

ХАНДАЕВА ПАТИМАТ МАГОМЕДОВНА

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ АКТГ-ЗАВИСИМОГО ЭНДОГЕННОГО
ГИПЕРКОРТИЦИЗМА И РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С
НЕВИЗУАЛИЗИРУЕМОЙ ПО ДАННЫМ МРТ АДЕНОМОЙ ГИПОФИЗА**

14.01.02 – Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Белая Жанна Евгеньевна**
доктор медицинских наук

Официальные оппоненты: **Древаль Александр Васильевич**
доктор медицинских наук, профессор, заведующий
кафедрой клинической эндокринологии факультета
усовершенствования врачей Государственного бюджетного
учреждения здравоохранения Московской области
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт имени М. Ф. Владимирского»

Астафьева Людмила Игоревна
доктор медицинских наук, профессор кафедры нейрохирургии
и нейронаук Федерального государственного автономного
учреждения «Национальный медицинский исследовательский
центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: **Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Московский
государственный медицинский университет имени И.М.
Сеченова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации (Сеченовский Университет)**

Защита диссертации состоится «__» _____2019 года в __ часов на заседании
диссертационного совета Д.208.126.01 в ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр эндокринологии» Министерства Здравоохранения Российской
Федерации по адресу: 117036, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства
Здравоохранения Российской Федерации www.endocrincentr.ru.

Автореферат разослан «__» _____2019 года

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор медицинских наук

Суркова Елена Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эндогенный гиперкортицизм (ЭГ) – редкое эндокринное заболевание, характеризующееся длительным повышением уровня кортизола вследствие первичной патологии надпочечников, повышенной секреции АКТГ опухолью гипофиза или АКТГ-секретирующей нейроэндокринной опухолью (НЭО) [Howlett Т.А. и соавт., 1986]. После подтверждения диагноза ЭГ наибольшую сложность представляет дифференциальная диагностика его АКТГ-зависимых форм: АКТГ-продуцирующей аденомы гипофиза – болезни Иценко-Кушинга (БИК; 80% случаев) – и АКТГ-эктопированного синдрома – нейроэндокринной опухоли любой локализации (20% случаев). Это связано с тем, что клинические проявления и лабораторные показатели, как правило, неотличимы у пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом. Кроме того, до 20% аденом гипофиза при БИК не визуализируются при магнитно-резонансной томографии (МРТ), в том числе с контрастным усилением [Марова Е.И. и соавт., 2012]. Даже при использовании сверхвысокопольных аппаратов мощностью 7 Тесла сохраняется определенное количество невизуализируемых аденом [Alexandra A.J. de Rotte и соавт., 2016]. Распространенность носительства гормональнонеактивных аденом гипофиза размером 6 мм и менее, по данным популяционных исследований, составляет 16-20% [Hall W.A. и соавт., 1994]. АКТГ-секретирующие НЭО чаще всего имеют маленькие размеры, вероятность их выявления при первом проведении МСКТ не превышает 47%, и до 20% этих опухолей, по данным мировых исследований, так и остаются недиагностированными [Utz А. и соавт., 2007]. В таких случаях необходимым методом диагностики АКТГ-зависимых форм эндогенного гиперкортицизма является селективный забор крови из нижних каменистых синусов. Однако количество ложноотрицательных результатов забора в некоторых случаях превышает 10% [Kaltsas G.A. и соавт., 1999]. В последнее время идет

активный поиск специфических биомаркеров для ранней диагностики новообразований. Некодирующие микроРНК (мкРНК) рассматриваются как перспективные биомаркеры ранней диагностики различных опухолей [Paranjape T., 2009]. МкРНК – это 19-25-нуклеотидные не кодирующие молекулы РНК, которые регулируют посттранскрипционную экспрессию генов через РНК-взаимодействие с множеством матричных РНК (мРНК) в 3'- и 5'-нетрансляционном регионе или в кодирующей последовательности. Исследования профилей мкРНК на геномном уровне показали, что экспрессия мкРНК специфична для различных аденом гипофиза и отличается в НЭО [Demes M. и соавт., 2016; Malczewska A. и соавт., 2018]. МкРНК обнаруживаются во многих биологических жидкостях, в том числе в сыворотке крови и могут служить маркерами при онкологических заболеваниях, многие из них уже были определены в ряде опухолей [Cheerla N. и соавт., 2009]. Выявление циркулирующих мкРНК, экспрессия которых различается у пациентов с АКТГ-зависимым ЭГ, позволило бы получить малоинвазивный биомаркер для дифференциальной диагностики БИК и АКТГ-эктопированного синдрома. Отсутствие визуализации АКТГ-секретирующей аденомы при МРТ является особенностью именно этих опухолей гипофиза. Введение контрастного препарата позволяет повысить чувствительность МРТ до 80%, однако 20% опухолей по прежнему остаются «невидимыми» [Findling J.W. и соавт., 2005]. Можно предположить, что особенности кровоснабжения ряда АКТГ-секретирующих новообразований являются причиной отсутствия визуализации аденомы на МРТ, даже при контрастном усилении.

Всем пациентам с БИК в качестве первого этапа лечения рекомендуется трансфеноидальная аденомэктомия. Предполагается, что отсутствие послеоперационной ремиссии при БИК может быть связано с маленьким размером аденом гипофиза или гиперплазией. Вместе с тем данные о выявлении аденомы при МРТ в дооперационном периоде на исход нейрохирургического лечения весьма противоречивы [Bichicchio D. и соавт., 1995; Invitti C. и соавт., 1999; Rees D.A. и соавт., 2002; Semple P.L. и соавт., 1999]. Актуально было бы отследить

эффективность хирургического вмешательства в зависимости от наличия визуализации опухоли при МРТ.

Цель работы

Изучить новые эпигенетические биомаркеры для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма у лиц без визуализации аденомы и отдаленные результаты их лечения.

Задачи исследования

1. Выделить различия в экспрессии мкРНК в периферической плазме у пациентов с АКТГ-зависимым гиперкортицизмом и контрольных лиц.
2. Определить, существуют ли различия в экспрессии мкРНК в периферической плазме пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом.
3. Оценить связь морфологии кровеносных и лимфатических сосудов в АКТГ-секретирующих опухолях гипофиза у лиц с БИК с визуализацией и отсутствием визуализации опухоли при МРТ.
4. Оценить отдаленные результаты нейрохирургического лечения пациентов с БИК в зависимости от наличия визуализации аденомы гипофиза при МРТ на дооперационном этапе.

Научная новизна

- Впервые выявлены различия экспрессии мкРНК, специфичных для АКТГ-секретирующих опухолей, в плазме крови пациентов с АКТГ-зависимым ЭГ по сравнению со здоровым контролем.
- Впервые произведен сравнительный анализ экспрессии мкРНК, специфичных для АКТГ-продуцирующих аденом гипофиза и НЭО, в периферической крови у пациентов с БИК и АКТГ-эктопией.

- Впервые изучены особенности кровеносных и лимфатических сосудов в АКТГ-секретирующих опухолях гипофиза в зависимости от визуализации аденомы при МРТ.

Практическая значимость

- Предложены новые биомаркеры для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого ЭГ и здорового контроля.
- Предложены новые биомаркеры для дифференциальной диагностики болезни Иценко-Кушинга и АКТГ-эктопированного синдрома.
- Впервые в Российской Федерации произведена оценка результатов нейрохирургического лечения пациентов с болезнью Иценко-Кушинга в зависимости от наличия визуализации аденомы гипофиза при МРТ через 5 лет.

Положения, выносимые на защиту

1. МкРНК, различно экспрессирующиеся в опухолях, продуцирующих АКТГ, могут обнаруживаться в периферической крови и использоваться как биомаркеры для дифференциальной диагностики эндогенного гиперкортицизма и его АКТГ-зависимых форм.
2. Выявление аденомы гипофиза при МРТ на дооперационном этапе у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга не влияет на отдаленные результаты нейрохирургического лечения больных.

Апробация

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 22.01.2019 года на расширенном заседании межотделенческой научной конференции ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России.

Фрагменты диссертационной работы были доложены в качестве устных докладов на VII Всероссийском конгрессе эндокринологов «Достижения

персонализированной медицины сегодня – результаты практического здравоохранения завтра» (Москва, 2016 г.), IV Международной конференции Европейского общества молодых ученых-эндокринологов (EYES, Москва, 2016 г.), 17-м Конгрессе Европейской нейроэндокринологической ассоциации (ЕНЕА, Милан, 2016 г.), III Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2017 г.), II выездном заседании Российского общества молодых эндокринологов (RYES, Ереван, 2017 г.), 20-м Европейском эндокринологическом конгрессе (ЕСЕ, Барселона, 2018 г.); в виде постерного доклада на 18-м Конгрессе Европейской нейроэндокринологической ассоциации (ЕНЕА, Вроцлав, 2018 г.).

Представленная работа была удостоена премии Европейского общества эндокринологов «Young Investigator Awards», присуждаемой молодым ученым за перспективные научные исследования (Барселона, 2018 г.).

Публикации

По теме диссертации всего опубликовано 9 печатных работ, в том числе в центральных, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России медицинских журналах – 3; тезисы, опубликованные за рубежом – 4, тезисы, опубликованные в сборниках российских конференций – 2.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, описание материалов и методов проведения исследования, собственные результаты и их обсуждение, заключение), выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Библиография включает 233 источника (из них 5 отечественных и 228 зарубежных). Работа иллюстрирована 15 таблицами и 8 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно поставленным целям и задачам в исследование было включено 157 человек: 133 пациента с установленным в ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом БИК; 13 пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом; 11 здоровых добровольцев. Все участники исследования проходили обследование или обращались за медицинской консультацией в отделение нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ (в настоящее время ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава РФ) в период 2015-2017 гг., включая ретроспективный фрагмент работы с 2009-2011 гг.

Диагнозы БИК и АКТГ-эктопированный синдром устанавливались ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» в соответствии с современными клиническими рекомендациями [Мельниченко Г.А. и др, 2015]. Окончательный нозологический диагноз устанавливался на основании результатов гистологического и иммуногистохимического исследования послеоперационного материала и/или наступления стойкой ремиссии заболевания после нейрохирургического лечения. При невозможности верифицировать локализацию опухоли, диагноз устанавливался на основании результатов селективного забора крови из нижних каменистых синусов с введением стимуляционного агента при условии наличия градиента пролактина.

Ремиссия подтверждалась развитием надпочечниковой недостаточности и/или нормализацией содержания кортизола в крови и свободного кортизола в суточной моче.

Распределение пациентов и здоровых добровольцев по группам для выполнения поставленных задач согласно описанным этапам (разделам) отображено в Таблице 1.

Таблица 1 – Распределение участников по разделам исследования.

Раздел исследования	Критерии включения	Количество пациентов
2.2.1. Анализ экспрессии мкРНК в плазме крови у пациентов с АКТГ-зависимым ЭГ и у здоровых лиц	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России диагнозом БИК или АКТГ-эктопированного синдрома и здоровые добровольцы	28 пациентов с БИК, 13 пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом и 11 здоровых добровольцев
2.2.2. Оценка связи морфологии кровеносных и лимфатических сосудов в АКТГ-секретирующих аденомах гипофиза с визуализацией опухолей при МРТ у пациентов с БИК	Ретроспективно включались данные пациентов, у которых были отобраны образцы тканей АКТГ-секретирующих аденом гипофиза при трансназальной трансфеноидальной аденомэктомии в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.	39 пациентов с БИК: 22 с визуализацией, 17 без визуализации аденомы гипофиза при МРТ
2.2.3 Оценка пятилетних исходов нейрохирургического лечения пациентов с болезнью Иценко-Кушинга в зависимости от наличия визуализации аденомы при МРТ	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России диагнозом БИК, перенесшие трансфеноидальную аденомэктомию с 2009 по 2011 гг.	105 пациентов с БИК

Критерии исключения: для первого и третьего этапов исследования критерии были одинаковы и включали в себя повторные оперативные вмешательства на гипофизе, недостаточное количество достоверной информации, смешанный характер секреции опухоли гипофиза, беременность, тяжелые, жизнеугрожающие состояния (такие как почечная и печеночная недостаточность,

инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения), возраст моложе 18 лет. Во второй этап исследования не были включены и не подвергались анализу ткани, в которых аденома не была выявлена при повторном гистологическом исследовании; в случае малого количества опухолевой ткани, предоставленной для морфологического исследования; аденомы гипофиза с обильными кровоизлияниями различной степени давности; полученные при повторном нейрохирургическом вмешательстве

Забор крови из периферической вены выполнялся утром натощак в промежутки 8.00-10.00, за исключением вечернего кортизола и адренокортикотропного гормона (АКТГ). Далее образцы подвергались двукратному центрифугированию (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов (А-4-81, Ф-4-81-МТP/Flex, FA-45-30-11 и F-45-48-PCR)) в течение 15 минут после забора крови из вены при температуре +5⁰С при скорости вращения 3000 оборотов/мин в течение 20 минут. Образцы сыворотки и плазмы были заморожены и хранились при температуре -80⁰С.

Сбор суточной мочи на свободный кортизол проводился обследуемыми самостоятельно в единую емкость строго в течение 24 часов, начиная со 2-й порции с утра и заканчивая 1-й порцией на следующий день. После перемешивания и измерения общего объема мочи образец объемом 50-100 мл доставлялся в лабораторию.

Выделение мкРНК из плазмы

Выделение мкРНК из 200 мкл плазмы проводили с помощью мкРНКNeasy Serum/Plasma Kit («Qiagen», Германия) согласно инструкции компании-производителя на автоматической станции QIAcube («Qiagen», Германия). Для предотвращения деградации в выделенную РНК добавляли 1 ед. RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Fisher Scientific», США) на 1 мкл раствора нуклеиновых кислот. Концентрацию суммарной РНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare», Великобритания). Обратная транскрипция для мкРНК осуществлялась с помощью TaqMan Advanced мкРНКNA cDNA Synthesis Kit («Applied Biosystems», США).

Количественная оценка транскриптов мкРНК с помощью qRT-PCR

Анализ экспрессии мкРНК производили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени», для чего использовали термоциклер StepOnePlus (Applied Biosystems, USA). В смесь для ПЦР добавляли Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, USA), раскапывали в 96-луночную плашку с праймерами и флуоресцентными зондами наборов TaqMan Advanced мкРНКNA Assays (Applied Biosystems, USA).

Морфологическое и гистологическое исследования

В исследование были включены образцы ткани с наличием опухоли, объем которых был достаточен для гистологического и иммуногистохимического исследований. Приготовление гистологических препаратов проводилось по стандартной методике с использованием гистопроцессора (Leica asp200) с проведением дегидратации полученных фрагментов ткани опухоли в абсолютном спирте в течение 12 часов, затем ткань заливалась в парафиновые блоки, после чего из парафиновых блоков производились срезы не более 5 мкм с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином и проведением иммуногистохимической реакции с антителами к АКТГ (1:100, Dako) и использованием низкомолекулярного цитокератина CAM 5.2 (1:100, Cell Marque) с демаскирующей обработкой щелочным буфером. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) выполнено с помощью автоматизированного аппарата (иммуностейнер Leica Bond Max) по стандартному протоколу.

При исследовании характера сосудистой сети АКТГ-секретирующих аденом иммуногистохимическое исследование (ИГХ) отобранных аденом проводилось с антителами к CD34 (клон QBEnd/10, RTU, «Leica»), D2-40 (клон D2-40, RTU, «Dako»). Также с помощью ИГХ метода была оценена пролиферативная активность аденом гипофиза с помощью маркера пролиферации Ki-67 (клон MIB-1, RTU, «Dako»).

Микроскопическая оценка сосудистого русла проведена с помощью светового микроскопа Leica DMLS2. Количество капилляров было подсчитано в

поле с максимальной плотностью сосудов при увеличении $\times 200$ при помощи лабораторного счетчика.

Отдельно измеряли диаметры самого крупного и самого мелкого сосудов в выбранных полях каждого из срезов (в мкм). С этой целью проводили фиксацию выбранных полей с помощью камеры Leica DFC 490, для обработки цифровых изображений использовали программное обеспечение Leica Application Suite V3. Затем подсчитывали средний диаметр сосудов, расположенных в $0,3 \text{ мм}^2$ выбранного поля каждого среза, с вычислением среднего значения. Полуколичественным методом оценивали долю (в %) «щелевидных» сосудов, просвет, которых с помощью светового микроскопа не определялся и диаметр при увеличении $\times 400$ установить не удалось.

Индекс пролиферации Ki-67 был рассчитан как доля Ki-67-положительных ядер в 500 клетках; для оценки индекса пролиферации была выбрана область с наибольшим количеством иммуноположительных клеток («горячих точек») на каждом срезе.

Селективный забор крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином проводили на васкулярной рентгеновской системе визуализации для инвазивных и диагностических процедур AlluraXper FD20 (Philips Medical Systems Nederland B.V., Нидерланды) с стимуляцией десмопрессином в дозе 8 мкг (Desmopressin Acetate 4 мкг в 1 мл, для внутривенных, внутримышечных и подкожных инъекций; Ferring Pharmaceuticals, Швейцария). Результаты селективного забора крови из нижних каменистых синусов расценивались как положительные для диагноза БИК при наличии градиента АКТГ ≥ 2 между образцом крови взятой в синусе и образцом периферической крови до стимуляции десмопрессином и градиентом АКТГ ≥ 3 после стимуляции десмопрессином. Результаты селективного забора крови оценивались как наличие АКТГ-эктопированного синдрома при градиенте АКТГ < 2 до стимуляции и < 3 после стимуляции десмопрессином при наличии градиента пролактина ≥ 2 между синусом и периферической кровью (контроль положения катетера).

Магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга проводилась для выявления или подтверждения аденомы гипофиза на магнитно-резонансном томографе Magnetom Harmony (Siemens, Германия) с введением контрастных веществ по показаниям.

Многосрезовая спиральная компьютерная томография (МСКТ, КТ) органов грудной клетки проводилась на аппарате Aquilion One фирмы Toshiba Medical Systems Corporation (Япония) с введением контрастного препарата «Оптирей 300».

Статистическая обработка данных

Основные количественные характеристики пациентов представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25–75 процентиль – Q25-Q75). Соотношения качественных признаков представлены в виде долей (%).

Сравнения групп проводилось с использованием непарных двухсторонних t-тестов или критерия Манна-Уитни. Точный критерий Фишера был использован для сравнения двух независимых групп для качественных параметров. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Статистический анализ и графический вывод результатов выполнялись с использованием программного обеспечения R версии 3.4.0 (2017-04-21). Количественные данные, полученные из исходного анализа ПЦР мкРНК, были преобразованы с использованием \log_2 fold changes (FC) в сравнении с контролем (cel-39), чтобы обеспечить прямое сравнение между группами. Затем значения FC2 сравнивались между каждой парой групп с использованием независимого t-критерия выборки с вычислением нескорректированного p-значения (p) и скорректированного значения q для исключения ложного обнаружения различий при множественных сравнениях (q FDR) с использованием метода коррекции.

В качестве поправки на множественные сравнения использовался метод коррективы Бенджамини-Хохберга (q-значения $< 0,10$) [Reiner A., 2003; Hirakawa A., 2008].

Значения и 95% интервалов совпадения \log_2 FC были построены на графиках для лучшего наглядного представления результатов, далее размер эффекта

(разность между FC2 и $\log_2 FC$) был составлен с использованием графика вулкана против скорректированного p-значения $-\log_{10}$ (то есть q FDR) с использованием порогового значения 2 для разности FC2 и 1,0 для значения $-\log_{10}$ q FDR.

Ввиду отсутствия подобных исследований и его экспериментального, а не подтверждающего характера, а также редкости заболеваний предварительной статистической гипотезы сформулировано не было.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ экспрессии мкРНК в плазме крови у пациентов с АКТГ-зависимым эндогенным гиперкортицизмом и у здоровых лиц

Общая характеристика и биохимические показатели пациентов с БИК, с АКТГ-эктопированным синдромом и у лиц из контрольной группы, включенных в исследование по оценке изменения экспрессии мкРНК в периферической крови, приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Основные характеристики и биохимические показатели пациентов с БИК, с АКТГ-эктопированным синдромом и у лиц из контрольной группы, включенных в исследование по оценке изменения экспрессии мкРНК в плазме крови*

Параметры	Me (Q25%; Q75%)			p*
	Пациенты с БИК	Пациенты с АКТГ-эктопированным синдромом	Контроль	
Количество пациентов	28	13	11	

Параметры	Me (Q25%; Q75%)			p*
	Пациенты с БИК	Пациенты с АКТГ-эктопированным синдромом	Контроль	
Пол, ж(%):м(%)	24(86%):4(14%)	6(46%):7(54%)	9(89%):2(11%)	0,003
Возраст, лет	37 (33,1–42,6)	43 (33,8–52,1)	39 (33,9–44,9)	0,5
ИМТ, кг/м ²	29,8 (27,2–32,4)	30,1 (28,8–31,5)	28,2 (22,2–34,1)	0,4
АКТГ утром, пг/мл	66,2 (45,3;95,5)	150 (127;206,5)	–	<0,001
АКТГ вечером, пг/мл	48,1 (28,7;73)	133 (112,1;166)	–	<0,001
Кортизол в суточной моче, нмоль/сут	1967,6 (1508;2041)	2554 (1349;4888)	–	0,04

* - *тест Манна-Уитни*

У пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом показатели кортизола в суточной моче и АКТГ были значимо выше по сравнению с пациентами с БИК.

В группе пациентов с БИК аденома была визуализирована в 17 случаях, размер аденом составил в среднем 3 мм (мин. 3 мм; макс. 8 мм). У 11 пациентов аденома гипофиза не была выявлена при МРТ даже после в/в контрастирования. Всем пациентам была проведена трансфеноидальная аденомэктомия. Ремиссия достигнута у всех пациентов – в 22 случаях зафиксирована надпочечниковая недостаточность, в 6 – нормализация уровня кортизола. Во всех случаях диагноз БИК подтвержден послеоперационным гистологическим исследованием.

В ходе поиска нейроэндокриной опухоли при МСКТ органов грудной полости у 8 пациентов были выявлены образования в легких. У всех пациентов

после хирургического удаления найденных образований наступила ремиссия – у 6 развилась надпочечниковая недостаточность, у 2 уровень кортизола в крови и суточной моче нормализовался.

Пяти пациентам была выполнена двусторонняя адреналэктомия, так как очаг АКТГ-эктопии выявить не удалось.

Всем пациентам с АКТГ-эктопированным синдромом был проведен селективный забор крови из НКС.

Сравнения экспрессии мкРНК в плазме у пациентов с БИК, АКТГ-эктопированным синдромом и у здорового контроля наглядно представлены на Рисунке 1.

Сравнения экспрессии выделенных мкРНК в образцах плазмы пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом в зависимости от пола представлены на Рисунке 2.

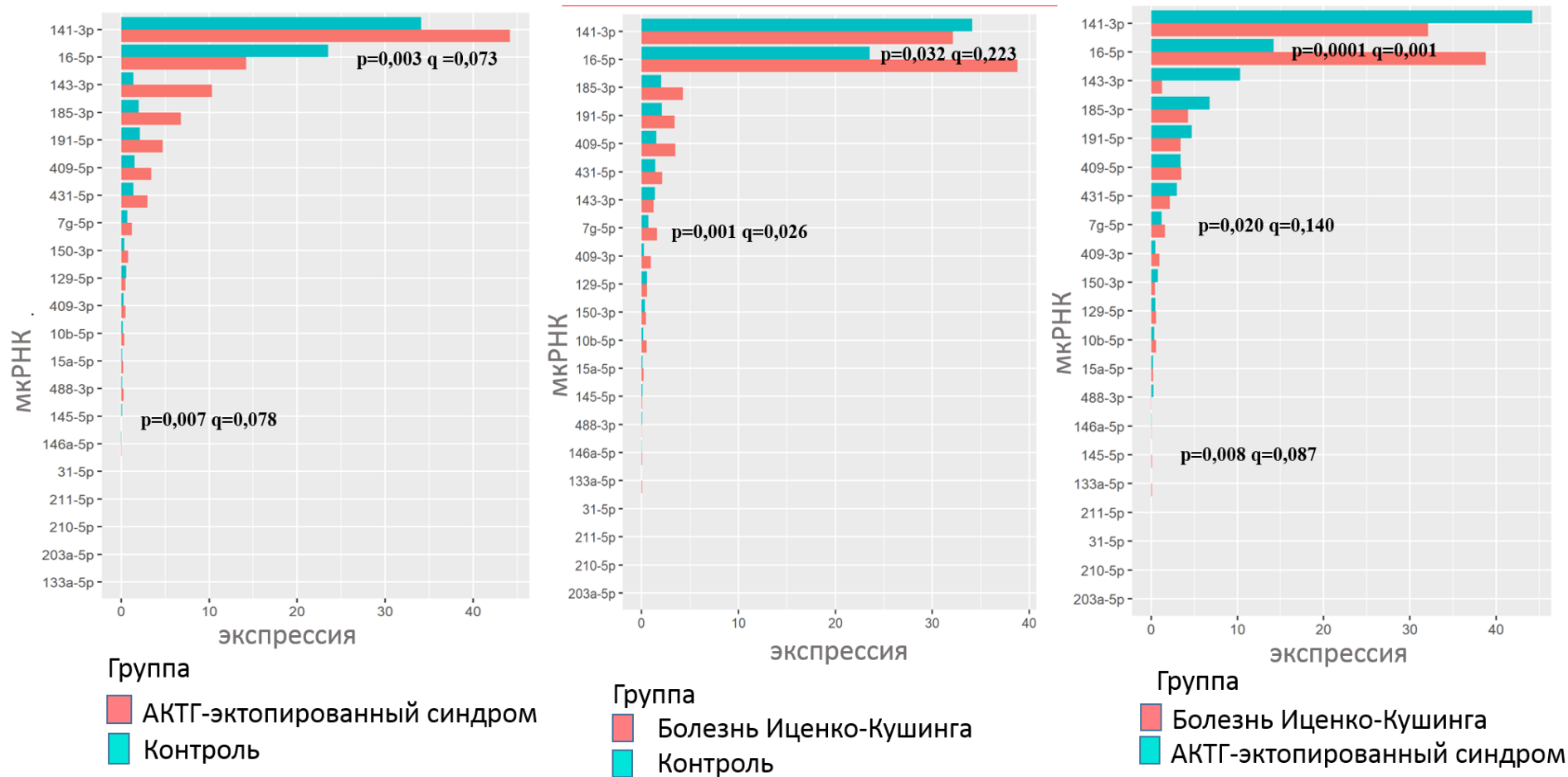


Рисунок 1 – Сравнения экспрессии мкРНК в плазме у пациентов с БИК, АКТГ-эктопированным синдромом и у здорового контроля

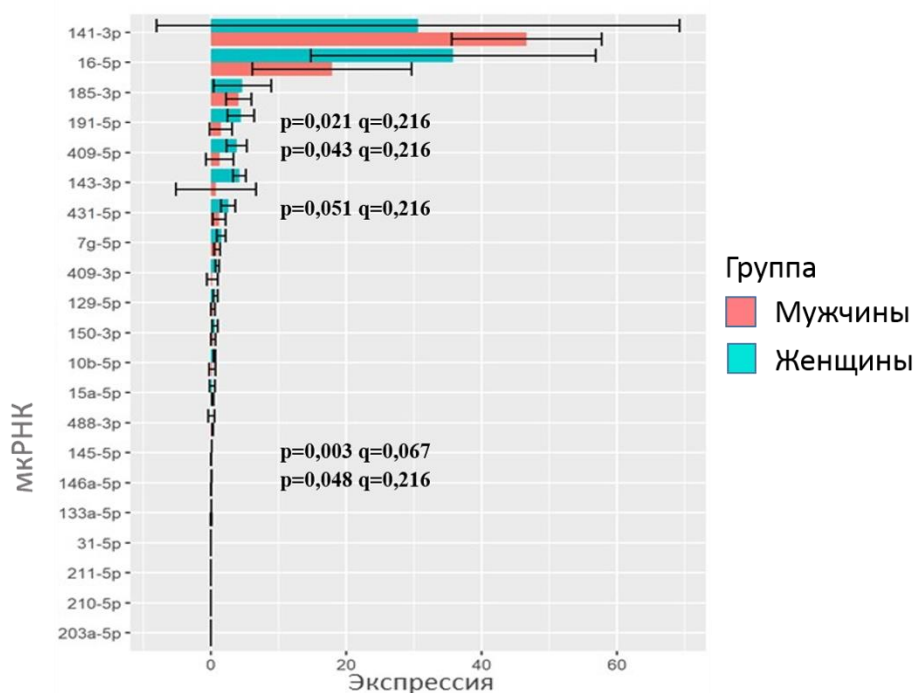


Рисунок 2 – Результат сравнения экспрессии выделенных мкРНК в зависимости от пола

Таким образом, в ходе данной работы были выявлены три мкРНК, экспрессия которых в плазме крови статистически значимо различается у пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом: экспрессия мкРНК-16-5p была повышена у пациентов с БИК (45,036 (28,76–61,308) по сравнению с АКТГ-эктопированным синдромом (5,263 (2,654–7,872)), $p < 0,001$; $q = 0,001$; экспрессия мкРНК 145-5p была снижена у пациентов с БИК (0,097 (0,027–0,167)) и отсутствовала у лиц с АКТГ-эктопированным синдромом (0,000 (0,000–0,000)), $p = 0,008$; $q = 0,087$; и экспрессия мкРНК 7g-5p была повышена у пациентов с БИК (1,842 (1,283–2,400)) по сравнению с АКТГ-эктопированным синдромом (0,847 (0,187–1,507)), $p = 0,02$; $q = 0,14$. В работе Amaral было показано снижение экспрессии всех трех мкРНК в тканях АКТГ-секретирующих аденом. Вероятно, что выявленное повышение этих мкРНК в циркуляции имеет другое происхождение [Amaral F.C. и соавт., 2009]. Проводилось исследование циркулирующих мкРНК у пациентов с аденомами гипофиза, однако среди пациентов не было лиц с БИК. В ходе работы выявлено снижение экспрессии мкРНК-143-3p в образцах крови, взятых через три месяца после оперативного лечения пациентов с ФСГ/ЛГ-продуцирующими аденомами, в

сравнении с плазмой, полученной на дооперационном этапе [Németh K. И соавт., 2019].

При сравнении экспрессии мкРНК у пациентов с АКТГ-зависимым эндогенным гиперкортицизмом и у здорового контроля установлены статистически значимые различия в экспрессии мкРНК-16-5p как у пациентов с БИК ($p = 0,032$), так и у пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом ($p = 0,003$) в сравнении с контрольной группой. В то же время экспрессия мкРНК-145-5p существенно различалась у пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом и здоровых добровольцев ($p = 0,007$), но была сопоставима у пациентов с БИК и контрольных лиц, а мкРНК-7g-5p, наоборот, была различна у пациентов с БИК и здоровых лиц ($p = 0,001$), но у пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом ее экспрессия уже не имела значимых отличий от наблюдавшейся у здорового контроля.

В последнее время активно обсуждается возможное влияние различий в экспрессии мкРНК у мужчин и женщин на достоверность выявленных биомаркеров [Meder В. и соавт., 2014]. В группе пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом распределение мужчин и женщин ожидаемо было равномерно. В то время как в группе с БИК и в подобранной под группу с БИК здоровым контролем преобладали женщины. При анализе различий экспрессии по полу было получено статистически значимое отличие в экспрессии miR-145-5p в зависимости от пола (Рисунок 2). Таким образом, выявленное различие по мкРНК-145-5p может быть ассоциировано с полом.

2. Оценка связи морфологии кровеносных и лимфатических сосудов в АКТГ-секретирующих аденомах гипофиза с визуализацией опухолей при МРТ у пациентов с БИК

Общая характеристика и биохимические показатели пациентов с БИК с визуализацией и без визуализации аденомы по данным МРТ представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Основные характеристики включенных в исследование пациентов с БИК с визуализацией и без визуализации аденомы по данным МРТ*

Параметры	Me (Q25%; Q75%)		p*
	Без визуализации	С визуализацией	
Количество пациентов	17	22	
Пол, Ж(%):М(%)	12(71%):5(29%)	17(77%):5(23%)	0,601
Возраст, лет	39,5 (24,5;50,5)	36 (31,0;39,0)	0,745
Кортизол в суточной моче, нмоль/сут	1708 (1497;1926)	1536 (1125,4;2148,0)	0,36
АКТГ утром, пг/мл	59,7 (51,6;107,3)	76,6 (59,02;95,5)	0,244
АКТГ вечером, пг/мл	51,7 (40;51,4)	71,6 (51,4;82)	0,427
Размер аденомы на МРТ, мм	0	6 (4,5;10)	0,003

* - *тест Манна-Уитни*

Содержание кортизола в суточной моче, концентрация АКТГ утром и вечером статистически значимо по группам не различались.

Размер аденом при МРТ составил 6 мм (4,5; 10) (в среднем 8 мм; мин. 2; макс. 25 мм), в том числе 6 макроаденом, размером от 10 до 25 мм (Me = 13 мм).

Результаты исследования ангиогенеза и пролиферативной активности в опухолях гипофиза у пациентов с БИК представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Показатели ангиогенеза и пролиферативной активности в зависимости от наличия визуализации на МРТ-снимках*

Параметры	Me (Q25%; Q75%)		p*
	Без визуализации	С визуализацией	
Количество пациентов	17	22	–
Количество кровеносных сосудов	112 (110,0;126,5)	123 (72,5;136,0)	0,615
Количество щелевидных сосудов, %	25 (5;50)	32 (5;50)	0,610
Диаметр наибольшего сосуда, мкм	33 (30,0;51,5)	53 (32,5;63,5)	0,820
Средний диаметр кровеносных сосудов, мкм	15 (14,5;26,0)	13 (12,0;14,0)	0,520
Уровень Ki-67, %	0 (0;0)	0 (0;1,0)	0,635

* - *тест Манна-Уитни*

При морфологическом исследовании удаленного материала у 26 пациентов выявлены аденомы гипофиза и в 13 случаях сочетания кортикотропиномы и небольшие фрагменты гиперплазии аденогипофиза. Кортикотропиномы состояли преимущественно из базофильных клеток – в 25 случаях, в 11 - наблюдалась значительная примесь эозинофильных клеток, в 3 – эозинофильных и хромофобных. Различий в обеих группах по клеточному составу и характеру новообразований не отмечено ($p > 0,05$). Пролиферативная активность в обеих группах была низкой. Всего в 3 образцах уровень индекса пролиферации составил 3, 4 и 15%.

В обеих группах был выполнен подсчет количества кровеносных сосудов и оценка их диаметра. Взаимосвязь между визуализацией аденомы гипофиза и состоянием сосудистого русла новообразования выявить не удалось. Результаты морфологического исследования наглядно представлены на Рисунке 3.

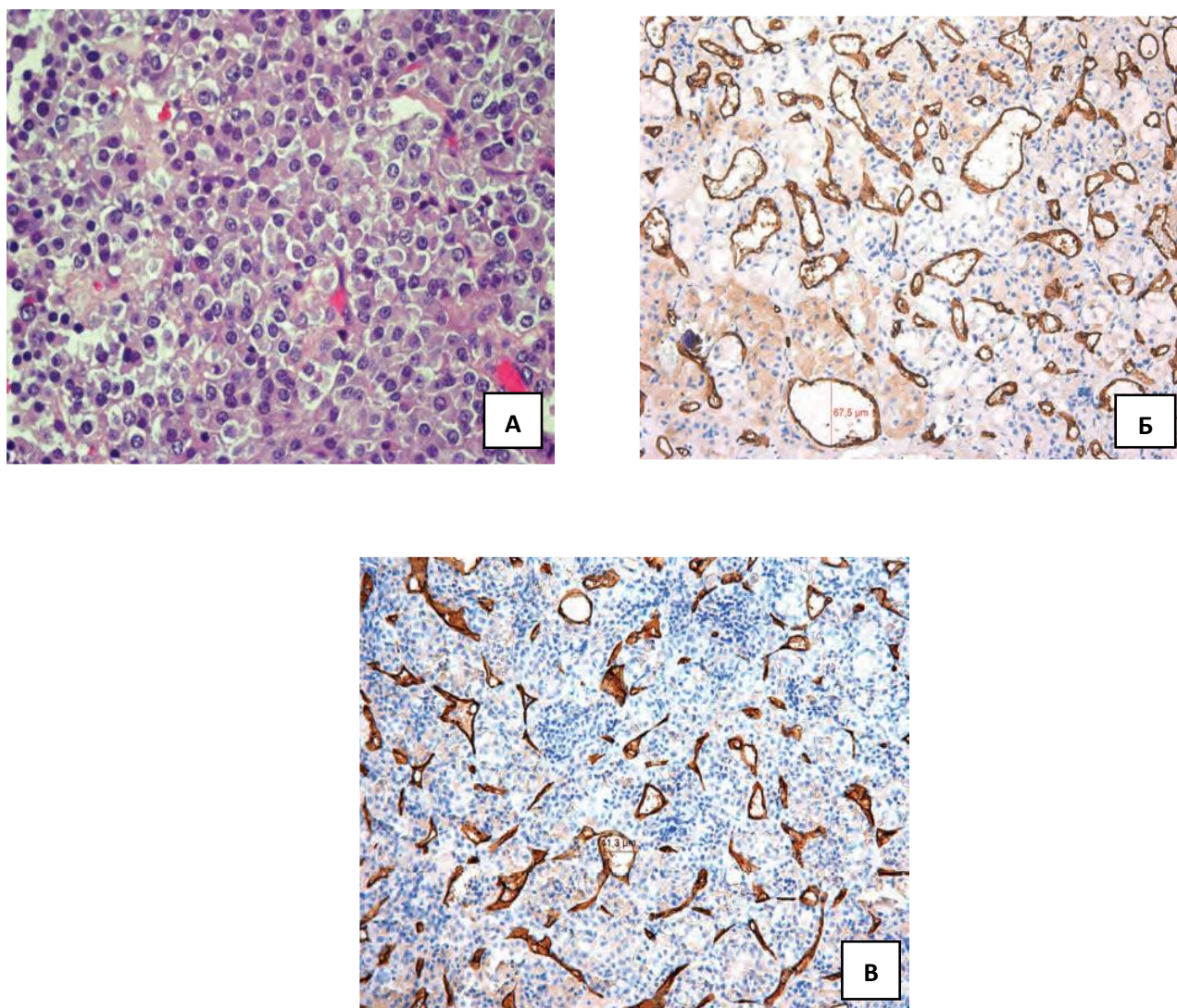


Рисунок 3. Морфологическая оценка удаленного материала

- А. Базофильная аденома гипофиза. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.
Б. Кортикотропинома с преобладанием сосудов крупного диаметра. ИГХ, $\times 200$.
В. Аденома гипофиза с преобладанием сосудов с средним и мелким просветами. ИГХ, $\times 200$.

В литературных источниках не было найдено данных для сопоставления с полученными нами результатами, поскольку исследование ангиогенеза

преимущественно осуществлялось в макроаденомах гипофиза с целью оценки агрессивного потенциала образований гипофиза [Takano S. и соавт., 2014; Miao Y. и соавт., 2016].

3. Оценка пятилетних исходов нейрохирургического лечения пациентов с болезнью Иценко-Кушинга в зависимости от наличия визуализации аденомы при МРТ

Общая характеристика и биохимические показатели пациентов с БИК с визуализацией и без визуализации аденомы по данным МРТ, включенных для оценки пятилетних результатов наблюдения, представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Основные характеристики включенных в исследование пациентов с БИК с визуализацией и без визуализации аденомы по данным МРТ*

Параметры	Me (Q25%; Q75%)		p*
	Без визуализации	С визуализацией	
Количество пациентов	35	70	–
Пол, Ж(%):М(%)	26(74%):9(26%)	59(74%):11(26%)	0,40
Возраст, лет	33 (26;52)	38 (32;50)	0,39
Кортизол, нмоль/сут	1590 (45;2632)	1460 (851;2925)	0,98
АКТГ утром, пг/мл	63,9 (47,8; 99,0)	82 (63,1;115)	0,02
АКТГ вечером, пг/мл	44 (34,1;72,9)	63,1 (48,1;93,7)	0,01
Кортизол в суточной моче после оперативного лечения, нмоль/сут	113,3 (48,0;205,2)	110 (52,0;341,0)	0,52

Параметры	Me (Q25%; Q75%)		p*
	Без визуализации	С визуализацией	
АКТГ утром после оперативного лечения, пг/мл	12 (2,0;29,8)	12 (3,8;26,2)	0,37

* - *тест Манна-Уитни*

Содержание кортизола в суточной моче статистически значимо не различалось между группами, в то время как концентрация АКТГ утром и концентрация АКТГ вечером была значимо выше в группе пациентов с визуализируемой аденомой.

Оценка отдаленных результатов нейрохирургического лечения и основные результаты различных видов лечения в зависимости от наличия или отсутствия визуализации аденомы по данным МРТ представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Результаты 5-летнего наблюдения*

Параметры	Без визуализации	С визуализацией	p*
Количество пациентов	35	70	–
Ремиссия в течение года после первого нейрохирургического лечения	25 (71%)	62 (88%)	0,594
Повторное нейрохирургическое лечение	4 (11%)	24 (34%)	0,057
Третье нейрохирургическое лечение	1 (2,8%)	2 (2,8%)	0,90
Лучевая терапия	5 (14%)	19 (27%)	0,28
Адреналэктомия	0 (0%)	6 (8,5%)	0,47

Параметры	Без визуализации	С визуализацией	p*
Частота рецидивов	6 (17,1%)	30 (42,8%)	0,03
Ремиссия через 5 лет после первого нейрохирургического лечения	27 (77%)	49 (70%)	0,15
Период наблюдения (месяцы)	120 (119;121)	120 (119;121,3)	0,98

* - тест Манна-Уитни

Во всей когорте пациентов после первой трансфеноидальной аденомэктомии ремиссия была достигнута у 87 пациентов (85%). Полученные данные наглядно представлены на Рисунке 4.

Среди пациентов с невыявленной на дооперационном этапе аденомой в 8 случаях развилась надпочечниковая недостаточность, в 17 была достигнута нормализация уровня кортизола в крови и суточной моче. В группе пациентов с визуализируемой аденомой надпочечниковая недостаточность развилась в 40 случаях, а в 22 достигнута нормализация уровня кортизола.

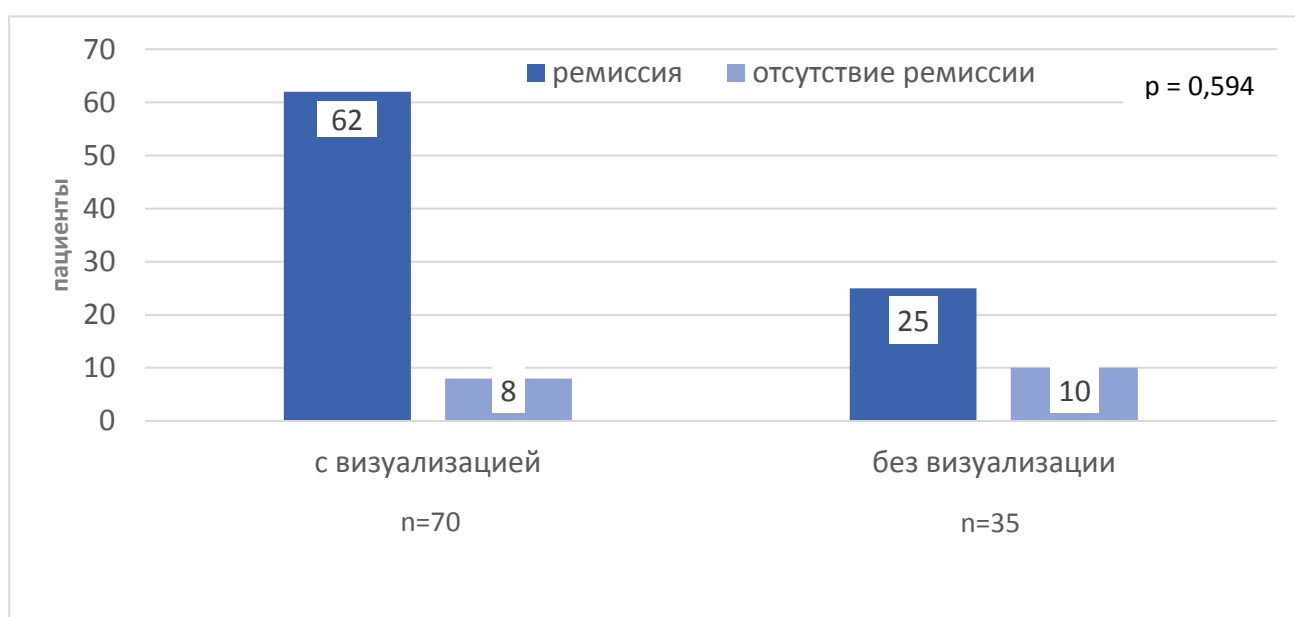


Рисунок 4 – Частота ремиссии после первого нейрохирургического лечения

Повторной трансфеноидальной аденомэктомии подверглись 28 пациентов: 10 – из-за отсутствия ремиссии после первого оперативного лечения, 18 – ввиду возникновения рецидива. При повторном оперативном лечении ремиссия была достигнута у 12 пациентов (42%). Лучевая терапия проведена 24 пациентам, и шести выполнена адреналэктомия.

Спустя пять лет после оперативного лечения ремиссия сохранялась у 76 пациентов (72%). У 10 пациентов (10%) был выявлен рецидив, и 19 пациентов (19%) пребывают в активной стадии гиперкортицизма на протяжении 5 лет. Данные о частоте ремиссии через 5 лет после нейрохирургического лечения наглядно представлены на Рисунке 5.

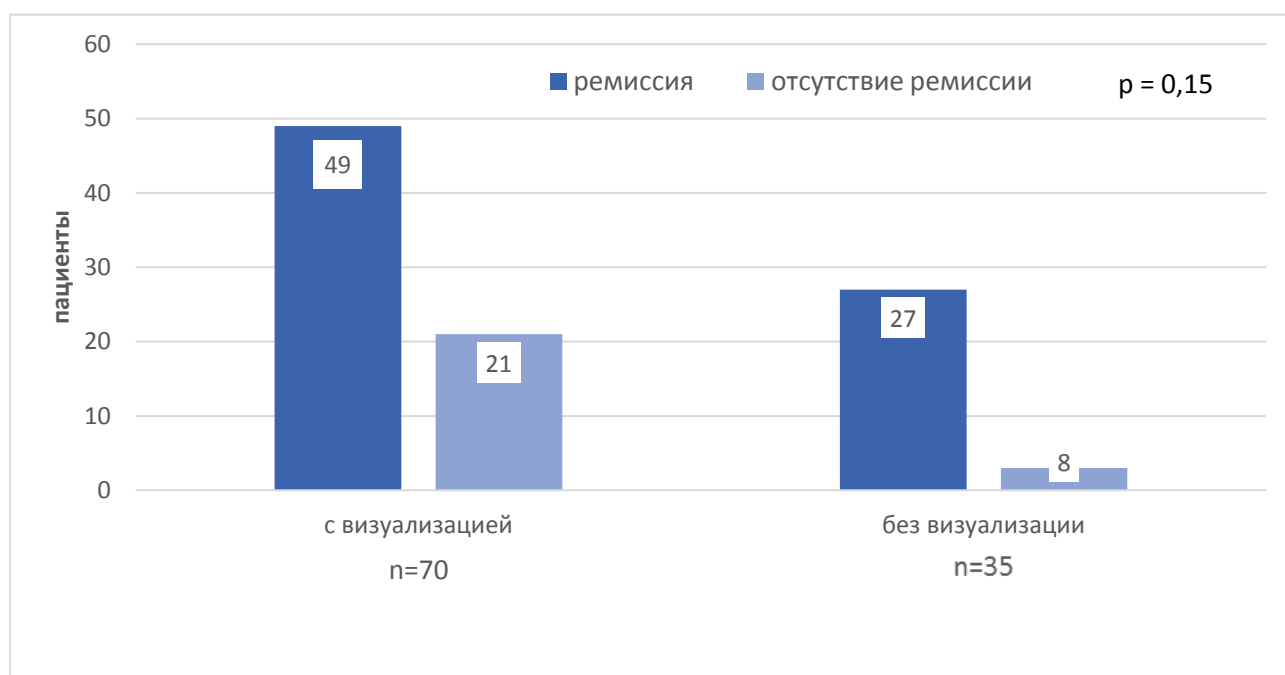


Рисунок 5 – Частота ремиссии через пять лет после нейрохирургического лечения

В ходе проведенного исследования не была выявлена связь между наличием визуализации аденомы на МРТ и уровнем пятилетней ремиссии после нейрохирургического лечения пациентов с БИК. Похожие данные были получены

и в исследованиях зарубежных коллег [Salenave S. и соавт., 2004; Cebula H. и соавт., 2017]. При этом установлено более частое возникновение рецидивов БИК в группе с визуализируемой аденомой, что сопоставимо с данными литературы. [Bochicchio D. и соавт., 1995; Arnott R.D. и соавт., 1990]. Вероятно, больший размер аденомы определяет более высокую частоту рецидива.

ВЫВОДЫ

1. Болезнь Иценко-Кушинга ассоциируется с увеличением экспрессии мкРНК-16-5p и мкРНК-7g-5p, а АКТГ-эктопированный синдром с подавлением экспрессии МкРНК-16-5p в плазме крови по сравнению со здоровым контролем, в связи с чем эти мкРНК могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров АКТГ-зависимого гиперкортицизма.
2. Экспрессия мкРНК-16-5p и мкРНК-7g-5p в плазме крови повышена у пациентов с БИК в сравнении с пациентами с АКТГ-эктопированным синдромом, что указывает на возможность их валидации для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимых форм гиперкортицизма.
3. Не выявлено связи между состоянием сосудистой сети и клеточным составом АКТГ-секретирующих аденом с визуализацией при МРТ.
4. Пятилетние исходы нейрохирургического лечения пациентов с болезнью Иценко-Кушинга не связаны с обнаружением аденомы гипофиза при МРТ на предоперационном этапе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с подтвержденной болезнью Иценко-Кушинга без визуализации аденомы при МРТ показано нейрохирургическое лечение в специализированных центрах с ожиданием сходной со случаями визуализируемых аденом эффективности лечения.

2. Пациентам с болезнью Иценко-Кушинга показано длительное комплексное наблюдение в связи с вероятностью развития рецидива в течение 5 лет после проведенного нейрохирургического лечения, особенно при визуализированной на дооперационном этапе аденоме и макроаденомах.

Список сокращений и условных обозначений

- АКТГ – адренокортикотропный гормон
БИК – болезнь Иценко-Кушинга
ДИ – доверительный интервал
ИГХ – иммуногистохимическое исследование
ИМТ – индекс массы тела
КТ – компьютерная томография
мкРНК – микроРНК
мРНК – матричная РНК
МРТ – магнитно-резонансная томография
МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
НКС – нижние каменистые синусы
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
ЭГ – эндогенный гиперкортицизм

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. **Хандаева П.М.**, Воронкова И.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Воронцов А.В., Григорьев А.Ю., Мельниченко Г.А. Связь морфологии сосудистой сети АКТГ-секретирующих аденом гипофиза с возможностью визуализации опухоли при магнитно-резонансной томографии. // Проблемы эндокринологии. - 2016. - Т. 62. - № 4. - С. 11-17. doi: 10.14341/probl201662411-17.
2. Лапшина А.М., **Хандаева П.М.**, Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. Роль микроРНК в онкогенезе опухолей гипофиза и их практическая значимость.

- // Терапевтический архив. - 2016. - Т. 88. - № 8. - С. 115-120. doi: 10.17116/terarkh2016888115-120.
3. **Хандаева П.М.**, Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Воронцов А.В., Григорьев А.Ю., Воронкова И.А., Лапшина А.М., Ситкин И.И., Мельниченко Г.А. Оценка исходов нейрохирургического лечения пациентов с болезнью Иценко-Кушинга в зависимости от наличия визуализации аденомы при МРТ. Пятилетнее наблюдение. // Проблемы эндокринологии. - 2017. - Т. 63. - № 5. - С. 276-281. doi: 10.14341/probl2017635276-281
 4. Belaya ZE, **Khandaeva PM**, Rozhinskaya LYa, Vorontsov AV, Sitkin II, Grigoriev AY, Ivashenko OV, Dzeranova LK, Melnichenko GA. Neurosurgery outcome in patients with Cushing's disease with and without visualised pituitary adenoma on MRI, who underwent inferior petrosal sinus sampling. // Endocrine Abstracts. – 2015. – Vol. 37. – GP22.07 doi: 10.1530/endoabs.37.GP.22.07.
 5. Voronkova IA, Belaya ZE, **Khandaeva PM**. Immunohistochemical characteristics of blood vessels in non-visualized and visualized on MRI pituitary adenomas in patients with Cushing's disease (pilot study). // Endocrine Abstracts. - 2016. - Vol. 41. – EP 13. doi: 10.1530/endoabs.41.EP13.
 6. Belaya ZE, **Khandaeva PM**, Nikitin AG, Solodovnikov AS, Sitkin II, Grebennikova TA, Vorontsov AV, Rozhinskaya LYa, Melnichenko GA, Dedov II. Plasma microRNA expression in patients with Cushing's disease differs from ACTH-ectopic Cushing's syndrome. // Endocrine Abstracts. – 2018. – Vol. – 56. – OC8.1. doi: 10.1530/endoabs.56.OC8.1
 7. **Khandaeva PM**, Belaya ZE, Lutcenko AS, Nikitin AG, Rozhinskaya LYa, Melnichenko GA. The role of miR-16-5p, miR-145-5p, miR-7g-5p and its targeted genes in development of ACTH-dependent Cushing syndrome. // ENEA abstracts. - 2018. - p47
 8. **Хандаева П.М.**, Воронкова И.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Воронцов А.В., Ситкин И.И., Григорьев А.Ю., Мельниченко Г.А. Иммуногистохимические характеристики кровеносных сосудов в визуализируемых и невизуализируемых аденомах гипофиза на МРТ у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга. Пилотное

исследование. // Сборник тезисов VII Всероссийского конгресса эндокринологов. – 2016. – С. 280.

9. **Хандаева П.М.**, Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Воронцов А.В., Григорьев А.Ю., Мельниченко Г.А. Результат пятилетнего наблюдения за пациентами с болезнью Иценко-Кушинга, прошедших нейрохирургическое лечение. // Сборник тезисов III Всероссийского эндокринологического конгресса с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии». – 2017. – С. 285.