler ) iken, patafizyolojik durumlarda veya yüksek kortizol tedavisi sırasında yavaştır ( saatler ve günler ). İnhibisyonun bütün durumları hem RNA hem de protein sentezi üzerine etkilidir.

ACTH, adrenal korteksten glikokortikoid sekresyonunu uyarırken, membrandaki adenil siklazı aktive eder ve cAMP yapımına yol açar. Maksimal etkisi 3 dakika içinde gerçekleşir. CRH, ACTH ve glikokortikoidlerin sekresyon miktarları sabahları yüksek ( 20 µg ), akşam geç saatlerde ise düşüktür ( 5 µg ) (94, 106, 142).

## 2-1) Glikokortikoid Hormonlar

Böbrek üstü bezi iki farklı bölümden oluşur; adrenal medulla ve adrenal korteks. Adrenal medulladan epinefrin ve norepinefrin, adrenal korteksten ise mineralokortikoidler ve glikokortikoidler salgılanır. Bunlara ek olarak da az miktarda seks hormonu, özellikle androjenik hormonlar salgılanır ( Şekil 2 ). Androjenik hormonların etkileri erkek seks hormonu olan testesterona benzemektedir. Normalde bu hormonlar çok önemli görülmemelerine rağmen, adrenal korteksinin bazı anormal durumlarında çok fazla miktarda salgılandıkları zaman zararlı etki gösterdikleri ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 2 : Böbrek üstü bezinde steroid sentezinin önemli aşamaları.

Glikokortikoid aktiviteye sahip hormonlar şunlardır ;

1- **Kortizol** ( çok güçlü olup, glikokortikoid aktivitesinin yaklaşık % 95 inden sorumludur).

2- **Kortikosteron** ( total glikokortikoid aktivitesinin % 4 kadarını oluşturur fakat kortizolden daha az güçlüdür ).

3- **Kortizon** ( sentetiktir ve hemen hemen kortizol kadar güçlüdür ).

4- **Prednizon** ( sentetiktir, kortizolden dört kat daha güçlüdür ).

5- **Metilprednizon** ( sentetiktir, kortizolden beş kat daha güçlüdür ).

6- **Dekzametazon** ( sentetiktir, kortizolden otuz kat daha güçlüdür ).

Özellikle kortizolün hafif mineralokortikoid aktivitesi vardır. Çok yoğun glikokortikoid aktivitesine karşın mineralokortikoid aktivitesi hemen hemen sıfır olması nedeniyle dekzametazon, özgün glikokortikoid aktiviteyi uyarmada ve glikokortikoid reseptör çalışmalarında önemli bir drog olarak kabul edilir (7, 144).

## 2 - II ) Glikokortikoidlerin Fonksiyonları

Glikokortikoidler protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasını düzenleyen önemli hormonlardır (29, 56, 92).

**1- Glikokortikoidlerin Karbonhidrat Metabolizmasına Etkileri :** Glikokortikoidler karaciğerdeki glikoneojenezi uyararak, glikoneojenez hızını 6-10 kat arttırmaktadır. Bunu amino asitlerin karaciğer hücrelerine transportunu artırarak, karaciğerde glikoneojenezi ile ilgili transaminazlar ile diğer enzimlerin sentezini artırarak ve ekstrahepatik dokulardaki protein katabolizmasını artırarak yaparlar.

Glikokortikoidler aynı zamanda, hücrelerin glikoz kullanım hızını azaltarak kan glikoz düzeyini artırırlar. Bu azalmanın kesin nedeni bilinmemekle beraber, glikozun hücreye girmesi ile son parçalanma aşaması arasında bir noktada, glikokortikoidlerin glikoz kullanım hızını direkt olarak yavaşlattığı düşünülmektedir.

**2- Glikokortikoidlerin Protein Metabolizmasına Etkileri :** Glikokortikoidlerin metabolik sistemlere en önemli etkilerinden biri, karaciğer dışındaki tüm vücut hücrelerinde protein depoları azaltılmasıdır. Bu etki, hücrelerde protein sentezinin azaltılması, katabolizmanın ise artmasıyla gerçekleşir. Bu etkilerden her ikiside ekstrahepatik dokularda amino asit transportunun azaltılmasına bağlı olabilir. Glikokortikoidlerin etkileri özellikle kas ve lenfoid doku gibi birçok ekstrahepatik dokuda gösterildiği gibi, RNA yapımının azaltılması tarzında da ortaya çıkabilir.

**3- Glikokortikoidlerin Yağ Metabolizmasına Etkileri :** Glikokortikoidler yağ dokusundan yağ asitlerinin mobilizasyonunu sağlar. Böylece serbest yağ asitlerinin plazma konsantrasyonları ve enerji için kullanımı artar. Glikokortikoidler aynı zamanda yağ asitlerinin oksidasyonunu da artırır. Yağların mobilizasyonunun artması ve hücrelerdeki oksidasyonun hızlanmasıyla, metabolik sistemlerinde enerji için glikoz yerine yağ asitlerinin kullanımı başlar. Kortizolün bu etkisi insülineminin azalması kadar çabuk ve güçlü değildir.

Glikokortikoidler yağ dokusunda orta derecede bir yağ mobilizasyonu yapmasına karşın, aşırı glikokortikoid sekresyonu olan kişilerde obezite gelişir. Bu tip obezitede, yağ vücudun göğüs ve baş bölgesinde depolanır. Bu durum vücudun bazı dokularında yağ oluşum hızının mobilizasyon ve oksidasyondan daha yüksek olduğunu gösterir.

**4- Glikokortikoidlerin Diğer Etkileri :** Birçok stres ( çeşitli travmalar, aşırı soğuk ve sıcak, infeksiyon, cerrahi operasyonlar gibi ) olaylarında ACTH'nun uyarılmasıyla glikokortikoid sekresyonu artmaktadır. Böylece çeşitli nonspesifik uyarılar adrenal korteksten glikokortikoid sekresyonunu belirgin olarak yükseltir.

Glikokortikoidlerin diğer bir etkisinde antienflamatuar etkidir. Dokular travma, bakteri infeksiyonu yada herhangi bir etkiyle haraplandığı zaman genellikle bir inflamasyon gelişir. Bu inflamasyon hastalığın kendisinden daha zararlı hale geldiğinde, glikokortikoid tedavisi bu olayı azaltır yada bloke eder.

Glikokortikoidlerin antienflamatuar etkilerini sıralıyacak olursak; (1) Glikokortikoidler lizozomal membranların yırtılmasını güçleştirerek, lizozomlarda depolanan ve inflamasyona yol açan proteolitik enzimlerin salınmasını güçleştirirler. (2) Kapiller permeabiliteyi azaltarak lökositlerin inflamasyon alanına göçünü azaltırlar. (3) Lökositlerin fagositoz yeteneğini azaltarak, daha fazla inflamasyon materyalinin serbestlenmesini önlerler. (4) T lenfositlerini suprese ederler. (5) Ateşi düşürerek bu yolla vazodilatasyonu azaltırlar. Bu özellikleriyle glikokortikoidler romatoid artrit, romatizmal ateş, akut glomerulonefrit ve sistemik lupus eritramatosus gibi hastalıkların tedavisinde kullanılırlar.

Glikokortikoidler kanda eozinofil ve lenfosit sayısını azaltır. Yüksek dozda glikokortikoidin alınması vücuttaki tüm lenfoid dokularda önemli ölçüde atrofiye yol açar. Bu özellikleriyle glikokortikoidler, kalp, böbrek ve öteki dokuların transplantasyonunda doku reddi reaksiyonlarını önlemek için en çok kullanılan droglardan biridir.

### **3- Glikokortikoid Reseptörleri**

Steroid reseptör biyokimyası 1960'dan beri endokrinolojik araştırmaların aktif bir sahası olmuştur. Reseptörlerin DNA'daki bağlanma dizilerin moleküler klonlanmasıyla, reseptörlerin daha detaylı yapısal ve fonksiyonel analizi ancak mümkün olmuştur.



Böylece reseptörlerin ligand bağlama, dimerizasyon, nükleer translokasyon, DNA'ya bağlanma ve transaktivasyon gibi çeşitli fonksiyonları reseptörün belirli bölgelerine tahsis edilmiştir.

Tridyum işaretli dekzametazon ve triamcinolone acetonide gibi sentetik glikokortikoidlerin yardımı ile glikokortikoid reseptörlerinin (GR) özellikleri tespit edilebilmiştir.

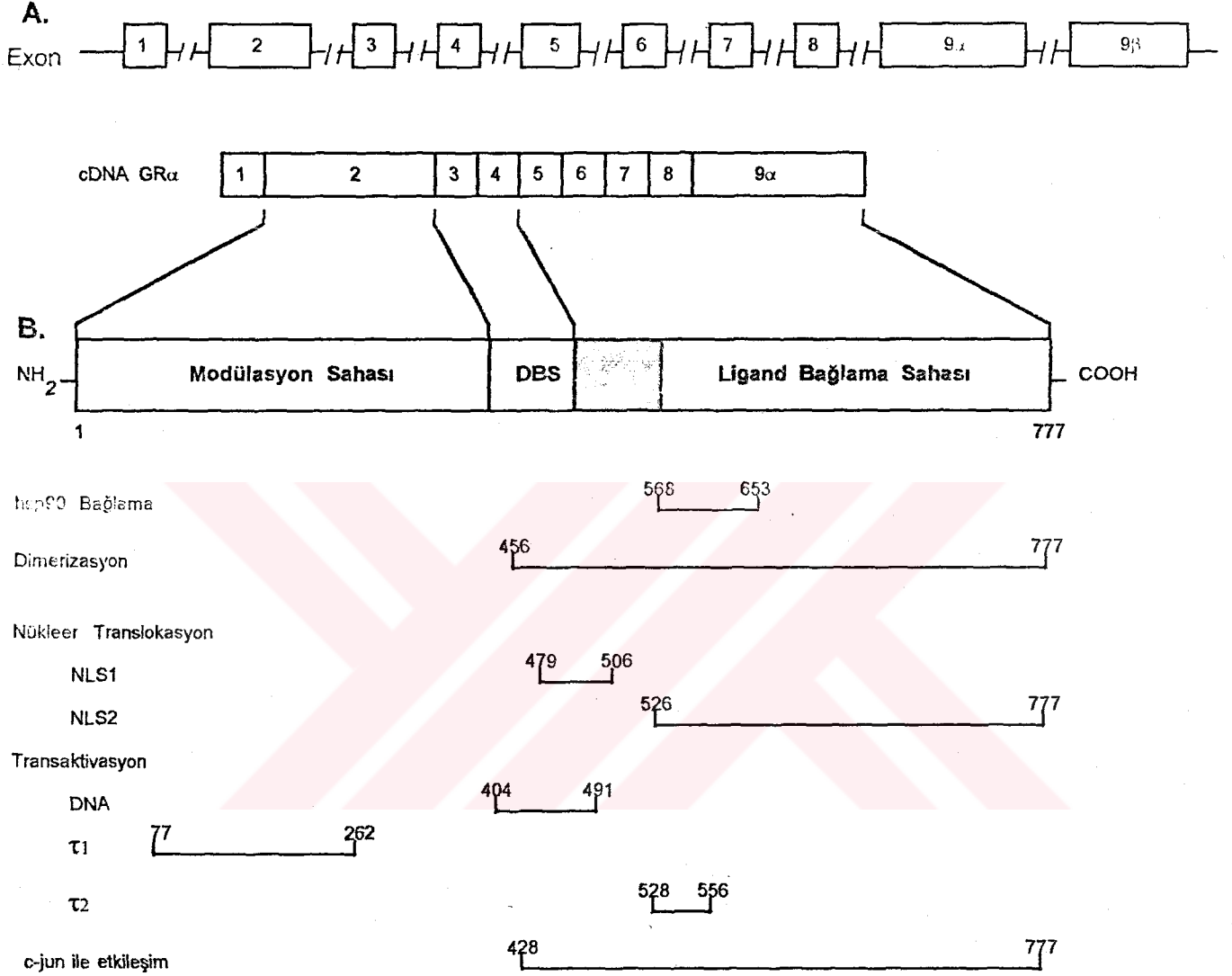
Glikokortikoidlerin hücredeki etkisi, ancak o hücrede mevcut olan GR'e bağlanmasından sonra hormon-reseptör kompleksinin nükleusa transportu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile gerçekleşebilir. Kolaylaştırılmış transport tarif edilmesine rağmen, glikokortikoidler büyük çoğunlukla pasif difüzyon vasıtasıyla hedef hücrelere girer. Spesifik reseptörlere glikokortikoidlerin bağlanması Michaelis-Menten kinetiğini takip eden bir denge reaksiyonudur.

Hormonun reseptöre bağlanması reseptörün fizikokimyasal özelliklerinde ve davranışlarında değişikliğe yol açar. Bu olay aktivasyon veya daha sıklıkla transformasyon diye adlandırılır. Sedimentasyon katsayısı 4S olan aktif reseptör, sedimentasyon katsayısı 8S olan aktif olmayan reseptörden daha ufaktır ve DNA'ya yüksek bir afiniteyle bağlanır. Sitozolik GR'nin fizikokimyasal analizi veya sodyum-dodeesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ( SDS-PAGE ) ile GR'ün yaklaşık 94 kDa'luk tek bir polipeptid parçasından meydana geldiği gösterilmiştir.

İnsan GR ( hGR )'ü 5'inci kromozomda lokalize olup, 10 farklı exondan oluşur. ( Şekil 3A ). Exon 1 kodlanmayan bölgedir. Exon 2-9 ise kodlanan bölgelerdir. Hollenberg ve arkadaşları hGR'nün iki formunu tespit etmişlerdir. Bunlar alternatif kesim (splicing) ile oluşan 777 amino asitlik  $\alpha$ -GR ve 742 amino asitlik  $\beta$ -GR'dür.  $\alpha$ -hGR birçok insan hücre serisinde tespit edilmiş önemli bir subtiptir.  $\beta$ -GR formu ise glikokortikoid bağlayamaz. Bu formun fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır (3, 42, 55, 105, 140).

Çeşitli proteolitik enzimler kullanılarak yapılan çalışmalarda GR'ün en azından üç fonksiyonel parçası gösterilmiştir. Merkezdeki bölge DNA'ya bağlanmadan, karboksil terminal uçtaki bölge ise hormonu bağlamadan sorumludur. Amino terminal uçtaki bölge ise modülasyon sahasıdır. DNA bağlama bölgesi ile hormon bağlama bölgesi arasında bir menteşe gibi görev yapan ve reseptörün uzaysal konfigürasyonu için kritik bir öneme sahip bir saha vardır. GR'ünün başka fonksiyonları da vardır. Bu fonksiyonların gerçekleştirilmesinden reseptörün belirli bölgeleri sorumludur ( Şekil 3B ).

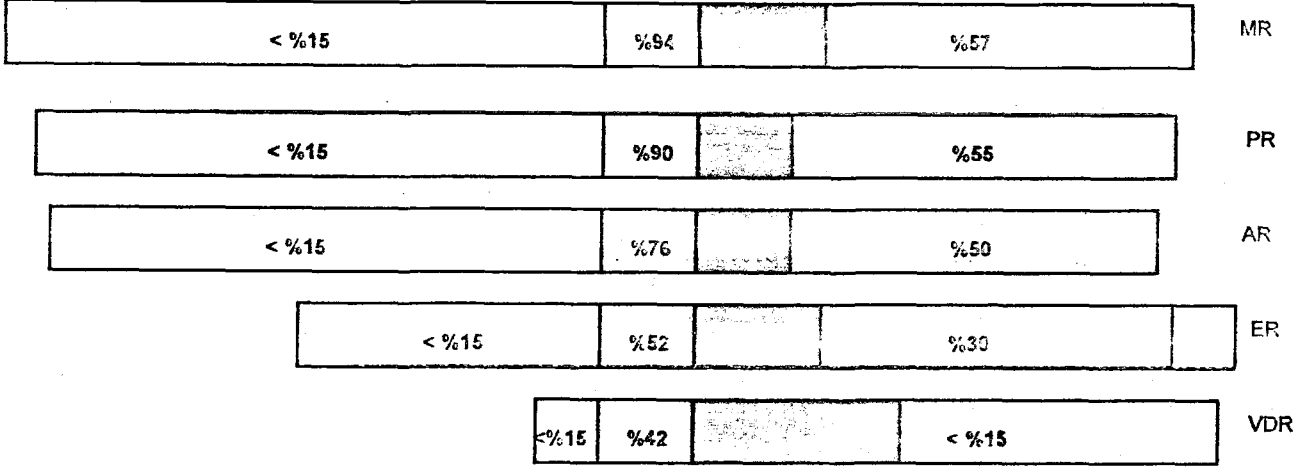
GR ile diğer SHR arasında yapısal benzerlikler vardır. Bundan dolayı steroid hormonlar farklı reseptörlere bağlanarak, kendine spesifik olmayan bir genin transkripsiyonunu uyarabilirler ( Şekil 3C ).



**Şekil 3A - 3B :** Glikokortikoid reseptörünün genomik ve komplementer DNA ( cDNA ) yapısı ( A ). GR'ü 10 farklı exondan oluşur. Exon 1 kodlanmayan bölgedir. Exon 2 modülasyon sahasını, exon 3 ve 4 DNA bağlama sahasını, exon 5-9 $\alpha$   $\alpha$ -GR için ligand bağlama sahasını kodlar. Exon 5-9 $\beta$  ise  $\beta$ -GR için ligand bağlama sahasını kodlar.

GR'ü üç fonksiyonel sahadan oluşur ( Modülasyon sahası, DNA bağlama sahası ve ligand bağlama sahası ) ( B ). Bu üç fonksiyonel sahanın ayrıca başka fonksiyonel görevleride vardır. Bu görevler: (a) hsp 90 proteinini bağlamak ; (b) GR'lerinin dimerizasyonu ; (c) Nükleer lokalizasyon (d) Transkripsiyonun aktivasyonu ; (e) c-jun proteini ile etkileşim (3).

C.



Şekil 3C : Glikokortikoid reseptörü ile yapısal benzerlik gösteren beş steroid hormon reseptörü ve yapısal benzerlik yüzdeleri. MR, mineralokortikoid reseptörü; PR, progesteron reseptörü; AR, androjen reseptörü; ER, östrojen reseptörü; VDR vitamin D3 reseptörü (3).

### 3- I ) Hormon Bağlama Sahası

Glikokortikoidler tarafından gen ekspresyonunun uyarılmasına yol açan olayların ilk aşaması, hedef hücrenin sitoplazmasındaki GR'üne hormonun bağlanmasıdır. Hormon bağlayan saha GR'ünün karboksil terminal ucundadır.

Çeşitli doku ve türlerde yaklaşık 94 kD'luk bir ağırlıkta olan GR'ü, 2-5 nM'lık bir afinite ( $K_d$ ) ile dekzametazona bağlanır. GR'ünün tripsin ile muamelesi, 14 kD'luk hormon bağlama sahasının (HBS) ortaya çıkmasına neden olur. Bir GR'ünün HBS'si tek bir hormon bağlayabilir.

GR cDNA'sı ile yapılan çalışmalar, HBS'nin karboksil terminal lokalizasyonunu doğrular. Fare lenfoma hücrelerinin glikokortikoidlerle muamelede ortadan kalkmayan bazı hormona dirençli varyantlarında, GR'ünün kendisinde bir defekt olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu mutantların çoğu, hormon bağlama aktivitesi olmayan ( $r^-$ ) reseptörlerdir (55, 105, 170).

### 3 - IA ) Sitoplazmik Multiprotein Kompleks

GR'ü hormon yokluğunda sitozolde bulunur, hormon bağlandıktan sonra ise nükleusa yönelir. Fakat bu durum trioid hormon reseptörü (THR) ve retinoik asit reseptörü (RAR) için gerekli değildir.

Ligand yokluğunda dahi THR ve RAR'ü zayıf olarak DNA' ya bağlanabilir. Diğer steroid hormonlarda bu durum söz konusu değildir .Bunun nedeni, ligand yokluğunda SHR'leri heat shock protein 90 (hsp 90) ile etkileşim gösterirken, THR ve RAR'leri heat shock (ısı şoku) proteinleri ile etkileşim göstermezler.

Ligand bağlamamış yani aktive olmamış GR'ün bir molekülü, hsp 90'nın bir dimerini bağlar ve 310 kDa'luk 9S kompleksi olarak sitozolde bulunur. Ligand bağlayıp aktive olan GR'ünün sedimentasyon katsayısı 3,2S ( 4S formu ) ve moleküler ağırlığı 90 kDa'dur. Böylece reseptör aktivasyonunun büyük bir multiprotein kompleksinin ayrılmasına bağlı olduğu görülür.

9S kompleksinin daha ayrıntılı analizi, 59 kDa'luk ilave bir proteinin ( p59 ) varlığını ortaya çıkarmıştır. p59'a karşı oluşturulan antikörlerle yapılan çalışmalar, bu proteinin direkt olarak hsp 90'a bağlandığını göstermiştir. Ligand bağlamamış reseptörlerde DNA bağlama sahası ( DBS ) DNA ile etkileşim göstermez. Çünkü bu bölge proteinin diğer sahalarıyla veya oligomerik protein kompleksinin diğer bölümleriyle gizlenir. DBS'ı, muhtemelen karboksil terminal bölgede bağlanma sahasının olduğu tespit edilen hsp 90 ile etkileşimdedir. Böylece hsp 90, bir yandan reseptörü inaktif halde tutarken diğer yandan p59 ile etkileşip reseptörün konformasyonel değişimini kolaylaştırır. Hatta reseptörün ligand için afinitesini arttırdığıda gösterilmiştir. Ligand bağlanması, hsp 90'nın ayrılmasına ve homodimerlerin oluşabilmesi HBS'nın konformasyonel değişimine yol açar. Homodimerler yüksek afiniteyle DNA'ya bağlanan ve dimerizasyonu indükleyen reseptörün fonksiyonel bir formudur.

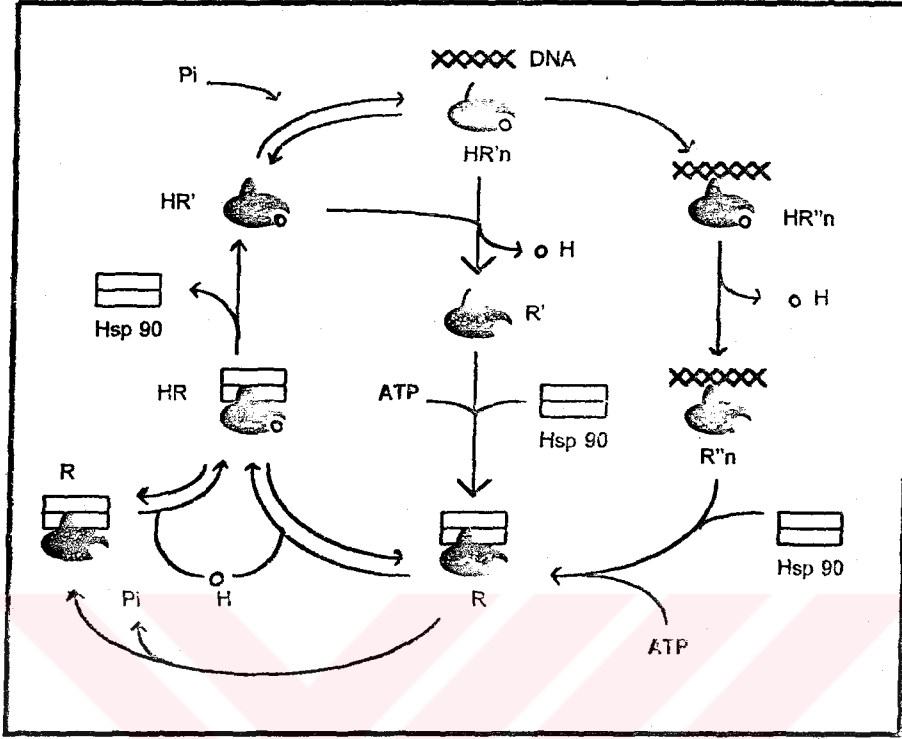
GR'üne hormonun bağlanması *in vitro* da 0°C'de gerçekleştiği halde, aktivasyon için 37°C'lik bir ısı ile yüksek tuz veya asidik pH gereklidir. Termal ( ısı ) aktivasyon için, reseptöre hormonun bağlanması gerekir. Isı aktivasyonu ile hsp 90'nın reseptörden ayrılması hormonun reseptörüne afinitesini 10 kez düşürür, hsp 90'nın reseptörle birleşmesi ise afiniteyi artırır (55, 105).

### **3- II ) Modülasyon ( Transaktivasyon ) Sahası**

Steroid ve DNA bağlama sahası reseptörün yaklaşık olarak yarısını kapsamaktadır. Reseptörün geriye kalan amino terminal sahası, modülasyon sahası olarak adlandırılmıştır.

SHR'ler fosfoproteinlerdir ve onların aktivasyonlarının kontrolünde fosforilasyon önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalarda 7 fosforilasyon sahası tespit edilmiş olup, bu sahaların amino terminal bölgede bulunurlar. Bu yedi bölgeden biri treonin, diğerleri ise serin rezidülerini içerir.

Fosforilasyon, hormon reseptör kompleksi aktive olduktan sonra başlar. Bundan dolayı aktive olmuş hormon reseptör kompleksi fosforilasyon için başlıca substrattır. Hormon-reseptör kompleksi DNA'ya bağlandıktan sonra da nükleusta fosforilasyon devam eder.



**Şekil 4** : Glikokortikoid reseptörünün fosforilasyon modeli ve ATP'ye bağlı döngüsü. H, hormon; R, ligand bağlamamış reseptör; HR, aktive olmamış hormon reseptör kompleksi; HR', aktive olmuş hormon reseptör kompleksi; R', ligand bağlamamış fakat aktive olmuş reseptör; HR'n, tuz muamelesi ile ayrılabilen nükleer hormon reseptör kompleksi; HR''n, tuz muamelesi ile ayrılamayan hormon reseptör kompleksi; R'', ligand bağlamamış nükleer hormon reseptör kompleksi; Pi, reseptörün fosforilasyonu ve defosforilasyonunu gösteren inorganik fosfat; Hsp 90, 90 kDa'luk ısı şoku proteini (15).

Aktive olmuş hormon reseptör kompleksinden hormonun ayrılmasıyla hormonsuz fakat aktive olmuş reseptör ancak ATP varlığında tekrar hsp90 ile etkileşime girerek hormon bağlayan forma dönüşebilir. Ayrıca DNA'dan ayrılan reseptörlerin tekrar hormon bağlayan forma dönüşebilmesi için de ATP gereklidir (Şekil 4).

Reseptörün fosforilasyonu ancak hormonun bağlanmasıyla gerçekleşebilse de, bazı durumlarda ortamda hormon olmasa dahi reseptör fosforilasyonunun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Örneğin; HBS'sı eksik mutand GR'ünün fosforile olabildiği gösterilmiştir. Bununla beraber, genellikle hormonun mevcudiyeti *invivo* da fosforilasyonu 2 yada 3 kat artırır.

Reseptörün fosforilasyonu çeşitli sinyalizasyon yolları ile gerçekleşir. Progesteron reseptörün cAMP'nin etkisiyle fosforile olduğu tespit edilmiştir. Bu tip fosforilasyon ligand bağlanmasından bağımsız gerçekleşebileceğinden dolayı, reseptör fosforilasyonu diğer sinyalizasyon yollarıyla da kontrol edilebilir.

GR'ü ile yapılan çalışmalarda, fosforilasyonun reseptörün hücre içi hareketini etkilediği gösterilmiştir. GR'ünün nükleusa hareketi, protein fosfataz 2A ve 1'i inhibe eden okadoik asit ile inhibe edildiğinde reseptör sitoplazmik bölgede kaldığı tespit edilmiştir.

Çeşitli türlerde modülasyon sahalarının bir çoğunun negatif yük taşımaları nedeniyle asidik karakterde oldukları tespit edilmiştir. Reseptörün transkripsiyonu aktive eden bu bölgesi içindeki negatif yük, amino asit rezidülerinin fosforilasyonu ile artabilir (15, 81, 157).

### 3- III ) DNA Bağlama Sahası

DNA bağlama sahası ( DBS) steroid reseptör ailesi içinde ve farklı türler arasında yüksek oranda korunmuş olup , GR'in merkezi bölgesinde lokalize olmuştur.

DBS'sındaki dört sisteinin bir çinko atomuyla yaptığı koordinasyon sonucu oluşan "zinc finger" denen parmak uçlar, DNA'ya bağlanmayı sağlar. Her DBS'sında bu "zinc finger" lardan iki tane olup, her biri farklı iki exon ( exon 2 ve 3 ) tarafından kodlanır.

İki "zinc finger" arasında lokalize olmuş  $\alpha$ -heliks yapı DNA'nın büyük oluğunu (major groove) tanımakla görevlidir. Bu "zinc finger" lardan bir tanesi ikinci bir GR monomerini tanıyıp onunla dimerizasyon oluşumundan da sorumludur.

GR'ün ve diğer steroid hormon reseptörlerinin DNA'da spesifik olarak bağlandıkları bölgeye "Hormon Respons Element = HRE " yani hormon yanıt bölgesi denir (105, 116, 132).

### 3-III A ) Glikokortikoid Respons Element ( GRE )

Yanıt bölgesinin nükleotid dizisi belirli bir genin belirli bir reseptör tarafından regüle edilip edilemeyeceğinin tayininde son derece önemlidir. HRE'ler genellikle transkripsiyon başlama bölgesinin üst kısmında bulunup, iki kısa ( 5-6 baz çiftlik ) diziden oluşurlar. İki yarım bölge arasındaki uzunluk reseptör tarafından tanınmanın spesifikliğini belirler. GRE için bu uzunluk 3 nükleotid, TRE (tiroid hormon respons element) için dört nükleotid ve RAR/RXR için ise beş nükleotiddir (Tablo 1). HRE'ler RARE ( retinoik asit respons element) hariç polindromik ( çift yönlü simetri gösteren ) dizilerden oluşmuşlardır.

Yapılan çalışmalarda, birbirine benzer yapıdaki HRE'lerin farklı reseptörler tarafından aktive edilebildiği gösterilmiştir. Örneğin, hem GR hem de PR'ü birbirlerinin yanıt bölgelerine bağlanabilmektedir. Her iki bağlanma da fonksiyoneldir, fakat kendi ligandının bağlanmasından daha az fonksiyoneldir.

GRE *promotorun* üst kısmında veya poliadenilat bölgesinin alt kısmında yerleşmiştir. GRE bir *promotor* aktivitesi göstermez. *Promotordan* bağımsız olarak, *promotorun* birkaç kilobaz yukarısında transkripsiyonu artırıcı bir etki gösterir. GRE'in bir *enhancer* element özelliği vardır ve aktivitesi tamamen glikokortikoide bağlıdır. GRE, GR içermeyen hücrelerde fonksiyonel değildir. Bundan dolayı, GRE'in fonksiyonu için gereken faktör veya faktörlerden en az biri GR'dür.

Reseptörün DNA'da bağlandığı bölgenin dizi spesifikliğinin en azından bir kısmını, *P-box* diye adlandırılan ve reseptörün amino terminal ucun sonundaki beş amino asitlik kısa bir element içindeki üç amino asit tayin eder. Steroid hormon reseptörleri için 7 farklı *P-box* tespit edilmiştir. Karboksil terminal ucun amino terminal sonunda bulunan *D-box* diye adlandırılan diğer kısa element ise HRE'i tanınmasının spesifikliği için önemlidir ve özellikle iki yarım bölge arasındaki bölgeyi tespit eder. Ayrıca *D-box* reseptör monomerleri arasındaki protein-protein ilişkisinde katılır. Bundan dolayı DBS'sının bir dimerizasyon sinyali de içerdiği görülür.

**Tablo 1 : Reseptör-DNA etkileşiminin spesifikliğini sağlayan özellikler**

RESEPTÖR	RESEPTÖRÜN YAPISAL ÖZELLİĞİ		HRE DİZİLERİ	
	P-box	D-box	Direkt Tekrar	Ters Tekrar
"GR subfamily"				
GR, PR, MR	GSCKV	AGRND		AGAACA(n3)TGTTGT
AR	GSCKV	ASRND		
"ER/TR subfamily"				
ER	EGCKA	PATNQ		AGGTCA(n3)TGACCT
TR $\alpha$	EGCKG	KYDSC	AGGTCA(n3)AGGTCA	AGGTCATGACCT
TR $\beta$	EGCKG	KYEGK	AGGTCA(n4)AGGTCA	AGGTCATGACCT
RAR $\alpha$ , RAR $\beta$	EGCKG	HRDKN	AGGTCA(n5)AGGTCA	
VD3R	EGCKG	PFNGD	AGGTCA(n3)AGGTCA	
RNR	EGCKG	RDNKD	AGGTCA(n)AGGTCA	
v-erbA	EGCKG	TYDGC		

Bir reseptör monomerinin HRE'e bağlanması, iki reseptör monomer arasındaki dimerizasyon etkileşimini kolaylaştırır. Ayrıca bir reseptör monomer DBS'sının HRE'in yarım bölgesine bağlanması, diğer yarım bölgeye ikinci bir reseptörün DBS'sının bağlanma afinitesini artırır.

Reseptör mutasyon analizleri, HRE'le ilişkili *promotörlerde* transkripsiyonun başlamasını aktive eden reseptördeki iki sahanın mevcudiyetini göstermiştir. Bunlar amino terminal bölgedeki TAF1 ( Transcription Activation Function ) ile HBS'sının karboksil terminal bölgesindeki TAF2' sahasıdır ( **Tablo 2** ).  $\tau 1$  ve  $\tau 2$  diye adlandırılan iki asidik segment transkripsiyon için gereklidir ( **Şekil 3B** ). Her iki saha da tek başlarına transkripsiyonu aktive etselerde, ikisinin birarada hareketi transkripsiyonu daha fazla aktive eder.

**Tablo 2** : Transaktivasyon sahaları

	TAF-1 ( $\tau 1$ )	TAF-2 ( $\tau 2$ )
Aktivasyon	Hormondan bağımsız	Hormona bağımlı
	Hücre ve <i>promotora</i> bağımlı	Agonistlerle aktive edilebilir
		Antagonistlerle inhibe edilebilir
		Hücre ve <i>promotora</i> bağımlı

Steroid reseptörler sadece aynı kategoriden reseptörlerle değil, farklı kategoriden reseptörler ve transkripsiyon faktörleri ile de etkileşime girebilirler. Bazı reseptörlerin ( Örneğin ; TR, RAR, VDR ) HRE'lere bağlanması, hücreye spesifik olarak sentez edilen yardımcı faktörlere bağlıdır. Örneğin ligand bağlamamış RAR'ü RAR'ünün yardımcı faktörü olarak etki eder. Diğer reseptörler için de benzer yardımcı faktörlerin varlığı muhtemeldir.

Reseptörün GRE'e bağlanmasıyla transkripsiyonel aktivitenin başlaması, kromatin yapısındaki değişikliklerle gerçekleşebilir. Nükleozomda yerleşmiş bulunan HRE'e reseptörün bağlanması ve reseptörün TAF bölgesinin çeşitli transkripsiyon faktörlerle ilişki kurması, nükleozomun değişikliğe uğrayarak açılmasına neden olur. Böylece inisiyasyon kompleksinin transkripsiyon başlama bölgesine yerleşmesi mümkün olur. HRE transkripsiyon başlama bölgesinden uzaktaki bir nükleozomda bulunuyorsa, inisiyasyonun başlaması için bazı ara transkripsiyon faktörler (TIF=Transcription Intermediary Factor) devreye girer. Bir reseptör ancak TATA box'ın kısa bir aralıkla yukarısına yerleşmiş bulunan HRE bağladığında gen ekspresyonunu uyarabilir. Eğer HRE TATA box'tan uzaktaysa gen ekspresyonu gerçekleşemez (69, 95, 137).



### 3-IV) Dimerizasyon

Nükleer reseptörler genel olarak homodimer ( iki aynı tip proteinin etkileşmesi ) olarak yanıt bölgeleriyle etkileşirler. Yapılan çalışmalar dimerizasyon için proteinler arasındaki etkileşimin gerekliliğini göstermiştir. Amino asit dizilerinin ilişkisi "*heptad repeats* = yedilik tekrarlar " veya "*lösin zipper motifs* = lösin fermuar motifleri " ile açıklanmıştır.

İki farklı reseptör arasında da heterodimer formu gerçekleşebilir. Heterodimer oluşumu glikokortikoid reseptörlerden başka progesteron ve östrojen reseptörleri içinde gösterilmiştir. Heterodimer oluşumu sadece reseptör proteinler arasında gerçekleşmeyip, iki protoonkogen protein ( c-jun ve c-fos ) arasında da gerçekleşebilir. Örneğin; c-jun proteini direkt olarak DNA'ya bağlanırken, c-fos proteini "*lösin zipper motif* " yoluyla c-jun'a bağlanır. Bu heterodimer formu gerçekleştiği zaman, heterodimer formu DNA'daki AP-1 bölgesine bağlanıp komşu genin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Glikokortikoidlerin etki mekanizmalarından biri de c-jun ile heterodimer formu oluşturup, bu onkogen proteinin etkisinin inhibisyonudur ( **Şekil 5C**).

GR'ü solüsyonda homodimer formu oluşturabilse de, bu yapı stabil değildir ve GR'ü bir monomer olarak GRE polindromunun yarım bölgesine bağlanır. Bununla beraber optimal bağlanma homodimerizasyon formuyla tamamlanır ( **Şekil 5A**) (55, 69, 157).

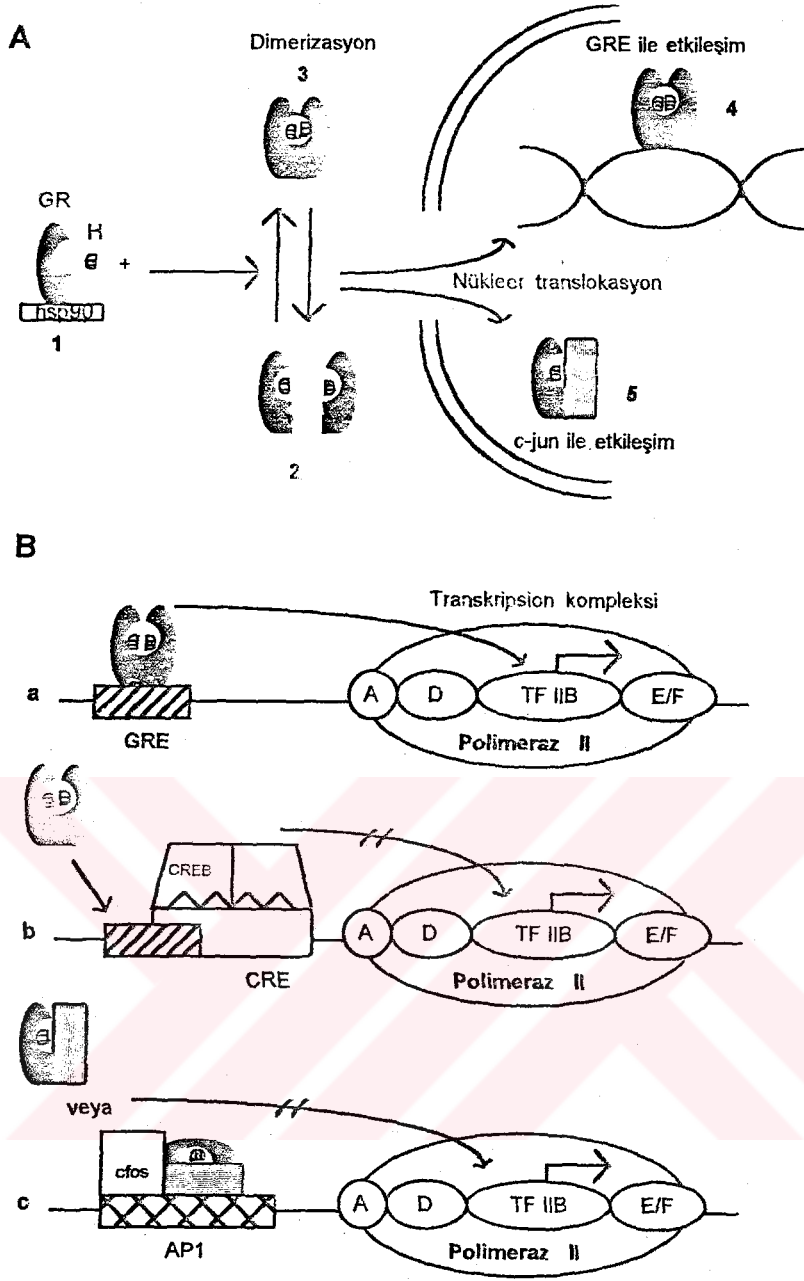
### 3-V) Gen Transkripsiyonuna Etkisi

GRE'e bağlanan GR'ü üç muhtemel yolla genomik transkripsiyonunu etkiler (1, 3, 121).

a) Pozitif olarak transkribe edilen genlerde, GR'ü homodimer formunda glikokortikoid tarafından transkribe edilecek genin *promotor* bölgesindeki veya *enhancer* bölgesindeki GRE'e bağlanır. Böylece ligand bağlanmış GR dimeri polimeraz II inisiyasyon kompleksini stabilize eder. Bu stabilizasyon olayını muhtemelen transkripsiyonun hız belirleyici faktörü olan transkripsiyon faktör IIB (TFIIB)'ye bağlanarak gerçekleştirir ( **Şekil 5Ba**).

b) Glikokortikoidlerce negatif olarak regüle edilen genlerde ise, GR dimerleri diğer transkripsiyon faktörlerin yanıt bölgelerinin bir kısmı ile etkileşime girer. Böylece onların etkilerinin ortaya çıkışını engelleyerek transkripsiyonu durdurur ( **Şekil 5Bb**).

c) Üçüncü yol glikokortikoidlerin büyümeyi durdurucu (*antigrowth*) ve antiinflamatuvar etkisinin ortaya çıktığı yoldur. Glikokortikoid bağlanmış reseptör monomeri c-jun proteinine bağlanarak apolipoprotein-1 ( AP-1) transkripsiyon faktörü ( c-fos-c-jun heterodimeri )'nün hücre içinde kompleks oluşmasını önler. Böylece bu transkripsiyon faktörünün DNA'da AP-1 bölgesindeki yanıt bölgesine bağlanması engellenerek, AP-1 transkripsiyon faktörünün büyümeyi artırıcı etkisi önlenir ( **Şekil 5Bc**).



**Şekil 5 :** Glikokortikoidlerin GR'ler yoluyla moleküler etki mekanizmaları. **(A)** Ligand bağlanmamış reseptör sitoplazmada heterodimer yapısında ( hsp 90 proteinine bağlı ) bulunur (1). GR'lere hormon (H) bağladığında, GR'ler monomer (2) veya dimer (3) yapısında nükleer porlar vasıtasıyla nükleusa geçerler. Nükleusa geçen GR'ler ya GRE'lere (4) yada c-jun gibi transkripsiyon faktörlere (5) bağlanırlar. **(B)** Glikokortikoidlerce pozitif olarak kontrol edilen genlerde, GRE'e bağlanan GR dimeri gen transkripsiyonunu uyarır (a). Glikokortikoidlerce negatif olarak kontrol edilen genlerde ise GR dimeri diğer transkripsiyon faktörlerin DNA'daki yanıt bölgelerine bağlanmalarını önleyerek gen transkripsiyonunu engeller (b). GR monomeri bazı durumlarda c-jun gibi transkripsiyon faktörlerle etkileşerek, bu faktörlerin transkripsiyonu başlatmasını önler (c) (3).

### 3-VI) İkincil Haberciler

GR ile GRE'nin etkileşimi glikokortikoid hormon etkisinin ilk aşamasını oluşturur. Bununla beraber, glikokortikoidlerin önemli biyolojik etkilerinin bazıları ikincil haberciler vasıtasıyla gerçekleşir.

İkincil habercilerin en önemli sınıfı fosfolipaz-inhibitör protein ailesinden lipokortinlerdir. Lipokortin glikokortikoidlerce gen düzeyinde regüle edilen bir fosfoproteindir. Lipokortin fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi inhibe ederek lipid depolarından araşidonik asit salınımını inhibe eder. Araşidonik asit prostaglandinlerin, tromboksanların ve lökotrienlerin sentezi için hız sınırlayıcı bir molekül olduğundan, lipokortin biyolojik olarak çok aktif maddelerin sentezinde önemli bir rol oynar. Bu yüzden lipokortin sentezinin glikokortikoidler tarafından uyarılması, glikokortikoidlerin antiinflamatuvar etkilerinin önemli bir aşamasıdır. Lipokortinin direkt antiinflamatuvar etkiside vardır. Ayrıca lipokortinin, Fc reseptörlerinin glikolizasyonunda ve *natural killer* hücre fonksiyonunda rol oynadığıda gösterilmiştir.

Araşidonik asit, prostaglandinler ve lökotrienler, transepiteryal Cl<sup>-</sup> transportu ve mukus sekresyonunda önemli etkilere sahiptirler. Bu fonksiyonlardan her ikiside kistik fibrozda bozuktur. Kistik fibroz hastalarının lenfosit ve fibroblastlarındaki araşidonik asit salınımının bozuk olduğu fakat GR miktarının ve afinitesinin normal olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden kistik fibrozda glikokortikoidler tarafından araşidonik asit salınım bozukluğunun sebebi ancak lipokortin veya fosfolipaz proteindeki bozukluktan kaynaklanabilir (22, 55).

### 3-VII) GR Regülasyon Mekanizması

Bir hücrede GR bulunması glikokortikoidlere yanıt için ilk şarttır, fakat hormonal yanıtın garantisi değildir. Hücrel farklılıklar, reseptör afinitesindeki değişiklikler, reseptörü modifiye eden faktörler ve reseptör konsantrasyonundaki farklılıklar glikokortikoidlere yanıtındaki farklılığın sebebidir.

Ligand vasıtasıyla reseptör konsantrasyonunun otoregülasyonu, peptit, steroid ve nörotransmitter reseptörlerinin çoğu için bildirilmiştir. Glikokortikoid miktarındaki artış GR'lerin *down-regülasyonla* (reseptör konsantrasyonunu azaltan hücrel bir mekanizma) azalmasına, glikokortikoid miktarının azalması GR konsantrasyonunun *up-regülasyonla* (reseptör konsantrasyonunu arttıran hücrel bir mekanizma) artmasına sebep olur. Bu etki 4-5 gün sonra normale döner. GR'lerinin otoregülasyonu bir çok hücre serisinde, canlı deney hayvanlarında ve sağlıklı insanlarda gösterilmiştir.

Sadece glikokortikoid agonistleri GR sayısını değiştirebilir; östrojenler, progestinler, androjenler ve mineralokortikoidler GR regülasyonunda etkisizdir. GR'lerin *down-regülasyonu* hormon konsantrasyonuna bağlıdır. Bu etki reseptörün ligand bağlama afinitesine benzer bir konsantrasyonda meydana gelir (yaklaşık 3nM). Glikokortikoidlerin saturasyon

konsantrasyonu, kalan GR moleküllerinin ligand bağlama afinitesini etkilemeksizin GR sayısında %50-75 azalmaya sebep olur. Glikokortikoidlerle muamele ( kısa veya uzun müddet ) hiçbir zaman reseptörlerin tamamını ortadan kaldırmaz. Reseptörlerin yaklaşık %20-40'ı *down-regülasyona* rezistandır. Bu reseptörler incelendiğinde, reseptörlerin yapısal özelliklerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Muhtemel bir açıklama, *down-regülasyona* rezistan reseptörlerin DNA'ya bağlı kalarak stabil durumda bulunan reseptörler olabileceğidir.

Otoregülasyon *cycloheximide* gibi protein sentez inhibitörünün mevcudiyetinde de gerçekleşebildiğinden dolayı, protein sentezine bağlı değildir. *Down-regülasyon* genellikle yavaştır ve glikokortikoidlerle muameleden en az 24 saat sonra başlar. Glikokortikoidlerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla, GR'lerinin normal seviyeye ulaşması protein sentezine bağlı olduğundan genellikle yavaş meydana gelir.

Reseptör otheregülasyonu, mRNA'sı seviyesinde de gerçekleşebilir. Sıçanlarla yapılan deneylerde, dekzametazon muamelesinden 18-48 saat sonra GRmRNA'sının %50-80 oranında azaldığı, 72 saat sonra ise GRmRNA'sının normal seviyeye geldiği tespit edilmiştir.. İnsan fibroblast hGRmRNA'sında da benzer sonuçlar alınmıştır.

Reseptör *down-regülasyonu* protein sentezinin azaltılmasıyla alakalı olmayıp, glikokortikoidlerin kendi GR genleriyle yaptıkları etkileşimin bir sonucu ortaya çıkan posttranskripsiyonel bir regülasyondur.

GR sayısındaki değişiklikler sadece glikokortikoidlere bağlı değildir. Hücrenin enerji metabolizmasındaki değişiklikler de GR sayısını değiştirebilir. Hücredeki ATP düzeyi, reseptörün hormon bağlama kapasini düzenler ve reseptörün steroid-bağlamayan formdan steroid-bağlayan forma dönüşümünü sağlar. Bu yüzden GR'üne glikokortikoidlerin bağlanması direkt olarak ATP seviyesiyle ilişkilidir. Enerji kısıtlayıcı koşullarda reseptörün steroid-bağlamayan formunun biriktiği tespit edilmiştir. Reseptördeki bu değişiklik geriye dönüşümlü ve hızlıdır (dakika-saat).

Hücrenel GR konsantrasyonunun regülasyonunda cAMP'nin de rolü vardır. Hücrenel cAMP miktarını arttıran ajanlar, hem GR'e [<sup>3</sup>H]-dekzametazon bağlanmasını hem de GRmRNA miktarını 2-3 kat arttırmaktadır. Diğer taraftan cGMP artışı glikokortikoid bağlanmasını inhibe eder. Bu yüzden cAMP'nin cGMP'ye oranı hem reseptör konsantrasyonunda hem de reseptör aktivitesinde önemli bir rol oynar. cAMP'nin, cAMP protein kinazın aktive ederek GR'ünü fosforile ettiği ve bunun sonucunda GR'ünün hormon bağlayan formunun arttığı tespit edilmiştir. Diğer yandan cAMP, GRmRNA'sının yarılanma ömrünü uzatarak GRmRNA miktarını arttırmaktadır.

GR konsantrasyonunun hücre siklusuyla de değiştiği ve S fazındaki hücrelerin G<sub>1</sub> ve G<sub>0</sub> fazındaki hücrelerden 1.5 ile 3 kat daha fazla GR konsantrasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hücre yüzey modülatörleri de (Konkavalin A) reseptör sayısını etkileyebilir.

Hücre kültür yaşı da reseptör sayısını etkiler. Fazla pasaj yapılmış hücrelerin, az pasaj yapılmış hücrelerden yaklaşık %70 oranında daha az reseptör içerdikleri tespit edilmiştir.

GR'lerinin proteolitik bir reaksiyona maruz kaldıkları bilinir. Reseptörü bölebilen enzimler kalsiyuma bağlı çalışan enzimlerdir. Bu enzimatik reaksiyonları, reseptör regülasyon mekanizmasına dahil eden herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (15, 38, 55, 66, 150).

### 3-VIII) Glikokortikoid Rezistansı ( Direnci )

Glikokortikoid rezistansının klinik görüntüsü, asemptomatikten mineralokortikoid ve/veya adrenal androjen fazlalığına kadar çeşitlilik gösterir ( Tablo 3 ).

**Tablo 3 : Glikokortikoid Rezistansının Patofizyolojisi**

---

A- Normal Glikokortikoid Fonksiyonu

Asemptomatik

Kronik yorgunluk ( glikokortikoid eksikliği ? )

B- Mineralokortikoid Fazlalık

Hipertansiyon

Hipokalemik alkaloz

C- Androjen Fazlalığı

Kadında maskülinizasyon: Akne, kıllanma, menstürel düzensizlik

(oligoamenore), oligoovülasyon, infertilite

Erken puberte

Spermatogenezde anormallik

---

Glikokortikoid rezistansının klinik belirtisi hastaların büyük bir çoğunluğunda ortaya çıkmaz. Bazı hastalarda ise belirli dokularda ortaya çıkan glikokortikoid rezistansın kompanseasyonunun gerçekleştirilememesinden kaynaklanan kronik yorgunluk belirtileri ortaya çıkabilir.

Kortizolün mineralokortikoid aktivitesi az olmasına rağmen, bazı hastalarda deoksikortikosteron ve kortikosteronun miktarının artması hipertansiyona, daha ciddi hastalarda hipokalemik alkaloz gibi mineralokortikoid fazlalığı bulgularına sebep olabilir.

Adrenal androjenlerin artan seviyeleri oligoamenore, oligoovülasyon ve infertil kadınlarda erkeksi özellikleri kapsayan androjen fazlalığı bulgularına sebep olur. Ayrıca folükül stimulan hormonun ( FSH ) feedback regülasyonu ile adrenal androjenlerin karışması, erkeklerde anormal spermatogenezise ve erken püberteye neden olur.

Glikokortikoid rezistansı otozomal dominant bir geçiş gösterir. Semptomatik hastaların klinik bulguları aynı aile içinde bile farklılık gösterebilir. Bu durumun iki muhtemel açıklaması vardır. İki, mineralokortikoid ve androjen ürünlerinin çeşitliliği, ilincisi ise mineralokortikoidlere ve androjenlere hedef dokularının hassasiyetindeki farklılıktır. Bu yüzden benzer steroid artışlarında bile aynı klinik belirtiler görülmeyebilir.

Glikokortikoid rezistansında periferal dokuların ve HHA sistemin glikokortikoidlere hassasiyeti azalmıştır. Kortizol HHA sistemdeki CRH ve ACTH sentezini baskılamaz. Bu yüzden adrenal bezden normalden daha fazla kortizol, adrenal androjen ve mineralokortikoid yapılır. Periferal dokular gibi hipofiz ve hipotalamusta aynı derecede glikokortikoidlere dirençlidir, fakat glikokortikoid fazlalığı bulgusu yoktur.

Glikokortikoid rezistansına fonksiyonel olarak anormal GR'ler sebep olur. GR'lerindeki fonksiyonel değişiklikler; afinitelerinin azalması, sayılarının azalması, DNA'ya bağlanmalarının azalması ve termobilitedir. Hiçbir deney sistemi bu bozuklukların tümünü ortaya çıkaramaz. [<sup>3</sup>H]-Deksametazon bağlama deneyi genellikle en çok kullanılan deney sistemidir.

Glikokortikoid rezistansının moleküler mekanizmasını aydınlatmaya çalışan birkaç çalışma vardır. Glikokortikoid rezistanslı bir ailede yapılan bir çalışmada, reseptörün steroide bağlanma afinitesini değiştiren bir nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Ligand bağlama sahasında olan bu nokta mutasyon, reseptörün 641'inci pozisyonunda asidik bir amino asit olan aspartatı hidrofobik bir amino asit olan valine dönüştürür. Bu mutasyon ligand bağlama fonksiyonunu etkilediğinden, reseptörün ligand bağlanma afinitesi değişir.

Glikokortikoid rezistanslı başka bir ailede ise GR konsantrasyonu % 50 azalmış fakat reseptör afinitesi değişmemiştir. Yapılan çalışmada exon 6 ile intron 6'nın 3' sınırında 4 baz çiftlik heterozigot bir delesyon tespit edilmiştir. Bu mutasyon GR mRNA yapımının azalmasına veya onun daha hızlı yıkımına yol açarak GR konsantrasyonunu düşürmektedir.

Çalışılan diğer bir ailede ise cDNA'nın 2317 pozisyonundaki bir nokta mutasyonun adenini guanine dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Ligand bağlama sahasındaki bu mutasyon, GR'ün fonksiyonel yeteneğini ve afinitesini azalmaktadır (3, 26,94 ).

### 3-IX) İnsan Glikokortikoid Reseptörlerinin Önemi

Tıpta GR'lerinin önemi, hematopoitik kanserlerde hormonal hassasiyetin ortaya çıkmasıyla anlaşılmıştır. Akut lenfoblastik lösemi ( ALL ) için bir model sistem olan insan lösemik hücre serisi CEM C7 hücreleri glikokortikoid rezistansının mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılmıştır. Bu hücrelerle yapılan çeşitli çalışmalar glikokortikoid rezistansının sebebini tam olarak açıklayamadığından (156), klinik çalışmalar çeşitli hastalıklarda GR miktarının tespitinde odaklanmıştır (91).

GR'lerinin varlığı tedaviye yanıtta çok önemli olmasına rağmen tek başına steroide hassasiyeti klinik açıdan ortaya çıkaramaz. Bu yüzden bu konuda yapılan ilk çalışmalarda, GR sayısı ile glikokortikoidlere klinik hassasiyet arasında tam bir ilişki ortaya çıkarılamamıştır (31)

ALL'li bazı hastaların steroid tedavisine dirençli olduğu veya tedavinin devamı sırasında yanıtın kesildiği iyi bilinir. İnsan lenfoblastları ile yapılan çalışmalar, düşük GR seviyesinin glikokortikoid dirençli ile ilişkili olduğunu ve GR miktarındaki azalmanın glikokortikoid dirençine yol açtığını ortaya çıkarmıştır. *In vivo* steroide hassasiyette, ALL'deki GR seviyesinin yaş ve immünolojik kriterlerle korelasyonuna göre hastaların seçimi son derece önemlidir ve ALL'nin spesifik subgrupları içinde yüksek reseptör miktarı hastanın remisyona girmesi ile ilişkilidir. Bundan dolayı GR'nün mevcudiyeti lösemik hücrelerin biyokimyasal farklılaşmasının derecesi için bir belirleyici olabilir (28, 90). Teşhis ve relaps arasında GR miktarındaki azalma steroide rezistans ile ilişkili olmasına rağmen diğer mekanizma veya mekanizmalarda ALL'deki steroid rezistansından sorumlu olabilir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, bazı lösemik hastalarda tespit edilen anormal reseptörlerden endojen enzimlerin sorumlu olabileceği ve bundan dolayı bu hastaların tedaviye yanıtızlığının reseptörlerin yapısal defektinden dolayı olmadığı ortaya çıkarılmıştır (62). Ayrıca diferansiyasyon kromatinin yapısal değişikliğine ve GR ile nonhiston / DNA birleşme bölgelerinin değişmesine neden olabileceğinden, hormon rezistansının gelişmesinde bu değişikliklerin de rolü olabilir (55).

ALL'lerin dışında diğer lösemi tiplerinde GR seviyesi ile glikokortikoidlere klinik yanıt arasında tam bir ilişki ortaya çıkarılamamıştır (32). Böyle bir korelasyon sadece ALL (61, 76) ve non-Hodgkin lenfoma (12) için gösterilmiştir.

Astımlı hastaların glikokortikoid tedavisine zayıf yanıt vermelerinin anormal GR'lerinden ve glikokortikoid klirensinin artmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (75).

Miyestanya gravisli hastaların mononükleer hücrelerinde ( 17 ) ve romatoid artritli (RA) hastaların (134) fibroblastlarında, GR afinitesi normal fakat GR miktarında azalma tespit edilmiştir. Bunun sebebinin kortizol sentezinin bozulması sonucu kortizol miktarının artmasından dolayı olabileceği söylenmiştir. Tezat olarak, Murakami ve arkadaşları (107) RA ve Sjögrens sendromu gibi bağ dokusunu tutan hastalıklarda, lenfosit GR sayı ve afinitesinde bir değişiklik tespit edememişlerdir. Schlichte ve Sherman, mental depresyon durumlarında tarif edilen

kortizol fazlalığının lenfosit GR miktarını değiştirmemesi, depresif hastalardaki hiperkortizolemi durumunun periferel glikokortikoid rezistansının bir durumunu yansıtabileceğini gösterir (136).

Nefrotik glomerulonefritli hastalarda yapılan çalışmalarda, bu hastaların glukokortikoid tedavisine yanıt vermeyen bir subgrubu tespit edilmiştir. Açık açılı glokom hastalarının glikokortikoidlere aşırı hassas olduğu bildirilmiştir, fakat bu aşırı hassasiyet sebebinin GR anormalliğinden kaynaklandığına dair herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (55).

Damak yarığının diferansiyasyon surecinde reseptore bağlı glikokortikoid induksiyonu gösterilmiştir. Embriyonik damak hücrelerinde immunokimyasal teknikler kullanılarak GR'lerinin varlığı gösterildiğinden, glikokortikoidlerin insan sekonder damak gelişiminde etkisinin olabileceği söylenmiştir (55).

Glikokortikoidler akciğer maturasyonunu hızlandırdığından prenatal terapide sıklıkla kullanılır (118). Fetal doku ekstrasyonlarında, akciğerlerde yüksek konsantrasyonda GR'lerin bulunduğu bildirilmiştir (5). GR'lerin neonatların akciğerlerinde de bulunduğu fakat hiyalin membran hastalıklı veya idiyopatik respiratuar distress sendromlu prematrlerin akciğerlerinde bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu yüzden GR yokluğunun hiyalin membran hastalıklarının bir sebebinin oluşturabileceği bildirilmiştir (77). Ayrıca Heller ve arkadaşları insan plasentasının sitozolünde, insan orjinali diğer dokularla kıyaslandığında benzer fizikokimyasal özelliklere sahip GR'lerin mevcudiyetini göstermişlerdir (59).

Glikokortikoidler immünolojik ve enflamatuar akciğer hastalıklarının büyük bir çoğunluğunda tedavi amacıyla kullanılır (116). Bronkoalveolar lavaj sıvısındaki MNH'lerin kandaki MNH'ler ile benzer fenotipik özellikler taşıdıkları gösterilmiştir (25, 45 ). GR miktarı özellikle sarkoidoz ve idiyopatik pulmoner fibrozis hastalarının tedavisinde önem taşır. Sarkoidoz hastalarının genellikle daha fazla oranda glikokortikoidlere yanıt vermelerinin GR sayısındaki fazlalıktan kaynaklandığı bildirilmiştir (2, 138). Glikokortikoidlere yanıt veren hastaların yanıt vermeyenlere göre daha fazla GR'lere sahip oldukları gösterilmiştir (82, 117).

#### **4- Glikoz Transportu**

Glikoz metabolizmanın önemli bir maddesidir. Barsaktan emilen veya karaciğerde yapılan glikoz, hücre membranında yerleşmiş bulunan spesifik glikoz taşıyıcı proteinler (glikoz transport protein) vasıtasıyla kandan vücudun tüm hücrelerine taşınır (89).

Çoğu hücreler glikozu pasif kolaylaştırılmış difüzyonla hücre içine alırken, böbrek ve ince barsak gibi dokular sodyuma bağlı aktif transport sistemiyle glikozu hücre içine alır (40).

Glikoz transport proteinler tarafından glikozun hücre içine alınması dört aşamada gerçekleşir. (a) Ekstrasellüler ortamdaki glikozun glikoz transport proteinine bağlanması. (b) glikoz transport protein-glikoz kompleksinin konformasyonel değişimi. (c) Glikozun hücre içine bırakılması. (d) Transport proteinin başlangıç şekline dönmesi.



Gerek aktif gerekse pasif transport sistemiyle glikozu hücre içine taşıyan glikoz transport proteinler geniş bir transport protein ailesinden gelir.

#### 4-I) Glikoz Transport Proteinleri

Herbir doku kendi glikoz gereksinimine göre farklı glikoz transport proteinine sahiptir. Glikoz transport proteinler 6 çeşittir (4, 11, 103).

GLUT1; Moleküler ağırlığı 54117 Dalton olup, 492 amino asitten oluşur. İnsan eritrositlerinde, plasentada, fetal dokularda bulunur. Ayrıca diğer dokularda da yaygın bir şekilde bulunduğu tespit edilmiştir. Glikoza afinitesi yüksektir (Km: 17 mM).

GLUT2; Moleküler ağırlığı 57000 Dalton olup, 524 amino asitten oluşur. Pankreasın beta-hücrelerinde, barsakta, ve karaciğer ile böbrek gibi kana glikoz veren organlarda bulunur. GLUT2'nin saturasyonu için yüksek glikoz transportu gereklidir (Km: 42 mM).

GLUT3; Moleküler ağırlığı 53933 Dalton olup, 496 amino asitten oluşur. Beynin nöral hücrelerinde bulunur. GLUT1'lerden daha yüksek bir afiniteyle glikozu taşır (Km: 11 mM).

GLUT4; Moleküler ağırlığı 54797 Dalton olup, 509 amino asitten oluşur. İnsülin tarafından regüle edilebilen GLUT4 sadece yağ dokusu ile iskelet kasında bulunur. Glikoza karşı afinitesi çok yüksektir (Km: 2 mM).

GLUT5; Moleküler ağırlığı 54983 Dalton olup, 501 amino asitten oluşur. Başlıca ince barsakta, daha az miktarda böbrek, iskelet kası ve yağ dokusunda bulunur. Henüz fonksiyonu tam olarak tespit edilememiştir.

GLUT7; Moleküler ağırlığı 53000 Dalton olup, 528 amino asitten oluşur. Plazma membranından ziyade, hepatositlerin endoplazmik retikulumunda yerleşmiştir.

#### 4-II) Glikoz transport proteinlerin regülasyonu

İnsülin tarafından aktivitesi düzenlenebilen glikoz transport proteininden başlıcası GLUT4 olup, GLUT1 daha az oranda insüline hassastır. Bunun nedeni, GLUT1'in dokularda çok yaygın olarak bulunması ve az miktardaki insülinle bile kolayca uyarılabilmesidir.

Bu iki glikoz transport proteininin fonksiyonu akut ve kronik olmak üzere iki yolla değiştirilir.

**Akut regülasyon;** İnsülin GLUT1'in hücre yüzey konsantrasyonunu artırır. Ayrıca büyüme faktörleri gibi çeşitli çevresel uyarılar ve farklı büyüme durumları da GLUT1'in fonksiyonunu değiştirebilir (49).

Viral enfeksiyonlar, ısı şoku, arsenit, solunum inhibitörleri ve alkali pH gibi çeşitli stres durumları GLUT1'lerin akut regülasyonuna yol açar. Bu regülasyon GLUT1'in miktarının

protein senteziyle değiştirilmesinden ziyade, transport proteinlerin plazma membranına taşınması (translokasyonu) ile ilişkilidir.

GLUT4'lerin genellikle % 99'u hücre içinde bulunur. İnsülinin akut uyarımı ile yaklaşık %20'si plazma membranına geçer. İnsülinin plazma membranındaki reseptörlerine bağlanmasıyla, sitoplazmada bulunan glikoz transport proteinler plazma membranına geçer. Bu translokasyonu uyaran sinyalizasyon henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Glikozun hücre içine geçişi sona erdiğinde, insülin reseptöründen ayrılır ve plazma membranındaki glikoz transport proteinler tekrar hücre içine geçerler. İsoproterenol gibi beta-adrenerjik agonistler, ACTH ve glukagon gibi lipolitik ajanlar insülinin stimüle ettiği transportu azaltır. Adenozin, nikotinik asit ve prostaglandin E1 gibi antilipolitik ajanlar ise insülinin uyardığı transportu artırır. Bu uyarıların etki mekanizması, transport proteinlerin aktivitesinin değiştirilmesi ile gerçekleşmektedir (4).

**Kronik regülasyon;** Kısa süreli stres durumları GLUT1'in sentezini etkilemezken, uzun süreli stress durumları hem GLUT1 mRNA'sı hem de GLUT1 protein miktarı üzerine etkilidir ve transport miktarını 20 katın üzerinde artırır. Bazı hücrelerde ise sentezde bir değişim görülmez, sadece GLUT1'lerin inaktivasyonunun azalmasından dolayı transportun arttığı tespit edilmiştir.

GLUT1'in kronik uyarıları; Serum, büyüme faktörleri ve interlökinler ( EGF, PDGF, FGF, TGF $\beta$  ve interlökin 1), forbol esterleri, cAMP ve viral transformasyonlardır (4).

Obezite ve tip II diabette insüline bağlı glikoz transportunda meydana gelen post-reseptör bir bozukluk insülin rezistansına yol açar (47, 115).

#### 4-III) İnsülin Rezistansı ve Glikoz Transportu

İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerine en önemli etkilerinden biri hücrelerin glikoz kullanımını artırarak kan şekerini düşürmektir. İnsülin bu etkisini özellikle kendine spesifik olan GLUT4 ve GLUT1 transport proteinleri üzerinden gerçekleştirir.

İnsüline bağlı glikoz transport bozukluğuyla ortaya çıkan insülin rezistansının, glikoz transport proteinlerin ( özellikle GLUT4 ) sayısının azalmasından ziyade bu proteinlerin plazma membranına translokasyonunun veya proteinin aktivitesinin azalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (104, 143).

Glikokortikoidlerin diabetojenik etkilerinin hem hepatik hem de periferik insülin rezistansından kaynaklandığı ve insüline bağlı glikoz transportunu bozarak insülin rezistansının oluşmasına neden olduğu bildirilmiş (57, 155).

Mekanizması tam olarak aydınlatılamamışsada, glikokortikoidler glikoz transport proteinlerin fonksiyonunu etkileyerek glikoz transportunu azaltırlar. *In vitro* yapılan çalışmalarda glikokortikoidlerin bu etkilerinin GR sayısına bağlı olduğu ve GR miktarının artmasıyla 3-O-Metil-glikoz ( 3-O-MG ) transportunun azaldığı bildirilmiştir (154).

Lökositlerdeki glikoz transportu kolaylaştırılmış difüzyon vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir (40). 3-O-MG hücre içinde metabolize olmayan bir glikoz analogu olup, glikoz transport çalışmalarında yaygın olarak kullanılır (113, 114). Bizde normal ve hasta grublarında yaptığımız glikoz transport çalışmasında 3-O-MG'ü kullandık.

## **5- Hastalıklardaki Durumu**

### **5-I) Obezite**

Obezite genel olarak adipoz dokunun miktarının artması şeklinde ifade edilir. Obeziteye yol açan enerji metabolizmasındaki bozukluklar, adipoz dokuda enerjinin trigliserit formunda depo edilmesine yol açar. Glikokortikoidler bu oluşumu arttırmaktadır (43).

Obezitenin etyolojisi kesin olarak aydınlatılamamıştır. Genetik, nöral, hormonal, metabolik, besinsel, psikolojik ve sosyoekonomik faktörler obezitenin gelişmesinde rol oynamaktadır (132).

Obezitenin gelişmesinde rol oynayan endokrin değişiklikler son yıllarda yoğun olarak araştırılmaktadır (51). Obez kişilerin endokrin fonksiyonundaki değişiklikler kortizol yapımını da etkiler. Kortizol yapımının artması, kortizol yıkımı ile dengelenerek plazma kortizol düzeyi normal seviyede tutulur. Kortizolün artan metabolik klirensi sekonder olarak kortizol bağlayan proteinin plazma konsantrasyonunu da artırır (13, 14, 80).

Slavov ve arkadaşları obezitede artan kortizol üretimini muhtemelen açıklayan plazma ACTH seviyesinde orta dereceli bir artış bildirmişlerdir (139).

Obezitede kortizol metabolizmasının artması kortizolün kortizona oksidasyonunun bir neticesidir. Kortizonun ACTH üzerine inhibisyon etkisi kortizolden daha zayıftır, bu yüzden ACTH'nun miktarı artar ve daha fazla kortizon yapımı uyarılır (16).

Obez kişilerin HHA sisteminde oluşan bu regülasyon bozukluğunun obezitenin gelişmesindeki rolü deney hayvanlarında gösterilmiştir (60).

### **5-II) Polikistik Over Sendromu**

Polikistik over sendromu ( PKOS ), over hiperandrojenemiye bağlı değişik klinik bulgular ile karakterize edilen bir hastalıktır. PKOS'lu kadınlarda menstüral siklus bozukluğu ve hiperandrojenemi bulguları mevcuttur. Menstüral siklus bozukluğu genellikle oligoamenore veya sterilite, hiperandrojenemi ise hirsutizm ve akne olarak ortaya çıkar. PKOS'da görülen diğer bulgular obezite, hiperprolaktinemi ve insülin rezistansıdır (52, 98).

Over fonksiyonunun bozulması ve over kaynaklı androjen yapımındaki artma, hiperandrojenemiye neden olur. Over fonksiyonunun bozulmasına neden olan faktörlerin başında LH fazlalığı veya LH/FSH oranının yükselmesi neticesinde overlerin uyarılmasının artmasıdır. Diğer nedenlerden biri over dışı androjen yapımının artması, diğeri ise over steroid sentezinin çeşitli enzim eksikliği (  $3\beta$ -HSD, 17-Ketosteroid redüktaz ve aromataz ) sonucu bozulmasıdır (39).

Over dışı androjen yapımında adrenal bezin katkısı PKOS'munun patogenezinde rol oynayabileceği önceleri pek kabul edilmezken (158), HHA sistemdeki regülasyon bozulması sonucu adrenal bezin fonksiyonunun artmasının PKOS'nun patogenezinde etkili olabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (24, 33, 53, 102).

### 5-III) Konjenital Adrenal Hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi ( KAH ) mineralokortikoid ve kortizol sentezi için gerekli enzimlerden birinin eksikliği sonucu gelişen ve klinikte sıklıkla anormal dış genital yapı ve erken püberte ile ortaya çıkan bir tablodur. Otozomal dominant bir geçiş gösterir. Kortizol eksikliğinin derecesine göre klinik bulgular farklılık göstermektedir ve glikokortikoid tedavisi hastalar için büyük önem taşır (167).

KAH'ye yol açan enzimatik defektler şunlardır ;

- 1) 21-Hidroksilaz eksikliği ( 21-OH )
- 2)  $11\beta$ -Hidroksilaz eksikliği (  $11\beta$ -OH )
- 3)  $3\beta$ -Hidroksisteroid dehidrogenaz (  $3\beta$ -HSD )
- 4)  $17\alpha$ -Hidroksilaz eksikliği
- 5) Kolesterol desmotaz eksikliği

KAH vakalarının büyük çoğunluğunda 21-OH eksikliği temel nedeni oluşturur.  $11\beta$ -OH ve  $3\beta$ -HSD enzim defektleri daha az sıklıkla raslanır.  $17\alpha$ -Hidroksilaz ve Kolesterol desmotaz eksikliği ise nadir görülür.

Kortizol sentezinin hız belirleyici enzimleri olan 21-OH ve  $11\beta$ -OH enzimlerinin eksikliği sonucu, HHA sistemdeki kortizolün negatif feedback etkisi ortadan kalkar. Bunun sonucu olarak ACTH'nun sentezinin inhibe edilememesi adrenokortikal hiperplaziye neden olur.

Tuz metabolizması ve su volümündeki imbalans iki enzim eksikliğinde farklılık gösterir. 21-OH eksikliğinde bozulmuş aldosteron sentezi tuz kaybı ve hipovolemiye sebep olurken,  $11\beta$

-OH eksikliğinde mineralokortikoid deoksikortikosteron ( DOC )'un artması su volümünde artışa ve hipertansiyona neden olur (110).

**21-OH Eksikliği ;** 21-OH eksikliğinin iki sonucu vardır. (1) Kortizol sentezi bozulur. (2) Hipotalamus ve hipofizde kortizolün negatif feedback etkisinin kaybolması sonucu, 21-OH aşamasının üstündeki kortizol öncüleri (prekürsör) birikir ( 17-hidroksi progesteron, pregnenolon, 17-hidroksi pregnenolon ve progesteron ). 17-hidroksillenmiş prekürsörler adrenal androjenlere çevrilir.

21-OH eksikliğinden dolayı KAH'li kadınlarda belirsiz bir genital oluşur. Erkek ve kadında yüksek ACTH'dan dolayı hiperpigmentasyon görülür. 21-OH eksikliğinde kortizol tespit sınırlarının altında veya normal sınırın altında tespit edilebilir. 17-hidroksi progesteron ( 17-OHP) ve adrenal androjenler artar (10, 100, 110).

**11 $\beta$ -OH Eksikliği ;** 11 $\beta$ -OH enzimi hem glikokortikoid hem de mineralokortikoid sentezi için gereklidir. Kortizol sentezinde 11-deoksikortizolün kortizole çevrimi azalmıştır. Paralel bir bozukluk aldosteron sentezinde de vardır. DOC'un kortikosterona dönüşümü azalmıştır veya yoktur. Bunun neticesi olarak 11-deoksisteroidler ( 11-deoksikortizol ve 11-DOC ) birikir. Hiperandrojenizm 21-OH eksikliğindeki gibidir (110, 123).

#### **5-IV) Cushing Sendromu**

Cushing sendromu genellikle 20 ile 60 yaşları arasında ortaya çıkan ve kadınlarda görülme sıklığı daha fazla olan bir hastalıktır.

Cushing sendromunun nedeni adrenal bezden aşırı kortizol salgılanmasıdır. Aşırı kortizol salgılanması ACTH'na bağlı olabilir yada olmayabilir. ACTH'na bağlı olmayan kortizol sentezinin nedeni adrenal adenom veya karsinomlardır ve Cushing hastalarının %10-20'sinin sebebini oluşturur.

ACTH'na bağlı Cushing sendromu hipofizer ve ektopik kaynaklı olup, adrenal hiperplaziye yol açar. Hastaların büyük çoğunluğu ( % 70-80 ) hipofizer Cushing sendromudur. Ektopik ACTH hipersekresyonunun yol açtığı Cushing sendromunun görülme sıklığı ise % 10'dur. Akciğerin ufak hücreli karsinomu, pankreatik tümörler ektopik ACTH hipersekresyonuna neden olabilir (161).

Cushing hastalığında ortaya çıkan bozuklukların çoğu aşırı kortizol salgılanmasından kaynaklansa da, kortizolle beraber androjenlerin salgılanmasında önemlidir. Hiperandrojenemi akne ve hirsütizmeye neden olur. Obezite ve hipertansiyon da hastaların büyük bir çoğunluğunda görülür (159).

Cushing hastalığında glikoz intoleransı sık görülen bir bulgudur. Aşırı kortizolün etkisiyle glikoneojenezin artması kan glikoz konsantrasyonunu artırır. Eğer bu adrenal diabetes uzun süre

devam ederse, yüksek kan şekerinin etkisiyle aşırı insülin salgılanması langerhans adacıklarının haraplanmasına ve gerçek bir diabetin ortaya çıkmasına neden olur. Hastalar diabet, glikoz toleransı bozuk veya normal olabilir (65).

Biz de bu dört hasta grubunda HHA sistemdeki regülasyon bozukluğu ( Obezite, Cushing sendromu ve PKOS ) ve enzim defekti (KAH) sonucu ortaya çıkan kortizol sekresyon bozukluğunun GR'ler üzerindeki etkilerini ve GR miktarıyla 3-O-MG transportu arasındaki ilişkiyi inceledik.



## AMAÇ

Glikokortikoidler protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasını düzenleyen önemli hormonlardır. Ayrıca çeşitli stres ve anti-enflamatuar olaylarda da rol oynarlar. Glikokortikoid hormonların biyokimyasal etkilerinin ilk aşaması, sitoplazmada bulunan GR'lere glikokortikoidlerin bağlanmasıdır. Bu yüzden hücresel glikokortikoid yanıtının oluşmasında GR'ler çok önemli bir rol oynar.

GR miktarıyla glikokortikoidlere biyolojik yanıt arasındaki ilişki hematolojik kanserlerde, nefritlerde, depresif hastalıklarda ve kollajen hastalıklarda bildirilmiştir. Hücresel GR konsantrasyonunu belirleyen birçok faktör vardır. Glikokortikoidlerde kendi reseptör konsantrasyonunun regülasyonunda rol oynarlar.

Çalışmamızın amacı, kortizol sentezinin etkilendiği çeşitli adrenokortikal hastalıklarda, MNH'lerdeki GR miktarının ne yönde değiştiğini ortaya çıkarmaktır. Glikokortikoidlerin karbonhidrat metabolizmasına etkilerinden biri glikoz transportunun inhibisyonudur. Glikokortikoidlerin bu etkisinin GR miktarıyla korelasyonu gösterilmiştir. Bizde çalışmamızın diğer kısmında aynı hasta grubunun MNH'lerindeki 3-O-MG transportunu tespit ederek GR miktarıyla olan korelasyonunu araştırdık.

Bu amaç doğrultusunda dört hasta grubuyla çalıştık. Bunlar; (1) Hiperkortizolemik Cushing hastaları, (2) Hipokortizolemik konjenital adrenal hiperplazili hastalar ve hipotalamik-hipofizer-adrenal sistemdeki regülasyon bozukluğu sonucu kortizol sentezinin etkilendiği (3) obez ve (4) polikistik over sendromlu hastalardır.

## MATERYAL ve YÖNTEMLER

### A) Materyal

Glikokortikoid reseptör ve 3-O-Metil glikoz transport parametrelerinin incelenmesi için seçilen hasta grupları (Obez, Cushing sendromu, Polikistik over sendromu ve Konjenital adrenal hiperplazi) iki farklı yaş grubundaki sağlıklı kontrol bireyleriyle kıyaslanmıştır.

Kontrol gruplarını oluşturan bireyler arasında herhangi geçirilmiş bir endokrin hastalık bulgusu yoktu. Ayrıca kontrol grupları herhangi bir ilaç kullanmayan bireylerden oluşturulmuştur. Hastaların hepsinde hastalıklarıyla ilişkili biyokimyasal parametreler gönderildikleri klinikte yapılmış ve tanıları konmuştur.

Hasta grupları;

**1- Obezite** : Çalışma, yaşları 23 ile 37 arasında ( $29 \pm 8$  yıl) değişen 11 obez (3 erkek ve 8 kadın) hastada yapıldı. Hastaların vücut kitle indeksleri (body mass index = BMI)  $\geq 28$  kg/m<sup>2</sup> (BMI :  $33.9 \pm 4.3$  kg/m<sup>2</sup>) olarak tespit edildi. Kortizol düzeyleri yüksek olan hastaların 1mg dekzametazon yüklemesine normal cevap vermeleriyle, bu hastalardaki Cushing sendromu şüphesi ortadan kaldırıldı. Ayrıca bu hastaların OGTT'sindeki glisemi değerleri normal olarak tespit edildi.

**2- Cushing sendromu** : Çalışma, yaşları 13 ile 38 arasında ( $26 \pm 8$  yıl) değişen 10 Cushing sendromlu (2 erkek ve 8 kadın) hastada yapıldı. Hastalar obez (BMI :  $29.6 \pm 5.7$  kg/m<sup>2</sup>) olarak tespit edildi. Bu hastalara bazal kortizollerinin ve üriner serbest kortizollerinin yüksek olması, diürenal kortizol ritminin bozulması ve yüksek doz dekzametazona yanıt vermelerinden dolayı hipofizer Cushing sendromu tanısı konmuştur. Ayrıca bu hastaların hiçbirinde diabetes tespit edilmemiştir.

**3- Polikistik over sendromu** : Çalışma, yaşları 18 ile 36 arasında ( $23 \pm 6$  yıl) değişen 10 kadın hastada yapıldı. Bu hastaların hepsi obez (BMI :  $29.9 \pm 5.6$  kg/m<sup>2</sup>) olup, hiperandrojenemiye ve oligoamnoreye sahipti. Bu olgularda diğer hiperandrojenemi nedenleri berteraf edildi. Hastaların hiçbirinde diabetes teşhis edilmedi.

**4- Konjenital adrenal hiperplazi** : Çalışma, yaşları 3 ile 14 arasında ( $9 \pm 3$  yıl) değişen 14 KAH'li (7 erkek ve 7 kadın) hastada yapıldı. Bu hastaların 3'üne 11-β- hidroksilaz, 11'ine 21-hidroksilaz eksikliği tanısı konmuştur. Hastalar arasında kortizol eksikliği nedeniyle ilaç kullananların kanları, ilaçları bir hafta süreyle doktor kontrolünde kesildikten sonra alındı.



## B) Metod

**1- Kandan Mononükleer Hücreler (MNH)'in Saflaştırılması :** MNH'ler Ficoll-Hypaque santrifüj yöntemiyle kandan izole edilmiştir. Bunun için alınan heparinli gece açlık kanı ( GR deneyi için 25 ml, 3-O-MG transportu için 15 ml ) 1 : 2 oranında PBS ( Fosfat-tuz tamponu ; NaCl 0.29 mol/l, KCl 5.6 mmol/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11.3 mmol/l ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mmol/l, pH 7.4 ) ile sulandırıldı. Ficoll-Hypaque ( 1.077 kg/l, Sigma ) üzerine tabakalandırılıp 400 x g'de 30 dakika (20°C) santrifüj edildi. MNH'lerden zengin arafaz aspire edilip, iki defa PBS ile yıkandı ( 100 x g, 10 dakika ).

En son aşamanın hücre pelleti; GR deneyi için yaklaşık  $5 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde RPMI-1640 ( Seromed ) ile süspansiyon haline getirildi. 3-O-MG transportu için ise yaklaşık  $1 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde PBS-BSA ( 10 mg fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma) / 1 ml PBS ) çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi.

Hücre sayısı sayım kamarası ile tespit edildi. Hücre canlılığı *tripan blue* boyamasıyla yaklaşık %92-98 oranında tespit edildi. Hücre süspansiyonundaki lenfosit oranı % 88-94, monosit oranı ise % 6-12 arasında tespit edildi.

**2- Glikokortikoid Reseptör Deneyi :** GR bağlama deneyi Damm ve arkadaşlarının modifiye ettikleri metoda göre yapıldı (34). Total bağlanmanın hesaplanması için beş ependorf tübünden herbirine içinde  $5 \times 10^7$  hücre/ml hücre bulunan süspansiyondan 0.15 ml (  $6 \times 10^6$  hücre/ml ) ve artan konsantrasyonda ( 5-50 nmol/l ) [ 6, 7- <sup>3</sup>H (N) ]-dekzametazon ( Spesifik aktivitesi : 43.9 Ci/mmol, 250 µCi, New England Nuclear, USA ) kondu.

Non-spesifik bağlanmanın tespiti içinde diğer beş ependorf tübüne ilk beş tübteki hücre ve radyoaktif dekzametazonun yanısıra 80 µmol/l olacak şekilde non-radyoaktif dekzametazon ( Sigma ) konup, bütün tübler 37°C'lik su banyosunda 2 saat süreyle ( orta derece sallantıda ) inkübe edildi ( Inkübasyon volümü 0.25 ml'ye RPMI-1640 ile tamamlandı ).

Inkübasyon tüblerine 1.2 ml soğuk PBS konarak inkübasyon sona erdirildi. Her bir inkübasyon tübü 3 kez soğuk PBS ile yıkandı ( 100 x g, 10 dak.). Hücrelerin parçalanması için, 1 ml etanol ( Merck ) ve 0.4 ml PBS ilave edilip vortekslendi. Bu süspansiyonun tamamı ( 1.4 ml ) içinde 5 ml Aquasol ( New England Nuclear, Boston, MA, USA ) bulunan sayım şişelerine aktarılıp, beta-sintilasyon sayacında sayımları yapıldı (Packard A C anberra Company, TRI-CARB 1000 TR).

Herbir sayım şişesinden alınan değerler kullanılarak hesaplanan total ve non-spesifik bağlanma değerlerinin farkından spesifik bağlanma değerleri elde edildi. Bu verilerden Scatchrd eğrisi (133) çizilerek, hücre başına düşen reseptör sayısı ve bağlanma afinitesi (  $K_d$  ) hesaplandı (Şekil 14).

**3- Mononükleer Hücrelerde 3-O-Metil Glikoz Transportu :** MNH'lerde 3-O-Metil glikoz (3-O-MG) transportu Tanaka ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre gerçekleştirildi (154).

İki ependorf tübünün herbirine, 0.01 ml 3-O-Metil-D-[1-<sup>3</sup>H]-Glikoz ( Spesifik aktivitesi; 2-5 Ci/mmol, 1 mCi, Amersham, UK ) ve içinde  $1 \times 10^7$  hücre/ml bulunan hücre süspansiyonundan 0.1 ml (  $1 \times 10^6$  hücre/ml ) konularak ( final glikoz konsantrasyonu 20  $\mu$ mol/l ) oda ısısında 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon ortamına transport inhibitörü phloretin ( 100  $\mu$ mol/l ) ( Sigma ) ilave edilerek inkübasyon durduruldu. Ayrıca bir başka iki inkübasyon tübünde, non-spesifik 3-O-MG transportunun tespiti için ortama [<sup>3</sup>H]-3-O-MG konmadan önce hücre süspansiyonuna phloretin ilave edilip transporta devam edildi.

Tübler 100xg'de 10 dakika santrifüj edilip oluşan hücre pelletleri phloretin/PBS ( 50  $\mu$  mol phloretin / l PBS ) ile iki defa yıkandı ( 100 x g, 10 dak.). Hücrelerin parçalanması için 0.4 ml 0.05 N NaOH ( Merck ) ilave edilip vortekslendi. Tübler 1 dakika 12000 x g'de santrifüj edildikten sonra her bir tübün süpernatantından 0.350 ml alınıp içinde 5 ml sayım sıvısı ( 25 g naftalin ( Sigma ), 1.5 g 2,5- Diphenyloxazole ( Sigma ) ve 0.0754 g POPOP ( Sigma ) 200 ml 1,4-Dioxan ( Merck ) içinde çözülerek hazırlandı ) bulunan sayım şişelerine konarak, beta-sayıcıda sayıldı. 3-O-MG transportunun dekzametazon, östrodiol ve progesteron ile inhibisyon çalışması için; MNH'ler kandan izole edildikten sonra PBS içinde bu üç hormon ile (37°C'de 1. saat) inkübe edilip PBS ile yıkandı ( 100xg, 10 dakika). PBS-BSA ile süspansiyon haline getirilip transporta yukarıdaki şekilde devam edildi.

Net [<sup>3</sup>H]-3-O-MG transportu, total ve non-spesifik transportun farkından "fmol/ml hücre x dak" cinsinden hesaplandı.

### **İstatiksel Analizler**

Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü analizi, student t testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Tüm veriler "ortalama  $\pm$  standart sapma" olarak ifade edilmiştir.

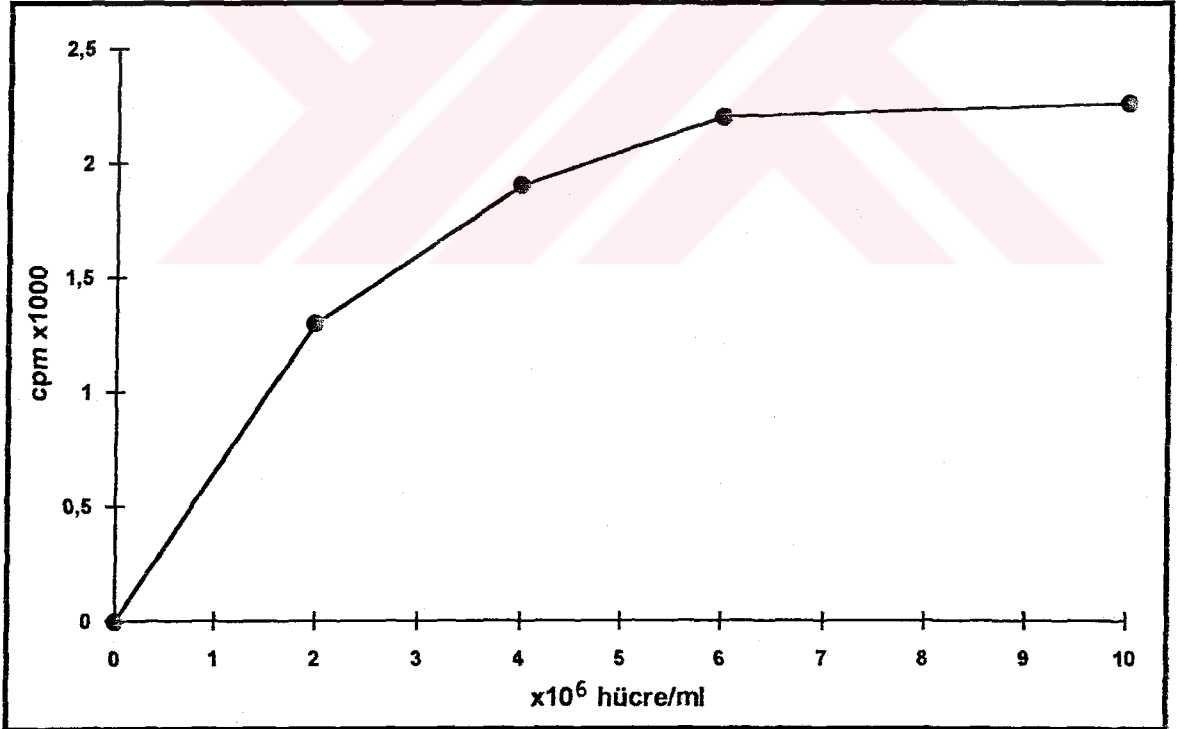
## BULGULAR

GR'lerin  $[^3\text{H}]$ -dekzametazon bağlanma parametrelerine ve  $[^3\text{H}]$ -3-O-MG transport kinetiklerine yönelik bir seri deney yapıldı ( I ). Optimum deney şartları sağlandıktan sonra normal ve hasta gruplarının GR miktarı ve afinitesi ile 3-O-MG transport değerleri hesaplandı ( II ).

### I A ) GR Kinetik Deneyleri

1- MNH sayısına bağlı olarak  $[^3\text{H}]$ -dekzametazonun GR'lerine bağlanması : Şekil 6'da görüldüğü gibi artan MNH miktarıyla GR'ine bağlanma artmakta ve  $6 \times 10^6$  hücre/ml hücre sayısında bağlanma doyuma ulaşmaktadır.

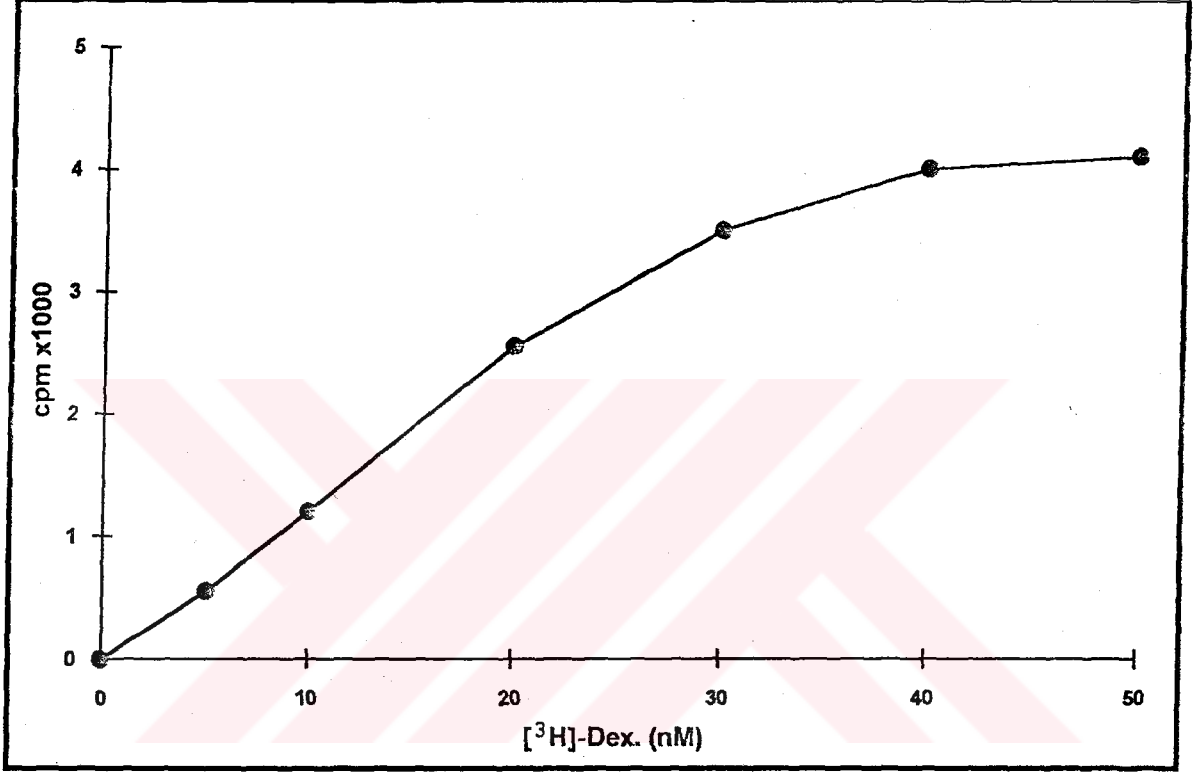
Şekil 6 : GR'lere bağlanmada hücre sayısının önemi



40 nmol/l  $[^3\text{H}]$ -dekzametazon, 2-10 x10<sup>6</sup> hücre/ml arasında değişen hücre ile metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.

2- [<sup>3</sup>H]-dekzametazonun artan konsantrasyonlarında GR'üne bağlanma kinetiği :  
[<sup>3</sup>H]-dekzametazonun artan konsantrasyonuyla GR'lere bağlanma artmakta ve 40 nmol/l'de satürasyona (doyuma) ulaşmaktadır ( Şekil 7 ).

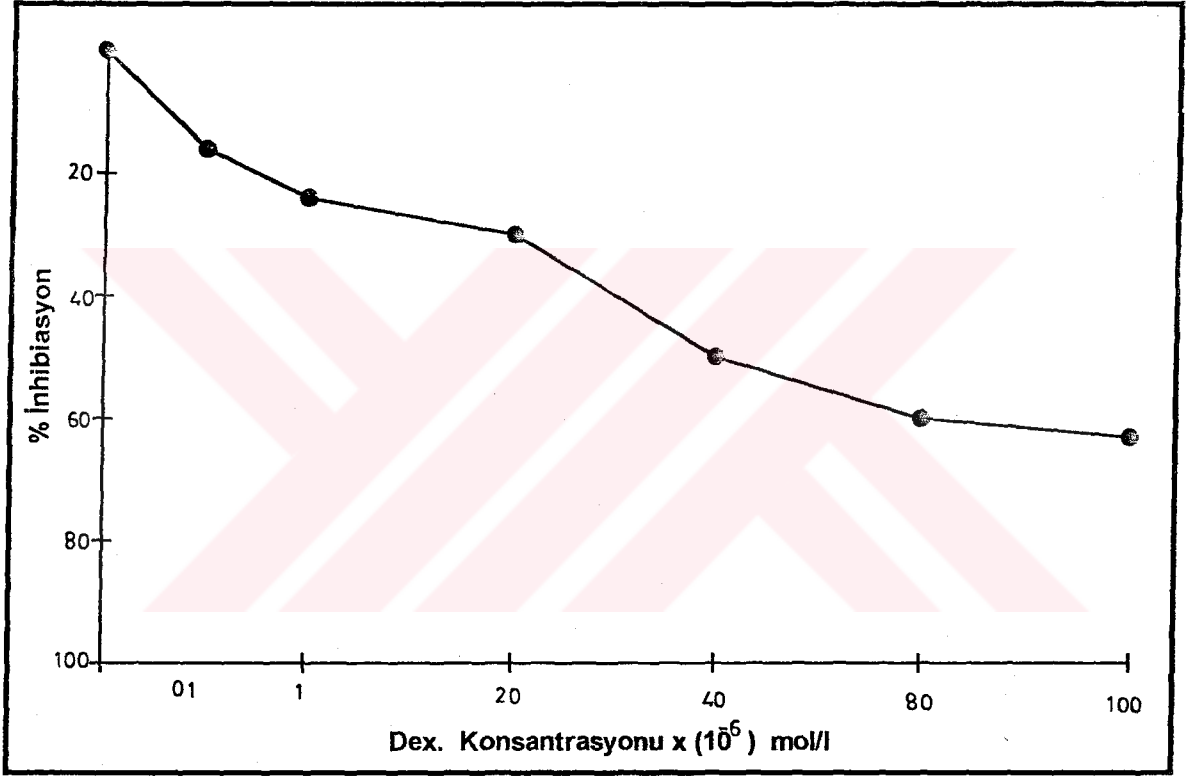
Şekil 7 : GR'lere bağlanmada [<sup>3</sup>H]-Dekzametazon konsantrasyonunun önemi



6x10<sup>6</sup> hücre/ml MNH, [<sup>3</sup>H]-dekzametazonun artan konsantrasyonlarıyla ( 5-50 nmol/l )  
metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.

**3- GR'lere [<sup>3</sup>H]-dekzametazon bağlanmasının dekzametazon ile inhibisyonu :**  
GR'üne [<sup>3</sup>H]-dekzametazon bağlanması artan non-radyoaktif dekzametazonla inhibe olmaktadır. GR'üne [<sup>3</sup>H]-dekzametazonun bağlanması; 0.1 μmol/l dekzametazonunda % 15, 1 μmol/l dekzametazonunda %21, 20 μmol/l dekzametazonunda %27, 40 μmol/l dekzametazonunda % 50, 80 μmol/l dekzametazonunda % 65, 100 μmol/l dekzametazonunda % 63 oranında inhibe olmaktadır (Şekil 8).

Şekil 8 : GR'lere [<sup>3</sup>H]-Dekzametazon bağlanmasının dekzametazonla inhibisyonu

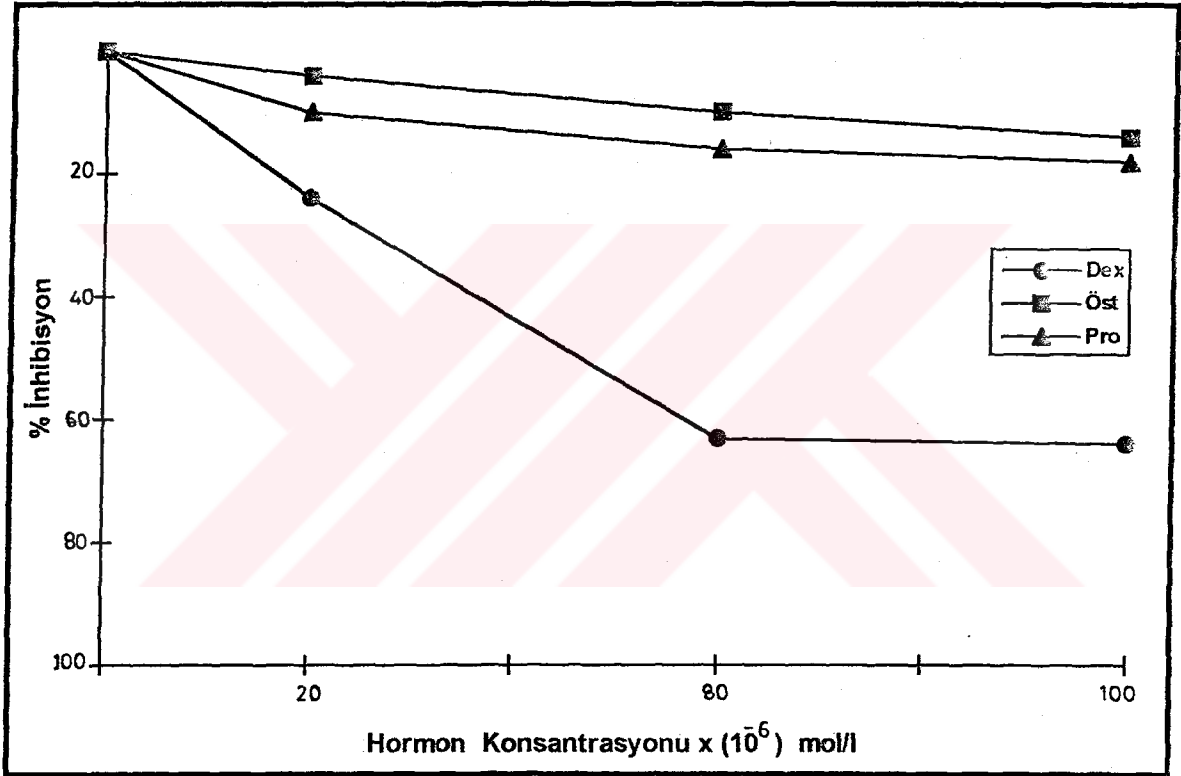


40 nmol/l [<sup>3</sup>H]-dekzametazon, 6x10<sup>6</sup> hücre/ml MNH ve artan konsantrasyonlarda non-radyoaktif dekzametazon ( 0.1-100 μmol/l ) metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.

#### 4- GR'lere [<sup>3</sup>H]-dekzametazon bağlanmasının farklı hormonlarla inhibisyonu:

[<sup>3</sup>H]-dekzametazonun GR'lerine bağlanmasının dekzametazonla inhibisyonu, 17- $\beta$ -östrodiol ve progesteronun inhibisyonuyla karşılaştırıldı. 20  $\mu$ mol/l hormon konsantrasyonunda : Dekzametazon %27, 17- $\beta$ -östrodiol %5, progesteron %10 ; 80  $\mu$ mol/l hormon konsantrasyonunda : Dekzametazon %65, 17- $\beta$ -östrodiol %8, progesteron %13 ; 200  $\mu$ mol/l hormon konsantrasyonunda : Dekzametazon %68, 17- $\beta$ -östrodiol %9, progesteron %14 oranında bağlanmayı inhibe ettiği görüldü ( Şekil 9 ).

Şekil 9 : GR'lere [<sup>3</sup>H]-Dekzametazon bağlanmasının dekzametazon, 17- $\beta$ - östrodiol ve progesteronla inhibisyonu

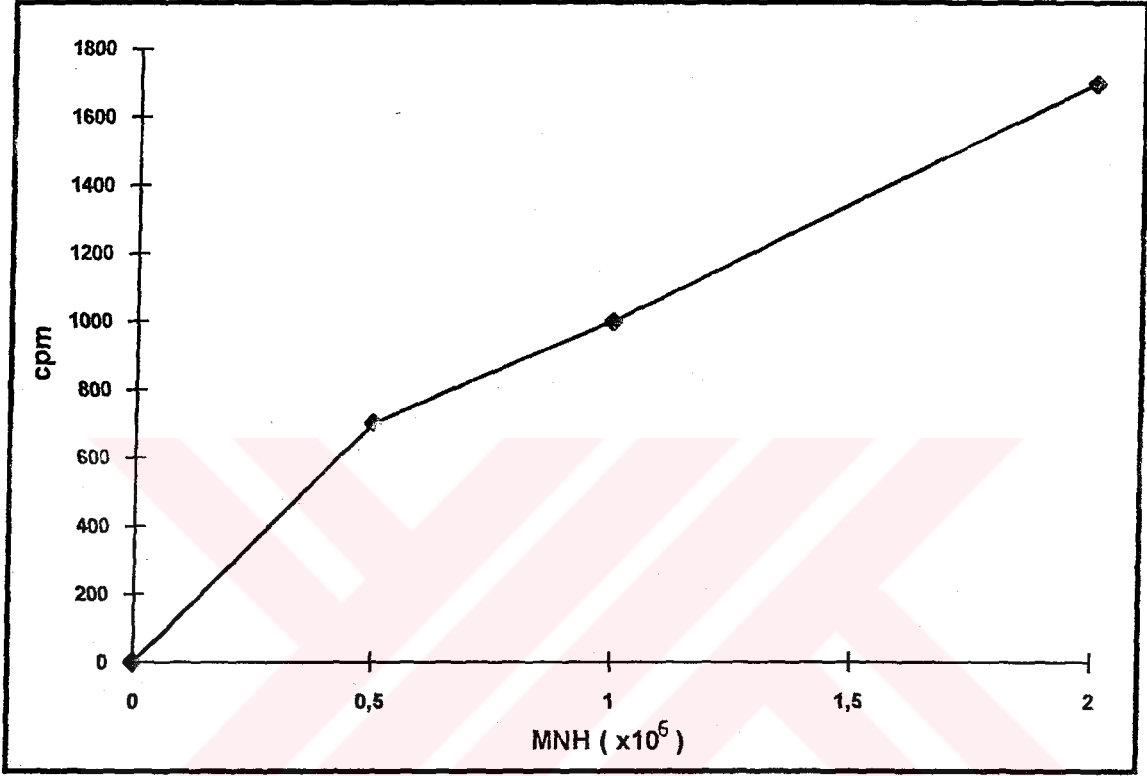


40 nmol/l [<sup>3</sup>H]-dekzametazon,  $6 \times 10^6$  hücre/ml MNH ve artan konsantrasyonlarda non-radyoaktif dekzamatazon, progesteron ve 17- $\beta$ -östrodiol ( 20-200  $\mu$ mol/l ) metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.

## I B ) 3-O-MG Transport Kinetik Deneyleri

1- MNH sayısına bağı olarak 3-O-MG transportunun artması : MNH'lerdeki 3-O-MG transportu hücre sayısı ile paralel bir şekilde artmaktadır ( Şekil 10 ).

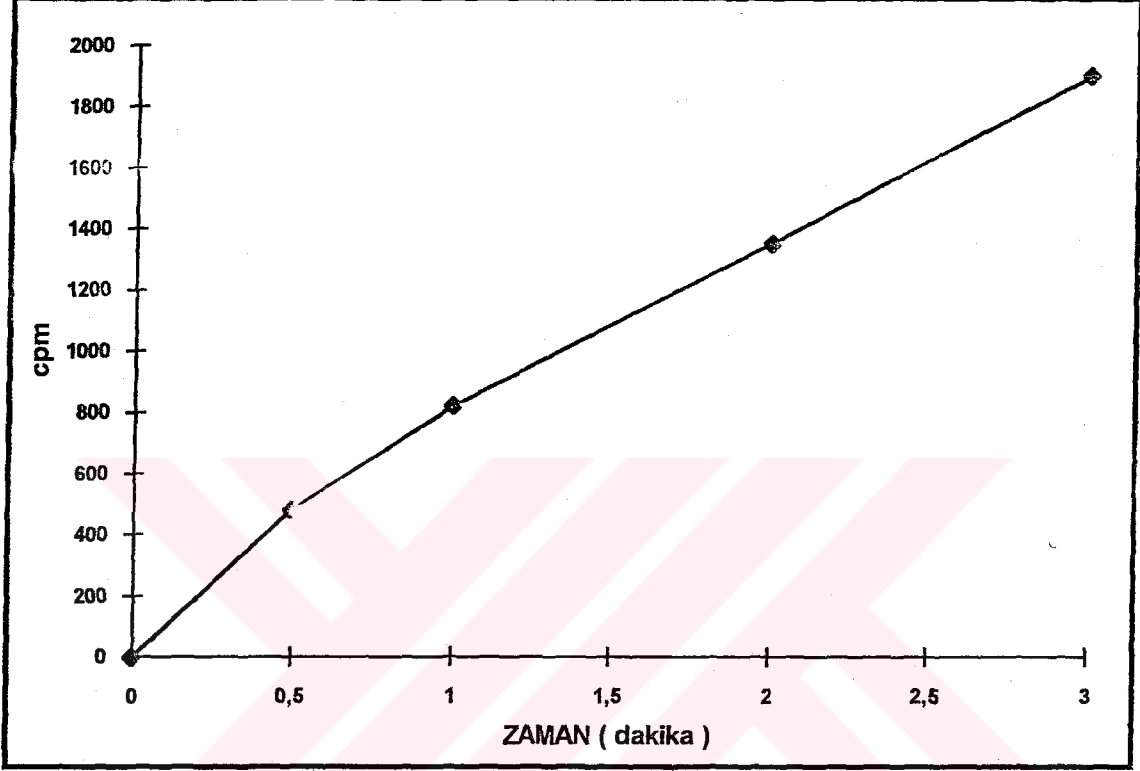
Şekil 10 : 3-O-MG transportuna MNH sayısının etkisi



20 µmol/l 3-O-MG konsantrasyonunda 0.5, 1.0 ve 2.0 x 10<sup>6</sup> hücre metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.

**2- MNH'lerdeki 3-O-MG transportunun zamana bağımlılığı :** MNH'lerdeki 3-O-MG transportunun zamana bağımlılığı incelendiğinde, 3'üncü dakikaya kadar transportun zamanla paralel bir şekilde arttığı tespit edildi ( Şekil 11 ).

**Şekil 11 :** 3-O-MG transportuna zamanın etkisi

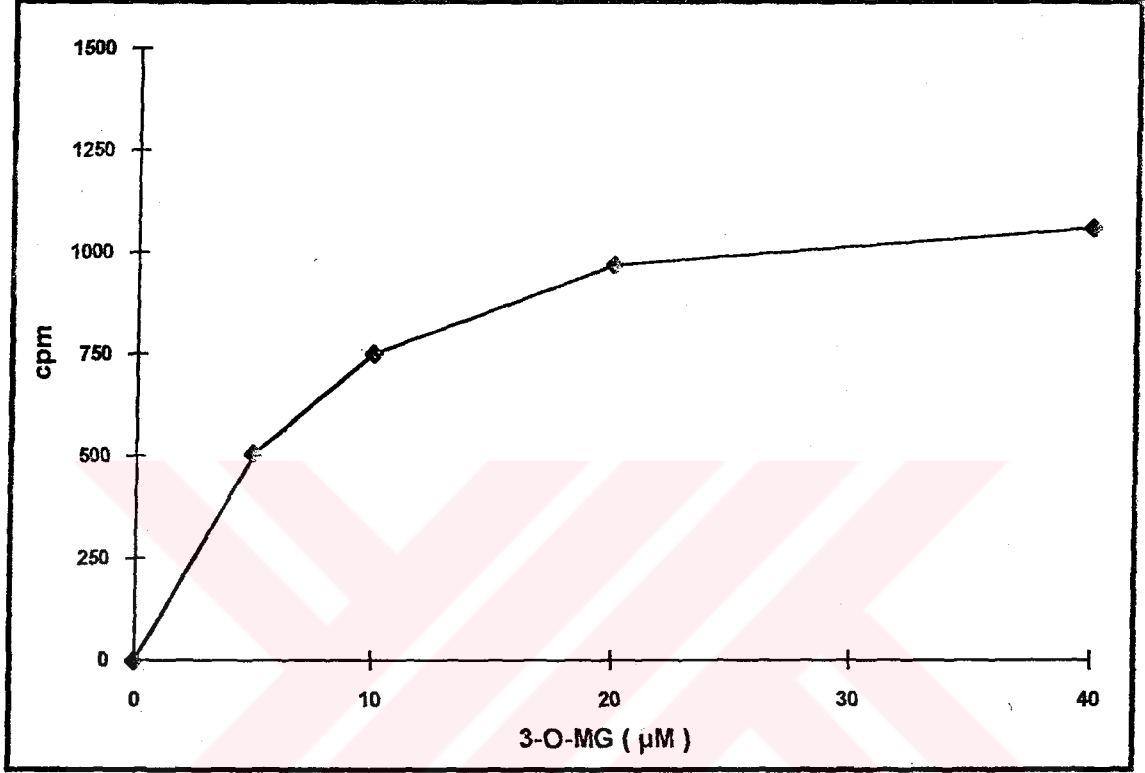


20  $\mu\text{mol/l}$  3-O-MG konsantrasyonunda,  $1.0 \times 10^6$  hücre çeşitli zaman aralıklarında ( 0.5, 1, 2, ve 3 dakika ) metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.



**3- MNH'lerdeki 3-O-MG transportuna glikoz konsantrasyonunun etkisi** : Artan glikoz konsantrasyonlarında MNH'lerdeki 3-O-MG transportu incelendiğinde, 20  $\mu\text{mol/l}$  glikoz konsantrasyonunda transport doyuma ulaştığı görülmüştür (Şekil 12).

**Şekil 12** : 3-O-MG transportuna glikoz konsantrasyonunun etkisi

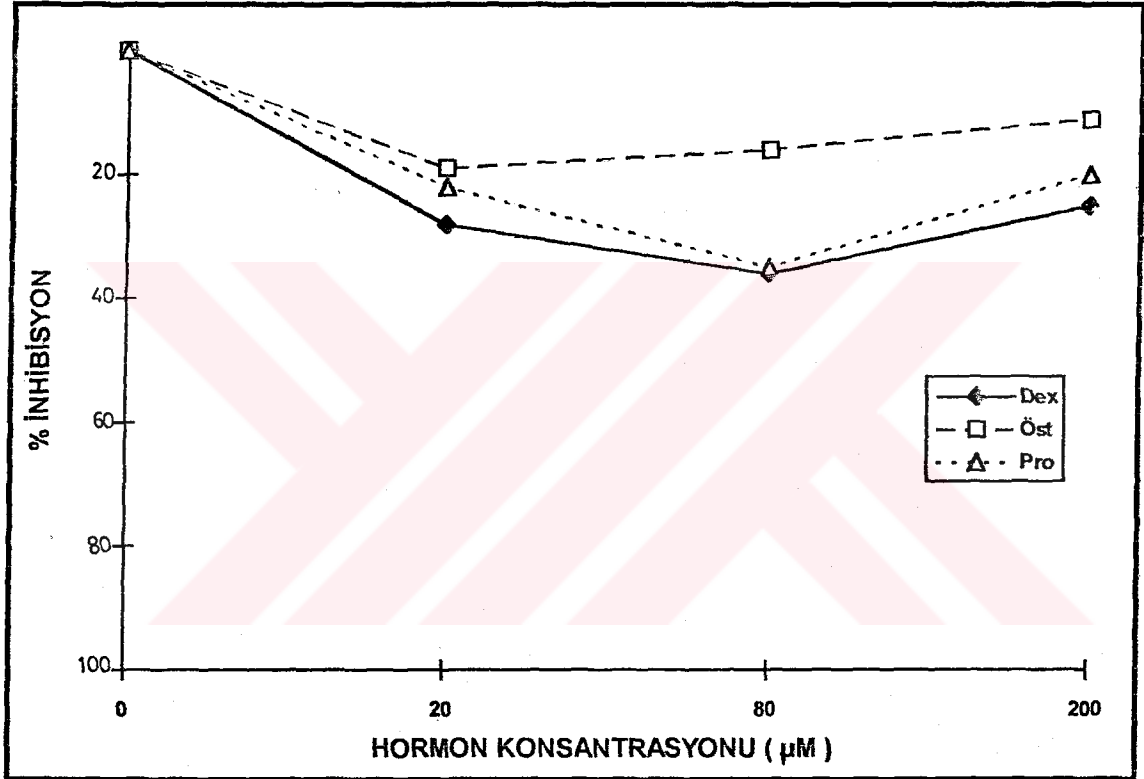


$1.0 \times 10^6$  hücre, 5- 40  $\mu\text{mol/l}$  3-O-MG konsantrasyonlarında metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.

#### 4- MNH'lerdeki 3-O-MG transportunun farklı hormonlarla inhibisyonu:

Dekzametazon, progesteron ve 17- $\beta$ -östrodiolün 3-O-MG transportuna etkisi incelendiğinde : 20  $\mu\text{mol/l}$  hormon konsantrasyonunda : Dekzametazon %28, 17- $\beta$ -östrodiol %19, progesteron %22 ; 80  $\mu\text{mol/l}$  hormon konsantrasyonunda : Dekzametazon %36, 17- $\beta$ -östrodiol %16, progesteron %35 ; 200  $\mu\text{mol/l}$  hormon konsantrasyonunda : Dekzametazon %25, 17- $\beta$ -östrodiol %11, progesteron %20 oranında transportu inhibe ettiği görüldü ( Şekil 13 ).

Şekil 13 : 3-O-MG transportuna dekzametazonun , 17- $\beta$ -östrodiolin ve progesteronun etkisi



$1.0 \times 10^6$  MNH 20, 80 ve 200  $\mu\text{M}$  dekzametazon (Dex), progesteron (Pro) ve 17- $\beta$ -östrodiol (Öst) ile 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra, 20  $\mu\text{mol/l}$  3-O-MG konsantrasyonunda metod kısmında izah edildiği gibi inkübe edildi.

## II ) Hasta ve Kontrol Gruplarının GR ve 3-O-MG Transport Sonuçları

HHA sistemindeki regülasyon bozukluğu ve enzim eksikliği sonucu ortaya çıkan ve kortizol sentezini etkileyen dört hastalık grubunda yaptığımız çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir. Ayrıca hasta gruplarını karşılaştırdığımız kontrol grupların da, kendi aralarında yaş ve cinsiyet yönünden kıyasladık.

**1- Erişkin ve çocuk kontrol gruplarının GR sayısı, afinitesi ve 3-O-MG transportu yönünden incelenmesi :** Normal erişkin ve normal çocuk gruplarının plazma kortizol ( $14.3 \pm 8.3 \mu\text{g/dl}$  vs  $13.9 \pm 4.6 \mu\text{g/dl}$ ,  $p>0.05$ ) ve açlık glikoz ( $92.3 \pm 5.6 \text{ mg/dl}$  vs  $86.3 \pm 18.9 \text{ mg/dl}$ ,  $p>0.05$ ) seviyeleri arasında da anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Her iki grubun, GR sayısı ( $6234 \pm 1568$  reseptör/hücre vs  $6816 \pm 1647$  reseptör/hücre,  $p>0.05$ ) ve afinitesi ( $4.56 \pm 0.68 \text{ nM}$  vs  $4.23 \pm 0.74 \text{ nM}$ ,  $p>0.05$ ) incelendiğinde anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 18). Her iki grubun 3-O-MG transport seviyeleri arasında da anlamlı bir fark yoktur ( $46.25 \pm 12.92 \text{ fmol}/10^6 \text{ hücre x dak}$  vs  $61.15 \pm 23.15 \text{ fmol}/10^6 \text{ hücre x dak}$ ,  $p>0.05$ ) (Tablo 5).

Her iki kontrol grubunun sonuçları (GR sayısı, afinite, 3-O-MG transportu, plazma kortizol ve açlık glikozu) cinsiyete göre değerlendirildiklerinde, bütün parametreler arasında hem erişkin hem de çocuk kontrollerde cinsiyet yönünden anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4 :** Erişkin kontrol ile çocuk kontrolün karşılaştırılması

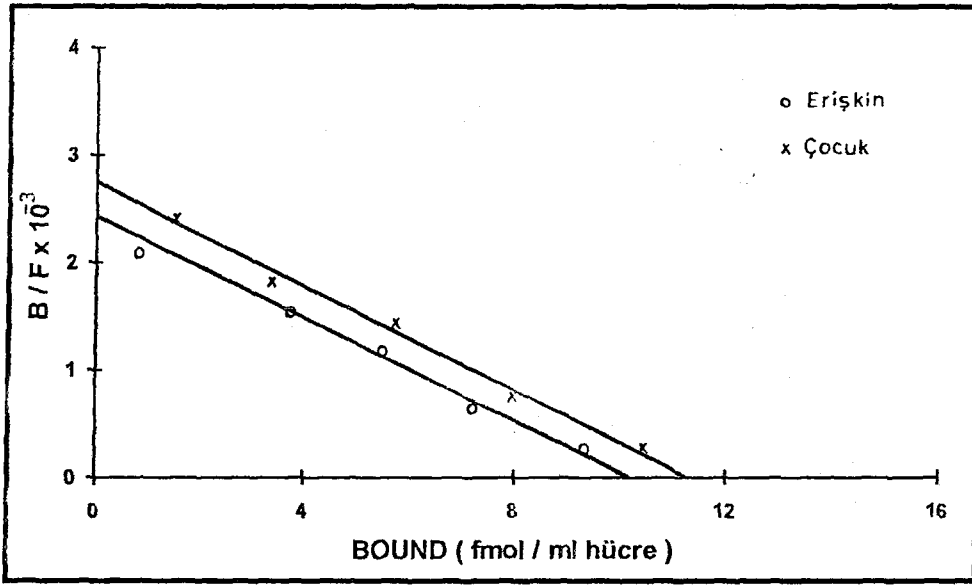
	ÇOCUK KONTROL		ERİŞKİN KONTROL	
	ERKEK	KADIN	ERKEK	KADIN
n	5	5	5	5
GR sayısı (reseptör/hücre)	$6816 \pm 1575$	$6816 \pm 1903$	$6312 \pm 1143$	$6156 \pm 2053$
GR afinitesi (Kd) (nM)	$4.53 \pm 0.92$	$3.90 \pm 0.43$	$4.29 \pm 0.63$	$4.82 \pm 0.66$
3O-MG Transport ( $\text{fmol}/10^6 \text{ hücrexdak}$ )	$61.68 \pm 28.34$	$60.63 \pm 20.06$	$48.77 \pm 12.05$	$43.73 \pm 14.65$
KORTİZOL ( $\mu\text{g/dl}$ )	$16.6 \pm 4.9$	$11.7 \pm 2.6$	$15.1 \pm 8.4$	$13.9 \pm 8.0$
GLİKOZ ( $\text{mg/dl}$ )	$79.7 \pm 5.5$	$92.8 \pm 24.0$	$102.1 \pm 6.3$	$82.5 \pm 4.8$

**Tablo 5 :** Erişkin kontrol ve çocuk kontrol grubunu oluşturan bireylerin GR parametresi ile 3-O-MG transport değerleri

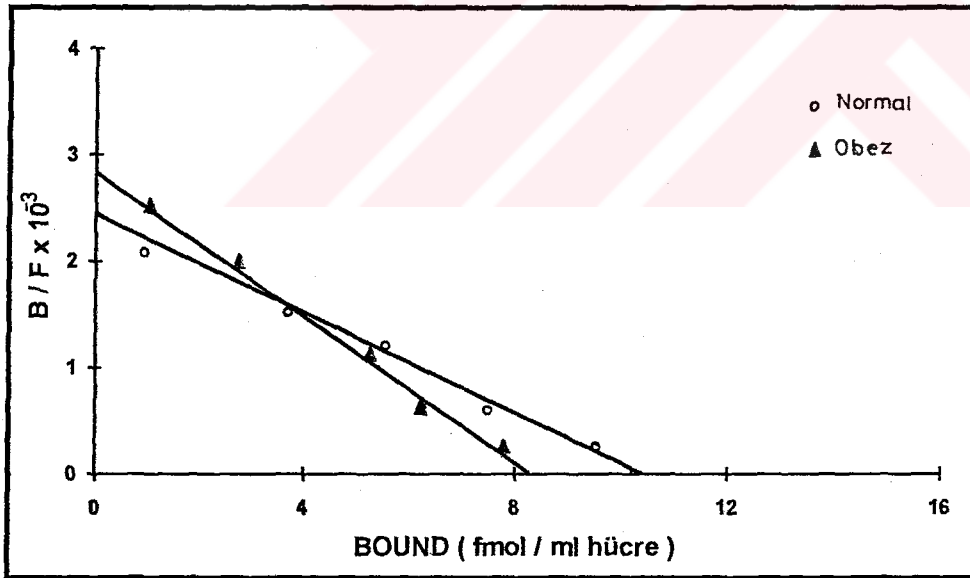
ERİŞKİN KONTROL					ÇOCUK KONTROL				
NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)	NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)
1	25 / E	8040	4.12	33.22	1	8 / K	4260	3.94	38.25
2	27 / E	5880	3.50	50.71	2	7 / E	5880	5.15	22.87
3	33 / K	9600	5.62	36.75	3	6 / E	6300	5.25	85.21
4	23 / K	5700	3.90	30.28	4	4 / K	6480	4.50	52.50
5	25 / E	4920	4.44	39.84	5	7 / E	8520	4.30	46.68
6	27 / E	6120	4.16	59.20	6	11 / K	9360	3.39	53.19
7	27 / K	4440	5.28	65.53	7	13 / K	7800	4.06	68.05
8	38 / E	6600	5.23	60.90	8	10 / E	8400	4.91	92.14
9	20 / K	6240	4.73	34.30	9	9 / K	6180	3.81	91.17
10	32 / K	4800	4.57	51.79	10	8 / E	4980	3.02	61.50
	<b>28 ± 5</b>	<b>6234 ± 1568</b>	<b>4.56 ± 0.68</b>	<b>46.25 ± 12.92</b>		<b>8 ± 3**</b>	<b>6816 ± 1647*</b>	<b>4.23 ± 0.74*</b>	<b>61.15 ± 23.15*</b>

\*p > 0.05, \*\*p < 0.001 vs normal erişkin

Şekil 18: Normal erişkin ve normal çocuk grub scatchart analizi



Şekil 14: Obez ve normal erişkin grub scatchart analizi



**2- Obezite :** Tablo 6'da görüldüğü gibi obez hastaların plazma kortizol düzeyleri normal sınırlarda olmasına rağmen, GR sayısında ve  $K_d$  değerinde anlamlı derecede azalma tespit edildi (Şekil 14 ). BMI değerlerinin ise normal gruba kıyasla anlamlı derecede arttığı görüldü.

Obez hastaların açlık glikoz değerleri normal düzeyde olmasına rağmen ve 3-O-MG transportunda anlamlı derecede azalma tespit edildi (Tablo 7 ).

**Tablo 6 :** Obez ve kontrol grubu değerlerinin kıyaslanması

	OBEZ	ERİŞKİN KONTROL	p
n	11	10	
GR Miktarı (reseptör/hüc.)	4855 ± 1389	6234 ± 1568	< 0.05
GR Afinitesi (nM)	2.92 ± 0.84	4.55 ± 0.67	< 0.001
3-O-MG Transportu (fmol/10 <sup>6</sup> hücre x dak)	31.90 ± 8.20	46.26 ± 12.91	< 0.01
BMI ( kg / m <sup>2</sup> )	33.9 ± 4.3	23.4 ± 3.2	< 0.001
Plaz. Kortizolü (µg/dl )	11.9 ± 2.9	14.3 ± 8.3	> 0.05
Açlık Glikozu (mg/dl )	85.3 ± 8.7	92.3 ± 5.6	> 0.05

Tablo 7 : Obez ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin GR parametresi ile 3-O-MG transport değerleri

OBEZ					ERİŞKİN KONTROL				
No	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)	NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)
1	23/K	2400	2.00	25.68	1	25/E	8040	4.12	33.22
2	34/E	3600	3.00	36.75	2	27/E	5880	3.50	50.71
3	37/K	6750	2.68	40.78	3	33/K	9600	5.62	36.75
4	26/K	3600	2.40	41.06	4	23/K	5700	3.90	30.28
5	29/K	4920	3.57	19.87	5	25/E	4920	4.44	39.84
6	36/E	6600	3.44	34.96	6	27/E	6120	4.16	59.20
7	30/K	5260	5.03	26.90	7	27/K	4440	5.28	65.53
8	25/K	4200	2.50	37.50	8	38/E	6600	5.23	60.90
9	35/E	4260	2.58	19.30	9	20/K	6240	4.73	34.30
10	26/K	5520	2.48	28.35	10	32/K	4800	4.57	51.79
11	27/K	6300	2.40	39.84					
	<b>29 ± 8*</b>	<b>4855 ± 1389**</b>	<b>2.92 ± 0.84***</b>	<b>31.9 ± 8.2****</b>		<b>28 ± 5</b>	<b>6234 ± 1568</b>	<b>4.55 ± 0.67</b>	<b>46.3 ± 12.9</b>

\*p > 0.05, \*\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.01 vs normal erişkin

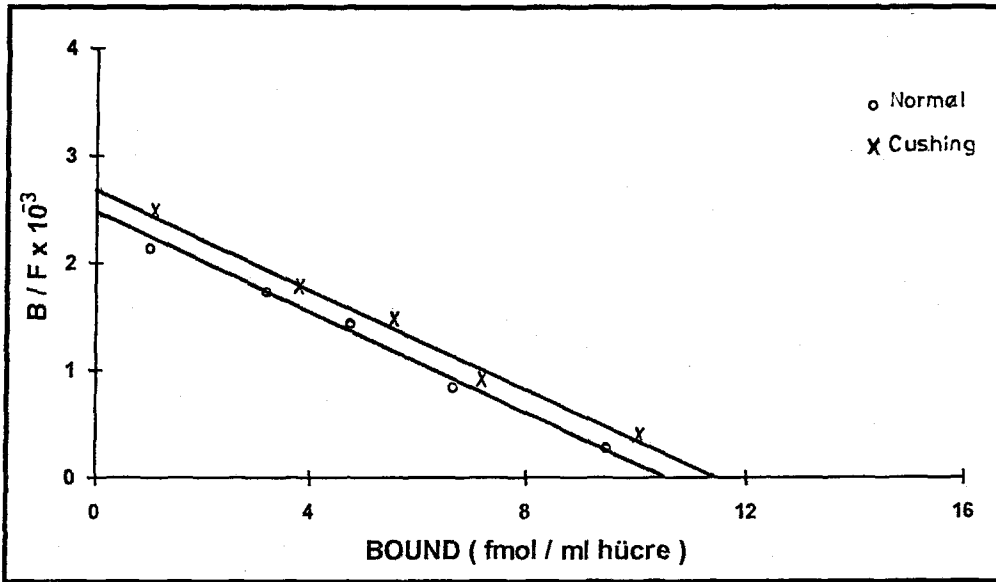
**3- Cushing sendromu :** Tablo 8'de görüldüğü gibi, Cushing sendromlu hastaların plazma kortizol düzeyleri normal gruba göre anlamlı derecede artmış olmasına rağmen, GR parametreleri ( reseptör sayısı ve afinitesi ) normal sınırlar içinde tespit edildi (Şekil 15). BMI'in ise normal gruba göre arttığı görüldü.

Cushing sendromlu hastaların açlık plazma glikoz düzeyleri ve 3-O-MG transportu normal sınırlar içinde tespit edildi (Tablo 9).

**Tablo 8 :** Cushing sendromu ve kontrol grubu sonuçlarının kıyaslanması

	CUSHING SENDR.	ERİŞKİN KONTROL	P
n	10	10	
GR Miktarı (reseptör/hüc.)	6513 ± 1255	6234 ± 1568	> 0.05
GR Afinitesi (nM)	4.20 ± 1.30	4.55 ± 0.67	> 0.05
3-O-MG Transportu (fmol/10 <sup>6</sup> hücre x dak)	48.1 ± 20.4	46.3 ± 12.9	> 0.05
BMI ( kg / m <sup>2</sup> )	29.6 ± 5.7	23.4 ± 3.2	< 0.05
Plaz. Kortizolü (µg/dl)	38.6 ± 10.3	14.3 ± 8.3	< 0.001
Açlık Glikozu (mg/dl)	95.6 ± 6.8	92.3 ± 5.6	> 0.05

**Şekil 15:** Cushing sendromu ve normal erişkin grub scathart analizi





Tablo 9 : Cushing sendromu ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin GR parametreleri ve 3-O-MG transport değerleri

CUSHING SENDROMU					ERİŞKİN KONTROL				
NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)	NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)
1	38 / K	5280	5.02	48.78	1	25 / E	8040	4.12	33.22
2	13/ K	6480	3.92	48.65	2	27/ E	5880	3.50	50.71
3	26 / K	6900	2.39	44.15	3	33 / K	9600	5.62	36.75
4	31 / K	7560	2.14	26.43	4	23 / K	5700	3.90	30.28
5	24 / E	4560	3.30	41.06	5	25 / E	4920	4.44	39.84
6	27 / K	6480	6.00	58.72	6	27 / E	6120	4.16	59.20
7	13 / K	8880	4.23	97.12	7	27 / K	4440	5.28	65.53
8	27 / K	7200	5.33	55.12	8	38 / E	6600	5.23	60.90
9	33 / K	5280	5.50	23.80	9	20 / K	6240	4.73	34.30
10	26 / E	6513	4.20	40.38	10	32 / K	4800	4.57	51.79
	26 ± 8*	6513 ± 1255*	4.20 ± 1.30*	48.1 ± 20.4*		28 ± 5	6234 ± 1568	4.56 ± 0.68	46.3 ± 12.9

\*p > 0.05 vs normal erişkin

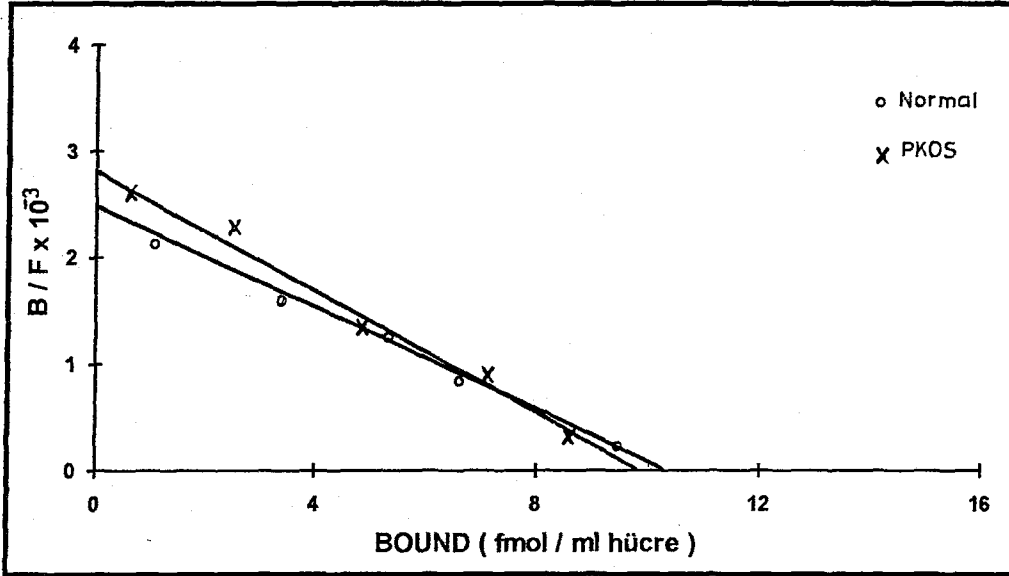
4- Polikistik over sendromu : Tablo 10'da görüldüğü gibi polikistik over hastalarının plazma kortizol düzeyleri ve GR parametreleri (GR miktarı ve afinitesi) normal sınırlar içinde tespit edildi (Şekil 16), BMI' değeri ise anlamlı olarak yüksek bulundu.

Açlık plazma glikoz düzeyi ve 3-O-MG transportu normal sınırlar içinde tespit edildi (Tablo 11).

Tablo 10 : PKOS ve kontrol grub sonuçlarının kıyaslanması

	PKOS	ERİŞKİN KONTROL	P
n	10	10	
GR Miktarı (reseptör/hüc.)	6592 ± 911	6234 ± 1568	> 0.05
GR Afinitesi (nM)	3.91 ± 0.79	4.55 ± 0.67	> 0.05
3-O-MG Transportu (fmol/10 <sup>6</sup> hücre x dak)	41.2 ± 13.0	46.3 ± 12.9	> 0.05
BMI (kg / m <sup>2</sup> )	29.9 ± 5.6	23.4 ± 3.2	< 0.05
Plaz. Kortizolü (µg/dl)	10.8 ± 5.2	14.3 ± 8.3	> 0.05
Açlık Glikozu (mg/dl)	97.8 ± 10.8	92.3 ± 5.6	> 0.05

Şekil 16: PKOS ve normal erişkin grub scatchart analizi



**Tablo 11** : PKOS ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin GR parametresi ile 3-O-MG transport değerleri

PKOS					ERİŞKİN KONTROL				
NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd ( nM )	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)	NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res./hüc.)	Kd ( nM )	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)
1	24 / K	7920	2.54	37.15	1	25 / E	8040	4.12	33.22
2	22 / K	5400	3.00	28.59	2	27 / E	5880	3.50	50.71
3	36 / K	7320	4.51	45.84	3	33 / K	9600	5.62	36.75
4	20 / K	6720	3.73	45.16	4	23 / K	5700	3.90	30.28
5	18 / K	7020	5.31	49.21	5	25 / E	4920	4.44	39.84
6	21 / K	4920	4.43	59.34	6	27 / E	6120	4.16	59.20
7	18 / K	6240	3.85	13.62	7	27 / K	4440	5.28	65.53
8	25 / K	7200	3.91	50.34	8	38 / E	6600	5.23	60.90
9	26 / K	6220	3.53	35.09	9	20 / K	6240	4.73	34.30
10	20 / K	6964	4.29	47.26	10	32 / K	4800	4.57	51.79
	<b>23 ± 6*</b>	<b>6592 ± 911*</b>	<b>3.91 ± 0.79*</b>	<b>41.2 ± 13.0*</b>		<b>28 ± 5</b>	<b>6234 ± 1568</b>	<b>4.56 ± 0.68</b>	<b>46.3 ± 12.9</b>

\*p > 0.05 vs normal erişkin

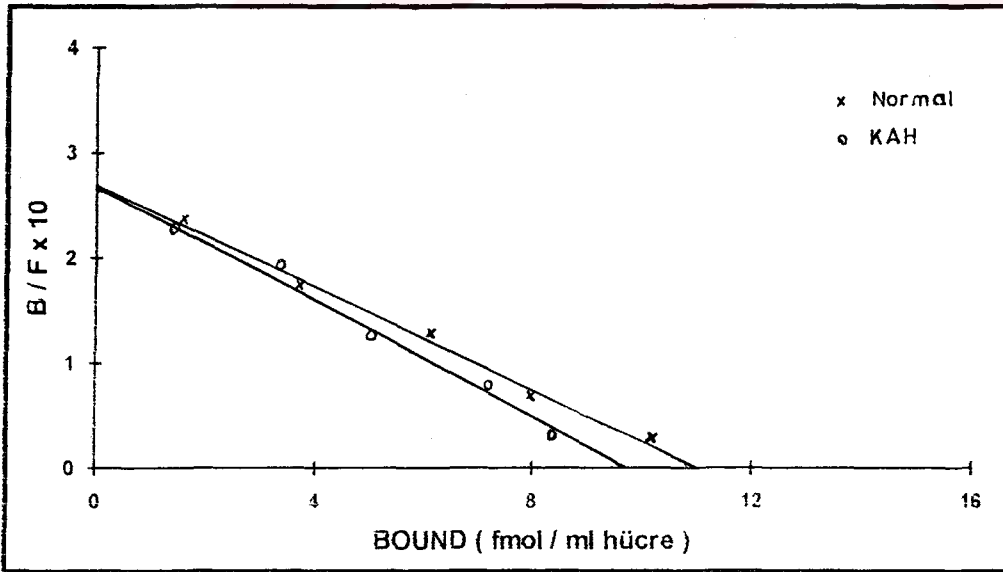
**5- Konjenital adrenal hiperplazi :** Tablo 12'de görüldüğü gibi KAH'li hastaların plasma kortizol düzeyleri çocuk kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olmasına rağmen, GR sayı ve afinitesinde ise anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 17).

KAH'li hastaların açlık glikoz değerlerinde ve 3-O-MG transportunda herhangi bir fark tespit edilememiştir (Tablo 13).

**Tablo 12 :** KAH ve kontrol grubu sonuçlarının kıyaslanması

	KAH	ÇOCUK KONTROL	P
n	10	10	
GR Miktarı (reseptör/hüc.)	5814 ± 1574	6816 ± 1647	> 0.05
GR Afinitesi (nM)	3.61 ± 1.51	4.23 ± 0.74	> 0.05
3-O-MG Transportu (fmol/10 <sup>6</sup> hücre x dak)	54.3 ± 27.2	61.2 ± 23.2	> 0.05
Plaz. Kortizolü (µg/dl)	4.52 ± 3.9	14.2 ± 4.8	< 0.001
Açlık Glikozu (mg/dl)	88.6 ± 6.4	86.33 ± 18.9	> 0.05

**Şekil 17:** KAH ve çocuk kontrol grub scatchart analizi



Tablo 13 : KAH ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin GR parametresi ile 3-O-MG transport değerleri

KAH					ÇOCUK KONTROL				
NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res../hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)	NO	YAŞ CİNS	RESEPTÖR (res../hüc.)	Kd (nM)	3-O-MG TRAS. (fmol/10 <sup>6</sup> hüc. x dak.)
1	8 / K	7500	3.38	40.31	1	8 / K	4260	3.94	38.25
2	9 / E	4200	3.34	24.75	2	7 / E	5880	5.15	22.87
3	5 / K	5100	1.57*	40.40	3	6 / E	6300	5.25	85.21
4	13 / E	4320	1.60*	65.71	4	4 / K	6480	4.50	52.50
5	3 / E	6960	3.13	24.84	5	7 / E	8520	4.30	46.68
6	5 / E	6240	4.62	32.62	6	11 / K	9360	3.39	53.19
7	14 / K	5340	2.41	65.43	7	13 / K	7800	4.06	68.05
8	10 / K	5520	2.04	26.81	8	10 / E	8400	4.91	92.14
9	11 / E	7920	6.28	119.06	9	9 / K	6180	3.81	91.17
10	12 / K	5640	3.42	44.62	10	8 / E	4980	3.02	61.50
11	12 / K	9240	2.96	65.53					
12	8 / E	5100	5.66	54.30					
13	5 / E	4300	5.38	62.06					
14	6 / K	4020	4.78	93.87					
	<b>8.9 ± 3.5*</b>	<b>5814 ± 1574*</b>	<b>3.61 ± 1.51*</b>	<b>54.3 ± 27.2*</b>		<b>8.4 ± 2.9</b>	<b>6816 ± 1647</b>	<b>4.23 ± 0.74</b>	<b>61.2 ± 23.2</b>

\*p > 0.05 vs çocuk kontrol

## TARTIŞMA

### NORMAL SONUÇLAR

GR'leri çeşitli dokularda tespit edilmiştir (6, 37). Glikokortikoid hormonların biyolojik aktivitelerinin GR konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (152). GR patolojisinden kuşkulanan birçok hastalıkta, GR çalışmaları için glikokortikoid hormonların hedef hücrelerden biri olan MNH'ler kullanılmıştır (34, 50, 134). Bizde çalışmalarımızda GR deneyleri için MNH'leri kullandık. Çalıştığımız hasta gruplarının sonuçlarını iki farklı yaş grubundaki kontrol grupları ile kıyasladık.

Optimum GR düzeyine genel olarak 5-15 post-natal günlerde ulaşıldığı ve reseptör düzeyinin bundan sonraki gelişim süreci boyunca değişmediği bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar ise gelişim süresi boyunca GR miktarının değiştiğini, bunun sebebinin ise maturasyona bağlı olarak dokuların glikokortikoidlere olan hassasiyetlerinin farklı olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir (73).

GR'lerin yaşlanmaya bağlı değişimi çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar yaşlanmayla GR miktarının azaldığını fakat afinitenin değişmediğini (129), bazı araştırmacılar hem GR miktarının hem de GR afinitesinin azaldığını (131), bazı araştırmacılar ise her iki parametrenin değişmediğini (72) bildirmişlerdir.

İnsan dokuları ile yapılan çalışmalarda, genel olarak yaşlanmayla GR parametrelerinde herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir (70, 143). Bir kaç çalışmada çok genç grupla , çok yaşlı grup arasında reseptör miktarı açısından anlamlı bir fark tespit edilmiş olup, yaşlanmayla reseptör miktarının azaldığı, afinitenin değişmediği bildirilmiştir (128, 153).

Bizim kontrollerimiz genç ( $8 \pm 2$  yıl) ve yetişkin ( $28 \pm 5$  yıl) gruplardan oluşmuş olup, bu iki grup arasında GR parametreleri açısından herhangi bir fark tespit edilememiştir. Literatürlerde de bu yaş grupları arasında herhangi bir farka rastlanmamıştır (153).

MNH'lerdeki GR miktarının 5000-10000 reseptör/hücre arasında olduğu bildirilmektedir (144), kontrol gruplarımızın GR sonuçlarında literatürlerle uyum içindedir (134, 153).

GR'lerinde cinsiyete bağlı bir değişim literatürlerde tespit edilmemiştir (70, 153). Bizim çalışmamızda da her iki kontrol grubunu oluşturan bireyler arasında cinsiyete bağlı bir değişim saptanmamıştır.

GR'üne [ $^3\text{H}$ ]-dekzametazon bağlanmasının farklı hormonlarla inhibisyon çalışmaları, GR için dekzametazonun spesifikliğini göstermek amacıyla yapıldı. [ $^3\text{H}$ ]-dekzametazon bağlanmasının soğuk 200  $\mu\text{mol/l}$  dekzametazonla % 68 inhibisyonu GR'lerinin dekzametazona

yüksek afinitesini gösterir. Bu sonuç diğer literatürlerle de uyum içindedir (169). Diğer taraftan [<sup>3</sup>H]-dekzametazon bağlanmasını, 200 µmol/l progesteron %14, 200 µmol/l östrodiol ise %9 oranında inhibe etmektedir. Literatürlerde progesteronun [<sup>3</sup>H]-dekzametazona bağlanmasını %14-53, östrodiolün ise %1-10 arasında inhibe ettiği bildirilmiştir (8, 50, 67). Bu sonuçlar özellikle progesteronun GR için belirli bir agonist etkiye sahip olduğunu gösterir. Östrodiol ise daha az agonist etkiye sahiptir.

GR'lerine [<sup>3</sup>H]-dekzametazon bağlanmasının optimum koşulları bizim deney sistemimizde; 6x10<sup>6</sup> hücre, 40 nmol/l [<sup>3</sup>H]-dekzametazon konsantrasyonu, 2 saat inkübasyon olarak tespit edilmiş olup, bu bağlanma 80 µmol/l dekzametazon ile en fazla % 65 oranında inhibe olmaktadır.

Glikokortikoidlerin periferel dokulardaki glikoz transportunu inhibe ettiği bilinmektedir (64). Glikokortikoidlerin bu etkisinin spesifik reseptörler vasıtasıyla gerçekleştiği ve GR sayısı ile glikoz transportu arasında ters bir ilişkinin bulunduğu *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (154).

3-O-MG, D-glikozun metabolize olmayan bir analogudur ve kolaylaştırılmış difüzyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (113). Kontrol grubumuzun MNH'lerindeki 3-O-MG transport sonuçları (35) ve 3-O-MG transportunun kinetik çalışmaları literatürle uyum göstermektedir (9, 35).

Glikokortikoidlerin 3-O-MG transportunu inhibe etme oranı, östrodiol ve progesteronla kıyaslandığında; dekzametazonun 80 µmol/l'de % 36, östrodiolün 80 µmol/l'de % 19 ve progesteronun 80 µmol/l'de % 36 oranında 3-O-MG transportunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu üç steroid hormonun 3-O-MG transportunu inhibe etme oranları, [<sup>3</sup>H]-dekzametazonun GR'üne bağlanmasının aynı hormonlarla inhibisyonu ile paralellik göstermektedir. Literatürle kıyaslandığında, dekzametazonun 3-O-MG transportunu yaklaşık % 40, östrodiolün % 10 ve progesteronun % 30 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir (154).

## OBEZİTE

Obez deney hayvanlarında GR'leriyle yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilerek (60, 84, 164), GR'lerinin obezitenin gelişmesinde önemli rol oynayabileceği sunucuna varılmıştır (85, 111).

Obez hastalarda gözlenen kortizol metabolik klirens artışının, GR parametrelerini etkileyebileceği düşünülmüştür (126). Özellikle abdominal obez hastaların viseral adipositlerinde diğer adipoz dokulara nazaran daha fazla miktarda GR'ünün bulunması (20), kortizolün metabolik klirens artışına bağlanabilir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise obez hastaların MNH'lerdeki GR sayısında ve Kd değerinde azalma tespit edilmiştir.

Kalinyak ve arkadaşları, glikokortikoid fazlalığı ve azlığı durumlarında GR sayısında dokuya spesifik bir regülasyonun gerçekleştiğini göstermişlerdir (74).

Gerçekte obez falfa sıçanlarında kortikosteroidler normal seviyede olmasına rağmen hipotalamus ve hipokampustaki GR sayısında artma görülmüş, karaciğerdeki reseptör sayısında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Adrenalektomiye rağmen GR sayısında herhangi bir değişikliğin olmaması, falfa sıçan beyninde diğer dokulara nazaran GR'lerin anormal olarak regüle edildiğini göstermektedir (86).

Obezitedeki gibi RA'li hastalarda adrenal sekresyon artmakta, kortizol sirkadyen ritmi bozulmakta ve kortizol düzeyi genellikle artmış veya normal seviyede bulunmaktadır (109). RA'li hastaların kortizol düzeyi değişmemesine rağmen, GR sayısı normal gruba göre düşüktür. Bu azalma sebebinin RA'li hastalardaki immün-HHA sisteminin bozukluğundan kaynaklanabileceği söylenmiştir (134). RA'in etyolojisinde immün sistem bozukluğu rol oynamasına rağmen, obezitenin etyolojisinde birçok faktör ( genetik, nöral, hormonal, metabolik, besinsel, psikolojik ve sosyoekonomik faktörler ) rol oynamaktadır (132).

HHA sistemi bozulmuş hastalarla yapılan bir çalışmada, obezite ve oligomenore bulgusu taşıyan bir hastada GR sayısında ve Kd değerinde bizim bulgularımıza benzer azalma tespit edilmiştir (162).

MNH'lerdeki GR sayı ve Kd değerinin azalması, MNH'lerdeki GR regülasyonunu etkileyen faktörlerden dolayı olabilir. GR regülasyonunda hücrenin enerji metabolizmasındaki değişikliklerin de rol oynadığı gösterilmiştir (150).

IM-9 kültür lenfositleriyle yapılan bir çalışmada, glikoz kullanımını kısıtlayıcı ortamda IM-9 lenfositlerinin hem ATP seviyesinde hem de GR'lerinin ligand bağlama kapasitesinde azalma tespit edilmiştir. Bu durum GR aktivitesinin hücrenin glikoz kullanımı ve ATP düzeyiyle direkt ilişkisini gösterir (163).

GR'lerinin hücresel sükülüslerinde ATP'ye olan bağımlılıkları gösterilmiştir (Şekil 4). ATP seviyesindeki azalma hücrede hormon bağlayamayan GR'lerinin birikmesine yol açmaktadır. GR deney sistemlerinde hücrede tespit edilebilen GR'leri hormon bağlayabilen reseptörler olduğundan, hormon bağlayamayan GR'lerin sayısının artması hormon bağlayan GR sayısının azalması gibi yansiyabilir (15).

Bizim obez hasta grubumuzda tespit ettiğimiz GR sayısındaki azalmada, obezitenin patogenezinde rol oynayan metabolik değişikliklerin de rolü olabilir. Obezlerde yapılan çalışmalar, obezlerdeki metabolik bozuklukların dokuların ATP kullanımını etkileyebileceğini göstermiştir (132).



Septik şoktaki hastalarla yapılan bir çalışmada, bu hastalarda tespit edilen GR sayısındaki azalmanın nedeni olarak, şok durumunda enerji metabolizmasında meydana gelen değişikliklerin ATP düzeyini etkileyebileceği ve buna bağlı olarak GR sayısını azalabileceği düşünülmüştür (171).

Obez hastaların MNH'lerindeki 3-O-MG transportunun azalması bu düşüncemizi desteklemektedir. 3-O-MG transportu % 34 oranında azalırken, GR sayısında % 22 oranında azalmıştır. GR sayısındaki azalmaya paralel olarak Kd değerinde % 36 oranında azalma olmuştur. Reseptör miktarındaki azalmanın neticesi olarak, reseptörlere bağlanacak ligand miktarında da (Kd) azalmanın olması (afinitenin artması) normal bir sonuçtur.

Obez hastalarda GR sayısı ile 3-O-MG transportu arasında *in vitro* daki sonuçların aksine paralel bir ilişkinin bulunmaması, obezitedeki insülin rezistansına bağlı olabilir. Obez deney hayvan modelleri ve obez insanlarda yapılan çalışmalar, obezitedeki insülin rezistansının glikoz transport protein sayısındaki azalmadan veya insülinin hücre içindeki glikoz transport proteinlerinin plazma membranına translokasyonunu uyaramamasından kaynaklanabileceğini göstermiştir (30, 47, 63, 143).

MNH'lerdeki glikoz transport proteinlerin izoformları tam olarak tespit edilememişse de monoklonal antikolarla yapılan çalışmalar, bu hücrelerde insüline duyarlı GLUT1'lerin mevcudiyetini göstermiştir (35).

Obez hastaların 3-O-MG transportunda tespit ettiğimiz azalmanın sebebi, insülin rezistansına bağlı olarak glikoz transport proteinlerin fonksiyon ve miktarındaki azalmadan kaynaklanabilir. Bu hücrelerin enerji metabolizmasındaki değişiklikler GR bağlanma kapasitesini etkileyebileceği gibi glikoz transportunda etkileyebilir. MNH'ler gibi GLUT1 proteinine sahip eritrositlerde Carruthers ve arkadaşlarının (23) yaptığı bir çalışmada ATP seviyesinin GLUT1 protein fonksiyonunu değiştirdiği gösterilmiştir.

Obez hastalarda lipoprotein metabolizmasının bozulduğu bildirilmiştir (36). Bunun sonucunda plazmadaki serbest yağ asit (FFA) artışı, glikoz oksidasyonunun inhibisyonu ve glikoz-6-fosfat miktarının artması yoluyla periferel glikoz transportunu azaltır (41). Bizimde obez hastalarımızdaki FFA miktarının yüksek oluşu, 3-O-MG transportundaki azalmanın bir nedenini oluşturabilir.

## **POLİKİSTİK OVER SENDROMU**

Son yıllarda PKOS'nun patogenezinde HHA sistem ve adrenal korteks fonksiyon bozukluğunun rolünü araştıran birçok çalışma yapılmıştır (44, 99).

11-β-hidroksisteroid dehidrogenaz (11β-HSD) aktif kortizolün inaktif kortizona dönüşümünden sorumlu mikrozomal bir enzimdir (165). Özellikle karaciğer ve böbrekte bulunan bu enzimin 11β-dehidrogenaz ve 11-oxo-redüktaz olmak üzere iki ayrı formu vardır.

11 $\beta$ -HSD enzimin konjenital eksikliği, AME ( Apparent mineralocorticoid excess = Mineralokortikoid fazlalığı ) sendromuna yol açar (48, 120, 146).

Enzim eksikliğinde aktif kortizol miktarının artması kortizolün klirensini artırır. Bunu kompanse edecek kortizol üretimindeki artışla normal kortizol konsantrasyonu sağlanır. Fakat bu arada ACTH'na bağlı androjen artışıda meydana gelir. Bu durumun görüldüğü kadınlarda hiperandrojeneminin klinik bulguları ortaya çıkar. Bu bulguların ışığı altında, PKOS'nun patogenezinde adrenal bezin rolünün olabileceği düşünülmüştür. Rodin ve arkadaşlarının PKOS'lu hastalar üzerinde geniş çapta yaptıkları bir çalışmada kortizol 11-oxo-redüktaz aktivitesinde orta derecede bir bozukluk tespit etmişlerdir (148).

Yapılan diğer çalışmalarda da HHA sistemin regülasyon bozukluğuna bağlı olarak, PKOS'lu hastaların adrenal bezinin hiperfonksiyonu tespit edilmiştir (88, 99, 124, 127).

HHA sistem regülasyon bozukluğunun GR otheregülasyonundaki rolünü inceleyen çalışmalar vardır. Atopik dermatit hastalarındaki HHA sistem regülasyon bozukluğunun GR parametrelerine etkisini inceleyen bir çalışmada, GR parametrelerinde herhangi bir farklılık gösterilmemiştir (131). Alzheimer hastalığındaki HHA regülasyon sistem bozukluğunun GR parametrelerine etkisini inceleyen bir başka çalışmada da GR parametrelerinde herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir (130).

Bizim PKOS'lu hasta grubunun, GR parametreleri üzerine yaptığımız çalışmada, GR sayısında veya afinitesinde herhangi bir farklılık saptanamamıştır. Bu bulgularımız, HHA sistem ile GR arasında ilişkiyi araştıran çalışmalarda elde edilen bulguları desteklemektedir. PKOS'lu hastalardaki HHA sistem hiperfonksiyonu GR parametrelerinde herhangi bir değişiklik yapmadan, hastaların hiperandrojenemisinde rol oynamaktadır.

PKOS'lu hastalarda glikoz metabolizmasını bozan insülin rezistansı sık görülen bir bulgu olmasına rağmen (21, 58, 87), bizim incelediğimiz hasta grubunun açlık glikoz seviyesi ve 3-O-MG transportu normal sınırlar içindedir. Hasta grubumuzun GR parametreleri değişmediğinden, 3-O-MG transportunda da herhangi bir değişiklik beklenmemektedir.

## CUSHING SENDROMU

Glikokortikoidler için hedef hücrelerden biri olan periferik MNH'ler, spesifik olarak ve yüksek afiniteyle glikokortikoidlere bağlanan reseptörleri içerdiklerinden, steroid reseptör regülasyon çalışmaları için ideal hücrelerdir (153). Sentetik glikokortikoidlerin MNH'deki GR'lerin down-regülasyonuna yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (169)..

Bununla beraber reseptör down-regülasyonunun derecesi steroidin cinsine ve etki süresine bağlıdır. Sıçan hepatoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda, hücrelerin

dekzametazonla 6 saat muamelesi GR'lerin % 50-95'inin down-regülasyonuna yol açarken, 72 saatlik muameleden sonra reseptörler normal seviyelerine dönmüştür (112). Benzer çalışmalarda da steroidin *in vitro* etki süresinin uzamasının reseptör down-regülasyonunun gücünü azalttığı bildirilmiştir (150).

Biz de hipofizer Cushing hastalarında yaptığımız çalışmada, endojen hiperkortizoleminin GR sayısında ve afinitesinde herhangi bir değişiklik yapmadığını tespit ettik. Cushing hastalarında yapılan diğer çalışmalarda da GR parametrelerinde herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir (18, 78, 119).

Ketoconazole adrenal bezdeki kortizol sentezini, sitokrom P450 hidroksilazı inhibe ederek durdurur. Ayrıca direkt olarak ACTH sentez ve sekresyonunu da azaltır. Bu özellikleriyle hiperkortizoleminin görüldüğü hastalarda yaygın olarak kullanılır (168). Cushing hastalarındaki kortizol seviyesi ketoconazole tedavisinden sonra azalmasına rağmen, GR parametrelerinde herhangi bir değişiklik saptanamamıştır (119). Bu bulgular Cushing hastalarındaki endojen kortizol seviyesinin GR'lerin regülasyonunda etkili olmadığını gösterir.

Sepsisli hastalarda yapılan bir çalışmada, sepsisli hastaların glikokortikoid tedavisine beklenen yanıtı vermemeleri üzerine GR'lerin rolü araştırıldığında, bu hastalarda hiperkortizolemi olmasına rağmen GR'lerin sayı ve afinitesinde herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir (141).

Bununla beraber, glikokortikoid rezistans sendromunda görülen hiperkortizolemi (Cushing bulgusu olmayan) GR sayı ve afinitesinde azalmaya neden olmaktadır (19, 27, 67, 108, 160).

Bütün bu bulgular glikokortikoidlere hassasiyette GR'lerin önemli bir rol oynadığını, fakat hastalıklarla ilişkili başka faktörlerinde GR regülasyonunda rol oynayabileceğini gösterir.

İncelediğimiz hasta grubumuzun glikoz değerleri normal sınırlar içinde olup, 3-O-MG transport değerleride normal sınırlar içinde tespit edildi. GR değerleri ile 3-O-MG transportu arasında herhangi bir ilişki tespit edilemedi.

## **KONJENİTAL ADRENAL HİPERPLAZİ**

Primer adrenal yetmezlik sebebi adrenal fonksiyonun bozulmasıdır. Kortizol üretiminde azalma ve plazma ACTH miktarında artma hastalığın özelliklerini oluşturur. Primer adrenal yetmezlik nedenlerinden biri de KAH'dir (93).

Adrenal yetmezlik görülen hastalarda yapılan GR çalışmalarında farklı sonuçlar bildirilmiştir.

Kontula ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; hipokortizolemili Addison hastalarındaki GR miktarı ve afinitesinin normal gruptan farklı olmadığını tespit edilmiştir (78).

Schlechte ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise yeni teşhis edilmiş, tedavi görmemiş adrenal yetmezlik bulguları olan hastaların MNH'lerindeki GR miktarında azalma, afinite ise artış tespit edilmiştir. 6 aylık tedaviden sonra bu hastaların reseptör miktarı değişmemiş, afinite ise normale doğru azalmıştır. Daha uzun tedaviden sonraki GR parametreleri tedavi öncesi değerlere gelmiştir (135).

Brentani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise; tedavi görmemiş adrenal yetmezlik bulgusu olan 2 hastada ( etyolojisi tüberküloz olan ) GR miktarının azaldığı, 2 hastada ( idiopatik ve bilateral adrenaletomili ) ise değişmediği, GR afinitesinde ise herhangi bir fark görülmediği bildirilmiştir (18).

Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda ise adrenaletomiden sonra GR afinitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemesine rağmen, GR sayısında artma tespit edilmiştir (149).

Bizim yaptığımız çalışmada ise hipokortizolemili 14 KAH'li hastanın GR miktarları ve afiniteleri normal çocuk grubundan farklı olarak bulunmamıştır.

İncelediğimiz KAH'li hastalar arasında glikokortikoid tedavisine direnç gösteren bazı vakaların GR sayı ve afinitesinin , glikokortikoid tedavisine yanıt verenlerden farklı olmaması, KAH'li hastalarda kortizol düzeyleri ile GR sayıları ve afiniteleri arasında ilişkinin bulunmadığını gösterir. Benzer bulgular bronşiyal astmada tespit edilmiştir (83). Kortikosteroid tedavisine yanıt veren bronşiyal astmalarla, kortikosteroid tedavisine yanıt vermeyen bronşiyal astma hastaları arasında GR sayı ve afinitesi yönünden bir fark tespit edilememiştir.

Adrenal fonksiyonun arttığı ve hiperkortizoleminin görüldüğü hastalarda yapılan çalışmalardaki GR sonuçları da farklılıklar göstermektedir. Bizimde çalışmamızda tespit ettiğimiz gibi Cushing hastalarının GR parametrelerinde herhangi bir değişiklik görülmezken (119), anoreksia nervroza hastalarında ise GR sayısında artma tespit edilmiştir (79).

Bu sonuçlardan ortaya çıkan; *in vitro* hipokortizolemi GR'lerinde artmaya neden olurken, endojen hipokortizoleminin GR reseptörlerinde yaptığı değişiklik hastalıklara göre farklılık göstermektedir. Bunun nedeni GR regülasyonunda kortizol düzeyi dışında hastalıklarla ilişkili başka faktörlerinde rol oynaması olabilir.

KAH'li hastalarda 3-O-MG transportu ile GR sayısı arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. Hasta grubumuzun glisemi değerleride normal sınırlar içinde tespit edilmiştir.

## ÖZET

Kortizole hücreyel yanıtın ilk aşamasını sitoplazmada bulunan glikokortikoid reseptörlerine (GR) kortizolün bağlanması oluşturur. Bu bağlanma steroid-reseptör kompleksinin nükleusa doğru hareketine ve spesifik protein sentezine yol açar. Böylece glikokortikoide hücreyel yanıt oluşur.

Glikokortikoidlerin hedef hücrelerinden biri olan periferel mononükleer hücreler (MNH), deksametazonu spesifik olarak ve yüksek bir afiniteyle bağlarlar. Birçok hastalık durumlarında GR çalışması için MNH'ler tercih edilmiştir. Hücreyel GR miktarı glikokortikoidler tarafından regüle edildiği ve glikokortikoidlerin kendi reseptörlerinin down-regülasyonuna yol açtıkları birçok çalışmada gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı çeşitli adrenokortikal hastalık durumlarında GR sayı ve afinitesinde meydana gelebilecek değişiklikleri araştırmaktır. Hücreyel GR seviyesi ile 3-OMG transportu arasında ters bir ilişki olduğundan, GR çalışmasıyla paralel olarak aynı hasta grubunda 3-O-MG transportunda inceledik.

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH), konjenital enzim eksikliği sonucu hipokortizoleminin görüldüğü bir hastalıktır. Cushing sendromu ise hiperkortizolemi ile ilişkili bir hastalıktır. Hipo- ve hiperkortizoleminin GR sayı ve afinitesine etkisi incelendiğinde, her iki hastalık grubunda da GR sayı ve afinitesinde ve 3-O-MG transportunda herhangi bir değişiklik saptanmadı. GR miktarı ile 3-O-MG transportu arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi. Bu bulgular, kalıcı hipo- ve hiperkortizoleminin hücreyel GR seviyesinde önemli bir değişikliğe yol açmadığını göstermektedir.

Obez ve polikistik over sendromlu (PKOS) hastalarda, hipotalamus-hipofizer-adrenal (HHA) sistem regülasyonunun bozulduğuna dair bulgular vardır. Bu hastalardaki HHA sistem bozukluğunun serum kortizol ritmini bozduğu gösterilmiştir. PKOS ve obezitenin patogeneğinde GR'nün rolünü araştırmak için, bu hastalardaki GR parametrelerini inceledik. PKOS'lu hastaların GR sayı ve afinitesi ile 3-O-MG transportunda herhangi bir değişiklik tespit edilmedi. Ayrıca GR miktarı ile 3-O-MG transportu arasında da herhangi bir ilişki görülmedi.

Bununla beraber, obez hastaların GR sayısında ve 3-O-MG transportunda azalma, afinitede ise artma tespit edildi. Obez hastalardaki insülin rezistansının önemli nedenlerinden biri glikoz transportunun bozulmasıdır. Hücrenin enerji metabolizmasında meydana gelebilecek değişiklikler GR sayısını etkileyebileceğinden, obez hastalardaki azalmış GR miktarının nedeni glikoz transportundaki azalma olabilir.

## SUMMARY

The first step in the cellular response to cortisol is a specific binding to cytoplasmic glucocorticoid receptors (GR). This leads to a transformation or activation of the steroid receptor complex which migrates into the nucleus where a specific synthesis of mRNA is induced, resulting in the synthesis of specific proteins. The ensuing effect on cellular metabolism represents the glucocorticoid response. Peripheral mononuclear leukocytes (MNL), which are targets for glucocorticoids, contain receptors that bind dexamethasone with high affinity and specificity. The ready availability of MNL makes this tissue favorable for an examination of receptors in disease states. The cellular GR concentration has been shown to be modulated by glucocorticoids. There are numerous reports demonstrating that glucocorticoids down-regulate their own receptor concentration.

The purpose of this study was to investigate potential changes in GR activity and affinity in MNL of patients with various adrenocortical disorders. In parallel, we have measured 3-O-methyl-D-glucose (3-O-MG) uptake in MNL because there was a reverse relationship between the cellular GR levels and the 3-O-MG uptake in MNL. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is associated with hypocortisolism when the hyperplasia fails to compensate for the congenital enzyme defect. Cushing's syndrome refers to the manifestations of glucocorticoid excess. To examine the effect of hyper- and hypocortisolism on GR, we studied GR number and affinity on peripheral MNL in patients with hypercortisolemic Cushing's disease and in patients with hypocortisolemic CAH disease. No change in GR number or affinity was found in MNL from patients with Cushing's syndrome and CAH. The 3-O-MG uptake in MNL from patients with Cushing's syndrome and CAH was within the normal range and there was no correlation between GR number or affinity and 3-O-MG uptake. These findings suggest that long lasting hypo- or hypercortisolism does not lead to major alteration in the amount of cellular GR.

Several lines of evidence suggest disturbances of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) system in polycystic ovary syndrome (PCOS) and obese patients. The possible hormonal dysregulation of HPA system in these patients may lead to imbalances in the circadian rhythm of cortisol serum levels. To examine the potential role of the GR in pathogenesis of obese and PCOS patients, we analyzed GR parameters in these patients. GR binding characteristics did not differ between PCOS patients and controls. The 3-O-MG uptake in MNL from patients with PCOS was within the normal range and there was no correlation between GR number or affinity and 3-O-MG uptake. However, GR number and 3-O-MG uptake in obese patients were significantly lower than in controls, but GR affinity was significantly higher than in controls. A major defect contributing to insulin resistance in obesity reduced glucose transport activity. Alterations in cell energy-metabolism may affect receptor number. The reason for the reduction of GR levels in obese patients may be production of sufficient ATP depending on reduced glucose transport.

## KAYNAKLAR

- 1) Akerblom IE., Slater EP., Beato M., Baxter JD., Mellon PL.: Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science* 241, 350-353, 1988.
- 2 ) Andersson O. Brönnegard M., Sonnenfeld TS., Schmekel B., Lund J., Ripe E. Gustafsson JA. : Glucocorticoid receptor mRNA expression in pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *Chest* 99, 1336-1341, 1991.
- 3 ) Arai K., Chrousos GP. : Glucocorticoid resistance. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (3), 317-331, 1994.
- 4) Baldwin SA.: Mammalian passive glucose transporters; members of an ubiquitous family of active and passive transport protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1154, 17-49, 1993.
- 5) Ballard PL., Ballard RA.: Cytoplasmic receptor for glucocorticoids in lung of the human fetus and neonate. *J.Clin.Invest.* 53, 477-480, 1974.
- 6 ) Ballard PL., Baxter JD., Higgins SJ., Tomkins GM.: General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissue. *Endocrinology* 94, 998-1002, 1974.
- 7) Baxter JD., Tyrrell JB.: The adrenal cortex. *Endocrinology and Metabolism*. Feling P., Baxter JD., Broadus AE., Frohman LA. (Ed). Mc Graw-Hill Book Com., USA, 385-510, 1981.
- 8 ) Bhakoo HS., Paolini NS., Milholland RJ., Lopez RE., Rosen F. : Glucocorticoid receptors and the effect of glucocorticoids on the growth of B16 melanoma. *Cancer Research* 41, 1695-1701, 1981.
- 9 ) Bieger W., Weicker H., Michl J.: Transport and utilization of amino acids and glucose in human monocytes. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 50, 1121-1126, 1980.
- 10 ) Biglieri EG., Wajchenberg BL., Malerbi DA., Okada H., Kater CE., Hirai J.: The zonal origins of the mineralocorticoid hormones in the 21-hydroxylation deficiency of congenital adrenal hyperplasia. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 53, 964-969, 1981.
- 11 ) Bilan P., Klip A.: Glycation of the human erythrocyte glucose transporter in vitro and its functional consequences. *Biochem J.* 268, 661-667, 1990.
- 12) Bloomfield CD., Peterson BA., Zaleskas J., Munck A. : In vitro glucocorticoid studies by predicting response to glucocorticoid therapy in adult with malignant lymphoma. *The Lancet* 3, 952-956, 1980.
- 13 ) Björntorp PB. : Neuroendocrine disturbances in visceral obesity. *Obesity in Europe*. H.Ditschuneit, F.A. Gries, H.Hauner, V. Schusdziarra, J.G.Wechsler ( Ed.), John Libbey & Company Ltd., 297-299 1994.
- 14 ) Björntorp PB. : Endocrine aberrations and body fat distribution; Primary and Secondary Eating Disorders. E.Ferrari, F.Brambilla, S.B. Solerte (Ed), Pergamon Press Ltd, UK, 261-263, 1993.
- 15) Bodwell JE., Hu LM., Munck A. : Glucocorticoid receptors; ATP-dependent cycling and hormone-dependent hyperphosphorylation. *J.Steroid Biochem. Molec. Biol.* 47 (1-6), 31-38, 1993.
- 16 ) Bray GA. : The syndromes of obesity. *An Endocrine Approach; Endocrinology*. Leslie J. De Groot ( Ed.), W.B. Saunders Company, USA, 2624-2662, 1995.
- 17) Brentani MM., Marchhione PE., Martins VR.: Glucocorticoid receptors of mononuclear leucocytes from myasthenia gravis patients. *Acta Nuerol. Scand* 72, 188-193, 1985.

- 18 ) Brentani MM., Wajchenberg BL., Cesar FP., Martins VR.: Regulation of the glucocorticoid receptor by glucocorticoids in human mononuclear leukocytes. *Hormone Res.* 24, 9-17, 1986.
- 19 ) Brönnegard M., Werner S., Gustafsson JA.: Primary cortisol resistance associated with a thermolabile glucocorticoid receptor in a patient with fatigue as the only symptom. *J.Clin.Invest.* 78, 1270-1278, 1986.
- 20) Bronnegard M., Arner P., Hellstrom L.: Glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in different regions of human adipose tissue. *Endocrinology* 127, 1689-1696, 1990.
- 21 ) Buffington CK., Givens JR., Kitabchi AE. : Enhanced adrenocortical activity as a contributing factor to diabetes in hyperandrogenic women. *Metabolism* 43 (5), 584-590, 1994.
- 22) Carlstedt-Duke J., Brönnegard M., Strandvik B.: Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis-the putative basic defect. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 83, 9202-9206, 1986.
- 23) Carruthers A.: Facilitative diffusion of glucose. *Physiological Reviews* 70, 1135-1176, 1990.
- 24 ) Chang RJ., Mandel FP., Wolfsen AR., Judd HL.: Circulating levels of plasma adrenocorticotropin in polycystic ovary disease. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 54 (6), 1265-1267, 1982.
- 25 ) Cherniack RM. : Cells in bronchoalveolar lavage fluid. *Respiratory disease* 141 (5), S175-S179, 1990.
- 26) Chrousos GP., Vingerhoeds V., Brandon D., Eil C. : Primary cortisol resistance in man. *J.Clin. Invest.* 69, 1261-1269, 1982.
- 27 ) Chrousos GP., Vingerhoeds ACM., Loriaux L., Lipsett MB.: Primary cortisol resistance: A family study. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 56, 1243-1245, 1983.
- 28 ) Compton MM., Cidlowski JA. : Identification of a glucocorticoid-induced nuclease in thymocytes. *J.Biol. Chem.* 262 (17), 8288-8292, 1987.
- 29) Compton MM., Caron LM., Cidlowski JA.: Glucocorticoid action on the immune system. *J.Steroid Biochem.* 27 (1-3), 201-208, 1987.
- 30 ) Cooney GJ. , Storlien LH. : Insulin action, thermogenesis and obesity. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (3), 481-508, 1994.
- 31 ) Crabtree GR., Kendal AS., Munck A.: Glucocorticoid receptors and sensitivity of isolated leukemia and lymphoma cells. *Cancer Research* 38, 4268-4272, 1978.
- 32) Crabtree GR., Bloomfield CD., Smith KA., Peterson BA., Munck A.: Glucocorticoid receptors and in vitro responses to glucocorticoid in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Research* 41, 4853-4856, 1981.
- 33) D'Ambrogio G., Facchinetti F., Golinelli S., Setti T., Petraglia F., Genazzani. Adrenal steroid responses to naloxone in polycystic ovarian disease. *Gynecol.Endocrinol.* 1(4), 355-361, 1987.
- 34 ) Damm P., Binder C. : Glucocorticoid receptors in type 1 diabetes mellitus. *Clin. Chimica Acta.* 184, 167-174, 1989.
- 35 ) Daneman DC., Zinman B., Elliott ME., Bilan PJ., Klip A.: Insulin-stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 41, 227-234, 1992.
- 36 ) Despres JP. : Dyslipidaemia and obesity. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (3), 629-660, 1994.



- 37 ) Doe RP., Goldman PM., Severson SP., Hruby HM. : Circadian variation of cytosol glucocorticoid receptors in human polymorphonuclear leukocytes (PMN) and mononuclear cells (MN) in a normal population. *J.Steroid Biochem.* 25 (4), 483-487, 1986.
- 38 ) Dong Y., Aronsson M., Gustafsson JA., Okret S. : The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. *J.Biol. Chem.* 264 (23), 13679-13683, 1989.
- 39 ) Ehrmann DA., Barney RB., Rosenfield RL.: Hyperandrogenism, hirsutism, and the polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. Leslie J.DeGroot et al. (Ed.), W.B.Sounders Company, USA, vol 3, 2099-2107, 1995
- 40) Elbrink J., Bihler I.: Membrane transport; Its relation to cellular metabolic rates. *Science* 188, 1177-1183, 1975.
- 41) Elks ML.: Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release. *Endocrinology* 133(1), 208-214, 1993.
- 42) Encio IJ., Detera-Wadleigh SD. : The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J.Biol. Chem.* 266 (11), 7182-7188, 1991.
- 43 ) Entenmann G., Junger E., Gries FA., Hauner H. : Morphological characterization of human preadipocytes during in vitro adipoconversion under the control of insulin and cortisol; Obesity in Europe. H.Ditschuneit, F.A. Gries, H.Hauner, V. Schusdzarra, J.G.Wechsler ( Ed.), John Libbey & Company Ltd., 59-64, 1994.
- 44 ) Eskobar MH., Pazos F., Potau N., Garcia RR., Sancho R., Varela C. : Ovarian suppression with triptorelin and adrenal stimulation with adrenocorticotropin in functional hyperandrogenism. *Fertil-Steril* 62(3), 521-530, 1994.
- 45 ) Etensohm DB., Jankovski MJ., Duncani PG., Lalor PA. : Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. *Chest* 94 (2), 275-280, 1988.
- 46) Evans RM.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895, 1988.
- 47 ) Friedman J., Dohm GL., Leggett-Frazier N., Elton CW.: Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. *J.Clin.Invest.* 89, 701-705, 1992.
- 48 ) Funder JW., Pearce PT., Smith R., Smith AI. : Mineralocorticoid action: Target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242, 583-585, 1988.
- 49) Garvey WT., Birnbaum MJ.: Cellular action and insulin resistance. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (3), 785-875, 1994.
- 50 ) Gladman DD., Urowitz MB., Doris F., Lewandowski K., Anhorn K. : Glucocorticoid receptors in systemic lupus erythematosus. *J.Rheumatol* 18, 681-684, 1991.
- 51) Glass AR.: Endocrine aspects of obesity. *Obesity*. Bray GA (Ed). *The Medical Clinics of North America* 73(1), 139-160, 1989.
- 52) Goldfien A., Monroe SE.: The ovaries. *Basic & Clinical Endocrinology*, Greenspan FS., Forsham PH. (Ed.), Greenspon Forsham, California, 368-413, 1984.
- 53 ) Gross MD., Wortsman J., Shapiro B., Meyers LC, Woodburry MC., Ayers JW.: Scintigraphic evidence of adrenal cortical dysfunction in the polycystic ovary syndrome. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 62(1), 197-201, 1986.
- 54) Gurwitz JH., Bohn RL., Glynn RJ., Monane M., Mogun H., Avorn J. : Glucocorticoids and the risk for initiation of hypoglycemic therapy. *Arch. Intern. Med.* 154, 97-101, 1994.
- 55.) Gustafsson JA., Carlstedt-Duke J., Poellinger L., Agnati L.: Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrine Reviews* 8 (2), 185-234, 1987.

- 56) Guyton AC. ( Ed.): Adrenal cortex hormones. Textbook of Medical Physiology. Merk Yayıncılık, 1331-1333, 1987.
- 57) Haber RS., Weinstein SP. : Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. *Diabetes* 41, 728-735, 1992.
- 58 ) Harrison LC., Dean B., Peluso I., Clark S., Ward G.: Insulin resistance, acanthosis nigricans, and polycystic ovaries associated with a circulating inhibitor of postbinding insulin action. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 60 (5), 1047-1052, 1985.
- 59) Heller C., Coirini H., De Nicola AF.: Influence of phosphatase inhibitors and nucleotides on [<sup>3</sup>H]-dexamethasone binding in cytosol of human placenta. *J.Steroid Biochem.* 21, 381-385, 1984.
- 60 ) Henry JT., Romsos DR. : Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor-binding characteristics in ob/ob mice. *Am. J.Physiol.* 261, E495-E499, 1991.
- 61 ) Ho AD., Stojakowits S., Pralle H., Dörner M., Hunstein W.: Glucocorticoid receptor level, terminal deoxynucleotidyl transferase activity and initial responsiveness to prednisone and vincristine in leukemia. *Klin. Wochenschr* 61, 455-459, 1983.
- 62) Holbrook NJ., Bloomfield CD., Munck A.: Stabilization of labile glucocorticoid receptor complexes from acute nonlymphocytic leukemia cells by a factor from chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Research* 44, 407-414, 1984.
- 63) Halverson DJ., Kramer J., Cava A., Permutt A., Santiago J. : Altered glucose tolerance, insulin response, and insulin sensitivity after massive weight reduction subsequent to gastric bypass. *Surgery* 92 (2), 235-240, 1982.
- 64 ) Honnert HC., Munck A., Lienhard GE.: Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 262 (36), 17696-17702, 1987.
- 65) Howlett TA., Rees LH., Besser GM.: Cushing' syndrome. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 14 (4), 911-947, 1985.
- 66 ) Höck W., Martin F., Jaggi R., Groner B. : Regulation of glucocorticoid receptor activity. *J. Steroid Biochem.* 34, 71-78, 1989.
- 67 ) Iacobelli S., Natoli V., Longo P., Ranelletti FO., De Rossi G., Mastrangelo R.: Glucocorticoid receptors determinations in leukemia patients using cytosol and whole-cell assays. *Cancer Research* 41, 3979-3984, 1981.
- 68 ) Iida S., Gomi M., Moriwaki K., Itoh Y., Tarui S.: Primary cortisol resistance accompanied by a reduction in glucocorticoid receptors in two members of the same family. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 60, 967-971, 1985.
- 69) Issemann I., Green S.: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650, 1990.
- 70) Junker K. : Glucocorticoid receptors of human mononuclear leukocytes in vitro. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 57, 506-512, 1983.
- 71) Kalimi M., Banerji A.: Age-related changes in the in vitro glucocorticoid responsiveness of rat spleen and splenic leukocytes. *Gerontology* 28, 91-98, 1982.
- 72 ) Kalimi M., Gupta S., Hubbard J., Greene K. Glucocorticoid receptors in adult and senescent rat liver. *Endocrinology* 112, 341-347, 1983.
- 73) Kalimi M. : Glucocorticoid receptors: From development to ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 24, 129-138, 1984.
- 74 ) Kalinyak JE., Dorin RI., Hoffman AN., Periman AJ. : Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J.Biol.Chem* 262, 10441-10444, 1987.

- 75 ) Kamada AK., Spanhn JD., Surs W., Brown E., Leung YM., Szefer SJ. : Coexistence of glucocorticoid receptor and pharmacokinetic abnormalities. *J. Pediatr.* 124, 984-986, 1994.
- 76 ) Kato GJ., Quddus FF., Shuster JJ., Pullen JD., Leventhal BG. : High glucocorticoid receptor content of leukemic blasts is a favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 82 (8), 2304-2309, 1993.
- 77) Kerepsi T.: Low levels of glucocorticoid binding sites in circulating lymphocytes of premature infants suffering from hyaline membrane disease. *J.Steroid Biochem.* 22, 151-155, 1985.
- 78 ) Kontula K., Pelkonen R., Anderson L., Sivula A.: Glucocorticoid receptors in adrenocorticoid disorders. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 51, 654-57, 1980.
- 79) Kontula K., Anderson LC., Huefunen M., Pelkonen R.: Reduced level of cellular glucocorticoid receptor in patients with anorexia nervosa. *Horm.Metab. Res.* 14, 619-620, 1982.
- 80 ) Kopelman P.G. : Hormones and obesity. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (3), 549-575, 1994.
- 81 ) Krane SM. : Some molecular mechanisms of glucocorticoid action. *British Journal of Rheumatology* 32, 3-5, 1993.
- 82 ) Lacronique JG., Rennard SI., Bitterman PB., Ozaki T., Crystal RG. : Alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis have glucocorticoid receptors. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 450-456, 1984.
- 83 ) Lane SJ., Lee TH. : Glucocorticoid receptor characteristics in monocytes of patients with corticosteroid bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143, 1020-1024, 1991.
- 84 ) Langley SC., York DA.: Increased type II glucocorticoid receptor numbers and glucocorticoid sensitive enzyme activities in the brain of the obese Zucker rat. *Brain-Res.* 533(2), 268-274, 1990.
- 85) Langley SC., York DA.: Effect of antiglucocorticoid RU486 on development of obesity in obese *fa/fa* Zucker rats. *Am. J.Physiol* 259, R539-544, 1990.
- 86) Langley SC., York DA.: Glucocorticoid receptor numbers in the brain and liver of the obese Zucker rat. *Int.J. Obes.* 16(2), 135-143, 1992.
- 87) Lanzone A., Fulghesu AM., Guido M., Fortini A., Caruso A., Mancuso S.: Differential androgen response to adrenocorticotrophic hormone stimulation in polycystic ovary syndrome : relationship with insulin secretion. *Fertil-Steril* 58 (2), 296-301, 1992.
- 88 ) Lanzone ., Petragilla F., Fulghesu AM, Ciampelli M., Caruso A., Mancuso S. : Corticotropin-releasing hormone induces an exaggerated response of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in polycystic ovary syndrome. *Fertil-Steril* 63(6), 1195-1199, 1995.
- 89) Lienhard GE., Slot JW., James DE., Mueckler MM.: How cells absorb glucose. *Scientific American*, 34-39, 1992.
- 90 ) Lippman ME., Yarbrow KY., Leventhal BG.: Clinical implication glucocorticoid receptors in human leukemia. *Cancer Research* 38, 4251-4256, 1978.
- 91 ) Lippman M.: Clinical implication of glucocorticoid receptors in human leukemia. *Am.J.Physiol* 243, E103-E108, 1982.
- 92) Lon NC.: Mechanism of glucocorticoid hormone action. *J.Steroid Biochem.* 20, 77-81, 1984.
- 93) Loriaux DL., McDonald WJ. : Adrenal insufficiency. *Endocrinology.* Leslie J.DeGroot et al. (Ed.), W.B.Sounders Company, USA, vol 2, 1731-1739, 1995.
- 94) Malchoff DM., Malchoff CD. : Glucocorticoid resistance. *Endocrinology.* Leslie J.DeGroot et al. (Ed.), W.B.Sounders Company, USA, vol 2, 1771-1774, 1995.

- 95 ) Master J., Baulieu EE. : Nuclear receptor superfamily. *Endocrinology*. Leslie J.DeGroot et al. (Ed.), W.B.Sounders Company, USA, vol 1, 93-112, 1995.
- 96) Mathews CK., Van Holde KE. (Ed.): Lipid metabolism. *Biochemistry*, The Benjamin/Cumming Oublishing Com, USA, 604-642, 1990.
- 97 ) McCann VJ., Fulton TT. : Cortisol metabolism in chronic liver disease. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 40, 1038-1044, 1975.
- 98) McKenna TJ.: Hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, Grossman A. (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Italy, 691-712, 1992.
- 99 ) McKenna TJ., Cunningham SK.: The pathogenesis of adrenal and extra adrenal hyperandrogenism. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 45 (1-3), 117-121, 1993.
- 100 ) Miller WL.: Genetics, diagnosis, and management of 21-hydroxylase deficiency. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 78 (2), 241-248, 1994.
- 101 ) Miller JE., Bray MA., Faiman C., Reyes FI.: Characterization of 24-h cortisol release in obese and non-obese hyperandrogenic women. *Gynecol-Endocrinol* 8 (4), 247-254, 1994.
- 102) Mongioi A., Macchi M., Vicari E., Moncada ML. : Pituitary and adrenal response to ovine corticotropin-releasing hormone in women with polycystic ovarian syndrome. *J.Endocrinol Invest.* 11 (9), 637-640, 1988.
- 103 ) Mueckler M., Caruso C., Baldwin SA., Panico M., Lodish HF.: Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945, 1985.
- 104 ) Mueckler M.: Family of glucose-transporter genes. *Diabetes* 39, 6-11, 1990.
- 105) Muller M., Renkawitz R.: The glucocorticoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1088, 171-182, 1991.
- 106 ) Munck A., Fejes-Toth AN. : Glucocorticoid action. *Endocrinology*. Leslie J.DeGroot et al. (Ed.), W.B.Sounders Company, USA, vol 2, 1642-1651, 1995.
- 107) Murakami T., Inakuma S., Ohsawa N., Tanaku F.: Effect of phytohemagglutinin on connective tissue disease. *Clin Chem.* 32, 621-625, 1986.
- 108 ) Nawata H., Sekiya K., Higuchi K., Kato K., Ibayashi H.: Decreased deoxyribonucleic acid binding of glucocorticoid-receptor complex in cultured skin fibroblasts from a patient with the glucocorticoid resistance syndrome. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 65, 219-226, 1987.
- 109 ) Neeck GN., Federlin K., Graef V., Rusch D., Schmidt KL. : Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol* 17, 24-29, 1990.
- 110 ) New MI.: Congenital adrenal hyperplasia.*Endocrinology*. Leslie J.DeGroot et al. (Ed.), W.B.Sounders Company, USA, vol 2, 1813-1831, 1995.
- 111 ) Okada S., York DA., Bray GA.: Mifepristone (RU486), a blocker of type II glucocorticoid and progestin receptors, reverses a dietary form of obesity. *Am.J.Physiol* 262, R1106-1110, 1992.
- 112 ) Okret S., Poellinger L., Dong Y., Gustafsson JA. : Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 83, 5899-5903, 1986.
- 113 ) Okuno Y., Morii H.: Clinical application of measurement of glucose transport in human polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 7, S5-S9, 1989.
- 114 ) Okuno Y., Plesner L., Larsen TR., Gliemann J.: Facilitated transport of 3-O-methyl-D-glucose in human polymorphonuclear leukocytes. *FEBS* 195 (1,2), 303-308, 1986.

- 115 ) O'shaughnessy IM., Kasdorf GM., Hoffmann RG., Kalkhoff RK. : Does ageing intensify the insulin resistance of human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 1075-1081, 1992.
- 116 ) O'Riordan LH. : Cell mates in the superfamily. *Endocrinology* 135 (1), 1-3, 1994.
- 117 ) Ozaki T., Nakayama T., Ishimi H., Kawano T., Yasuoka S., Tsubura E. : Glucocorticoid receptors in bronchoalveolar cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126, 968-971, 1982.
- 118) Papageorgiou AN., Desgranges MF., Masson M., Gelfand MM.: The antenatal use of betamethasone in the prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 63, 73-77, 1979.
- 119 ) Pardes EP., DeYampey JEW., Moses DF., DeNicola AF.: Regulation of glucocorticoid receptors in human mononuclear cells: Effect of glucocorticoid treatment, Cushing's disease and ketoconazole. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 39 (2), 233-238, 1991.
- 120 ) Pearce DP., Yamamoto KR.: Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* 259, 1161-1165, 1993.
- 121 ) Pfahl M. : Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocrine Reviews* 14 (5), 651-658, 1993.
- 122) Picard D., Yamamoto KR. : Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *The EMBO Journal* 6 (11), 3333-3340, 1987.
- 123) Pang S., Levine LS., Lorenzen F., Chow D., New MI. : Hormonal studies in obligate heterozygotes and siblings of patients with 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 50, 586-589, 1980.
- 124 ) Prelevic GM., Wurzbarger MI., Balint PL. : 24-hour serum cortisol profiles in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol* 7 (3), 179-84, 1993.
- 125) Proietto J., Thorburn AW. : Animal models of obesity-theories of aetiology. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (3), 509-525, 1994.
- 126) Rebuffe-Scrive M., Bronnegard M., Nilsson A., Björntorp P. : Steroid hormone receptors in human adipose tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 1215-1219, 1990.
- 127 ) Rodin A., Thakkar H., Taylor N., Clayton R. : Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. Evidence of dysregulation of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *N. Engl. J. Med.* 330 (7), 460-465, 1994.
- 128 ) Rosner B., Cristofalo V.: Changes in specific dexamethasone binding during ageing in WI-38 cells. *Endocrinology* 108, 1965-1971, 1981.
- 129 ) Roth G., Livingston J.: Reductions in glucocorticoid inhibition of glucose oxidation and presumptive glucocorticoid receptor content in rat adipocytes during ageing. *Endocrinology* 99, 831-839, 1976.
- 130 ) Rupprecht R., Frölich L., Mergenthaler T., Kornhuber J., Wodarz, Riederer P., Maurer K. : Glucocorticoid receptors on mononuclear leukocytes in Alzheimer' disease. *Psychiatry Research* 34, 237-241, 1990.
- 131 ) Rupprecht M., Rupprecht R., Kornhuber J., Wodarz N., Koch HU., Hornstein OP. : Elevated glucocorticoid receptor concentrations before and after glucocorticoid therapy in peripheral mononuclear leukocytes of patients with atopic dermatitis. *Dermatologica* 183, 100-105, 1991.
- 132) Salons LB.: The obesities. *Endocrinology and Metabolism.* Feling P., Baxter JD., Broadus AE., Frohman LA. (Ed). Mc Graw-Hill Book Com., USA, 891-916, 1981.

- 133) Scatchard G.: The attractions of proteins by small molecules and ions. *Ann. N Y Acad. Sci.* 51, 1689-1696, 1990.
- 134 ) Schlaghecke R., Kornely E., Wollenhaupt J., Specker C: Glucocorticoid receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 35 (7), 740-744, 1992.
- 135) Schlechte JA., Sherman BM.: Decreased glucocorticoid receptor binding in adrenal insufficiency. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 54, 145-149, 1982.
- 136) Schlechte JA., Sherman B.: Lymphocyte glucocorticoid receptor binding in depressed patients with hypercortisolemia. *Psychoendocrinology* 10, 469-473, 1985.
- 137 ) Schuchard M., Landers JP., Punkay N., Spelsberg TC. : Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrine Reviews* 14 (6), 659-669, 1993.
- 138) Sharma SK., Verna U., Pande JN., Murugesan K., Verna K., Guleria JS. : Glucocorticoid receptors in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis. *Chest* 93 (3), 577-579, 1988.
- 139) Slavnov VN., Epshtein EV.: Somatotrophic, thyrotrophic and adrenotrophic functions of the anterior pituitary in obesity. *Endocrinology* 15, 213-218, 1977.
- 140) Sluysers M.: Steroid/thyroid receptor-like proteins with oncogenic potential: a review. *Cancer Research* 50, 451-468, 1990.
- 141 ) Sigal GA., Maria DA., Lucia M., Katayama H., Brentani MM. : Glucocorticoid receptors in mononuclear cells of patients with sepsis. *Scand. J.Infect Dis.* 25, 245-248, 1993.
- 142) Simpson ER., Waterman MR.: Steroid hormone biosynthesis in adrenal cortex. *Endocrinology*. Leslie J.DeGroot et al. (Ed.), W.B.Sounders Company, USA, vol 1, 1630-1642, 1995.
- 143 ) Sinha MK., Raineri-Maldonado C., Buchanan C., Caro JF. : Adipose tissue glucose transporters in NIDDM. *Diabetes* 40, 472-477, 1991.
- 144 ) Smith EL, Hill RL., Letman IR.: The adrenals. Principles of biochemistry, Mc.Graw-Hill Book Company, 528-542, 1983.
- 145) Steiner AN., Wittliff JL. : Concentration of glucocorticoid receptor sites in normal human lymphocytes. *Clin.Chem* 32 (1), 80-83, 1986.
- 146 ) Stewart PM., Wallace AM., Valentino R., Burt D., Edwards CRW.: Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. *The Lancet* 10, 821-824, 1987.
- 147) Stewart PM., Burra P., Shackleton CHL., Sheppard MC., Elias E.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease.hormone action. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 76, 748-751, 1993.
- 148) Stewart PM.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (2), 357-378, 1994.
- 149 ) Stith RD., McCallum RE. : General effect of endotoxin on glucocorticoid receptors in mammalian tissues. *Circulatory Shock* 18, 301-309, 1986.
- 150) Svec F. : Glucocorticoid receptor regulation. *Life Sciences* 36 ( 25 ), 2359-2366, 1985.
- 151 ) Swinburn BA., Ravussin E. : Energy and macronutrient metabolism. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8 (3), 527-548, 1994.
- 152 ) Tanaka H., Ichikawa Y., Akama H., Homma M. : In vivo responsiveness to glucocorticoid correlated with glucocorticoid receptor content in peripheral blood leukocytes in normal humans. *Acta Endocrinologica ( Copenh )* 121, 470-476, 1989.

- 153 ) Tanaka H., Akama H., Ichikawa Y., Homma M. and Oshima H. : Glucocorticoid receptors in normal leukocytes. *Clin. Chem.* 37 (10), 1715-1719, 1991.
- 154 ) Tanaka H., Akama H., Ichikawa Y., Homma M., Makino I.: Glucocorticoid receptor and inhibition of 3-O-methyl-D-glucose uptake by glucocorticoids in peripheral blood leukocytes from normal humans. *Acta Endocrinologica* 126, 29-36, 1992.
- 155 ) Tappy L., Randin D., Vollenweider P., Vollenweider L., Jequier E. : Mechanisms of dexamethasone-induced insulin resistance in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1063-1069, 1994.
- 156) Thomson EB., Smith JR., Bourgeois S., Harmon JM. : Glucocorticoid receptors in human leukemias and related disease. *Klin. Wochenschr* 63, 689-698, 1985.
- 157) Truss M., Beato M.: Steroid hormone receptors: Interaction with DNA and transcription factors. *Endocrine Reviews* 14 (4), 459-479, 1993.
- 158 ) Turi AU., DiProspore F., Mazzarini A., Romanini C.: Lymphocytes subset in hyperandrogenic women with PCOS. *Acta. Eur. Fertil.* 19 (3), 155-157, 1988.
- 159) Tyrrell JB., Forsham PH.: Glucocorticoid & adrenal androgens. *Basic & Clinical Endoc.*, Greenspan FS., Forsham PH. (Ed.), Greenspan Forsham, California, 258-294, 1984.
- 160 ) Vecsei P., Frank K., Haack D., Heinze V., Ziegler R. : Primary glucocorticoid receptor defect with likely familial involvement. *Cancer Research (Suppl.)* 49, 2220-2221, 1989.
- 161) Von Werder K., Müller OA.: Cushing's syndrome. *Clinical Endocrinology*, Grossman A. (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Italy, 442-458, 1992.
- 162 ) Werner S., Thoren M., Gustafsson J., Brönnegård M. : Glucocorticoid receptor abnormalities in fibroblasts from patients with idiopathic resistance to dexamethasone diagnosed when evaluated for adrenocortical disorders. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 75, 1005-1009, 1992.
- 163 ) Wheeler RH., Leach KL., Forest CF., Pratt WB. : Glucocorticoid receptor activation and inactivation in cultured human lymphocytes. *J.Biol.Chem* 256, 434-441, 1981.
- 164 ) White BD., Martin RJ.: Alterations in the binding characteristics of glucocorticoid receptors from obese Zucker rats. *J.Steroid Biochem.* 36(6), 681-686, 1990.
- 165 ) Whorwood CB., Sheppard MC., Stewart PM.: Licorice inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels and potentiates glucocorticoid hormone action. *Endocrinology* 132, 2287-2292, 1993.
- 166) Willcox M., Kervitsky A., Watters LS., King TE. : Quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 74-80, 1988.
- 167) Winterer J., Chrousos GP., Loriaux DL., Cutler GB.: Effect of hydrocortisone dose schedule on adrenal steroid secretion in congenital adrenal hyperplasia. *J.Pediatr.* 106, 137-142, 1985.
- 168 ) Wolkowitz OM., Reus VI., Manfredi F., Ingbar J., Brizendine L., Weingartner H. : Ketoconazole administration in hypercortisolemic depression. *Am. J. Psychiatry* 150, 810-812, 1993.
- 169 ) Yeakley JM., Balasubramanian K., Harrison RW. : Comparison of glucocorticoid-receptor binding kinetics with predictions from a biomolecular models. *J.Biol. Chem.* 255 (9), 4182-4188, 1980.
- 170) Yumamoto KR.: Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann.Rev.Genet.* 19, 209-252, 1985.
- 171 ) Zonghai H., Han G., Renbao X. : Study on glucocorticoid receptors during intestinal ischemia shock and septic shock. *Circulatory Shock* 23, 27-36, 1987.