

На правах рукописи

Малыгина Анастасия Андреевна

**ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ В
ДИАГНОСТИКЕ ЭНДОГЕННОГО ГИПЕРКОРТИЦИЗМА И ЕГО
АКТГ-ЗАВИСИМЫХ ФОРМ**

3.1.19. Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика
И.И. Дедова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Белая Жанна Евгеньевна

доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Астафьева Людмила Игоревна

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник 8 нейрохирургического отделения (базальные опухоли), профессор кафедры нейрохирургии с курсами нейронаук Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Гринева Елена Николаевна

Член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук, директор Института эндокринологии, заведующая кафедрой эндокринологии с клиникой Института медицинского образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Тюменский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России)

Защита состоится «...».....2025 года в ____ часов на заседании
диссертационного совета 21.1.045.01 в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ
эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России - www.endocrincentr.ru.
Автореферат разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Мазурина Наталия Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эндогенный гиперкортицизм (ЭГ) – тяжелое нейроэндокринное заболевание, при естественном течении которого смертность достигает 50% за пять лет наблюдения [Plotz, C.M. et al., 1952], что определяет важность своевременной диагностики и выбора оптимальной тактики лечения. Несмотря на яркую клиническую картину изменения внешности, далеко не всегда диагноз ЭГ устанавливается своевременно из-за неспецифичности многих симптомов. Так, например, классические стрии и матронизм встречаются лишь в 50% случаев, преимущественно у лиц молодого возраста. Кроме того, диагностика ЭГ объективно сложна для амбулаторных врачей, так как определение кортизола крови и АКТГ неинформативно [Nieman, L.K. et al., 2008], сбор суточной мочи на свободный кортизол сопряжен с ошибками пациента, а определение кортизола в сыворотке крови в вечерние часы требует госпитализации. Сведение инвазивности к минимуму и повышение простоты и точности лабораторно-диагностических мероприятий может стать важным звеном в совершенствовании диагностики ЭГ. Анализ слюны на свободный кортизол, собранной в 23:00, доказал свою эффективность для диагностики ЭГ и вошел в международные и российские клинические рекомендации [Nieman, L.K. et al., 2008; Мельниченко, Г.А. и соавт., 2015]. Этот метод исследования также отличается рядом технических преимуществ: пациент может выполнить сбор слюны самостоятельно, в домашних условиях, методика безболезненная, что минимизирует вероятность стресса; слюна содержит свободный, стабильный при комнатной температуре до 7 дней кортизол, что делает возможным дистанционное проведение анализа (отправление материала по почте); уровень кортизола в слюне не зависит от содержания кортизол-связывающего глобулина (КСГ), что дает возможность проводить анализ в группе пациентов, принимающих заместительную гормональную терапию эстрогенами, а также данный анализ имеет преимущество перед определением свободного кортизола в суточной моче, так как количество слюны не влияет на результат [Valassi, E. et al., 2017]. Вместе с тем, одного теста недостаточно для установления ЭГ, поэтому рекомендуется обязательное дополнительное проведение пробы с 1 мг дексаметазона или сбор суточной мочи на свободный кортизол [Nieman, L.K. et al., 2008]. В Российской Федерации терминологически ночной подавляющий тест (НПТ) с 1 мг дексаметазона и малая проба с дексаметазоном (МПД) являются синонимами и предполагают определение кортизола утром после приема 1 мг дексаметазона. В данной диссертационной работе мы будем использовать термин МПД. До настоящего времени не существует точки разделения для проведения МПД с определением кортизола по слюне, хотя таковая определена для кортизола в крови (50 нмоль/л) [Barbot, M. et al., 2020]. Определение подобной точки разделения для кортизола в слюне позволила бы сделать первый этап диагностики ЭГ полностью неинвазивным.

Среди причин ЭГ наиболее частой является кортикотропинома (60-70% случаев), более редко встречаются кортикостеромы (~20%) и АКТГ-эктопированный синдром (5-10%) [Lacroix, A. et al., 2015].

На данном этапе имеется ограниченная информация, касающаяся биологических особенностей нейроэндокринных новообразований, секретирующих АКТГ [Seltzer, J. et al., 2015]. В качестве перспективного и уже доказавшего свою значимость для диагностики многих других патологий, маркера предлагается исследовать определенные наборы микроРНК как в периферической крови, так и в других биологических жидкостях и тканях [Cho, H.J. et al. 2020; Fabris, L. et al., 2016; Ghizoni, J.S. et al., 2020]. МикроРНК – это класс малых (состоящих примерно из 22 нуклеотидов) некодирующих высококонсервативных одноцепочечных РНК, осуществляющих регуляцию на посттранскрипционном уровне таких процессов как клеточная пролиферация, дифференциация, выживаемость и апоптоз [Matsuyama, H. et al., 2019]. Ранее было выявлено, что разные опухоли экспрессируют различные микроРНК, в том числе карциноидные опухоли и кортикотропиномы [Wierinckx, A. et al. 2017; Mairinger, F.D. et al., 2014]. Разница в экспрессии miR-145, miR-21, miR-141, let-7a, miR-150, miR-15a, miR-16 и miR-143 ранее наблюдалась в кортикотропиномах по сравнению с интактным гипофизом [Amaral, F. et al. 2009].

В крупных обзорах были обобщены микроРНК и таргетные гены в различных типах аденом гипофиза [Wierinckx, A. et al. 2017; Feng, Y. et al., 2018]. В нескольких исследованиях сообщалось о разнице в экспрессии микроРНК в нейроэндокринных опухолях, включая карциноидные опухоли легких [Feng, Y. et al., 2018; Yoshimoto, T. et al., 2017; Di Fazio, P. et al., 2017]. Было бы перспективным проанализировать различия в циркулирующих микроРНК в том числе при селективной заборе крови из нижних каменистых синусов (НКС).

Таким образом, актуальными являются разработка и внедрение неинвазивных методов диагностики ЭГ, а также изучение новых биомаркеров, которые могут использоваться как для диагностики, так и для лучшего понимания патофизиологических процессов, стоящих за формированием кортикотропином, что в дальнейшем может способствовать разработке принципиально новых тестов для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимых форм ЭГ.

Цель работы

Разработать методы малоинвазивной диагностики эндогенного гиперкортицизма и изучить различия в циркулирующих микроРНК крови при АКТГ-зависимом гиперкортицизме как потенциальных диагностических биомаркеров.

Задачи исследования

1. Исследовать диагностические характеристики определения свободного кортизола в слюне в ходе пробы с 1 мг дексаметазона для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением.
2. Изучить диагностические характеристики комбинированного применения оценки свободного кортизола в слюне в 23:00 и 08:00 в ходе пробы с 1 мг дексаметазона для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением.
3. Выявить отличающиеся по профилю экспрессии микроРНК в плазме крови из нижних каменистых синусов у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга (БИК) и АКТГ-эктопированного синдрома (АКТГ-ЭС) методом секвенирования нового поколения (NGS).
4. Выполнить валидизацию конкретных микроРНК в образцах периферической крови пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом методом ПЦР в реальном времени (RT-qPCR).

Научная новизна

- Впервые определена отрезная точка для диагностики ЭГ по уровню кортизола в слюне методом ЭХЛА после приема 1 мг дексаметазона.
- Впервые изучена комбинация исследования свободного кортизола в слюне в 23:00 и уровня кортизола слюны после приема 1 мг дексаметазона для диагностики ЭГ среди лиц с ожирением.
- Впервые проведен анализ уровней микроРНК при АКТГ-зависимом ЭГ в крови из НКС и периферической крови.

Теоретическая и практическая значимость работы

- Разработан алгоритм неинвазивной диагностики ЭГ с определением уровня кортизола в вечерней слюне и определением кортизола в слюне в утренние часы в ходе малой пробы с дексаметазоном.

Личное участие автора в получение научных результатов

Автором разработан дизайн фрагментов исследования, выполнена основная часть сбора клинико-анамнестических данных, систематизирована информация, сформирована база пациентов. Автором проведен набор пациентов в исследование, сбор, подготовка и заморозка образцов слюны и крови для дальнейшего выполнения анализа, а также выполнена статистическая обработка и анализ полученных результатов, которые предоставлены в виде публикаций и заявки на патент. Автор принимал участие в предварительной обработке биологических образцов для исследования, в том числе выделении микроРНК.

Основные положения, выносимые на защиту

- Исследование слюны на кортизол в 08:00 после приема 1 мг дексаметазона в сочетании с определением кортизола в 23:00 накануне может быть интегрировано в алгоритм неинвазивной диагностики ЭГ.
- Экспрессия спектра микроРНК, оцененная методом NGS (miR-10b-5p, miR-152-3p, miR-345-5p, miR-186-5p, miR-375, miR-27a-3p, let-7e-5p, let-7c-5p, let-7f-5p, miR-206, let-7b-5p), подавлена у пациентов с АКТГ-секретирующей опухолью гипофиза по сравнению с условно интактным гипофизом при АКТГ-эктопированном синдроме.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 25 февраля 2025 года на расширенном заседании межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Результаты, описанные в диссертационной работе, были представлены в виде постерного доклада на 18-м Конгрессе Европейской нейроэндокринологической ассоциации (ЕНЕА, Вроцлав, 2018 г.), устного доклада на 26-м Национальном конгрессе эндокринологов «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение» (2019 г.), электронного постера на 22-м Европейском эндокринологическом конгрессе (ЕСЕ, 2020 г.), устного доклада на 27-м Национальном конгрессе эндокринологов с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (2021 г.), постерного доклада на 21-м Конгрессе Европейской нейроэндокринологической ассоциации (ЕНЕА, Севилья, Испания, 2024 г.).

В ходе работы был получен патент «Способ неинвазивной диагностики эндогенного гиперкортицизма» (патент РФ № 2018120923, 06.06.2018).

Публикации

По теме кандидатской диссертации опубликовано 9 печатных работах, в том числе в рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России медицинских журналах – 2; тезисы, опубликованные за рубежом – 2, тезисы, опубликованные в сборниках российских конференций – 2, патент – 1, учебно-методических пособий – 2.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и заключение), выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Библиография включает 194 источника (из них 12 отечественных и 182 зарубежных). Работа иллюстрирована 15 таблицами и 8 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты, включенные в исследование

В соответствии с поставленными целями и задачами в исследование включено 248 пациентов: 120 пациентов с БИК, 18 пациентов с АКТГ-ЭС, 56 пациентов с ожирением, 54 здоровых добровольца. Все включенные пациенты проходили обследование в отделении нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ (ныне ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии Минздрава России») в период с 2015 по 2024 гг.

АКТГ-зависимый гиперкортицизм подтвержден на основании как минимум 2х диагностических критериев: повышенного значения кортизола слюны в 23:00, повышенной экскреции свободного кортизола с мочой по данным исследования суточной мочи на кортизол, отсутствия подавления кортизола в ходе МПД. Диагноз АКТГ-зависимого ЭГ устанавливался на основании значения АКТГ утром более 10 пг/мл в сочетании с лабораторным подтверждением ЭГ. У лиц без визуализации аденомы или с аденомой менее 6 мм проводился селективный забор крови из НКС. Диагноз АКТГ-эктопированный синдром устанавливался на основании результатов селективного забора крови из НКС. Окончательная верификация диагноза БИК проводилась на основании данных гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования послеоперационного материала у пациентов после нейрохирургического/хирургического вмешательства и/или послеоперационной ремиссии. Окончательная верификация диагноза АКТГ-эктопированный синдром проводилась на основании гистологического, ИГХ исследования послеоперационного материала (при наличии) и/или данным послеоперационной ремиссии у пациентов с установленной локализацией НЭО. У нескольких пациентов точную локализацию АКТГ-продуцирующей опухоли в ходе комплексного онкопоиска (МСКТ грудной клетки, колоноскопии, гастроскопии, УЗИ щитовидной железы, ПЭТ-КТ 68Ga-DOТА-ТАТЕ, скintiграфия с однофотонной эмиссионной компьютерной томографией, совмещенной с рентгеновской компьютерной томографией (ОФЭКТ/КТ), с 99mTc-Тектротидом) установить не удалось (окультная опухоль).

Послеоперационная ремиссия после нейрохирургического лечения БИК или удаления НЭО при АКТГ-ЭС оценивалась по клинико-лабораторной картине развития надпочечниковой недостаточности или при нормализации кортизола крови и/или слюны в 23:00, а также свободного кортизола суточной мочи. Диагноз алиментарно-конституционального ожирения устанавливался на основании подсчета индекса массы тела (ИМТ более 30 кг/м²) при исключении гормональных причин ожирения.

В группу контроля были включены здоровые добровольцы старше 18 лет без клинических признаков гиперкортицизма и других тяжелых системных заболеваний, с нормальным ИМТ, в основной массе набирались среди сотрудников ФГБУ НМИЦ эндокринологии МЗ РФ.

Дизайн исследования

Дизайн исследований исходя из поставленных целей и задач, критерии включения и исключения представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики выполненных исследований

| Раздел исследования | Критерии включения | Критерии исключения | Тип исследования | Объем выборки |
|--|--|---|--|---|
| Исследовать диагностические возможности определения свободного кортизола в слюне в ходе МПД. | <ol style="list-style-type: none"> 1. пациенты, обратившиеся для амбулаторного или стационарного обследования в НМИЦ эндокринологии с направительным диагнозом ЭГ; 2. пациенты с избыточной массой тела, у которых диагноз ЭГ исключался по решению врачей НМИЦ эндокринологии на основании комплекса лабораторных исследований; 3. здоровые добровольцы, осмотренные врачами НМИЦ эндокринологии и не имевшие клинических признаков ЭГ; 4. возраст старше 18 лет. | <ol style="list-style-type: none"> 1. беременность; 2. работа в ночное время, прием глюкокортикоидов; 3. острые инфекционные заболевания; 4. обострение хронических заболеваний; 5. тяжелые соматические заболевания (почечная и печеночная недостаточность, терминальные состояния, острые периоды инсульта и инфаркта, ранее диагностированные злокачественные новообразования); 6. тяжелые психические расстройства; 7. злоупотребление алкоголем (установленный диагноз «хронический алкоголизм» или употребление крепких алкогольных напитков ежедневно); 8. прием препаратов, влияющих на метаболизм дексаметазона; 9. кровоточивость десен; 10. курение. | Диагностическое, проспективное исследование. | 54 пациента с ЭГ, 54 пациента с алиментарно-конституциональным ожирением, 56 здоровых добровольцев. |

| | | | | |
|--|--|---|---|---|
| Исследование экспрессии микроРНК в крови, оттекающей от гипофиза у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС методом высокопроизводительного секвенирования (NGS). | 1. Возраст старше 18 лет; 2. АКТГ-зависимый гиперкортицизм, подтвержденный на основании критериев, установленных действующими клиническими рекомендациями по диагностике БИК с последующей верификацией БИК или АКТГ-эктопии на основании результатов селективного забора крови из НКС и иммуногистохимического исследования. | 1. прием препаратов, снижающих уровень кортизола; 2. тяжелые системные заболевания, терминальные состояния; 3. беременность; 4. хроническая болезнь почек (ХБП) с СКФ менее 30 мл/мин/1,73м ² | одноцентровое, одномоментное, выборочное исследование случай-контроль | 24 пациента с БИК, 12 пациентов с АКТГ-ЭС |
| Исследование наиболее отличающихся по данным NGS микроРНК-кандидатов в плазме крови пациентов с БИК и АКТГ-ЭС методом ПЦР в реальном времени. | | | | 54 пациента с БИК, 13 пациентов с АКТГ-ЭС |

Методика забора биологического материала и проведения фармакологических проб

Забор слюны в 23:00 для определения уровня свободного кортизола проводился в стационарных или домашних условиях после детального обсуждения правил сбора материала и выдачи печатной инструкции при помощи специальной системы для сбора слюны Salivette Sarstedt. За час до сбора материала исключался прием пищи, курение и чистка зубов во избежание травматизации десен. В 23:00 ватный шваб из системы Salivette помещался в ротовую полость на 2-3 минуты, после чего возвращался в пробирку. После сбора материал хранился на дверце холодильника до отправки материала в лабораторию.

Забор утренних образцов слюны в ходе МПД выполнялся натошак в 08:00-09:00 по тому же принципу, что и забор слюны в 23:00 на том же анализаторе.

Забор крови из периферической вены для последующего проведения ПЦР осуществлялся в 08:00-10:00 натошак. Образцы крови подвергались двукратному центрифугированию (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов (A-4-81, Ф-4-81-MTP/Flex, FA-45-30-11 и F-45-48-PCR) на скорости 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут при температуре +5°C, далее осуществлялся забор плазмы и замораживание материала при температуре -80 C до дальнейшего анализа.

Двусторонний селективный забор крови из НКС выполнялся опытным сосудистым хирургом д.м.н. Ситкиным И.И. на базе ФГБУ НМИЦ эндокринологии МЗ РФ на васкулярной рентгеновской системе визуализации для инвазивных и диагностических процедур AlluraXper FD20 (Philips Medical Systems Nederland B.V., Нидерланды). Процедура проводилась в первой половине дня, после стандартной подготовки пациента и премедикации (диазепам 5 мг/мл в/м). Доступ осуществлялся через бедренную вену, через которую под рентгенологическим контролем после установки интродьюсеров 4F и 5F проводились многоцелевые катетеры 4F, которые устанавливались в правом и левом нижних каменистых синусах.

До введения стимуляционного агента осуществлялся забор базальных образцов плазмы крови из нижних каменистых синусов и нижней полой вены в пробирки с ЭДТА для определения АКТГ и пролактина, а также для дальнейшей оценки экспрессии микроРНК методом NGS. Для анализа микроРНК забирались образцы до введения десмопрессина с наибольшим градиентом АКТГ. Далее забор крови повторялся во время введения десмопрессина в дозе 8 мкг (Desmopressin Acetate 4 мкг в 1 мл, для внутривенных, внутримышечных и подкожных инъекций; Ferring Pharmaceuticals, Швейцария), а также через 3,5 и 10 мин после введения. После получения результатов уровня АКТГ в каждой точке, осуществлялся подсчет его градиента между каменистыми синусами и периферией (нижняя полая вена). Значения градиента АКТГ ≥ 2 до и ≥ 3 после введения препарата свидетельствовал о наличии болезни Иценко-Кушинга, более низкие значения градиента указывали на наличие АКТГ-ЭС. Обязательным этапом являлся подсчет градиента пролактина до введения десмопрессина для уточнения правильного позиционирования катетеров в нижних каменистых синусах. Градиент более 1,5 свидетельствовал о надлежащей установке катетеров. Для определения микроРНК брался образец с наибольшим градиентом АКТГ или пролактина.

Забор вечерних образцов плазмы крови для определения уровня вечернего кортизола и АКТГ проводился в условиях стационара в состоянии бодрствования в 23:00.

Забор утренних образцов плазмы крови для определения уровня АКТГ, а также других биохимических параметров осуществлялся натошак в 08:00-09:00.

Малая проба с дексаметазоном выполнялась согласно действующими клиническими рекомендациями: в 23:00 пациент принимал 1 мг дексаметазона, на следующий день в 08:00-09:00 проводился забор крови с определением кортизола. Проба считалась положительной при

снижении кортизола менее 50 нмоль/л [Nieman, L.K. et al., 2008; Мельниченко, Г.А. и соавт., 2015].

Забор суточной мочи осуществлялся в стационарных условиях: пациент собирал мочу в единую тару в течение 24-х часов: первая утренняя порция пропускалась, далее вплоть до утра следующих суток продолжался сбор мочи. Пациент был проинформирован, что при пропуске одной порции мочи, материал необходимо собирать заново. Сбор суточной мочи всегда предшествовал проведению МПД.

Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования выполнялись в лаборатории НМИЦ эндокринологии МЗ РФ.

Исследование слюны на кортизол в 23:00 проводилось на автоматическом анализаторе Cobas e 601 фирмы F. Hoffmann-LaRocheLtd, (каталожный No 11875116 122), используя метод ЭХЛА (точка разделения 9,4 нмоль/л). Исследование кортизола слюны утром проводилось тем же методом.

Уровень пролактина (референсные значения 60-510 мЕД/л) исследовался иммунохемилюминесцентным методом на автоматизированной системе Vitros (Johnson@Johson).

Исследования уровня АКТГ утром (референсный интервал 7-66 пг/мл) и вечером (референсный интервал 0-30 пг/мл), кортизола крови утром (171-536 нмоль/л) и вечером (46,0-270,0 нмоль/л) выполнены на электрохемилюминесцентных анализаторах фирмы Roche (Elecsys 2010; Cobas e601) стандартными наборами фирмы F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Анализ суточной экскреции свободного кортизола проводился иммунохемилюминесцентным методом на аппарате Vitros Eci с предварительной экстракцией диэтиловым эфиром (референсный интервал 60-413 нмоль/сут).

Инструментальные методы исследования

Магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга проводилась на магнитно-резонансном томографе Magnetom Harmony 1.0T фирмы Siemens (Германия) с введением гадолиниевого контрастного препарата.

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».

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ-КТ) с ^{99m}Tc -Тектронидом на аппарате GE Discovery NM/CT 670.

Также всем пациентам проводились антропометрические измерения (рост, вес) с подсчетом ИМТ путем оценки массы тела (кг) на квадрат роста (м^2), при этом значение $\text{ИМТ} \geq 30 \text{ кг/м}^2$ соответствовало ожирению, $\text{ИМТ} \geq 25 \text{ кг/м}^2$, но менее 30 кг/м^2 – избыточной массе тела.

Гистологические и иммуногистохимические исследования

Морфологический анализ образцов кортикотропином выполнен к.м.н. Лапшиной А.М. на базе отдела фундаментальной патоморфологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» и включал гистологический и иммуногистохимический (ИГХ) методы исследования.

В исследование были включены образцы ткани с наличием опухоли, объем которых был достаточен для гистологического и ИГХ 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 ИГХ реакции с антителами к АКТГ (1:100, Dako) и использованием низкомолекулярного цитокератина САМ 5.2 (1:100, Cell Marque) с демаскирующей обработкой щелочным буфером. ИГХ исследование выполнено с помощью автоматизированного аппарата (иммуостейнер Leica Bond Max) по стандартному протоколу.

Согласно морфологической классификации опухолей гипофиза ВОЗ от 2017 г. [Nishioka, Н., 2018] кортикотропиномы были разделены на плотногранулированные кортикотропиномы (ПГК), состоящие из базофильных клеток с интенсивным окрашиванием цитоплазмы большинства опухолевых клеток-кортикотрофов (при ИГХ); редкогранулированные кортикотропиномы (РГК) – аденомы, состоящие из базофильных и хромофобных клеток с очаговой и слабо выраженной иммуноэкспрессией АКТГ цитоплазмой опухолевых клеток; аденомы из Круксовских клеток (Crooke's cell) характеризующиеся преимущественно хромофобными клетками со «стекловидной», гиалиновой цитоплазмой, с секреторными гранулами, окрашенными антителами к АКТГ, смещенными к периферии опухолевых клеток, с накоплением цитокератиновых филаментов, выявляемые при ИГХ с антителами к САМ 5.2 в виде кольца вокруг ядер.

Генетические методы исследования

Высокопроизводительное секвенирование проводилось на базе лаборатории генетики Центра биомедицинских технологий Федерального научно-клинического центра ФМБА России и медико-генетического центра «Геномед».

Выделение микроРНК из плазмы крови проводилось с помощью miRNeasy 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).

Высокопроизводительное секвенирование методом NGS.

Для проведения высокопроизводительного секвенирования отбирали образцы с концентрацией суммарной РНК в водном растворе не ниже 5 нг/мкл. Экспрессию микроРНК анализировали с помощью секвенирования на Illumina NextSeq 500 (Illumina NextSeq 500, США). Библиотеки были подготовлены с помощью QIAseq miRNA Library Kit в соответствии со стандартными протоколами производителя. Биоинформационная обработка была следующей: адаптеры удалялись с помощью Cutadapt; полученные файлы FASTQ были затем картированы на геном человека (сборка GRCh37) с помощью bowtie2. FastQC использовался в качестве инструмента для визуализации различных измерений контроля качества. Для каждого образца последовательности аннотировались с использованием баз данных человеческих пре-микроРНК и зрелых микроРНК, предоставленных в miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) с помощью SeqBuster.TargetScan, Diana-TarBase v8 и mirPath v.3, были использованы для предсказания мишеней. Платформа miRNet использовалась для анализа взаимодействия микроРНК и их генов-мишеней.

Валидизация полученных микроРНК методом ПЦР в реальном времени.

Анализ экспрессии микроРНК производили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Исследование проводилось на оборудовании StepOnePlus (Applied Biosystems, США) с наборами TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, США) и TaqMan Advanced miRNA (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкциям производителей. Общий объем ПЦР реакции составлял

20 мкл. Условия амплификации фрагментов ДНК: 95C/20 сек – 1 цикл; 95C/1 сек, 95C/20 сек – 40 циклов. Данные экспрессии нормализованы с использованием геометрической средней референсной микроРНК (cel-miR-39-3p). Для получения значений пороговых циклов (cycle threshold, Ct) использовано программное обеспечение SDS (версия 2.3, Applied Biosystems, США). Значение Ct <35 выбрано в качестве порогового для определения экспрессии микроРНК. Для сравнительной оценки циркулирующих микроРНК использован метод дельта-Ct, выполненный в пакете ddCT версии 1.30.0.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в сотрудничестве с к.м.н Солодовниковым А.Г.

Количественные параметры представлены в виде среднего и стандартного отклонения (M+SD) или медианы (Me) и интерквартильных размахов [Q25; Q75], меры вариабельности - в виде абсолютных и относительных частот. 95% доверительные интервалы (95% ДИ) были рассчитаны методом Клоппера-Пирсона.

Сравнение по количественным параметрами пациентов разных групп проводили с использованием критерия Манна-Уитни, критерия Краскела-Уоллиса. Точный критерий Фишера был использован для сравнения независимых групп для качественных параметров. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Референсный интервал (свободный кортизол в слюне утром после МПД) рассчитан и представлен в виде 5–95 процентиля в качестве нижнего и верхнего пределов. Поиск точки разделения и расчет чувствительности и специфичности проводился на основании построения кривой операционных характеристик (ROC-анализ). В качестве оптимальной точки разделения использовался такой уровень показателя, которому соответствовала максимальная сумма чувствительности и специфичности метода, полученные в ходе ROC-анализа. Площади под кривыми операционных характеристик (AUC) были измерены для демонстрации возможностей диагностических тестов верно оценивать истинно положительные и истинно отрицательные результаты. Для сравнения качества диагностических тестов сравнивались площади под кривыми операционных характеристик. Статистически достоверным считался $p < 0,05$. Все p рассчитывались как двухсторонние. Для анализа данных использовались статистические пакеты SPSS 23.0.

Для коррекции множественности сравнений применялась поправка Бонферрони (кроме сравнений в уровнях экспрессии микроРНК, где был использован метод Бенджамини-Хохберга, встроенный в соответствующие вычислительные алгоритмы). После применения поправки значения p в диапазоне между рассчитанным и 0,05 интерпретировались как статистическая тенденция.

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 RT-qPCR, 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 p для исключения ложного обнаружения различий при множественных сравнениях с использованием метода Бенджамини-Хохберга.

Этическая экспертиза

Проведение исследования было одобрено комитетом по этике ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ (протокол №1 от 25.01.2017 г.) в рамках темы «Постгеномные технологии и неинвазивные методы в диагностике эндогенного гиперкортицизма и его АКТГ-зависимых форм».

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Изучение диагностических возможностей исследования кортизола слюны в ходе МПД методом ЭХЛА

Образцы слюны были взяты у 164 участников исследования: 54 здоровых добровольцев, 45 из которых имели нормальный ИМТ и еще 9 человек имели ИМТ в пределах от 25,0 - 30,0 кг/м², соответствующий избыточной массе тела, и 110 пациентов с ожирением (ИМТ \geq 30 кг/м²), имевших также клинические признаки ЭГ. ЭГ был подтвержден у 54 пациентов (47 пациентов – БИК, 5 пациентов – СИК, 2 пациента с АКТГ-эктопированным синдромом), у 56 пациентов было подтверждено алиментарно-конституциональное ожирение. Основные характеристики групп пациентов и здоровых добровольцев представлены в таблице 2.

Таблица 2. Основные количественные и качественные характеристики и сравнение групп пациентов с эндогенным гиперкортицизмом, ожирением и здоровыми добровольцами.

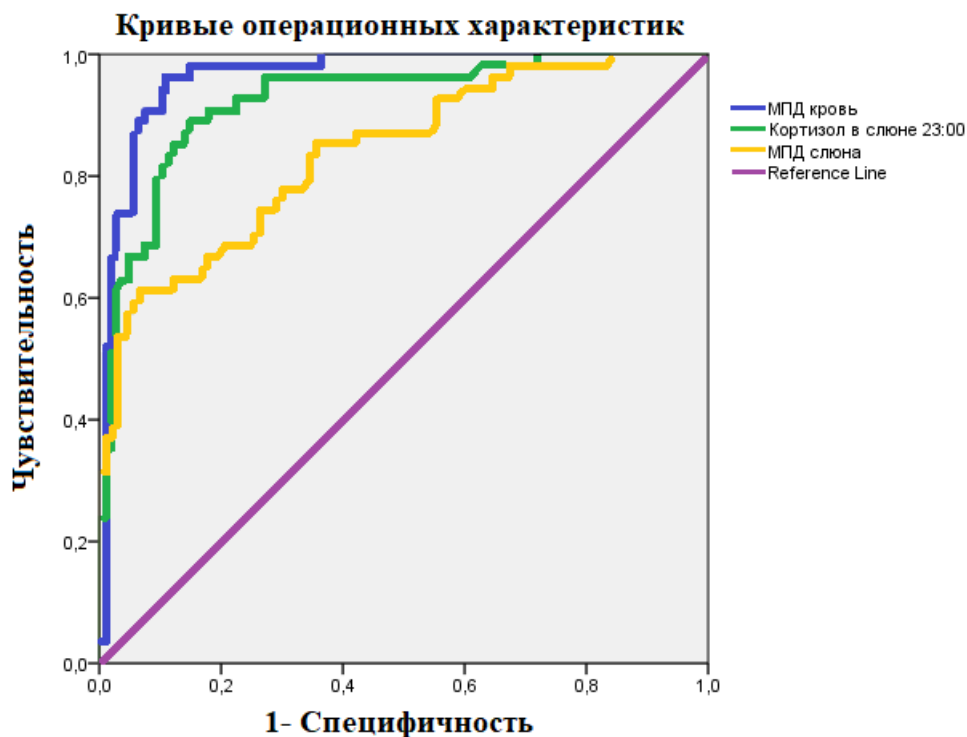
| | Эндогенный гиперкортицизм | Ожирение | Здоровые добровольцы | P* |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| N | 54 | 56 | 54 | |
| Пол: Ж/М, % | 44 (81,5%) 10 (18,5%) | 46 (82,1%) 10 (17,9%) | 44 (81,5%) 10 (18,5%) | 1,000 ¹ |
| Возраст, лет | 40,0 [26; 53] | 45,0 [34; 58] | 25,0 [24;29] | <0,001 ² |
| ИМТ, кг/м ² | 31,64 [27,4; 35,4] | 37,2 [32,8; 40,0] | 21,4 [19,6;23,5] | <0,001 ² |

Ж – женщины; М – мужчины; ИМТ – индекс массы тела. Меры вариабельности отражены в виде медианы и интерквартильного размаха. ¹ – точный критерий Фишера; ² – критерий Манна-Уитни. Пороговый P₀=0,017 (после применения поправки Бонферрони)

Группа пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением не отличалась от пациентов с ЭГ по полу и возрасту, но имела более высокий ИМТ.

В результате исследования, референсный интервал свободного кортизола слюны в ходе МПД, рассчитанный по данным группы 54 здоровых добровольцев, составил 0,5-12,7 нмоль/л (5-95 процентиля). Минимальное значение уровня свободного кортизола слюны, который удалось определить методом ЭХЛА составил 0,5 нмоль/л (лабораторная чувствительность метода). Максимальный зарегистрированный уровень кортизола в слюне в рамках МПД у здоровых добровольцев составил 29,6 нмоль/л. Максимальный уровень свободного кортизола слюны в 23:00 у здоровых добровольцев составил 20,4 нмоль/л.

Был выполнен ROC-анализ. При сравнении площадей под кривой операционных характеристик (AUC) с целью выявления ЭГ получены следующие результаты: для кортизола слюны в ходе МПД - 0,838 (95% ДИ 0,772-0,905), для кортизола в крови в ходе МПД - 0,965 (95% ДИ 0,939-0,992) и свободного кортизола слюны в 23:00 - 0,925 (95% ДИ 0,882-0,969). Были определены оптимальные точки разделения (cut-off) для исследования свободного кортизола в слюне в ходе МПД. При условии наибольшего значения суммы чувствительности и специфичности для разных когорт получены следующие результаты: для когорты «Контроль + ЭГ» значение составило 12,6 нмоль/л (чувствительность = 58,2%, специфичность = 96,2%), для когорты «ожирение + ЭГ» значение кортизола в слюне в ходе МПД составило 12,1 нмоль/л (чувствительность = 60%, специфичность = 92,9%), для всех когорт точка разделения составила 12,2 нмоль/л (чувствительность = 60,7%, специфичность = 93,4%). Учитывая незначительную вариабельность отрезных точек для разных когорт пациентов, cut-off значение было определено как 12,0 нмоль/л. На рисунке 1 представлены кривые операционных характеристик для исследованных методов диагностики.



| Определяемые параметры | AUC | Стандартная ошибка | Асимптотическая значимость | Асимптотический 95% Доверительный интервал | |
|------------------------|-------|--------------------|----------------------------|--|-----------------|
| | | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| МПД кровь | 0,965 | 0,014 | 0,000 | 0,939 | 0,992 |
| Кортизол в слюне 23:00 | 0,925 | 0,022 | 0,000 | 0,882 | 0,969 |
| МПД слюна | 0,838 | 0,034 | 0,000 | 0,772 | 0,905 |

Рисунок 1. Кривые операционных характеристик для анализа слюны на кортизол в ходе МПД, анализа крови на кортизол в ходе МПД и кортизола слюны в 23:00. Примечание: AUC – площадь под кривой операционных характеристик.

Диагностические возможности анализа слюны на кортизол в ходе МПД при точке разделения 12,0 нмоль/л сведены в таблице 3.

Таблица 3. Диагностические возможности определения кортизола в слюне в ходе МПД методом ЭХЛА при cut-off значении равном 12,0 нмоль/л.

| | Выявление ЭГ среди пациентов с: | |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| | нормальным ИМТ | ожирением |
| Точка разделения (cut-off) | 12,0 нмоль/л | |
| Чувствительность (95%ДИ) | 61,1% (47,8-72,96%) | |
| Специфичность (95%ДИ) | 92,5% (82,4-97,08%) | 92,8% (83,02-97,19%) |
| ПЦПР (95%ДИ) | 8,25 (3,14-21,69) | 8,56 (3,25-22,52) |

| | | |
|---|----------------------|----------------------|
| ПЦОР (95%ДИ) | 0,42 (0,29-0,592) | 0,42 (0,3-0,59) |
| Отношение правдоподобия для положительного результата теста | 8,25 (3,23-26,24) | 8,55 (3,33-27,22) |

Учитывая, что при выбранной нами точке разделения кортизола слюны в ходе МПД чувствительность недостаточна высокая, были определены границы «серой зоны» для данного теста. При анализе наибольшей суммы чувствительность + специфичность, при которой чувствительность была максимальной, выявлено, что при значении кортизола слюны 5,2 нмоль/л, чувствительность увеличивается до 85,2% (95% ДИ 73,4-92,3) при специфичности 57,3% (95% ДИ 47,9-66,1). Таким образом, диапазон с 5,2 нмоль/л до 12 нмоль/л можно считать границами «серой зоной», при этом, при получении результатов анализа, находящегося в данном промежутке, рекомендуется провести уточняющее исследование, так как ЭГ не может быть полностью исключен. Диагностические возможности анализа слюны в ходе МПД при точке разделения 5,2 нмоль/л отражены в таблице 4.

Таблица 4. Диагностические возможности определения кортизола в слюне в ходе малой пробы с дексаметазоном методом электрохемилюминесцентного анализа при точке разделения кортизола слюны 5,2 нмоль/л.

| | Выявление ЭГ среди пациентов с: | |
|--|---------------------------------|----------------------|
| | нормальным ИМТ | ожирением |
| Точка разделения (cut-off) | 5,2 нмоль/л | |
| Чувствительность (95% ДИ) | 85,2% (73,4-92,3%) | |
| Специфичность (95% ДИ) | 59,3% (46,0-71,3%) | 55,4% (42,41-67,61%) |
| ПЦПР (95% ДИ) | 0,89 (0,76-0,96) | 0,89 (0,76-0,96) |
| ПЦОР (95% ДИ) | 0,70 (0,63-0,74) | 0,71 (0,65-0,75) |
| Отношение правдоподобия для положительного результата теста | 8,25 (3,23-26,24) | 8,55 (3,33-27,22) |

При анализе комбинации исследования свободного кортизола слюны в 23:00 и кортизола в ходе МПД при точке разделения 5,2 нмоль/л были получены результаты, свидетельствующие о более высоких показателях чувствительности. Таким образом, количество ложноотрицательных результатов у пациентов с ЭГ сократилось до 3 случаев, процент дискордантных результатов уменьшился до 14,8% (8 случаев). Тем не менее, что закономерно, за счет снижения специфичности увеличилось общее количество ложноположительных результатов у пациентов без ЭГ.

Изучена диагностическая возможность комбинации исследования кортизола слюны в 23:00 и кортизола слюны в ходе МПД, так как данная комбинация была бы оптимальным выбором для пациента в виду полной неинвазивности и возможности удаленной диагностики. Выявлено, что в когорте пациентов с ЭГ (n=54), процент дискордантных результатов составил 33,3% (18 случаев), оба исследования были ложноотрицательными в 5 случаях. Вследствие более высокой специфичности, при анализе групп пациентов без ЭГ диагностические возможности такой комбинации были несколько выше. При анализе данных пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением (n=56) выявлено, что процент дискордантных результатов

равен 12,5% (7 случаев), при этом оба теста были ложноположительны в 4 случаях. В контрольной группе (n=54) оба теста показали ложноположительные результаты лишь в двух случаях, при этом процент дискордантных результатов был минимальным и составил 5,6% (3 случая).

При сравнении диагностических возможностей комбинации исследований кортизола слюны в 23:00 и кортизола слюны в ходе пробы с 1 мг дексаметазона (с учетом «серой зоны» 5,2-12,0 нмоль/л) с классической комбинацией исследований кортизола слюны в 23:00 и кортизола крови в ходе пробы с 1 мг дексаметазона обращают на себя внимание удовлетворительные показатели чувствительности первой комбинации (77,8%), которые, тем не менее, несколько уступают диагностическим возможностям классической комбинации (85,2%). При учете выбранной «серой зоны» неинвазивная комбинация тестов отличается невысокими показателями специфичности (45,5%), при этом, если опираться на точку разделения 12,0 нмоль/л, значения специфичности возрастают до 83,6%, что превосходит классическую комбинацию тестов (специфичность 70,9%). Более подробное сравнение диагностических возможностей комбинации тестов представлено в таблице 5.

Таблица 5. Сравнение диагностических возможностей двух различных комбинаций исследований при точке разделения кортизола слюны в ходе МПД при учете «серой зоны» 5,2-12,0 нмоль/л.

| | Комбинации тестов | |
|--|--|--|
| | Кортизол слюны в 23:00 + кортизол слюны в ходе МПД | Кортизол слюны в 23:00 + Кортизол крови в ходе МПД |
| Чувствительность (95% ДИ) | 77,8% (66,4% - 86,9%) | 85,2% (74,5-92,6) |
| Специфичность (95% ДИ) | 45,5% (39,9-49,9) | 70,9% (65,7-74,5) |
| ПЦПР (95% ДИ) | 0,41 (0,35-0,46) | 0,59 (0,51-0,64) |
| ПЦОР (95% ДИ) | 0,81 (0,71-0,89) | 0,91 (0,84-0,95) |
| Отношение правдоподобия для положительного результата теста | 1,43 (1,11-1,73) | 2,93 (2,17-3,63) |

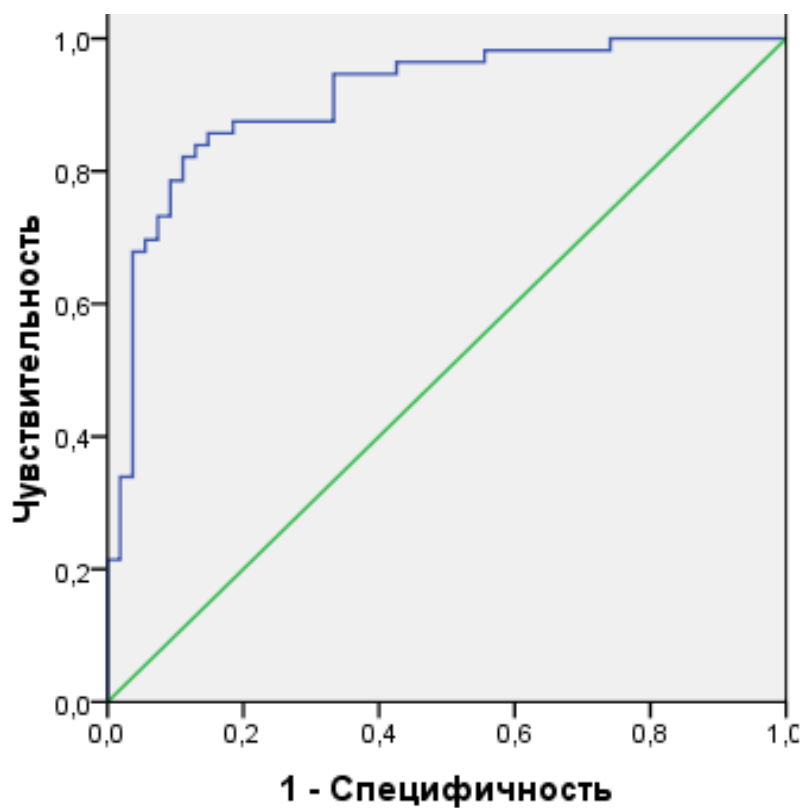
При комбинации исследований кортизола слюны в 23:00 и в ходе МПД при отрезной точке 5,2 нмоль/л чувствительность составила 77,8%. Сравнение диагностических возможностей классической комбинации исследований кортизола в слюне в двух точках представлено в таблице 6.

Таблица 6. Сравнение диагностических возможностей двух комбинаций исследований при точке разделения кортизола слюны в ходе МПД при различных точках разделения.

| | Комбинации тестов | |
|------------------------------|--|---|
| | Кортизол слюны в 23:00 + кортизол слюны в ходе МПД (точка разделения 5,2 нмоль/л) | Кортизол слюны в 23:00 + Кортизол слюны в ходе МПД (точка разделения 12,0 нмоль/л) |
| Чувствительность (95% ДИ) | 77,8% (66,4% - 86,9%) | 61,1% (50,0-70,7) |

| | | |
|--|----------------------|----------------------|
| Специфичность (95% ДИ) | 45,5% (39,9-49,9) | 83,6% (78,2-88,3) |
| ПЦПР (95% ДИ) | 0,41 (0,35-0,46) | 0,65 (0,53-0,75) |
| ПЦОР (95% ДИ) | 0,81 (0,71-0,89) | 0,81 (0,76-0,86) |
| Отношение правдоподобия для положительного результата теста | 1,43 (1,11-1,73) | 3,74 (2,29-6,05) |

Был проведен ROC-анализ для комбинации исследований кортизола слюны в 23:00 и в ходе МПД. Площадь под кривой операционных характеристик составила 0,910 (см. рис. 2).



| Определяемые параметры | AUC | Стандартная ошибка | Асимптотическая значимость | Асимптотический 95% Доверительный интервал | |
|--|-------|-----------------------|-------------------------------|---|--------------------|
| | | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| Комбинация исследований кортизола слюны в 23:00 и кортизола слюны в ходе МПД | 0,910 | 0,028 | 0,000 | 0,854 | 0,965 |

Рисунок 2. Кривые операционных характеристик для комбинации исследований слюны на кортизол в 23:00 и кортизола слюны в ходе МПД. Примечание: AUC – площадь под кривой операционных характеристик.

Таким образом, нами разработан алгоритм неинвазивной диагностики ЭГ на основании исследования кортизола слюны в 23:00 в комбинации с исследованием кортизола слюны в ходе МПД. При этом однонаправленные результаты обоих исследований могут с большой долей вероятности подтвердить или опровергнуть диагноз ЭГ, при дискордантных результатах диагностику следует дополнить исследованием суточной экскреции кортизола с мочой (см. рисунок 3).

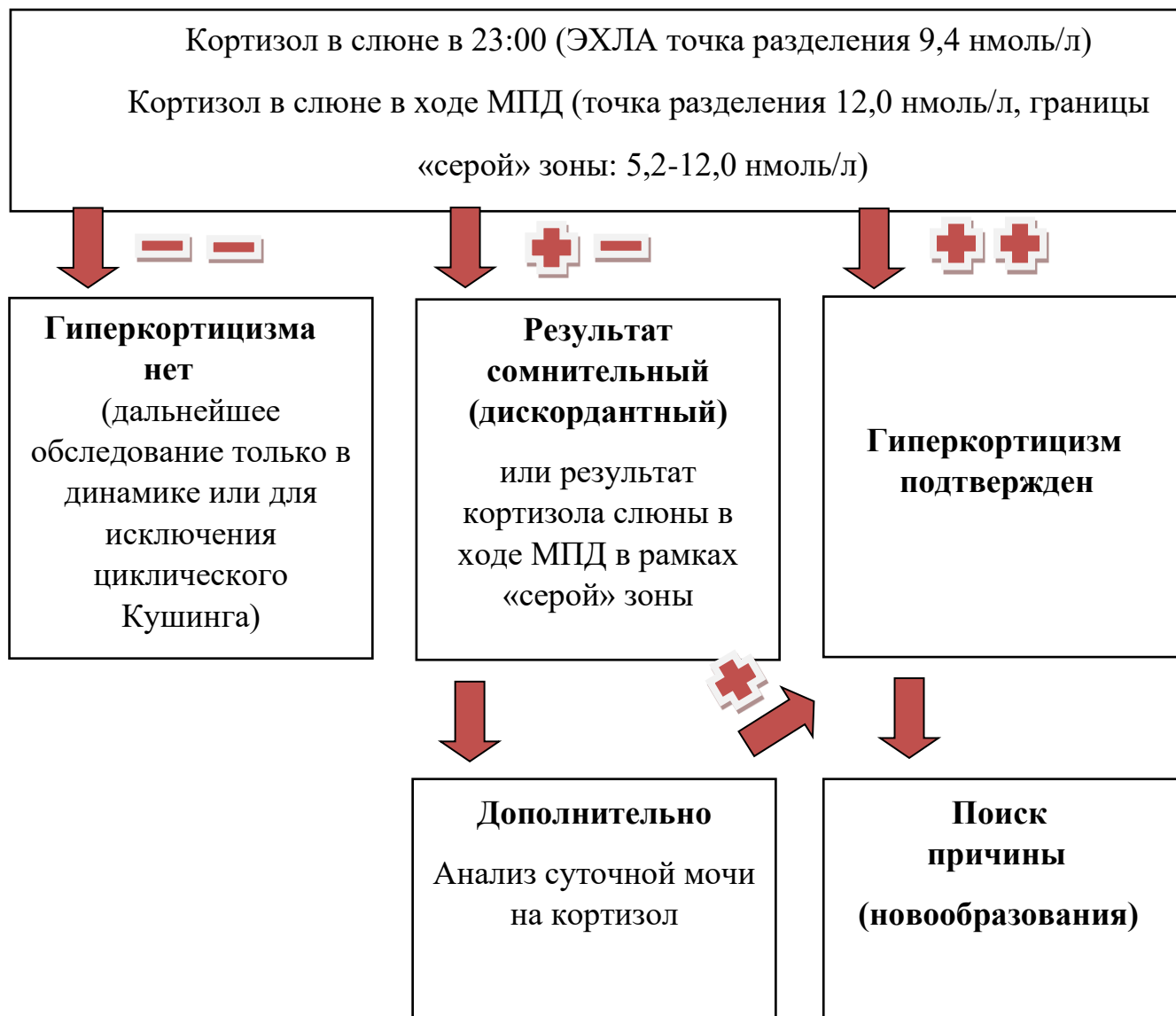


Рисунок 3. Схематическое отображение алгоритма неинвазивной диагностики ЭГ.

Исследование микроРНК у пациентов болезнью Иценко-Кушинга и АКТГ-эктопированным синдромом

Определение микроРНК в образцах плазмы крови, оттекающей от гипофиза у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС

В исследование были включены 24 пациента с БИК и 12 пациентов с АКТГ-ЭС. Общая характеристика участников представлена в таблице 7.

Таблица 7. Основные характеристики пациентов, включенных в исследование для определения микроРНК в крови, оттекающей от гипофиза.

| | БИК | АКТГ-ЭС | P* |
|-----------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|
| N | 24 | 12 | |
| Пол: М:Ж (%) | 3(12,5%):21 (87,5%) | 4(33,33%):8 (66,67%) | 0,190 ¹ |
| Возраст, лет | 46 [33; 54] | 54 [38; 60] | 0,177 ² |
| ИМТ, кг/м ² | 31 [29,2; 36,1] | 33,35 [24,6; 41,4] | 0,987 ² |
| АКТГ утром, пг/мл | 58 [49,1; 84,2] | 181,2 [84,9; 210,5] | 0,003 ² |
| АКТГ вечером, пг/мл | 49,12 [29,1; 74,0] | 112,81 [66,3; 193,7] | 0,009 ² |
| Кортизол суточной мочи, нмоль/сут | 1120 [796,5; 2217,3] | 3537,6 [922,4; 6982,6] | 0,062 ² |
| Кортизол слюны в 23:00, нмоль/л | 29,94 [15,7; 52,6] | 80,74 [16,3; 104,2] | 0,299 ² |

М-мужчины; Ж-женщины; ИМТ- индекс массы тела; Количественные данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов; ¹ – точный критерий Фишера; ² – критерий Манна-Уитни.

*Пороговый P₀=0,007 (после применения поправки Бонферрони)

Все пациенты разделены на группы согласно результатам селективного забора крови из НКС. Всем пациентам из группы БИК выполнена трансфеноидальная аденомэктомия (ТА): в 21 случае достигнута ремиссия, в 3 случаях сохранялся гиперкортицизм, по причине чего в одном случае из-за выраженности симптомов выполнена двусторонняя адреналэктомия (ДА). Из 12 пациентов с АКТГ-ЭС у 6-и диагностирован карциноид легкого, у 1 - феохромоцитома с продукцией АКТГ, еще у 1 - НЭО поджелудочной железы. В 4 случаях источник гиперпродукции АКТГ не был обнаружен после применения всех возможных методов визуализации (КТ органов грудной клетки, малого таза и брюшинного пространства, гастроскопии, колоноскопии, позитронно-эмиссионной томографии с применением соматостатина). Хирургическое удаление опухоли выполнено в 7 случаях: в 5 случаях удален карциноид легкого, в 1 случае - НЭО поджелудочной железы, еще в 1 случае - феохромоцитома надпочечника с гиперпродукцией АКТГ. Во всех случаях наблюдалась послеоперационная ремиссия. Один пациент с подтвержденным карциноидом и циклическим гиперкортицизмом отказался от хирургического лечения. За период наблюдения (4-6 лет) умерло 2 пациента: пациент, отказавшийся от хирургического лечения, умер в результате тяжелой инфекции COVID-19 и пациент с оккультной опухолью (в результате полиорганной недостаточности).

В результате высокопроизводительного секвенирования методом NGS выявлены 187 дифференциально экспрессирующихся микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС с количеством прочтения более 100. Среди них отобраны 11 микроРНК со значением p < 0,05, которые также показали статистическую значимость после поправки на множественность сравнения (таблица 8).

Таблица 8. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС по данным NGS с количеством прочтений более 100.

| | микроРНК | Log 2 fold change | p | p* |
|---|------------|-------------------|-------|-------|
| 1 | miR-10b-5p | -11,379 | 0,001 | 0,001 |
| 2 | miR-152-3p | -13,021 | 0,001 | 0,001 |
| 3 | miR-345-5p | -13,309 | 0,001 | 0,001 |
| 4 | miR-186-5p | -11,728 | 0,001 | 0,002 |
| 5 | miR-375 | -11,469 | 0,001 | 0,002 |
| 6 | miR-27a-3p | -10,719 | 0,001 | 0,007 |

| | микроРНК | Log 2 fold change | p | p* |
|----|-----------|-------------------|-------|-------|
| 7 | let-7e-5p | -2,209 | 0,003 | 0,032 |
| 8 | let-7c-5p | -1,807 | 0,010 | 0,080 |
| 9 | let-7f-5p | -1,953 | 0,010 | 0,080 |
| 10 | miR-206 | -5,494 | 0,010 | 0,080 |
| 11 | let-7b-5p | -1,381 | 0,013 | 0,093 |

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде абсолютной экспрессии (2-dCt). Данные по экспрессии представлены в виде средней и стандартного отклонения. Log2FC – бинарные логарифмы значений кратности изменений, рассчитанных как отношения геометрических средних значений 2-dCt. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни.

*Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга.

Уровень экспрессии всех микроРНК-кандидатов был снижен у пациентов с БИК по сравнению с пациентами группы АКТГ-ЭС. Для дальнейшей валидации мы также включили miR-16-5p, которая наиболее значимо отличалась у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС по данным пилотного исследования. Тепловая карта выявленных микроРНК представлена на рисунке 4.

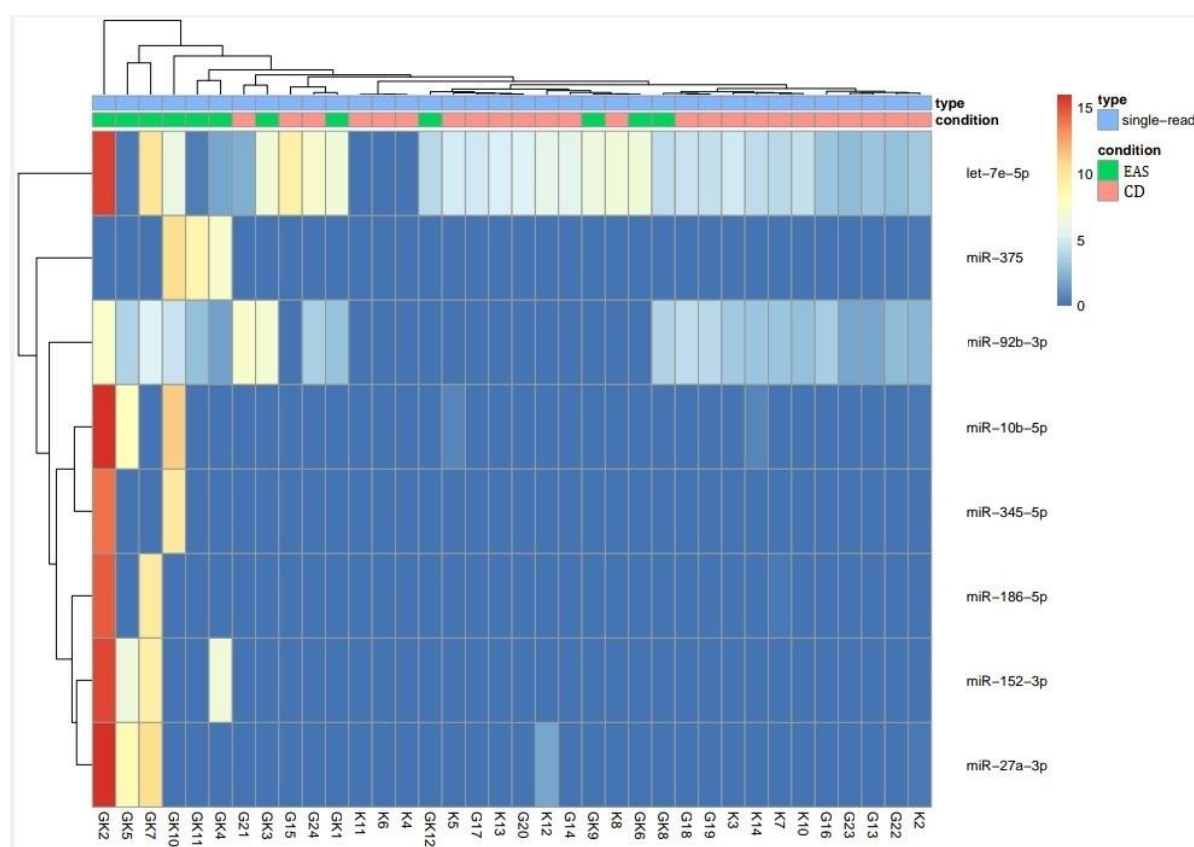


Рисунок 4. Циркулирующие микроРНК у пациентов с БИК (n=24) и АКТГ-ЭС (n=12) в крови, оттекающей от гипофиза. Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. Высокая экспрессия конкретной микроРНК показана оттенками красного, низкий уровень экспрессии – оттенками синего. Горизонтальная полоса в верхней части рисунка указывает на групповую принадлежность пациента (зеленый цвет – АКТГ-ЭС, розовый – БИК).

Валидизация микроРНК-кандидатов на расширенной выборке пациентов с БИК и АКТГ-ЭС методом RT-qPCR

На этапе валидизации мы включили 54 пациента с БИК и 13 пациентов с АКТГ-ЭС. Большинство пациентов первого раздела исследования были включены во второй раздел (19 пациентов с БИК и 12 пациентов с АКТГ-ЭС). Основные характеристики пациентов представлены в таблице 9.

Таблица 9. Основные характеристики пациентов второго раздела исследования.

| | БИК | АКТГ-ЭС | p |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| <i>N</i> | 54 | 13 | |
| Пол: М:Ж (%) | 11(20,4):43(79,6) | 4(30,8):9 (69,2) | 0,466 ¹ |
| Возраст, лет | 44[34; 51] | 54,0 [34; 61] | 0,263 ² |
| ИМТ, кг/м ² | 31,5 [27,5; 35,1] | 32 [22,5; 42,2] | 0,818 ² |
| АКТГ утром, пг/мл | 73,7 [52,2; 109,9] | 149,6 [81,9; 210,5] | 0,004 ² |
| АКТГ вечером, пг/мл | 62,43 [37,3; 82,2] | 109,4 [63,52; 194,3] | 0,005 ² |
| Кортизол суточной мочи, нмоль/сут | 988,9 [703,9; 1610,1] | 2098 [822,35; 6988,4] | 0,05 ² |
| Кортизол слюны в 23:00, нмоль/л | 26,6 [14,4; 36,6] | 80,79 [16,3; 104,2] | 0,091 ² |

М- мужчина; Ж-женщина; ИМТ- индекс массы тела; Меры вариабельности представлены в виде медианы и интерквартильных размахов; ¹ – точный критерий Фишера; ² – критерий Манна-Уитни. *Пороговый P₀=0,007 (после применения поправки Бонферрони)

Дифференциальная экспрессия 13 микроРНК представлена в таблице 10.

Таблица 10. Дифференциальная экспрессия микроРНК-кандидатов у пациентов с БИК (n=54) и АКТГ-ЭС (n=13), исследованная методом RT-qPCR.

| микроРНК | БИК Среднее ± СО | FC | log2FC | p | p* |
|-----------------|-----------------------------|-------------------|---------------|----------|-----------|
| let-7b-5p | 0,107 ± 0,160 | 0,162 ± 0,215 | 0,660 | -0,600 | 0,185 |
| miR-375 | 0,072 ± 0,122 | 0,168 ± 0,211 | 0,431 | -1,214 | 0,150 |
| miR-27a-3p | 17,921 ± 31,046 | 16,189 ± 7,572 | 1,107 | 0,147 | 0,077 |
| let-7e-5p | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,609 | -0,716 | 0,145 |
| miR-186-5p | 0,829 ± 0,880 | 0,793 ± 0,353 | 1,045 | 0,064 | 0,292 |
| miR-16-5p | 161,998 ± 120,422 | 145,283 ± 159,644 | 1,115 | 0,157 | 0,365 |
| miR-10b-5p | 1,171 ± 2,105 | 1,220 ± 1,856 | 0,960 | -0,059 | 0,868 |
| miR-206 | 0,005 ± 0,011 | 0,007 ± 0,012 | 0,721 | -0,471 | 0,572 |
| let-7g-5p | 0,306 ± 0,449 | 0,329 ± 0,520 | 0,930 | -0,104 | 0,818 |
| miR-152-3p | 0,194 ± 0,236 | 0,178 ± 0,147 | 1,088 | 0,121 | 0,818 |
| miR-345-5p | 0,004 ± 0,005 | 0,005 ± 0,006 | 0,706 | -0,502 | 0,687 |
| let-7c-5p | 0,079 ± 0,167 | 0,060 ± 0,071 | 1,311 | 0,391 | 0,709 |
| let-7f-5p | 0,023 ± 0,047 | 0,014 ± 0,019 | 1,670 | 0,740 | 0,689 |

В результате анализа ни одна из микроРНК-кандидатов не показала существенных различий между двумя группами (см. рис. 5).

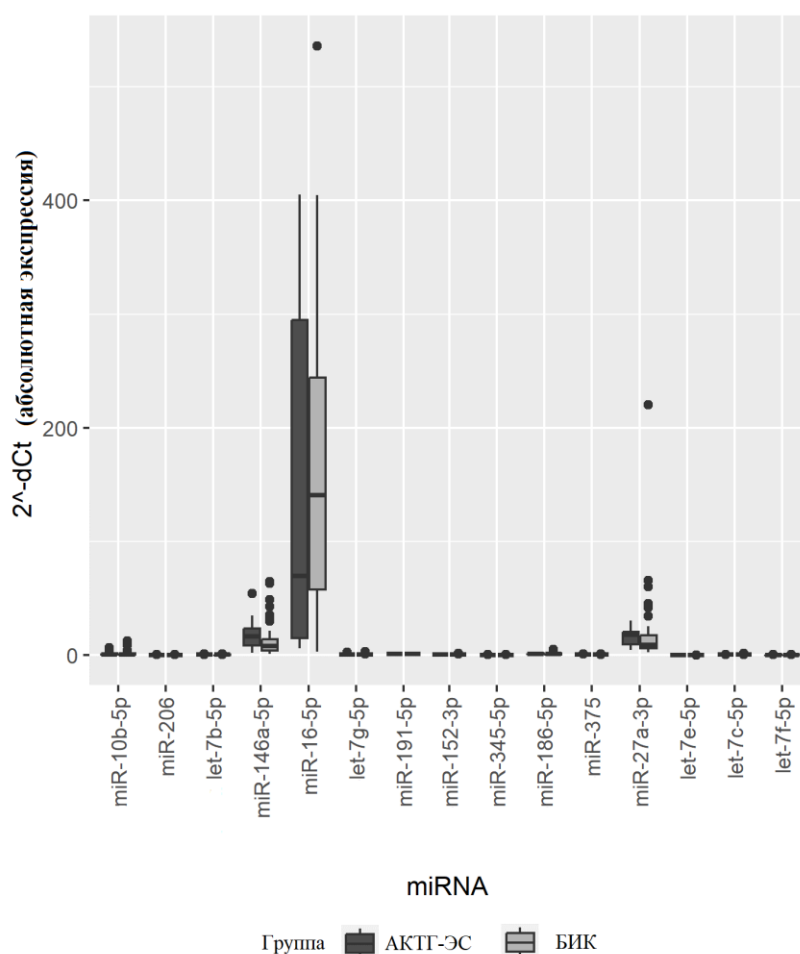


Рисунок 5. Сравнение циркулирующих микроРНК плазмы крови у пациентов с БИК (n=54) и АКТГ-ЭС (n=13), исследованных методом RT-qPCR.

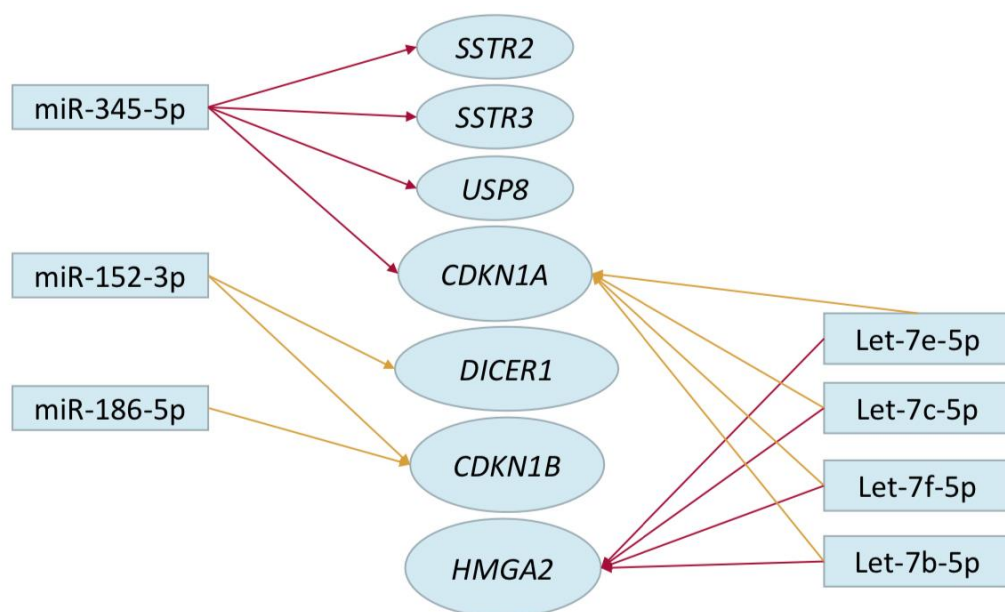
Достоверно определить гены-мишени конкретной микроРНК сложно, так как каждая микроРНК может взаимодействовать с разными таргетами. Тем не менее существуют базы данных, такие как TargetScan, которые предоставляют информацию о предполагаемых взаимодействиях микроРНК с мРНК-мишенями на основе их комплементарности. Результаты оцениваются на основании индекса cumulative weighted context++ score, отражающему вклад 14 параметров вероятности связывания, при этом значения находятся в диапазоне от 1 до -3. Чем меньше значение данного показателя – тем больше вероятность взаимодействия [Nam, J.W., 2014]. В таблице 11 отражены результаты поиска в базе TargetScan.

Таблица 11. Потенциальные гены-мишени некоторых микроРНК.

| | miR-383-3p | miR-4290 | miR-6717-5p | miR-1229-3p |
|----------------|------------|----------|-------------|-------------|
| <i>USP8</i> | -0,18 | | | |
| <i>GNAS</i> | | | | -0,09 |
| <i>PRKARIA</i> | | -0,01 | | -0,09 |
| <i>CABLES1</i> | -0,07 | 0 | -0,01 | 0 |
| <i>CDKN1B</i> | | -0,46 | | |
| <i>TSC1</i> | | | | -0,07 |
| <i>SSTR2</i> | | | | 0 |
| <i>SSTR3</i> | -0,02 | -0,48 | | -0,02 |
| <i>SSTR5</i> | -0,01 | -0,32 | | |

В таблице указан индекс cumulative weighted contex++ для пары микроРНК-ген-мишень.

Карта взаимодействий отражена на рисунке 6.

**Рисунок 6.** Карта взаимодействий микроРНК с потенциальными таргетными генами, которые по данным литературы могут участвовать в патофизиологии аденом гипофиза.

Гены, кодирующие соматостатиновые рецепторы 2 и 3 подтипов экспрессируются в ткани нормального гипофиза. Мутации этих генов чаще встречаются в СТГ-секретирующих аденомах. Мутации гена *CDKN1B* ингибитор циклин-зависимой киназы 1b были описаны при МЭН-1 синдроме и в редких случаях кортикотропином. Ген *HMGA2* по данным исследований экспрессировался в тканях гормонально-неактивных аденом. Герминальные и соматические мутации в гене *DICER1* были описаны при тяжелом течении болезни Иценко-Кушинга у детей. Таким образом, измененные микроРНК могут влиять эпигенетически на экспрессию данных генов даже без наличия мутации непосредственно в гене и таким образом могут вовлекаться в патогенез развития кортикотропином.

ВЫВОДЫ

1. Исследование свободного кортизола слюны после приема 1 мг дексаметазона на автоматическом анализаторе методом ЭХЛА может быть использовано для диагностики эндогенного гиперкортицизма с площадью под кривой операционных характеристик 0,838 (95%ДИ 0,772 – 0,950).
2. Комбинация исследований свободного кортизола в слюне в 23:00 и свободного кортизола в слюне после приема 1 мг дексаметазона демонстрирует высокую диагностическую значимость с площадью под кривой операционных характеристик 0,910 (95%ДИ 0,854-0,965).
3. Профили экспрессии miR-10b-5p, miR-152-3p, miR-345-5p, miR-186-5p, miR-375, miR-27a-3p, miR-92b-3p, let-7e-5p, let-7c-5p, let-7f-5p, miR-206, miR-7b-5p, miR-151b/miR-151a-5p, miR-185-5p подавлены в плазме крови из нижних каменистых синусов у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга при сравнении с АКТГ-эктопированным синдромом по данным секвенирования нового поколения.
4. При исследовании уровней let-7b-5p, miR-146a-5p, miR-375, miR-27a-3p, let-7e-5p, miR-186-5p, miR-16-5p, miR-10b-5p, miR-206, let-7g-5p, miR-152-3p, miR-345-5p, let-7c-5p, let-7f-5p в периферической крови методом ПЦР в реальном времени различий выявить не удалось. Эти микроРНК не рекомендуются для дальнейшей валидации для дифференциальной диагностики болезни Иценко-Кушинга и АКТГ-эктопированного синдрома по периферической крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследование свободного кортизола в слюне в утренние часы методом ЭХЛА после приема 1 мг дексаметазона в 23:00 накануне рекомендуется использовать с точкой разделения 5,2 нмоль/л для оптимизации чувствительности метода и 12,0 нмоль/л для достижения максимальной специфичности метода.
2. Комбинация исследований свободного кортизола в слюне в 23:00 (точка разделения 9,4 нмоль/л) и кортизола в слюне в утренние часы после приема 1 мг дексаметазона (точка разделения 5,2 нмоль/л, границы «серой» зоны 5,2 – 12,0 нмоль/л) может быть использована в качестве алгоритма полностью неинвазивной диагностики ЭГ среди пациентов с ожирением и избыточной массой тела.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Малыгина А.А.**, Белая Ж.Е., Никитин А.Г. [и др.] Экспрессии микроРНК в плазме крови, оттекающей от гипофиза, у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга и АКТГ-эктопированным синдромом // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 18-30. doi: 10.14341/probl12817
2. Белая Ж. Е., **Малыгина А.А.** [и др.]. Диагностические возможности исследования кортизола слюны в ходе малой пробы с дексаметазоном // Ожирение и метаболизм. 2020. Т. 17, № 1. С. 13-21. doi: 10.14341/omet10117
3. Патент РФ на изобретение RU №2695798 С1. Способ неинвазивной диагностики эндогенного гиперкортицизма / Белая Ж.Е, **Малыгина А.А.**, Гребенникова Т.А, Ильин А.В, Рожинская Л.Я, Фадеев В.В, Мельниченко Г.А, Дедов И.И.; заявка №2018120923 заявл. 06.06.2018; опубл. 29.07.2019. Бюл. № 22.
4. Белая Ж.Е., **Малыгина А.А.**, Пигарова Е.А., Дзеранова Л.К., Пржиялковская Е.Г., Рожинская Л.Я., Арапова С.Д., Мельниченко Г.А. Болезнь Иценко-Кушинга (учебное пособие). – М. ФГБУ «НМИЦ эндокринологии Минздрава России, 2021. – С. 40.
5. Белая Ж.Е., Марова Е.И., Рожинская Л.Я., Голоунина О.О., Малыгина А.А. [и др.] Эндогенный гиперкортицизм (учебное пособие). – М. ГНЦ, ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, 2024. – С. 58.

6. Белая Ж.Е., **Малыгина А.А.**, Гребенникова Т.А. [и др.]. Диагностические возможности исследования кортизола слюны в ходе малой пробы с дексаметазоном с использованием метода электрохемилюминисцентного анализа // Сборник тезисов VIII (XXVI) Национального конгресса эндокринологов с международным участием "Персонализированная медицина и практическое здравоохранение". – Москва: УП Принт, 2019. – С. 348-349.
7. Belaya Zh, **Malygina A.**, Nikitin A. et al. Difference in plasma miRNA levels in inferior petrosal sinus samples from patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome as assessed by next-generation sequencing (NGS) // Endocrine Abstracts. – 2020. doi: 10.1530/endoabs.70.AEP569
8. **Малыгина А.А.**, Белая Ж.Е., Никитин А.Г. [и др.] // Уровни микроРНК (мкРНК) при заборе крови из нижних каменистых синусов у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга (БИК) И АКТГ-эктопированным синдромом // Инновационные технологии в эндокринологии : Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов с международным участием. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Типография "Печатных Дел Мастер", 2021. – С. 198.
9. **Malygina A.A.**, Belaya Zh., Solodovnikov A. et al Circulating plasma microRNA in patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome // Endocrine Abstracts. – 2022. doi: 10.1530/endoabs.81.EP642

Список основных сокращений

АКТГ – адренокортикотропный гормон
 АКТГ-ЭС – АКТГ-эктопированный синдром
 БИК – болезнь Иценко-Кушинга
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ИГХ – иммуногистохимия
 ИМТ – индекс массы тела
 МПД – малая проба с дексаметазоном
 МР – магнитно-резонансный
 МРТ – магнитно-резонансная томография
 МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
 ОФЭКТ/КТ – сцинтиграфия с однофотонной эмиссионной компьютерной томографией
 ПГК – плотногранулированная кортикотропинома
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 РГК – редкогранулированная кортикотропинома
 СД – сахарный диабет
 ЭГ – эндогенный гиперкортицизм
 ЭХЛА – электрохемилюминисцентный анализ
 NGS – Next Generation Sequencing
 RT-qPCR – real-time quantitative polymerase chain reaction