

на правах рукописи

Белая Жанна Евгеньевна

**РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА ЭНДОГЕННОГО ГИПЕРКОРТИЦИЗМА.
КАНОНИЧЕСКИЙ WNT СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ И ИЗМЕНЕНИЕ
КОСТНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОМ
ОСТЕОПОРОЗЕ**

14.01.02 – Эндокринология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва 2013

**Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении
«Эндокринологический научный центр» Минздрава России
(Директор – академик РАН и РАМН, профессор И.И.Дедов)**

Научный консультант:

Мельниченко Галина Афанасьевна
доктор медицинских наук, профессор
Академик РАМН

Официальные оппоненты:

Петунина Нина Александровна
доктор медицинских наук, профессор,
заведующая кафедрой эндокринологии ФППОВ
ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России

Анциферов Михаил Борисович
доктор медицинских наук, профессор,
главный врач ГБУЗ г. Москвы
«Эндокринологический диспансер Департамент
здравоохранения города Москвы»

Древаль Александр Васильевич
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой эндокринологии ФУВ
МОНИКИ

Ведущее учреждение:

ГБОУ ДПО «Российская Медицинская Академия
Последипломного Образования» Минздрава России

**Защита диссертации состоится «___» _____ 2014 года в _____ часов
на заседании Диссертационного Совета Д 208.126.01 при ФГБУ «Эндокринологический
научный центр» Минздрава России по адресу: 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Эндокринологический
научный центр» Минздрава России
Автореферат разослан « 28 » декабря 2013 года**

**Ученый секретарь Диссертационного Совета,
доктор медицинских наук**

Е.В. Суркова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Эндогенный гиперкортицизм (ЭГ), обусловленный гиперсекрецией кортизола вследствие аденокортикотропин (АКТГ)-, кортиколиберин (КРГ)- или кортизол-секретирующего новообразования различной локализации, - одна из наиболее тяжёлых патологий в эндокринологии. Заболеваемость ЭГ варьирует по различным источникам от 2-3 (Steffensen C, et.al., 2010) или 10 случаев на миллион (Guaraldi F, et.al., 2012) до 2-5% при активном скрининге пациентов с плохоконтролируемыми заболеваниями, такими как сахарный диабет, гипертония, остеопороз (Catagri B, et.al., 2003, Chiodini I, et.al., 2007 Chiodini I, 2009). Течение ЭГ, как правило, прогрессирующее с увеличением риска всех осложнений инвалидизации и летальности (Nieman LK, et.al, 2008), что определяет необходимость ранней диагностики.

Исследование уровня кортизола в слюне кажется наиболее привлекательным первым исследованием скрининга среди пациентов с клиническими симптомами ЭГ, т.к. не требует участия среднего медперсонала, фармакологического вмешательства, безболезненно, легко выполняется пациентом, занимает мало времени, не нуждается в предварительной экстракции в отличие от кортизола в суточной моче (Putigano S, et.al. 2003). Вместе с тем, различия в точке деления, рекомендуемые для одного и того же метода (от 2,8 нмоль/л до 15,2 нмоль/л) делают интерпретацию результата крайне затруднительной (Alexandraki KI, et.al. 2011). Авторитетные исследователи включили необходимость стандартизации определения свободного кортизола в слюне, наряду с некоторыми другими гормонами в число приоритетных задач 21 века (Wartofsky L, et.al., 2011). Всё большую распространённость приобретают электрохемилюминесцентные методы (ЭХЛА), выполняемые на полностью автоматизированных анализаторах, что позволяет добиться быстрого и точного результата. Такие анализаторы обладают достаточной чувствительностью для определения свободного кортизола в слюне. Однако внедрение нового метода требует разработки референтного интервала и точки деления. Кроме того, оправдано внедрение новых диагностических маркеров, в том числе хорошо знакомых смежным специалистам. В этой связи, оценка диагностических возможностей определения маркера костеобразования – остеокальцина у пациентов без лечения с впервые выявленным остеопорозом может быть актуальной. Имеется потребность в обоснованных рекомендациях по оптимальной последовательности и комбинации тестов, а также кратности выполнения различных диагностических исследований в рамках обследования для исключения ЭГ.

После установления диагноза ЭГ наибольшие сложности возникают при проведении точного дифференциального диагноза АКТГ-зависимого гиперкортицизма. «Золотым

стандартом» для дифференциальной диагностики болезни Иценко-Кушинга (БИК) и АКТГ-эктопированного синдрома признан селективный забор крови из нижних каменистых синусов (НКС) с определением градиента АКТГ центр/периферия до и после введения кортиколиберина (Newell-Price J, 2006). Объективные сложности связаны с отсутствием кортиколиберина в РФ, а также его высокой стоимостью. Внутривенное введение десмопрессина как альтернативного агента возможно в связи с наличием в кортикотрофах рецепторов к вазопрессину (Machado MC, et.al. 2007), экономически более оправдано, но менее изучено. Ложно-отрицательные результаты селективного забора крови, обусловленные неправильным положением катетера, приводят к отсрочке нейрохирургического вмешательства и дорогостоящему поиску источника АКТГ-эктопии, а в некоторых случаях могут повлечь неоправданное хирургическое вмешательство. Разработка, оценка и внедрение методов, улучшающих чувствительность и специфичность селективного забора крови из НКС, является важной задачей мирового научного сообщества (Heaney AP, et.al., 2004).

Глюкокортикоидный остеопороз (ГКО) вследствие экзогенного гиперкортицизма – наиболее распространенная причина вторичного остеопороза (Watts, et.al., 2010). По некоторым данным, супрафизиологические дозы глюкокортикоидов (ГК) получает до 1-3% населения (van Staa TP, et.al. 2000). Негативное влияние ГК на костный обмен в большей степени реализуется через уменьшение количества остеобластов, снижение их функциональной активности и повышение апоптоза остеобластов и остеоцитов (Lekamwasam S, et.al, 2000). Согласно современным представлениям, подавление канонического Wingless/ β -catenin сигнального пути (Wnt сигнал) является ключевым механизмом подавления костеобразования при ГКО. В экспериментальных исследованиях на грызунах и культурах клеток ГК в супрафизиологических дозах стимулировали экспрессию генов, кодирующих антагонисты Wnt сигнала, в частности секреторного связывающего белка фризельда 1 (сФР31) (Wang F-S, 2005), диккофа 1 (Дкк1) (Wang F-S, 2008, Yao W, 2008) и склеростина (Yao W, 2008). Результаты экспериментальных исследований позволяют только сформулировать гипотезу и должны быть подтверждены у человека (Lekamwasam S, et.al, 2012). Пациенты с экзогенным гиперкортицизмом получают различные дозы и типы ГК по поводу различных заболеваний, которые сами по себе по-разному негативно влияют на костную ткань. Пациенты с ЭГ чаще заболевают в молодом возрасте на фоне полного здоровья, повышение эндогенного кортизола достаточно выраженное, не зависит от рекомендованной дозы и комплаенса пациента, а также типа ГК. Таким образом, пациенты с ЭГ могут служить лучшей моделью для изучения ГКО и содержания внеклеточных антагонистов Wnt сигнала в условиях гиперкортицизма у человека. Исследование молекул регуляторов остеоклатогенеза: лиганда рецептора активатора ядерного фактора капа-бета (РАНКЛ) и остеопротегерина (ОПГ), как основных молекул, от соотношения

которых зависит привлечение зрелых остеокластов (Silva I, 2012), позволит лучше понимать изменений в остеокластогенезе у пациентов с ЭГ.

Подобные исследования актуальны для выбора наиболее специфичных таргетных молекул для терапевтического вмешательства у человека с ГКО.

Стероидная миопатия и низкотравматичные переломы остаются значимыми клиническими проявлениями и тяжелыми осложнениями у пациентов с ЭГ (Kaltsas G, et.al. 2010). Ввиду редкости ЭГ, опубликованные работы по распространенности низкотравматичных переломов в этой категории пациентов включают не более 80-100 больных (Tauchmanova L, et.al, 2006, Vestergaard P, et.al, 2002). Еще меньше исследований посвящено анализу предикторов низкотравматичных переломов у пациентов с ЭГ. Между тем, своевременная антиостеопоретическая терапия, назначенная пациентам с высоким риском переломов, могла бы предупредить появление инвалидизирующих осложнений на этапе поиска источника гиперкортицизма или при невозможности полного излечения.

ЦЕЛЮ настоящей работы стала оптимизация и внедрение новых методов диагностики и дифференциальной диагностики эндогенного гиперкортицизма; современный анализ патогенеза ГКО, распространенности низкотравматичных переломов, их предикторов у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом

В соответствие с установленной целью были поставлены следующие

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1) Проанализировать распространенность жалоб, проявлений и осложнений ЭГ с выбором наиболее характерной комбинации клинических симптомов для проведения скрининга у пациентов с ожирением

2) Изучить диагностические возможности и разработать точку разделения для определения вечернего кортизола в слюне методом ЭХЛА на автоматическом анализаторе для выявления ЭГ среди пациентов с ожирением или избыточной массой тела; сравнить его возможности с другими тестами.

3) Определить оптимальную последовательность и кратность тестов для диагностики ЭГ, оценить их комбинированные возможности

4) Изучить возможности исследования остеокальцина в сыворотке крови для диагностики гиперкортицизма среди пациентов с ожирением и определить его роль по сравнению с другими тестами

5) Исследовать диагностическую ценность остеокальцина для верификации ЭГ среди пациентов с впервые выявленным остеопорозом в постменопаузе

6) Сравнить диагностические возможности рутинных лабораторных исследований в дифференциальной диагностике АКТГ-зависимого гиперкортицизма, рассчитав точку деления для выявленного теста с наибольшей диагностической ценностью

7) Проанализировать диагностические возможности и безопасность селективного забора крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма

8) Изучить возможности по улучшению чувствительности и специфичности селективного забора крови путем определения градиента пролактина и/или расчета АКТГ/пролактин нормализованного соотношения

9) Исследовать содержание антагонистов Wnt-сигнала (дикропф 1, секреторный связывающий белок фризельда 1, склеростин), а также РАНКЛ, ОПГ в сыворотке крови у пациентов с ЭГ по сравнению со здоровым контролем и соотнести их уровни с маркерами костного обмена

10) Исследовать распространённость низкотравматичных переломов среди пациентов с ЭГ, наиболее значимые клинические предикторы развития низкотравматичных переломов и их влияние на качество жизни и функциональные возможности пациентов.

Научная новизна:

- Впервые в России изучены диагностические возможности автоматизированного электрохемилюминесцентного метода определения кортизола в слюне для верификации ЭГ среди пациентов с ожирением и избыточной массой тела
- Впервые проведен прямой сравнительный анализ различных методов первичной диагностики ЭГ
- Впервые исследована роль остеокальцина для диагностики ЭГ, в том числе в дифференциальной диагностике постменопаузального остеопороза (ПМО) и ГКО на фоне ЭГ у пациентов старше 45 лет.
- Впервые в России исследованы возможности селективного забора крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма
- Впервые в России исследована возможность контроля положения катетера при селективном заборе крови из НКС по градиенту пролактина
- Впервые проанализированы возможности улучшения чувствительности и специфичности селективного забора крови из НКС в результате расчета АКТГ/пролактин нормализованного соотношения, когда в качестве стимуляционного агента используется десмопрессин

- Впервые изучены патогенетические аспекты глюкокортикоидного остеопороза на модели пациентов с ЭГ с определением концентрации белков основных сигнальных путей остеобластогенеза (антагонисты Wnt сигнала) и остеокластогенеза (РАНКЛ/ОПГ)
- Впервые описаны изменения концентрации антагониста канонического Wnt-сигнала – склеростина, ключевого ингибитора дифференцировки мезенхимальной стволовой клетки в остеобласт, в сыворотке крови пациентов с ЭГ.
- Впервые на достаточно большой выборке пациентов методом многофакторного анализа предложены основные предикторы низкотравматичных переломов у пациентов с ЭГ

Практическая значимость работы:

- Выделена наиболее частая комбинация субъективных жалоб и проявлений ЭГ для выбора пациентов, нуждающихся в скрининге на ЭГ
- Разработана точка разделения для свободного кортизола в вечерней слюне, измеренного методом ЭХЛА на автоматическом анализаторе, для диагностики ЭГ среди пациентов с ожирением, отработан референтный интервал для этого метода у здоровых добровольцев.
- Предложена оптимальная последовательность тестов для первичной диагностики ЭГ среди пациентов с избыточной массой тела или ожирением с оптимизацией чувствительности, специфичности и удобства для практического здравоохранения, которая объединена в алгоритм диагностики ЭГ.
- Рассчитана точка разделения для уровня остеокальцина в сыворотке крови для диагностики ЭГ среди пациентов с ожирением и пациентов с остеопорозом старше 45 лет. Определена роль определения остеокальцина среди других диагностических тестов
- Оптимизированы показания и методика интерпретации селективного забора крови из НКС на фоне стимуляции десмопрессином для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого ЭГ.
- Разработана точка разделения для градиента пролактина и АКТГ/пролактин нормализованного соотношения в ходе селективного забора крови из НКС, отработаны критерии неверной установки катетера и показания для повторного забора крови из НКС, а также ограничения АКТГ/пролактин нормализованного соотношения при оценке максимального градиента АКТГ после стимуляции десмопрессином
- Выделены наиболее значимые предикторы низкотравматичных переломов у пациентов с ЭГ, которыми стали уровни кортизола в суточной моче и вечернего кортизола в крови, т.е. тяжесть гиперкортицизма как таковая. Пациентам высокого риска на этом основании может быть предложена терапия для профилактики ГКО

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Пациенты с ожирением или избыточной массой тела при наличии плохо контролируемых проявлений метаболического синдрома, жалоб на общую и мышечную слабость и/или низкотравматичных переломов нуждаются в обследовании для исключения ЭГ
2. Состояние функционального гиперкортицизма, в частности, ожирение, завышает оптимальную точку разделения уровня вечернего кортизола в слюне для диагностики ЭГ.
3. Комбинация однократного исследования уровня кортизола в вечерней слюне методом ЭХЛА и малой пробы с дексаметазоном для диагностики ЭГ позволяет добиться максимальной чувствительности и специфичности для конкордантного результата при оптимальном удобстве для пациента.
4. Исследование остеокальцина может применяться в качестве дополнительного теста для диагностики ЭГ. Низкий уровень остеокальцина у нелеченных пациентов с низкотравматичными переломами тел позвонков в том числе в постменопаузе является основанием для исключения ГКО на фоне ЭГ
5. Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимого ЭГ в ходе селективного забора крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином может быть улучшена при определении градиента пролактина и АКТГ/пролактин нормализованного соотношения
6. Состояние эндогенного гиперкортицизма у человека препятствует физиологическому снижению уровня склеростина. Именно склеростин среди других протестированных молекул (Дкк1, сФРЗ, РАНКЛ, ОПГ) является наиболее многообещающей молекулой для терапевтического вмешательства с целью повышения костеобразования у пациентов с ГКО.
7. Пациенты с высоким содержанием свободного кортизола в суточной моче (выше 1960 нмоль/24ч) и/или вечернего кортизола в крови (выше 674 нмоль/л) имеют повышенный риск развития низкотравматичных переломов и нуждаются в дополнительном обследовании с решением вопроса о назначении профилактического лечения остеопороза

Апробация работы

Официальная апробация диссертации состоялась 14 ноября 2013 года на расширенном заседании межотделенческой научной конференции ФГБУ ЭНЦ Минздрава России. Основные результаты работы доложены на ученом совете ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ 15 ноября 2011 года; в рамках Московского общества эндокринологов в 2009 и 2011 гг; в рамках V Всероссийского конгресса «Современные технологии в эндокринологии» (май 2009); на образовательной

конференции с международным участием Pituitary Masterclass в Санкт-Петербурге 14.09.2011; на внутренней конференции повышения квалификации врачей Московского эндокринологического диспансера (07.01.2012); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Инновационные технологии в нейроэндокринологии, нейронауках и гематологии" в Санкт-Петербурге (24.05.2013); в рамках IV (сентябрь 2010г) и V (ноябрь 2013) Российского конгресса по остеопорозу; VI Всероссийского конгресса эндокринологов (май 2012); награда за лучший постер присуждена в рамках ENEA Workshop on Cushing's syndrome (декабрь 2009 Италия, Неаполь), постерные доклады выполнены в рамках 14th congress European Neuroendocrine Association (сентябрь, 2010 Бельгия), на 12 European Congress on osteoporosis and osteoarthritis (март 2012 Франция); The Endocrine Society's 94th Annual Meeting and Expo (июнь 2012 США (Хьюстон)), в рамках American Society of Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting. Minneapolis, Minnesota (октябрь 2012 США). Научная ценность работы была отмечена именным приглашением для участия с тем же докладом на 16th European Congress on Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO13-IOF) апрель 2013 Италия; постерный доклад на 15th European Congress of Endocrinology (Дания 2013) и в рамках 50th European Calcified Tissue Society 2013 (мая 2013 Португалия); устный доклад был представлен на 15th Congress of the European Neuroendocrine Association 12-15 сентября 2012 Австрия (Вена)

Публикации

По теме диссертации всего опубликовано 40 печатных работ, в том числе в центральных, рецензируемых ВАК Министерства Образования РФ медицинских журналах – 17, международные статьи в журналах, индексируемых в PubMed – 3; главы в международных изданиях на английском языке – 1, электронная книга на английском языке – 1, главы в федеральных руководствах – 2, методические рекомендации для врачей, одобренные Минздравом – 1, тезисы, опубликованные зарубежом - 9 и тезисы, опубликованные в сборниках Российских конференций - 6.

Внедрение результатов работы

Результаты работы включены в стандарты высоко-технологической медицинской помощи пациентам с БИК, с синдромом Кушинга, вошли в методические рекомендации, одобренные МЗ, внедрены и активно применяются для ведения пациентов в ФГБУ ЭНЦ, Московском эндокринологическом диспансере, Московском областном научно-исследовательском институте имени Владимирского, в ведущих медицинских учреждениях Санкт-Петербурга и других городов России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 293 страницах, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов проведенной работы, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, который включает 387 источников литературы. Работа содержит 35 таблиц и 34 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты, включенные в исследование

Согласно поставленным целям и задачам в исследование было включено 542 человека: 259 пациентов с установленным в ФГБУ ЭНЦ диагнозом эндогенный гиперкортицизм (ЭГ) и 283 без гиперкортицизма: у 78 - диагноз алиментарно-конституциональное ожирение, у 67 - постменопаузальный остеопороз (ПМО) и 138 здоровых добровольцев привлекались на разных этапах исследования.

Диагноз ЭГ был установлен на базе ФГБУ ЭНЦ за период 2001-2011 годы на основании повышенного кортизола в суточном анализе мочи, нарушения ритма кортизола крови и отрицательной малой пробы с дексаметазоном (Дедов ИИ, др. 2000, Марова Е.И., 1999, Nieman, et.al., 2008). АКТГ-зависимый ЭГ диагностировали при нормальном или повышенном АКТГ и повышенном кортизоле в крови и моче. Окончательный нозологический диагноз ЭГ устанавливался на основании результатов патоморфологического исследования на базе **лаборатории патоморфологии** (зав. отделением профессор, д.м.н. Абросимов А.Ю). Ожирение устанавливалось на основании рассчитанного индекса массы тела (ИМТ) ≥ 30 кг/м²; избыточная масса тела диагностировалась при ИМТ ≥ 25 кг/м², но меньше 30 кг/м² (ВОЗ № 311, март 2013 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/ru/>). Пациенты с алиментарно-конституциональным ожирением проходили обследования для исключения ЭГ в том числе субклинического и находились на динамическом наблюдении в ФГБУ ЭНЦ в период консервативного лечения. Диагноз постменопаузального остеопороза устанавливался у женщин в постменопаузе на основании подтвержденного рентгенологически низкотравматичного перелома позвонка и/или бедра в анамнезе и/или снижения минеральной плотности кости (МПК) $\geq -2,5$ по Т-критерию в поясничных позвонках (L1-L4) или бедре (Neck, Total Hip) (Беневоленская ЛИ, др, 2009, Kanis JA, et.al., 2013).

Все исследования выполнялись на базе отделений ФГБУ ЭНЦ. Основная работа велась в отделении **нейроэндокринологии и остеопатий** (зав. отделения профессор, д.м.н. Рожинская Л.Я.). Исследования, посвященные диагностике ЭГ среди пациентов с ожирением, частично проводились на базе отделения **терапии с группой ожирения** (зав. отделения профессор, д.м.н. Трошина Е.А.)

Дизайн исследования

Согласно поставленным целям и задачам в проведенном исследовании выделено семь основных разделов. Общая характеристика включенных пациентов, типа исследования и критерии включения и исключения сведены в Таблице 1.

Таблица 1. Характеристика основных разделов исследования.

Кол-во пациентов. Тип исследования	Критерии включения	Критерии исключения
Раздел 1. Выделение клинического симптомокомплекса для скрининга на ЭГ		
259 пациентов с ЭГ. Ретроспективное (2001-2007) и проспективное (2008-2011) когортное исследование	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ ЭНЦ диагнозом ЭГ	Недостаточное кол-во достоверной информации. Сомнительный диагноз ЭГ как такового
Раздел 2. Дифференциальная диагностика с функциональным гиперкортизолизмом		
N= 127 человек, анализ только подтвержденного диагноза n= 123 Здоровый контроль n=98 (для выработки референтного интервала). Проспективное диагностическое исследование	Пациенты с клиническими признаками ЭГ, направленные врачами для исключения ЭГ с января 2010- январь 2011 Ожирение ($ИМТ \geq 30 \text{ кг/м}^2$) или активные жалобы на быстрый набор массы тела до $ИМТ 26-29 \text{ кг/м}^2$	Беременность, работа в ночное время, кровоточивость дёсен, приём ГК, острые инфекционные заболевания, обострение хронических заболеваний, тяжёлые соматические заболевания (почечная и печёночная недостаточность, терминальные состояния, острые периоды инсульта и инфаркта, ранее диагностированные злокачественные новообразования), тяжёлые психические расстройства, злоупотребление алкоголем (установленный диагноз хронический алкоголизм или употребление крепких алкогольных напитков ежедневно).
Раздел 3. Выбор оптимальной комбинации методов первичной диагностики ЭГ		
N=123 (45 пациентов с ЭГ и 78 с алиментарно-конституциональным ожирением). Диагностическое исследование.	Такие же, как во втором разделе	Такие же, как во втором разделе
Раздел 4. Информативность маркера костеобразования- остеокальцина как дополнительного метода диагностики ЭГ		
N=106 пациентов с ожирением и/или избыточной массой тела. Проспективное диагностическое исследование. N= 89 женщин старше 45 лет, из которых 67 имели ПМО и 22 - ГКО вследствие ЭГ. Ретроспективное исследование	Те же, что и во втором разделе и дополнительно -пациенты с верифицированным ЭГ в возрасте 45 лет или старше, с аменореей в течение минимум 1 года и диагностированным остеопорозом. -женщины с постменопаузальным остеопорозом (ПМО) без лечения	Те же, что и во втором разделе и дополнительно антирезорбтивная или анаболическая терапия остеопороза, а также другие препараты, влияющие на костный обмен (Watts NB, et.al., 2010)

Кол-во пациентов. Тип исследования	Критерии включения	Критерии исключения
Раздел 5. Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимого ЭГ		
<p>N = 187 пациентов. Ретроспективное когортное исследование с целью анализа возможностей рутинных тестов для выявления АКТГ-эктопированного синдрома среди пациентов с АКТГ-зависимым гиперкортицизмом</p> <p>N = 117 пациентов. Проспективное диагностическое исследование с целью оценки возможностей селективного забора крови из НКС и методов повышения его чувствительности и специфичности для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого ЭГ</p>	<p>Пациенты с лабораторно подтверждённым в ФГБУ ЭНЦ АКТГ-зависимым ЭГ.</p> <p>Для проведения забора крови из нижних каменистых синусов пациенты должны были удовлетворять хотя бы одному из перечисленного:</p> <ul style="list-style-type: none"> - отсутствие аденомы на МРТ, - аденома менее 6 мм и/или отрицательная большая проба с дексаметазоном (8мг) - отсутствие ремиссии после предыдущей нейрохирургической операции, когда послеоперационный материал недоступен для иммуногистохимического подтверждения диагноза или неинформативен. 	<p>Такие же, как в разделе 1.</p> <p>Кроме того, абсолютные противопоказания для проведения селективного забора крови из НКС: хроническая почечная недостаточность (СКФ<30мл/мин) -серьёзные нарушения гомеостаза (некомпенсированная гипо-, гиперкоагуляция).</p>
Раздел 6. Сывороточное содержание внеклеточных антагонистов Wnt сигнала и молекул остеокластогенеза у пациентов с ЭГ		
80 (40 пациентов с ЭГ и 40 добровольцев группы контроля). Исследование случай-контроль	<p>Пациенты с манифестным клинически ярким и биохимически установленным ЭГ.</p> <p>Здоровые добровольцы, подобранные в соответствии случай контроль по полу, возрасту и индексу массы тела</p>	Такие же ограничения, как в разделе 2 и 4 и пролонгированная иммобилизация (>1 недели), а также другие заболевания, приводящие к вторичному остеопорозу (Watts NB, et.al., 2010)
Раздел 7. Распространенность низкотравматичных переломов, их предикторы и влияние на качество жизни у пациентов с ЭГ		
223 пациента с ЭГ. Ретроспективное (2001-2007) и проспективное (2008-2011) когортное исследование	<p>Такие же как в первом разделе. Пациенты должны быть опрошены по наличию внепозвоночных переломов за период активных клинических симптомов заболевания.</p> <p>Выполненная рентгенография грудного и поясничных отделов позвоночника в боковой проекции</p>	Такие же как в первом разделе и дополнительно отсутствие данных по переломам

Лабораторные исследования

Гормональные исследования кортизол в сыворотке крови (референтные значения утро 123-626 нмоль/л; вечер 46,0-270,0 нмоль/л), АКТГ (утро 7,0-66,0 пг/мл; вечер 0,0-30,0 пг/мл), остеокальцин (11,0-43,0 нг/мл), С-концевой телопептид коллагена первого типа (СТх) (0,01-0,69 нг/мл) проводились методом ЭХЛА на анализаторе Roche (Elecsys 2010; Cobas e601) стандартными наборами. Пролактин (60-510 мЕД/л) исследовался иммунохемилюминесцентным (ИХЛА) методом на автоматизированной системе Vitros (Johnson@Johnson). Инсулиноподобный фактор роста (ИРФ1), витамин D измеряли методом ИХЛА на аппарате Liaison. Исследование свободного кортизола в суточной моче проводилось методом ИХЛА на аппарате Vitros ECi с предварительной экстракцией диэтиловым эфиром (60-413 нмоль/24 часа). Исследования выполнялись в лаборатории гормонального анализа (зав. лабораторией, профессор, д.м.н. Гончаров НП).

Свободный кортизол в слюне измерялся на автоматическом анализаторе Cobas e 601 фирмы F. Hoffmann-La Roche Ltd, (диагностический набор Cortisol кат. № 11875116 122) методом ЭХЛА. Иммуноферментный анализ (ИФА) образцов слюны на свободный кортизол проводился с помощью DRG Salivary Cortisol ELISA KIT SLV-2930. Исследования выполнялись в лаборатории клинической биохимии (руководитель отделения Ильин АВ).

Уровни антагонистов Wnt-сигнала в сыворотке крови исследовались коммерчески доступными наборами: склеростин - Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Vienna, Austria rev.no. 100728; Дкк1 - Enzo Life Sciences ADI-900-151; сФР31 - Uscn Life Science Inc, E95880Hu. методом ИФА. Содержание РАНКЛ и ОПГ в сыворотке крови было измерено методом ИФА с применением коммерческих наборов (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG Vienna, Austria rev.no. 090130 (РАНКЛ) и rev. no. 100131 (ОПГ). Исследования выполнялись в лаборатории клинической биохимии (руководитель отделения Ильин АВ).

Методики забора биологического материала и проведения фармакологических проб

Сбор слюны производился в 23.00 два дня подряд с использованием системы для сбора слюны Salivette Sarstedt. Образцы слюны в порядке поступления направлялись для проведения ЭХЛА и эти же образцы были заморожены при температуре -70 градусов по Цельсию для одномоментного проведения ИФА. **Заборы крови из периферической вены** выполнялись утром натощак 8-10.00 утра, за исключением вечернего кортизола и АКТГ. Замороженные образцы сывороток для исследования РАНКЛ, ОПГ, Дкк1, сФЗД 1 и склеростина (контроль и пациенты) были разморожены и проанализированы одновременно в соответствие с рекомендациями производителя. Забор вечерних образцов крови для определения кортизола и АКТГ проводился у бодрствующих стационарных пациентов в 21-23 часа.

Малая проба с дексаметазоном (МПД) выполнялась по стандартному протоколу: в 23.00 (после последнего сбора слюны и после сбора мочи) пациент принимал дексаметазон 1 мг, затем утром между 8-9.00 часами проводился забор крови на кортизол. Современными клиническими рекомендациями для выявления эндогенного гиперкортицизма рекомендована точка деления выше 50 нмоль/л после МДП (Nieman, et.al., 2008), и этот критерий был принят нами в работе. Большая проба с дексаметазоном проводилась по крови с 8 мг дексаметазона и считалась положительной при подавлении на 60%.

Технические особенности выполнения селективного забора венозной крови из нижних каменистых синусов (НКС):

Для выполнения забора крови из нижних каменистых синусов (НКС) использовалась стандартная методика, включающая двусторонний трансфеморальный доступ, селективную катетеризацию внутренних яремных вен с обеих сторон из соответствующего венозного доступа, с последующей установкой катетеров в проекциях НКС. Заборы крови из нижних каменистых синусов выполнял ангиохирург к.м.н. Ситкин И.И.

Непосредственный забор венозной крови из правого, левого НКС и нижней полой вены проводился одномоментно с экспозицией в 5 минут до введения Десмопрессина и 3 раза с интервалом в 3, 5 и 10 минут после внутривенного введения Десмопрессина (Desmopressin Acetate 4 мкг в 1 мл для внутривенных, внутримышечных и подкожных инъекций Ferring Pharmaceuticals) в дозе 8 мкг.

Результаты забора крови оценивались на основании расчетного максимального отношения уровней АКТГ в синусах к периферическому уровню АКТГ до стимуляции десмопрессином и после введения препарата внутривенно. Градиент $АКТГ \geq 2$ до стимуляции и ≥ 3 после стимуляции свидетельствовал в пользу БИК, более низкие значения градиента в пользу АКТГ-эктопии (Oldfield E, et.al.1991)

АКТГ/пролактин нормализованное соотношение рассчитывалось как максимальный градиент АКТГ после введения десмопрессина/ максимальный градиент базального пролактина (модифицировано из Findling JW, et.al, 2004).

Инструментальные исследования

Рентгенологическое исследование позвоночника выполняли в боковой проекции грудного и поясничного отделов Th4-L4 (Axiom Icons R200 “Siemens”). Перелом позвонка диагностировался на основании визуального осмотра при снижении высоты тела позвонка (передней, средней, задней проекции) на 20% и более (Genant НК, 1993). Пациентов прицельно расспрашивали по поводу низкотравматичных переломов в период заболевания. К низкотравматичным переломам относился любой перелом, который случился без травматического воздействия или при минимальной травме, в частности при самопроизвольном

падении с высоты собственного роста на тот же уровень, на котором находился пациент исходно. Минеральную плотность кости (МПК) измеряли методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA) на аппарате GE LUNAR Prodigy в поясничных позвонках (L1-L4), шейке бедра (Neck) и в проксимальном отделе бедренной кости в целом (Total Hip). Мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) проводилась с целью обнаружения новообразования при первичном поражении надпочечников и для выявления АКТГ-эктопированного синдрома на аппарате Aquilion One “Toshiba”. Все рентгенологические методы исследования проводились на базе отделения рентгенодиагностики и рентгеновской компьютерной томографии ФГБУ ЭНЦ (зав. отд., профессор, д.м.н. Ремизов О.В.)

Магнитно-резонансное исследование головного мозга (МРТ) выполнялось для выявления аденомы гипофиза на магнитно-резонансном томографе Magnetom Harmony фирмы Siemens (Германия) с введением контрастных препаратов по показаниям в отделении магнитно-резонансной томографии (зав.отд. профессор, д.м.н. Воронцов АВ)

Для оценки качества жизни использовали опросники EQ-5D и визуально-аналоговая шкала качества жизни как наиболее универсальные и широко-используемые инструменты (Rabin R, et.al. 2011). Функциональные возможности пациентов исследовали с применением функциональных тестов, разработанных для оценки выраженности саркопении: тест «подъем со стула» (Runge M, et.al., 2000), «встать и идти» (Podsiadlo D, et.al.,1991), тест на равновесие «тандем» (Williams CS, et.al.,1995).

Статистический анализ данных

Основные количественные характеристики пациентов представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-75 процентиль – Q25-Q75), а также минимального и максимального значений. В некоторых случаях, при условии нормального распределения, результаты представлены в виде среднего (M) \pm стандартное отклонение (CO). Для представления качественных параметров использовались проценты и двухсторонний 95% доверительный интервал (95%ДИ). Для сравнения независимых количественных показателей использовался критерий Манна-Уитни. В случае нормального распределения признака сравнения независимых переменных проводились с использованием t-критерия для независимых групп. Для сравнения качественных пропорций использовался точный критерий Фишера. Корреляционный анализ проводился в зависимости от распределения и возможности провести корреляционный анализ параметрическим методом – применялась корреляция Пирсона (R), в других случаях использовалась непараметрическая корреляция Спирмана (ρ_0). Регрессионный анализ применялся для подбора моделей, отражающих зависимость одного фактора от другого.

Референтный интервал (свободный кортизол в слюне) рассчитан и представлен в виде 2,5-97,5 процентиля в качестве нижнего и верхнего пределов. Поиск точки разделения и расчёт 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. Отношение шансов (95% доверительный интервал) для выбранной точки разделения рассчитывались для количественной оценки влияющего фактора как описано Glas, et al., 2003. Бинарная логистическая регрессия использовалась для проведения многофакторного анализа. Статистически достоверным считался $p < 0.05$. Все p рассчитывались как двухсторонние.

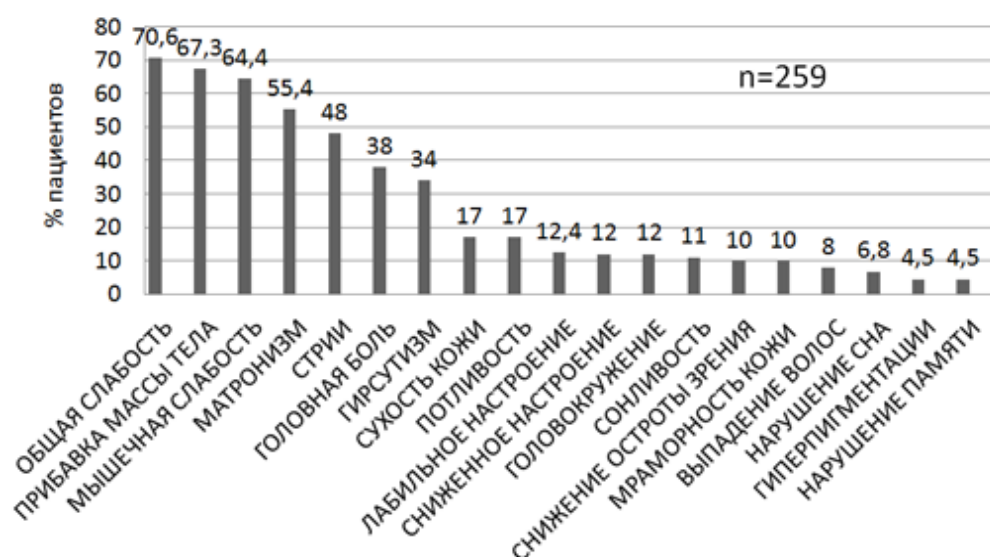
Для анализа данных использовались статистические пакеты SPSS 16.0 и MedCalc(C) Version 10.4.6.0 (прямое сравнение площадей под кривыми операционных характеристик).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Раздел 1. Выделение клинического симптомокомплекса для скрининга на ЭГ

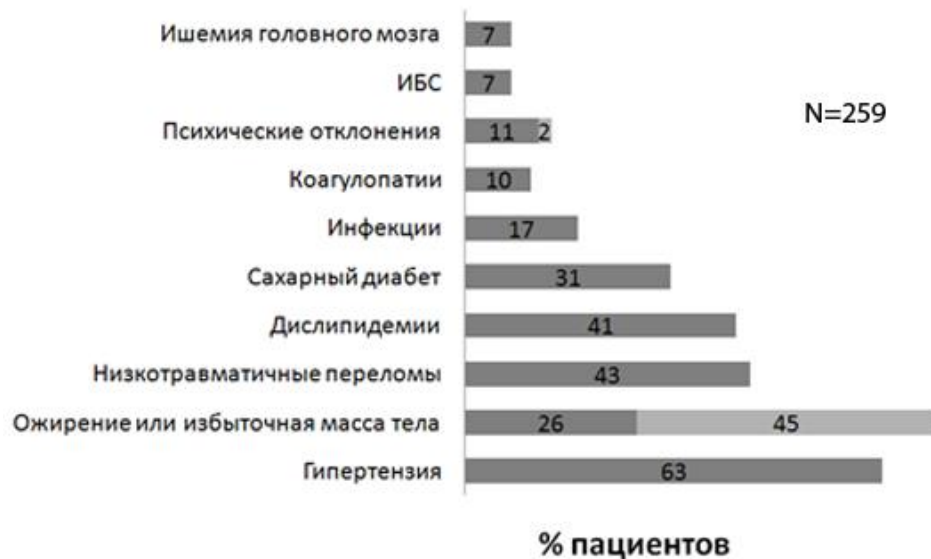
Для выделения наиболее характерного симптомокомплекса ЭГ ретроспективно были проанализированы жалобы и клинические проявления среди 259 пациентов, большинство из которых составили женщины ($n=214$ человек, в 43% случаев диагностировали аменорею, в 22% менопаузу (≥ 50 лет) и в остальных случаях - нарушение менструального цикла). Медиана возраста на момент установления диагноза - 31 (24-45) год и не отличалась у мужчин и женщин. В этиологической картине ЭГ у 210 человек установлена болезнь Иценко-Кушинга (БИК), у 30 пациентов был диагностирован АКТГ-эктопированный синдром (в 15 случаях бронхиальный карциноид; у 4 больных карциноид тимуса, в 1 случае мелкоклочечная карцинома лёгкого, 1 случай карциноида аппендикса и в 9 случаях опухоль обнаружить не удалось); 19 пациентов имели доброкачественную кортизол-секретирующую опухоль надпочечника. Наиболее часто пациенты жаловались на общую и мышечную слабость, прибавку массы тела и изменения внешности (Рисунок 1).

Рисунок 1. Распространенность жалоб у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом.



Среди клинических проявлений и осложнений заболевания в большинстве случаев регистрировалась избыточная масса тела, чаще ожирение, гипертония, низкотравматичные переломы и чуть реже - дислипидемия (Рисунок 2).

Рисунок 2. Распространённость клинических проявлений/осложнений ЭГ.



В 45% случаев у пациентов диагностировалось ожирение ($ИМТ \geq 30 \text{ кг/м}^2$) и у 26% больных была избыточная масса тела. Среди психических отклонений большинство пациентов наблюдались по поводу депрессии (11%), 2% находились под наблюдением психиатра всвязи с галлюцинациями и бредовыми переживаниями.

Таким образом, на основании обобщения клинических и лабораторных данных пациентов с ЭГ, обследованных и получивших лечение в ФГБУ ЭНЦ за 10 лет, к наиболее частым субъективным жалобам можно отнести общую и мышечную слабость в сочетании с

прибавкой массы тела. Ожирение и избыточная масса тела в наибольшем проценте случаев (71%) встречались среди зарегистрированных проявлений гиперкортицизма, реже наблюдались гипертония и дислипидемия, низкотравматичные переломы и сахарный диабет. Сходная частота осложнений ЭГ была описана в ретроспективном исследовании среди пациентов итальянской популяции, хотя ожирение наблюдалось еще чаще (93%) (Boscaro M, et.al, 2009) и недавно опубликованных первых результатов Европейского регистра - ERCUSYN (Valasi E et.al, 2011).

Так как ожирение распространено в популяции и является наиболее частым симптомом ЭГ, именно эта когорта пациентов была выбрана для дальнейшего раздела исследования.

Раздел 2. Дифференциальная диагностика с функциональным гиперкортицизмом

Для оценки диагностических возможностей определения свободного кортизола в слюне методом ЭХЛА среди пациентов с ожирением, направленных для исключения ЭГ, образцы слюны были взяты у 225 человека (98 здоровых добровольцев с нормальным индексом массы тела (ИМТ) и 127 пациентов с ожирением, в том числе 10 человек с избыточной массой тела, которые имели клинические признаки эндогенного гиперкортицизма). Эндогенный гиперкортицизм был подтверждён у 45 пациентов (40 человек – БИК, 1 – АКТГ-эктопированный синдром, 4 – синдром Кушинга); у 78 пациентов было верифицировано алиментарно-конституциональное ожирение. В 4-х случаях диагноз остался неустановленным, эти пациенты были исключены из анализа. Общие характеристики пациентов, включенных в исследование, приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Характеристики пациентов и группы контроля, включенных в исследование по оценке диагностических возможностей определения вечернего кортизола в слюне (ЭХЛА)

	Эндогенный гиперкортицизм Среднее \pm СО	Алиментарно- конституциональное ожирение Среднее \pm СО	Здоровые добровольцы Среднее \pm СО
N	45	78	98
Пол Ж:М (%)	35 (78%):10 (22%)	54(69%) :24(31%)	73(74%) 25(26%)
Возраст (лет)	39,2 \pm 13,3	37,5 \pm 13,7	**28,7 \pm 7,5
ИМТ (кг/м ²)	*32,5 \pm 6,7	38,5 \pm 6,6	**22,5 \pm 3,2
Окружность талии (см)	108,6 \pm 14,9	115,2 \pm 17,5	**75,4 \pm 11,2
Окружность бёдер (см)	*107,0 \pm 15,0	124,4 \pm 15,4	**96,7 \pm 7,2

Ж – женщины, М- мужчины

**Пациенты с эндогенным гиперкортицизмом статистически значимо отличались от пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением ($p < 0.001$).*

***Здоровые волонтеры отличались как от пациентов с ЭГ, так и от пациентов с ожирением. Здоровые волонтеры были моложе, имели нормальный индекс массы тела (ИМТ), а также окружность талии и бедер ($p < 0.001$)*

Референтный интервал свободного кортизола в слюне, рассчитанный по данным 98 добровольцев составил 0,5-9,4 нмоль/л. Минимальный уровень свободного кортизола в слюне, который удалось определить - 0,5 нмоль/л (лабораторная чувствительность метода). Максимальный уровень вечернего кортизола в слюне у здоровых добровольцев – 14,5 нмоль/л.

Воспроизводимость определения свободного кортизола в вечерней слюне оценивалась при сравнении измерения уровня кортизола в двух образцах слюны. Всего два образца слюны сдали 205 человека (410 образцов), статистически значимых различий между двумя тестами выявлено не было ($p = 0,12$). Коэффициент корреляции между двумя образцами составил $R = 0,785$ ($p < 0,0001$). Уровень вечернего кортизола в слюне у пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением 3,2 (2,1-5,9) нмоль/л был статистически значимо выше по сравнению с здоровым контролем 2,6 (1,6-4,1) нмоль/л ($p < 0.001$), что может объясняться состоянием функционального гиперкортицизма широко описанного у пациентов с ожирением. Анализ когорты пациентов с ожирением и здоровых добровольцев продемонстрировал достоверную корреляционную зависимость уровня вечернего кортизола в слюне и ИМТ $\rho_s(\text{Spearman}) = 0.26$ ($p = 0.004$).

В целом площадь под кривой операционной характеристики для выявления ЭГ по уровню вечернего кортизола в слюне среди здоровых пациентов и пациентов с ожирением составила 0.968 (95% ДИ 0.943-0.992).

Оптимальная точка разделения отличалась для выявления ЭГ среди пациентов с нормальным ИМТ (6,85 нмоль/л) и среди пациентов с ожирением с клиническими признаками ЭГ (9,4 нмоль/л), что было получено впервые и позволило предложить объяснение серьезным вариациям точек разделения для одного и того же метода.

Различие в уровне вечернего кортизола в слюне между здоровыми людьми и пациентами с ожирением повлияло на выбор оптимальной точки разделения, рассчитанной на основании ROC-анализа. Точки разделения и диагностические индексы сведены в Таблице 3.

Таблица 3. Диагностические возможности однократного определения вечернего кортизола в слюне методом электрохемилюминисцентного анализа.

	Выявление ЭГ среди пациентов с:			
	нормальный ИМТ	Ожирение	нормальный ИМТ	Ожирение
Точка разделения (cut-off)	9,4 нмоль/л		6,85 нмоль/л	
Чувствительность (95%ДИ)	84,4% (71,2-92,2)		91,1% (79,3-96,5)	
Специфичность (95%ДИ)	97,9% (92,9-99,4)	92,3% (84,2-96,4)	96,9% (91,4-98,9)	84,6% (75,0-90,9)
Прогностическая ценность положительного результата теста (95%ДИ)	41,3 (10,4-164,0)	11,0 (5,0-23,9)	29,8 (9,7-91,0)	5,9 (3,5-10,0)
Прогностическая ценность отрицательного результата теста (95%ДИ)	0,16 (0,08-0,31)	0,17 (0,08-0,33)	0,09 (0,04-0,23)	0,1 (0,04-0,27)
Отношение правдоподобия для положительного результата теста	260,5 (51,8-1311,1)	65,1 (20,4-207,6)	324,5 (69,5-1515,7)	56,4 (17,0-186,6)

Действительно, предлагаемые в литературе точки разделения, в том числе для метода ЭХЛА, отличаются на 300%, варьируя от 4,55 нмоль/л (Jeyaraman K, et.al., 2010) до 14,2 нмоль/л (Yaneva M, et.al., 2009). Самая высокая точка разделения была получена в ретроспективном сравнительном исследовании пациентов с ЭГ и больных с ожирением, в то время как самая низкая точка разделения рекомендуется авторами, верифицировавшими ЭГ среди здорового контроля. Можно предположить, что различие в точках разделения зависит от количества включенных пациентов с явлениями функционального гиперкортизолизма, в частности ожирения, по сравнению с пациентами с инсиденталомами надпочечников, гипертонией или просто здоровым контролем, включение которых занижает точку разделения. Кроме того, из-за относительной редкости ЭГ, для исследования диагностических методов, достаточно часто проводятся ретроспективные сравнительные исследования. Преимуществом настоящей работы является проспективный дизайн и отдельный анализ группы здорового контроля и пациентов с ожирением и признаками ЭГ, что позволило показать различия в точке разделения.

Раздел 3. Комбинация методов первичной диагностики ЭГ для повышения чувствительности и специфичности

Существует эмпирическая рекомендация измерять кортизол в вечерней слюне дважды (Nieman, et.al., 2008), так как стресс может влиять на уровень кортизола. Тем не менее, сложно предсказать, какой из двух результатов является ошибочным, и как интерпретировать полученный результат, если он дискордантный. Количество ложно-положительных, ложно-отрицательных результатов и процент дискордантных результатов исследования вечернего кортизола в слюне для обеих точек разделения не отличался.

Площадь под кривой операционной характеристики для первого исследования уровня кортизола в вечерней слюне – 0,965 (95% ДИ 0,938-0,991) не отличалась от второго измерения – 0,945 (95% ДИ 0,909-0,981).

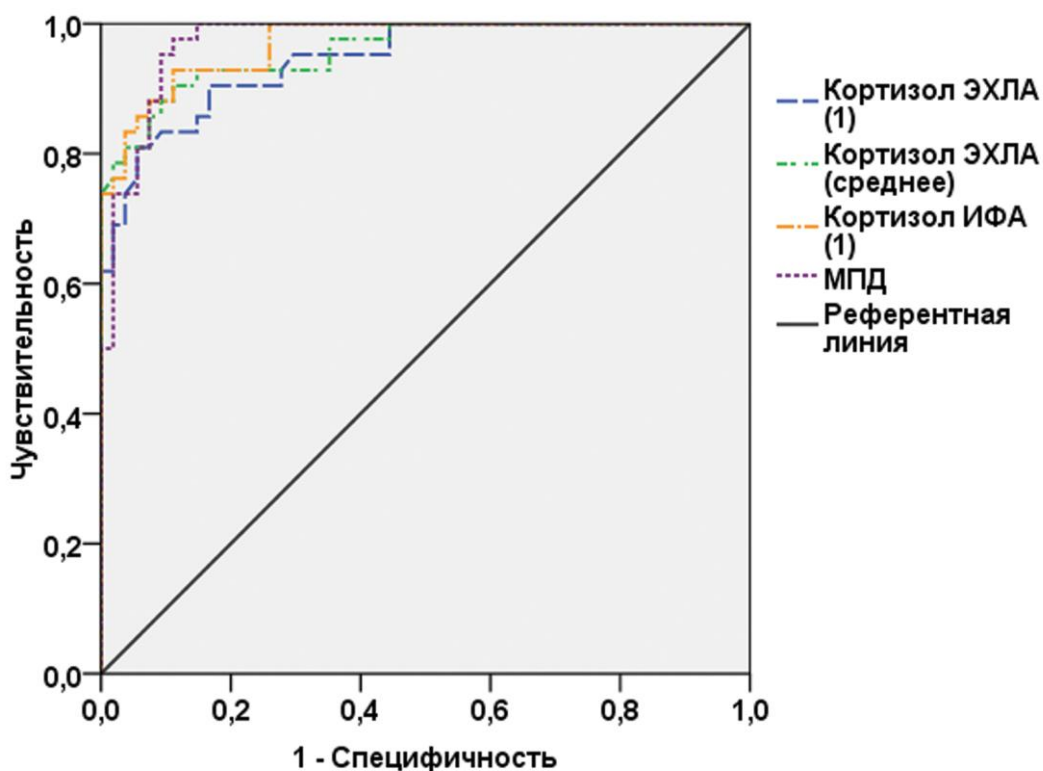
Расчет среднего значения от двух последовательных измерений уровня кортизола в вечерней слюне не позволил значимо улучшить диагностические возможности метода: площадь под кривой операционной характеристики – 0,962 (95% ДИ 0,930-0,993) в популяции пациентов с ожирением. Прямое сравнение площадей под кривыми операционных характеристик для первого исследования свободного кортизола или среднего от двух исследований не продемонстрировали статистически значимых различий ($p = 0,447$).

Carrasco с коллегами предлагали ориентироваться на максимальный уровень кортизола в слюне из двух результатов при верификации ЭГ и доказали эффективность этого подхода при условии поиска ЭГ среди пациентов без ожирения при анализе случай – контроль (Carrasco CA, et.al. 2012). В настоящей популяции пациентов, имеющих ожирение или избыточную массу тела, использование наибольшего уровня кортизола не дало дополнительных преимуществ: площадь под кривой операционной характеристики – 0,960 (95%ДИ 0,927-0,994).

Таким образом, в данной работе впервые математически показано, что двухкратное измерение свободного кортизола в вечерней слюне не дает диагностического преимущества для верификации ЭГ. То есть, достаточно однократного исследования свободного кортизола в слюне, собранной в 23.00; повторный анализ рекомендуется проводить при возникновении технических сложностей с первым образцом или через какое-то время при подозрении на циклическое течение ЭГ.

При проведении корреляционного анализа была выявлена сильная зависимость между результатами определения свободного кортизола в слюне методом ИФА и ЭХЛА: коэффициент корреляции Пирсона $R=0,899$ $p<0,0001$. Диагностические возможности определения кортизола в вечерней слюне, полученные методом ЭХЛА, сравнивались с результатами исследования кортизола методом ИФА и МПД (Рисунок 3.)

Рисунок 3. Кривые операционных характеристик различных методов диагностики ЭГ



Кортизол ЭХЛА (1) – однократное исследование свободного кортизола в слюне методом электрохемилюминесцентного (ЭХЛА) анализа $AUC = 0.953$ (95% ДИ 0.918-0.987)

Кортизол ЭХЛА (среднее) – расчет среднего от двух последовательных измерений свободного кортизола в слюне $AUC = 0.962$ (95% ДИ 0.930-0.993)

Кортизол ИФА (1) исследование кортизола в слюне методом иммуноферментного анализа (ИФА) $AUC = 0.964$ (95% ДИ 0.936-0.993)

МПД – малая проба с дексаметазоном. $AUC = 0.982$ (95% ДИ 0.959-1.00)

При прямом сравнении всех площадей под кривыми операционных характеристик статистически значимых различий выявлено не было, т.е. тесты обладают примерно одинаковыми диагностическими возможностями.

Вместе с тем, по сравнению с определением вечернего кортизола в слюне МПД обладает лучшей чувствительностью 100% (95% ДИ 91,8-100%), и худшей специфичностью 88,7% (78,5-94,4%). Комбинация кортизола в вечерней слюне и МПД позволяет значительно повысить специфичность для однонаправленного результата (только два ложно-положительных случая) до 97,4% (95% ДИ 91,1 - 99,3). Кроме того, исследование кортизола в вечерней слюне и МПД более удобны для проведения в амбулаторных условиях в качестве тестов первой линии

для диагностики ЭГ. На основании результатов исследования был разработан алгоритм диагностики ЭГ (Схема 1.)

Схема 1. Алгоритм диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением или избыточной массой тела



Как правило, для верификации ЭГ рекомендуется как минимум два положительных теста первой линии (Nieman, et.al., 2008), но сами тесты не определены. В данной работе впервые продемонстрированы возможности повышения чувствительности и специфичности при комбинации однократного исследования вечернего кортизола (ЭХЛА) и МПД. В общей сложности, дискордантный результат наблюдался у 13 человек из 123 больных с подтвержденным диагнозом, т.е. 10,5% пациентов нуждаются в дополнительном обследовании (определение кортизола в суточной моче, кортизола в вечерней крови и т.д.).

Раздел 4. Информативность маркера костеобразования - остеокальцина как дополнительного метода диагностики ЭГ

У 106 из 123 пациентов с ожирением или избыточной массой тела, включенных в проспективное исследование диагностических возможностей определения вечернего кортизола в слюне был произведен забор крови для исследования уровня остеокальцина. Медиана возраста (Q25-Q75) 39 (26-49) лет; ИМТ 35 (31-41) кг/м². Данные о пациентах с верифицированным диагнозом сведены в Таблице 4.

Таблица 4. Характеристики пациентов, включенных в исследование диагностических возможностей остеокальцина у пациентов с ожирением и избыточной массой тела

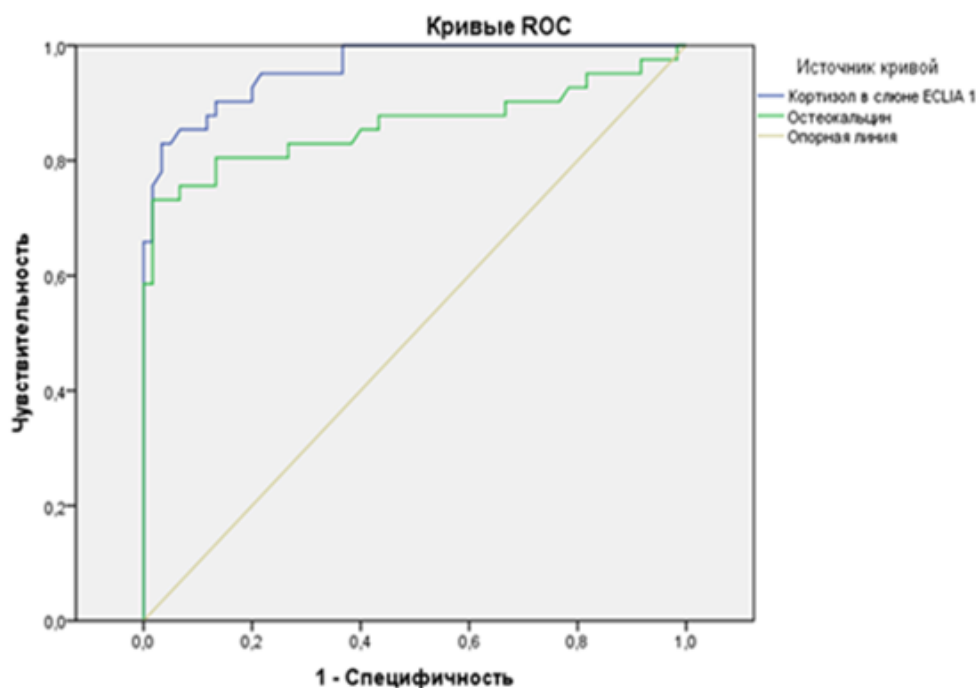
	Эндогенный гиперкортицизм Me (Q25-Q75)	Алиментарно-конституциональное ожирение Me (Q25-Q75)	P
Количество человек	42	64	
Пол Ж:М (%)	34 (81%):8 (19%)	45(70%) :19(30%)	0,8
Возраст (лет)	37 (24-51)	39 (29-48)	0,61
ИМТ (кг/м ²)	31,5 (28-37)	37 (34-42)	<0,01
Остеокальцин (нг/мл)	6,5 (4,1-10,2)	16,5 (13,2-23,3)	<0,01
Кортизол в слюне в 23.00 (нмоль/л)	23,3 (16,0-43,8)	3,1 (2,0-4,4)	<0,01

Оптимальная точка разделения – 8,3 нг/мл для уровня остеокальцина, рассчитанная на основании ROC-анализа позволяет добиться чувствительности 73,8% и специфичности 96,9%.

На сегодняшний день, существует одна ретроспективная работа, в которой остеокальцин исследовался для диагностики ЭГ (Sereg M, et.al., 2011). В работу было включено 151 человек, в том числе у 23 больных был верифицирован ЭГ. Предложенная в этом исследовании точка разделения для уровня остеокальцина - 12,9 нг/мл (Sereg M, et.al., 2011), по нашим данным, демонстрирует лучшую чувствительность – 81,0%, но значительно уступает по специфичности – 78,1% точке разделения 8,3 нг/мл.

При сравнении диагностических возможностей различных тестов в настоящей работе исследование остеокальцина оказалось статистически значимо менее информативным методом для диагностики ЭГ среди пациентов с ожирением, по сравнению с исследованием свободного кортизола в слюне в 23.00 ($p=0,015$) и МПД ($p=0,003$), которые между собой не отличались ($p=0,316$). Кривые операционных характеристик для остеокальцина и свободного кортизола в слюне представлены на Рисунке 4.

Рисунок 4. Кривые операционных характеристик возможностей остеокальцина и свободного кортизола в слюне, собранной в 23.00, измеренных методом ЭХЛА для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением.



Таким образом, остеокальцин может быть рекомендован как один из тестов второй линии для диагностики ЭГ среди пациентов с ожирением или избыточной массой тела.

Активный скрининг пациентов с идиопатическим остеопорозом продемонстрировал достаточно высокий процент пациентов с недиагностированным ЭГ (4,8%) [67]. Клиническая картина ЭГ часто неявная в постменопаузе, и ЭГ может оставаться недиагностированным, в том числе под «маской» постменопаузального остеопороза.

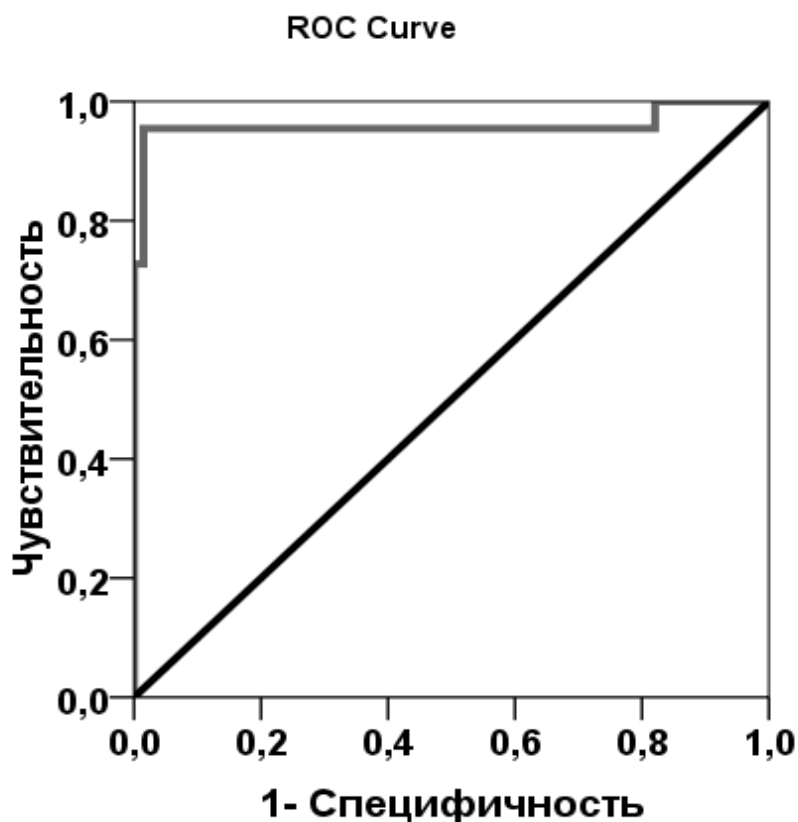
В данной части работы остеокальцин исследовался ретроспективно у пациенток с установленным диагнозом постменопаузальный остеопороз, которые ранее не получали лечения и у 22 пациенток с ЭГ и остеопорозом 45 лет и старше с аменореей. Общая характеристика включенных больных представлена в Таблице 5.

Таблица 5. Общая характеристика пациентов, включенных в ретроспективный анализ диагностических возможностей остеокальцина для выявления ЭГ среди пациентов с ПМО.

	Пациенты с ЭГ и ГКО Me (Q25-Q75)	Пациенты с ПМО Me (Q25-Q75)	P
Количество пациентов	22	67	
Возраст (годы)	52 (51-56)	69 (61-73)	<0,01
Индекс массы тела (кг/м ²)	28 (26-33)	24 (20-27)	<0,01
Общее количество пациентов с низкотравматичными переломами (%), Переломы позвонков Внепозвоночные переломы	19 (86%) 17 7 (1 перелом бедра)	36 (54%) 14 20 (4 перелома бедра)	0,04
Позвонки (L1-L4) T-критерий	-1,4 (-2,1 - -0,4)	-2,9 (-3,7 - -2,5)	<0,01
Шейка бедра (Neck) T-критерий	-1,5 (-1,7 - -0,9)	-2,4 (-2,8 - -1,8)	<0,01
Остеокальцин (нг/мл)	4,0 (2,6 – 7, 4)	23,2 (15,8 – 23, 4)	< 0,01

При анализе диагностических возможностей остеокальцина для верификации пациентов с ЭГ среди женщин с ПМО площадь под кривой операционной характеристики составила -0,959 (95% ДИ 0,887-1,00) (Рисунок 5.)

Рисунок 5. Анализ кривой операционной характеристики остеокальцина (ЭХЛА) для диагностики ЭГ у пациентов с остеопорозом в постменопаузе



Оптимальная точка разделения для уровня остеокальцина на основании ROC-анализа - 8,3 нг/мл в данной популяции продемонстрировала чувствительность – 95,4%, специфичность – 98,5%.

Таким образом, на фоне высокого костного обмена, который в целом наблюдается у женщин в постменопаузе (Johnell O, et.al. 2002, Sornay-Rendu E, et.al. 2005), определение остеокальцина обладает высокой диагностической ценностью для выявления ЭГ и может использоваться, особенно у женщин в ранней постменопаузе с тяжелым остеопорозом. Настоящее исследование является первой подобной работой. Важно учитывать, что лечение пациентов антирезорбтивными или анаболическими препаратами влияет на уровень остеокальцина, как и на другие маркеры костного обмена, поэтому диагностически информативно исследование остеокальцина только у нелеченных больных. Уровень остеокальцина зависит от метода, который используется в лаборатории и данный результат не может быть использован для другого оборудования и диагностических наборов (Civitelli R, et.al. 2009).

Раздел 5. Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимого ЭГ

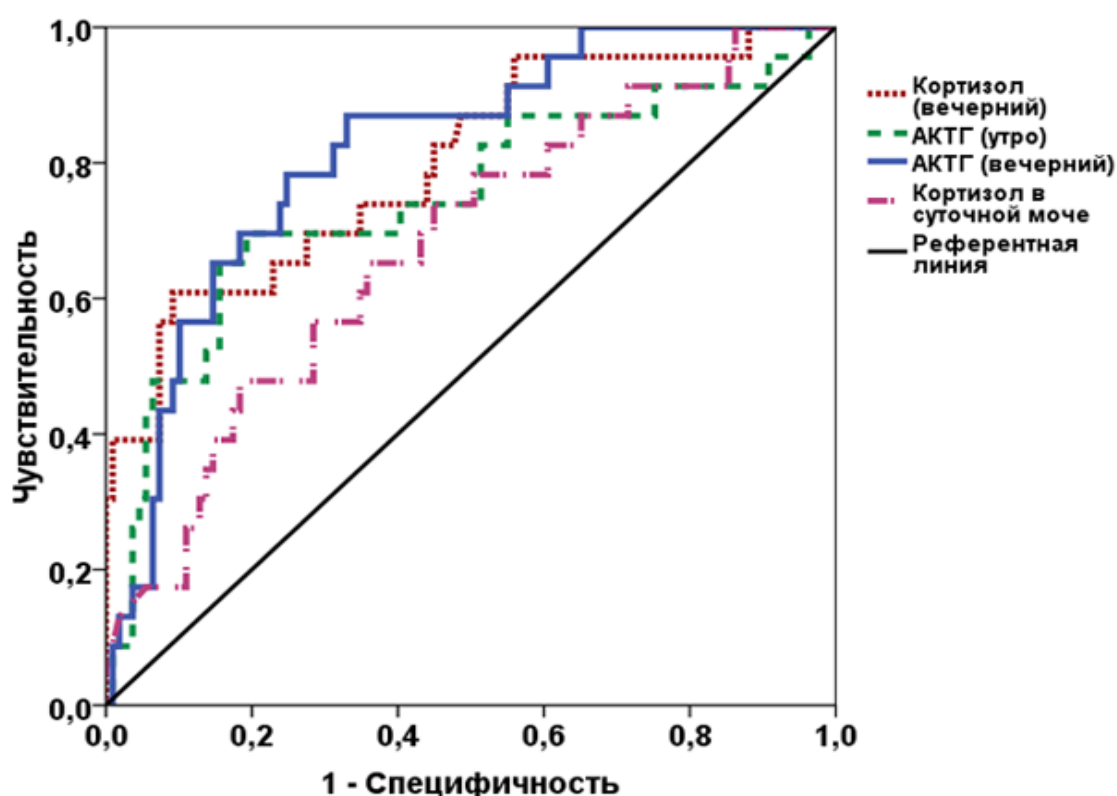
Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимого ЭГ является одним из наиболее сложных этапов нозологической диагностики. Существуют некоторые клинические (тяжесть течения) и лабораторные стигматы (гипокалиемия, более высокие уровни гормонов), которые позволяют заподозрить АКТГ-эктопию уже на первом этапе диагностического поиска (Марова Е.И., 1999). В Таблице 6 представлены ретроспективные данные рутинных обследований среди пациентов с БИК и АКТГ-эктопией.

Таблица 6. Общая и лабораторная характеристика пациентов с различной этиологией АКТГ-зависимого эндогенного гиперкортицизма.

	Болезнь Иценко-Кушинга (n=159)	АКТГ-эктопированный синдром (n=28)	P
	Me (Q25-Q75)		
Пол Ж:М (%)	137(86%): 22(14%)	19 (54%): 11 (36%)	0,014
Возраст (годы)	34 (26-47)	34 (28-49)	0,54
ИМТ (кг/м ²)	30 (26-33)	27 (25-31)	0,08
Калий (ммоль/л)	4,3 (3,9-4,7)	3,9 (3,1-4,5)	0,003
23:00 Кортизол(нмоль/л)	615 (420-801)	1019 (608-1490)	0,001
Свободный кортизол в моче нмоль/24 часа	1535 (900-2776)	2643 (1437-4459)	0,011
АКТГ 8:00 пг/мл	89,4 (63,3 -118,6)	137,0 (85,0-201,3)	0,01
АКТГ 23:00 пг/мл	73,4 (48,8-101,5)	128,8 (85,9 – 188,6)	0,001

При проведении ROC-анализа для тестов, по которым были выявлены различия площади под кривыми распределились следующим образом: для уровня АКТГ в вечернее время - 0,811 (95% ДИ 0,712-0,909), АКТГ в утренние часы - 0,722 (95% ДИ 0,539-0,787); кортизол в сыворотке крови, взятый в вечернее время - 0,773 (95% ДИ 0,657-0,889); уровень свободного кортизола в суточной моче - 0,663 (95% ДИ 0,539-0,787) и низкий уровень калия в сыворотке крови - 0,687 (95% ДИ 0,553-0,821). Таким образом, наибольшей диагностической информативностью обладает показатель АКТГ в вечернее время (Рисунок 6).

Рисунок 6. Кривые операционных характеристик диагностических исследований первой линии для раннего выявления этиологии АКТГ-зависимого гиперкортицизма.



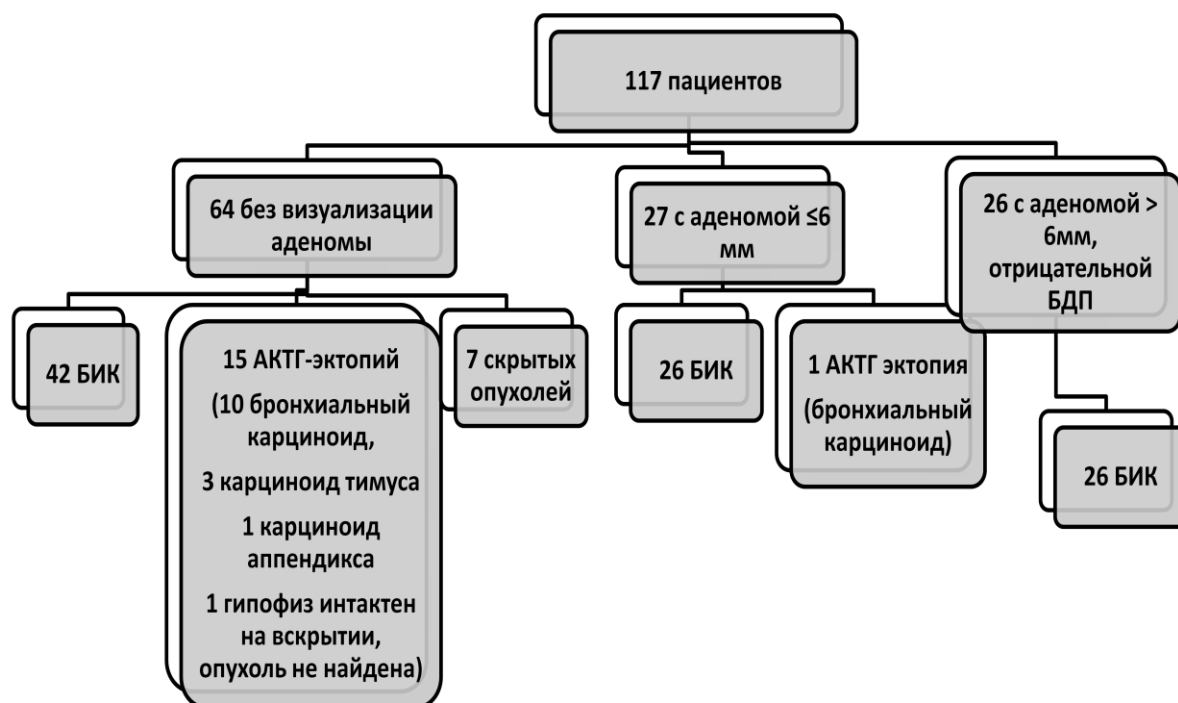
Точка разделения 108,9 пг/мл для уровня вечернего АКТГ (рассчитанная на основании максимальной суммы чувствительности и специфичности) обладает чувствительностью 70,6%, и специфичностью – 81,7%. Остальные «стигматы» АКТГ-эктопии (высокий АКТГ утром, высокий уровень кортизола в крови и моче, а также гипокалиемия) имеют худшие диагностические возможности.

Наиболее информативным тестом для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого ЭГ считается двухсторонний селективный забор крови из нижних каменистых синусов на фоне введения стимуляционного агента. В качестве стимуляционного агента в данной работе использовался десмопрессин.

В исследование включено 117 пациентов (86 женщин (73,5%) и 31 мужчина (26,5%)); медиана возраста 34 года (Q25-Q75 26-49 лет), минимальный возраст 17 лет и максимальный 66 лет, медиана свободного кортизола в суточной моче составила 2148 (1268-4129) нмоль/24 часа; уровень утреннего АКТГ 105,8 (67,7-150,8) нг/мл; вечернего - АКТГ 83,6 (51,8-126,2) нг/мл.

В трёх случаях процедура селективного забора крови из нижних каменистых синусов была выполнена дважды, поэтому у 117 представленных пациентов было выполнено 120 заборов крови. Распределение пациентов по показаниям для проведения забора крови из нижних каменистых синусов, а также окончательный диагноз по результатам гистологического исследования представлены на Схеме 2.

Схема 2. Распределение пациентов по показаниям для проведения забора крови из нижних каменистых синусов. Окончательный диагноз по результатам гистологического исследования.



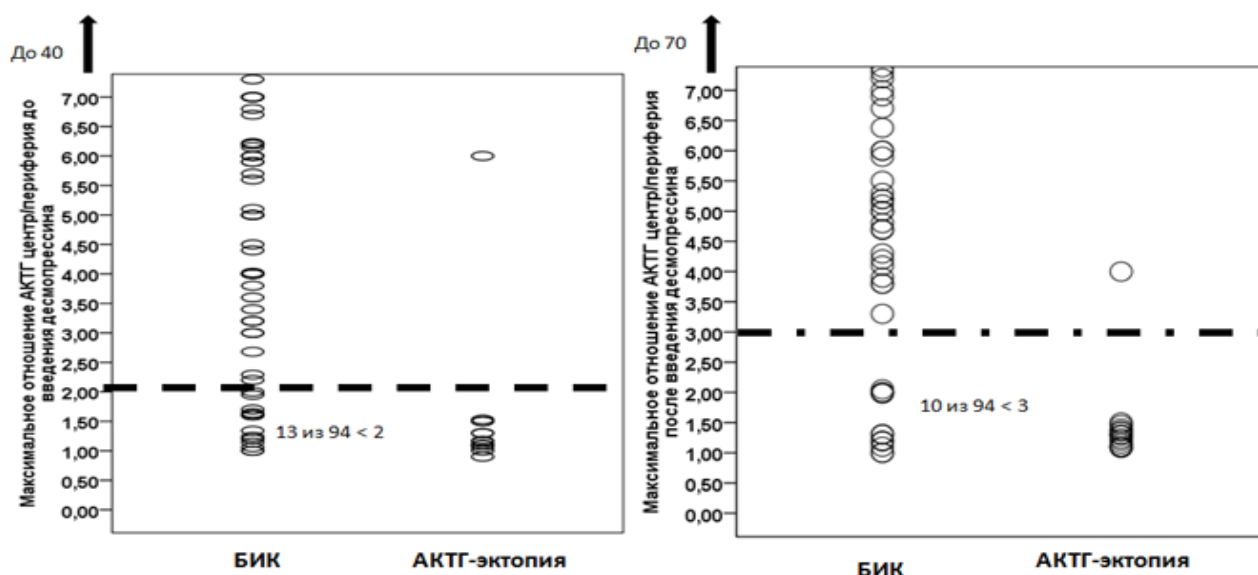
Среди пациентов с визуализацией аденомы АКТГ-эктопированный синдром был диагностирован и гистологически подтверждён лишь в 1 случае: у больной с микроаденомой, без ремиссии после проведённого нейрохирургического лечения. Среди пациентов без визуализации аденомы на МРТ АКТГ-эктопию удалось диагностировать и прооперировать у 15 пациентов.

В 7 случаях опухоль не была найдена, при этом в 6 случаях по результатам селективного забора крови была диагностирована АКТГ-эктопия и в 1 случае – БИК, но пациент был направлен на лучевую терапию, в исходе которой не наблюдалось ремиссии за

период наблюдения. Таким образом, анализ диагностических возможностей метода проводился только среди пациентов с гистологически верифицированным диагнозом (n=110).

Максимальное отношение АКТГ центр/периферия до введения десмопрессина позволило верифицировать БИК с чувствительностью 86,1% (95%ДИ 77,1-91,7) и специфичностью 93,7% (95%ДИ 71,7% - 98,9). При условии анализа двух максимальных отношений АКТГ чувствительность метода составила 90,4% (95% ДИ 82,8-94,9), а специфичность 93,7% (95% ДИ 71,7 – 98,9). Результаты суммированы на Рисунке 7.

Рисунок 7. Уровни максимального градиента АКТГ до (на рисунке слева) и после (на рисунке справа) введения десмопрессина 8мкг внутривенно в ходе забора крови из нижних каменистых синусов.



БИК – верифицированная болезнь Иценко-Кушинга, каждый кружок обозначает индивидуального пациента, для удобства указано общее количество ложно-отрицательных результатов до введения десмопрессина (градиент АКТГ<2) и после введения десмопрессина (градиент АКТГ < 3).

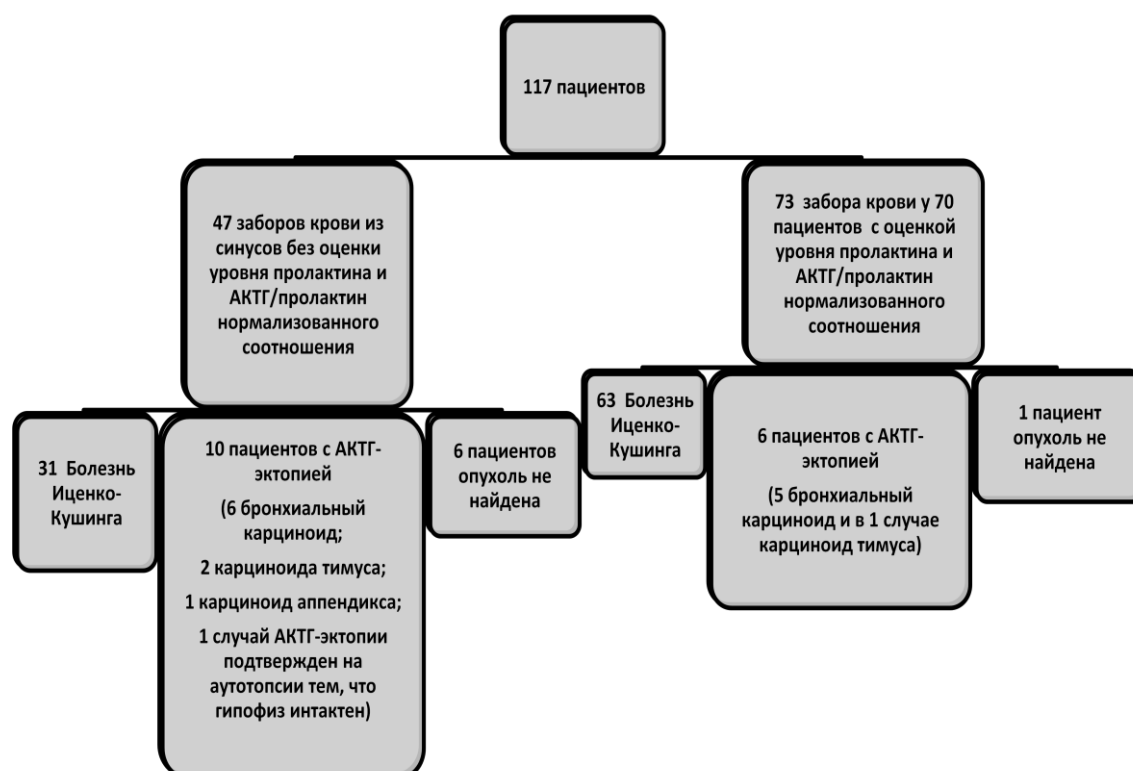
Площадь под кривой операционной характеристики для метода катетеризация нижних каменистых синусов без введения десмопрессина составила 0,930 (95%ДИ 0,870-0,990) и была выше при анализе данных после введения десмопрессина – 0,941 (95%ДИ 0,898-0,985). В целом, площадь под кривой операционной характеристики с анализом обеих цифр отношения АКТГ как до введения десмопрессина, так и после введения препарата составила 0,940 (95%ДИ 0,893-0,988).

Настоящее исследование является первой работой в России, посвященной оценке диагностических возможностей селективного забора крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином для дифференциальной диагностики АКТГ зависимого гиперкортицизма. Паралельно с исследованием и публикациями в ФГБУ ЭНЦ серия

клинических случаев проведения забора крови без стимуляционного агента была описана на базе ГБУЗ МО МОНИКИ (Древаль АВ, и др. 2012). Применение десмопрессина в ходе селективного забора крови из нижних каменистых синусов описано в трех работах (Castinetti F, et.al. 2007; Machado MC, et.al., 2007, Tsagarakis S, et.al, 2007). Количество пациентов в этих исследованиях не превышало 60 человек и чувствительность, специфичность метода приближались к 100%. Настоящая работа является наиболее крупной в мире, так как включает 110 случаев АКТГ-зависимого гиперкортицизма. Введение десмопрессина, как и в предыдущих работах позволяло улучшить диагностические возможности метода, но при увеличении количества пациентов чувствительность и специфичность оставалась чуть больше 90%.

В исследовании были проанализированы возможности повышения чувствительности и специфичности селективного забора крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином путем определения уровня пролактина и расчета АКТГ/пролактин нормализованного соотношения. Окончательный диагноз по результатам гистологического исследования с распределением в группы пациентов, у которых исследовался и не исследовался уровень пролактина представлены на Схеме 3.

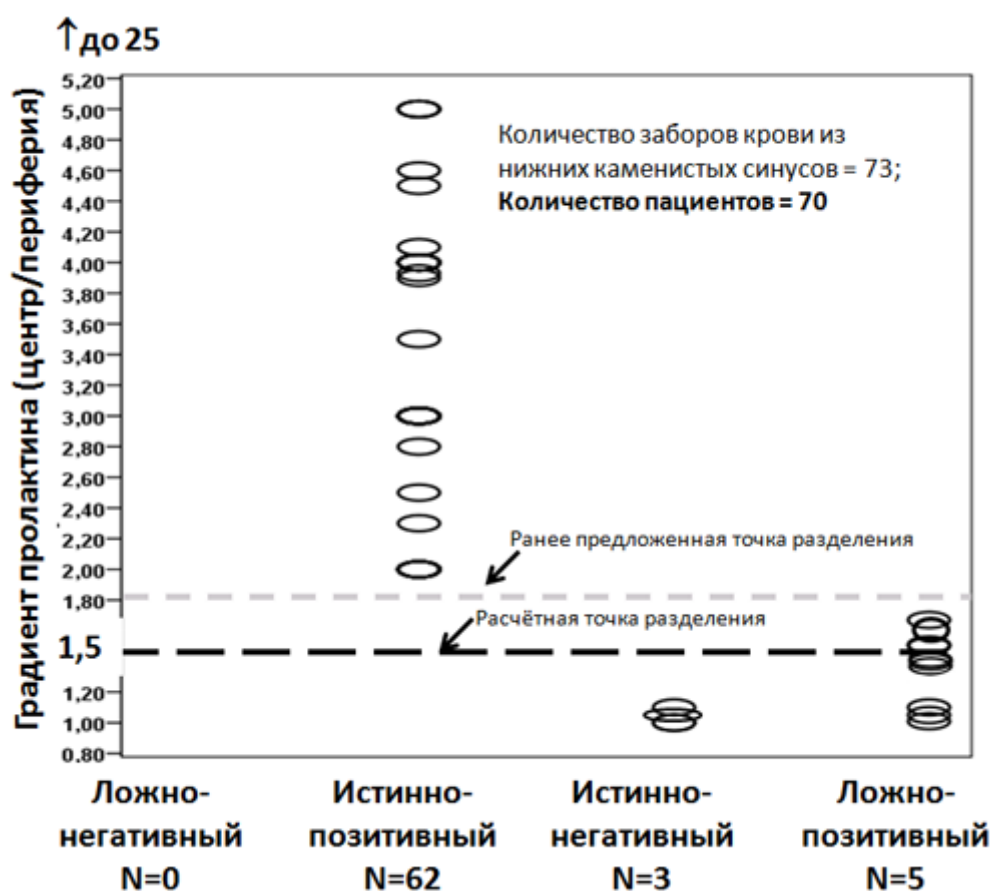
Схема 3. Окончательный гистологически подтвержденный диагноз включенных пациентов в группе, где контроль положения катетера не проводился (n=47) и, где проводился (n=70)



Таким образом, среди 117 пациентов, у которых выполнялся селективный забор крови, у 47-ми больных процедура проводилась без контроля положения катетера по градиенту пролактина, в то время как у последующих 70 пациентов в ходе селективного забора крови в обоих синусах и периферической вене однократно исследовалось содержание пролактина до введения десмопрессина с последующим расчетом АКТГ/пролактин нормализованного соотношения. По общим характеристикам пациенты, которым проводилось и не проводилось исследование пролактина, не отличались.

В трех клинических случаях, когда градиент АКТГ < 2 до стимуляции и градиент АКТГ < 3 после стимуляции совпадал с градиентом пролактина < 1,5; селективный забор крови из нижних каменистых синусов был проведен повторно. Неверное положение катетеров не было верифицировано во время первой процедуры. При повторном заборе крови удалось правильно установить катетеры и подтвердить центральный ЭГ. Однако в восьми случаях для точки разделения 1,8 и в пяти случаях для точки разделения 1,5 градиент АКТГ был больше 2 и 3х соответственно до и после стимуляции, в то время как градиент пролактина был ниже точки разделения. Данные сведены на Рисунке 8.

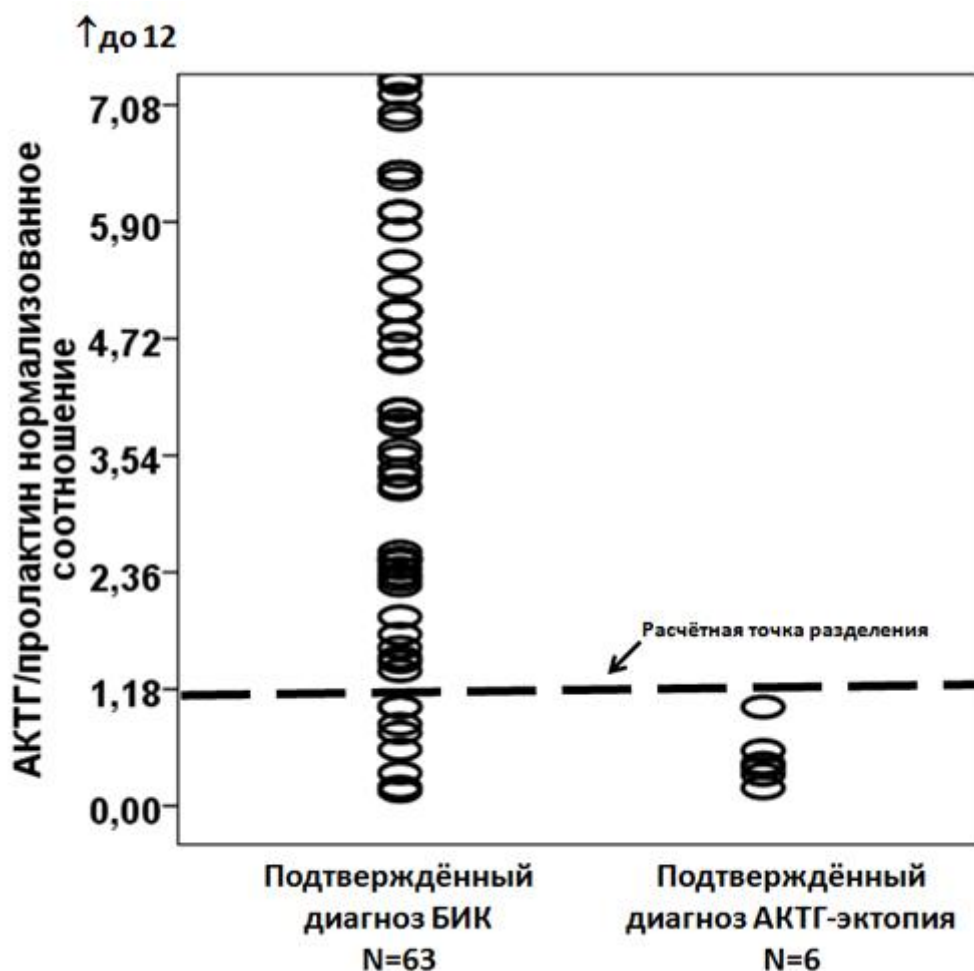
Рисунок 8. Возможности оценки градиента пролактина для контроля положения катетера в ходе селективного забора крови из нижних каменистых синусов.



Чувствительность контроля положения катетера по градиенту пролактина для ранее предложенной точки разделения составила – 88% при 100% специфичности. При снижении точки разделения для градиента пролактина до 1,5 удалось сократить количество ложно-отрицательных результатов до 5 случаев, позволив повысить чувствительность до 92,5% при неизменно 100% специфичности. У всех пациентов, которым исследовался уровень пролактина, рассчитывалось АКТГ/пролактин нормализованное соотношение.

Точка разделения – 1,18 для АКТГ/пролактин нормализованного соотношения (ROC-анализ с оптимизацией чувствительности и специфичности) позволяет добиться чувствительности - 85,9% (95% ДИ 76,8 – 93,4) и специфичность – 100% (95% ДИ 60,9 – 100). Данные сведены на Рисунке 9.

Рисунок 9. Анализ возможностей расчетного АКТГ/пролактин нормализованного соотношения в ходе селективного забора крови на фоне стимуляции десмопрессином



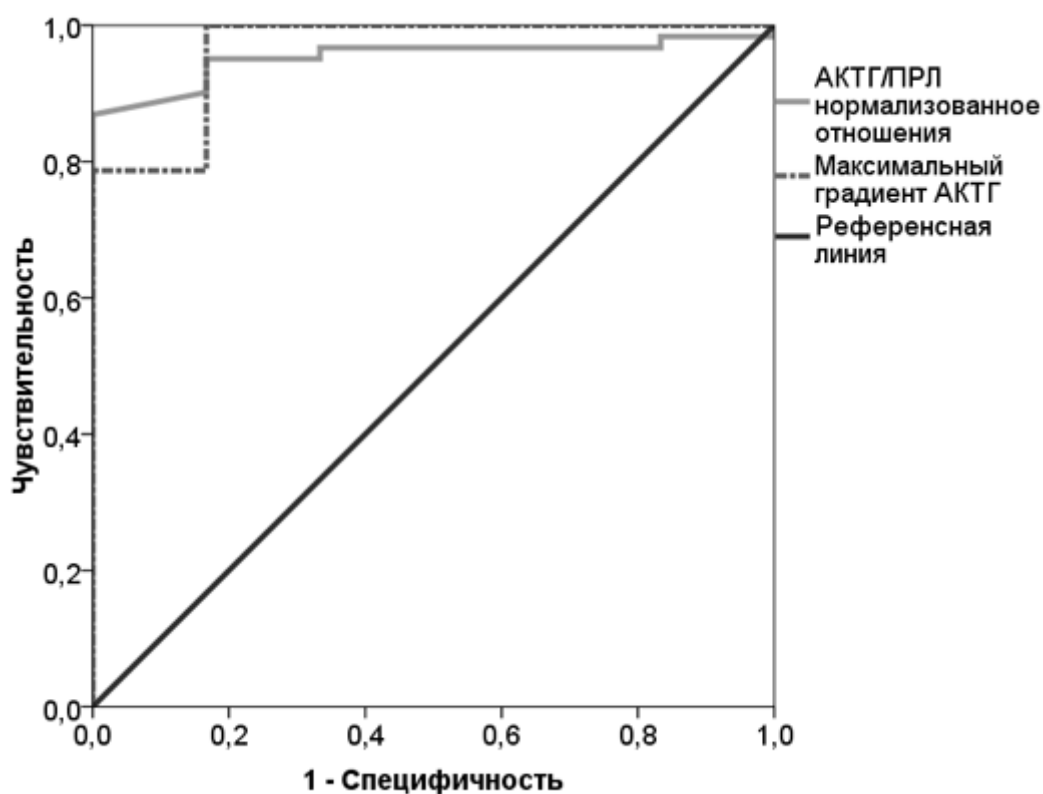
Ранее предложенная точка разделения для АКТГ/пролактин нормализованного соотношения – 0,7 (Grant P, et.al., 2012) продемонстрировала лучшую чувствительность –

92,2%, но значительно уступала по специфичности – 83,3%. Использование точки разделения 1,18 в настоящем исследовании позволило повысить специфичность до 100%.

Наиболее частыми причинами ложно-отрицательных результатов были высокий базальный градиент пролактина и парадоксальное снижение градиента АКТГ после стимуляции десмопрессином.

Прямое сравнение площади под кривыми операционных характеристик диагностических возможностей селективного забора крови со стимуляцией десмопрессином с определением только максимального градиента АКТГ (0,964 (95%ДИ 0,897-1,032) и проведение забора крови с расчетом АКТГ/пролактин нормализованного соотношения (0,954 (95%ДИ 0,902 -1,005) в единой выборке пациентов (n=70) не позволило продемонстрировать статистически значимого преимущества последнего, что видно на Рисунке 10.

Рисунок 10. Прямое сравнение площадей под кривыми операционных характеристик использования только градиента АКТГ в ходе селективного забора крови из нижних каменистых синусов и АКТГ/пролактин нормализованного соотношения для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма.



Однако ретроспективный анализ когорты пациентов (n=47), которым не проводилось определение градиента пролактина и расчет АКТГ/пролактин нормализованного соотношения в

ходе селективного забора крови из НКС на фоне стимуляции десмопрессином показал, что по мере накопления опыта и с внедрением контроля положения катетера по градиенту пролактина количество пациентов с неустановленным диагнозом уменьшилось от 6 больных среди 47 пациентов до 1 среди 70 больных. При этом у троих пациентов забор крови из нижних каменистых синусов проводился повторно в связи с отсутствием градиента пролактина и АКТГ, и при анализе учитывался результат только повторного забора крови, когда удалось продемонстрировать градиент пролактина.

Впервые в рамках настоящего исследования максимальное отношение АКТГ для расчетного индекса – АКТГ/пролактин нормализованного соотношения получено на фоне стимуляции десмопрессином. Проспективный дизайн исследования с включением достаточного количества пациентов позволил рассчитать точку разделения -1,18 на основании анализа кривой операционной характеристики с целью максимизировать чувствительность и специфичность, что также было сделано впервые.

В ходе проведения 120 селективных заборов крови из НКС были зарегистрированы нежелательные явления: в двух случаях падение артериального давления и тахикардия уже после процедуры, в одном из этих случаев потребовалась интенсивная терапия. У двоих пациентов были зарегистрированы отсроченные (2-5 дней) забрюшинные кровотечения, однако связь с процедурой не является абсолютно доказанной, так как кровотечения развивались на фоне инъекций прямых антикоагулянтов. В одном случае после вмешательства наблюдалась лихорадка и обострение инфекции. Кроме того, наблюдались два случая аллергической реакции (сыпь) наиболее вероятно на контрастное вещество. У троих пациентов гематомы в местах пункции бедренных вен потребовали специального лечения. В целом безопасность метода не уступала данным, описанным зарубежом.

Раздел 6. Сывороточное содержание внеклеточных антагонистов Wnt сигнала и молекул остеокластогенеза у пациентов с ЭГ

По современным представлениям, в основе патогенеза подавления костеобразования при ГКО лежит подавление канонического Wnt- β -катенин сигнального пути. Повышение экспрессии его внеклеточных антагонистов (склеростина, секретируемого связывающего белка фризельда 1, диккофа 1) было выявлено у животных и в культурах клеток при воздействии супрафизиологических доз ГК (Wang F-S, et.al, 2005; Wang F-S, et.al., 2008; Yao W, et.al., 2008), и эти белки были измерены в настоящей работе у пациентов с ЭГ.

В анализ были включены данные 40 последовательно обратившихся пациентов с клинически явным и биохимически подтвержденным ЭГ (36 пациентов с БИК, 1 случай синдрома Кушинга, 1 пациентка с АКТГ-эктопией с локализацией в аппендиксе и 2-х случая

скрытых опухолей, по поводу которых была проведена двухсторонняя адреналэктомия ввиду тяжести состояния). В контрольную группу подбирались здоровые люди в соответствии с возрастом, полом и ИМТ. Общие характеристики пациентов и здорового контроля сведены в Таблице 7.

Таблица 7. Общая характеристика пациентов с ЭГ и группы контроля, включенных в исследование сывороточной концентрации ключевых белков, влияющих на остеобластогенез и остеокластогенез

	Эндогенный гиперкортицизм Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	Здоровый контроль Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	P
Количество участников	40	40	
Пол ж(%) : м(%)	32 (80%): 8 (20%)	31 (77%):9 (23%)	0.96
Возраст (лет)	30 (26-40) 20-56	28 (24-38) 21-57	0.37
Индекс массы тела (кг/м ²)	29.3 (25.5-34.1) 17.6-45.0	27.7 (23.8-32.4) 18.7-42.1	0.24
Кортизол в слюне в 23:00 (нмоль/л)	26.3 (20.0-43.8) 15.5-224.0	3.2 (2.0-4.1) 1.2-13.6	<0.0001
ИРФ1 (нг/мл)	167.7 (120.8-225.3) 25.8-426.5	212.1 (177.8-245.3) 121.3-630.1	0.003
Витамин D (нг/мл)	13.0 (8.1 -20.2) 4.0 – 63.4	19.1 (14.0 – 27.0) 4.2 – 77.0	0.003
Остеокальцин (нг/мл)	7.1 (3.7-8.4) 2.1-30.8	17.6 (13.1-23.4) 5.9-36.5	<0.001
С-концевой телопептид коллагена 1 типа (нг/мл)	0.41 (0.29-0.63) 0.01-1.72	0.36 (0.25-0.53) 0.1-0.97	0.58

Все пациенты с ЭГ имели повышенный уровень кортизола в суточной моче – 2575 (1184-4228) нмоль/24ч. Значительное подавление маркера костеобразования сочеталось с нормальным уровнем маркера костного разрушения. Корреляционная зависимость ОК и СТх, существующая среди здорового контроля ($\rho_0=0.724$ ($p<0.001$)) ослаблялась среди пациентов с эндогенным гиперкортицизмом до статистически незначимого уровня ($\rho_0=0.285$ ($p=0.083$)), что может свидетельствовать о разобщении костного обмена. Уровень свободного кортизола в моче у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом коррелировал с уровнем остеокальцина $\rho_0=-0.464$ $p=0.003$, но связи не было выявлено с СТх $\rho_0=0.245$ ($p=0.132$).

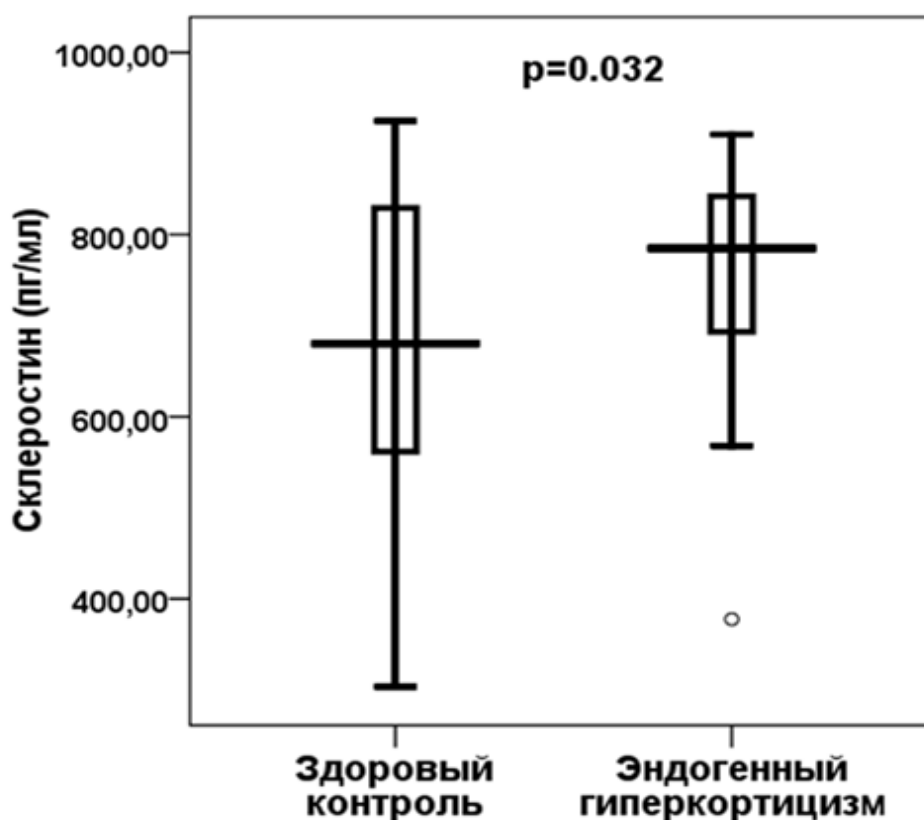
Уровни экстрацеллюлярных белков ингибиторов Wnt сигнального пути представлены в Таблице 8.

Таблица 8. Уровни экстрацеллюлярных белков антагонистов Wnt сигнального пути у пациентов с ЭГ по сравнению с здоровым контролем

	Эндогенный гиперкортицизм Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	Здоровый контроль Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	P
N	40	40	
Диккопф 1 (пг/мл)	440.49 (353.3-479.7) 185.6-502.5	448.8 (408.6-474.4) 208.8-494.4	0.53
Секретируемый связывающий белок фризельда 1 (нг/мл)	0.09 (0.07-0.11) 0.06-1.87	0.08 (0.07-0.11) 0.05-2.68	0.27
Склеростин (пг/мл)	784.8 (693.1 - 842.1) 377.2 - 910.0	680.2 (561.6 - 829.3) 303.4 - 924.9	0.032

Статистически значимые различия были найдены только для уровня склеростина, и были обусловлены отсутствием низких значений склеростина, но не увеличением уровня протеина выше обнаруженных у здоровых людей, что видно на Рисунке 11.

Рисунок 11. Уровень склеростина в сыворотке крови у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом по сравнению со здоровым контролем.



Уровень склеростина выше 662 пг/мл существенно чаще встречался среди больных ЭГ по сравнению со здоровыми людьми (ОШ=4,19 95% ДИ 1,44-12,22), $p=0,006$.

У здоровых людей наблюдалась корреляционная зависимость склеростина и РАНКЛ $\rho_0=-0.37$ ($p=0.018$), но не у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом $\rho_0 = 0.30$ ($p=0.057$).

Wnt –сигнал влияет на систему РАНКЛ/ОПГ через регуляцию костеобразования, что обеспечивает тесную сопряженность костного обмена (Boysen BF, et.al. 2007, Spencer GJ, et.al., 2006). Отсутствие этой зависимости у больных с ЭГ может косвенно свидетельствовать о разобщении костного обмена.

В целом, настоящее исследование и экспериментальные работы (Yao W, et.al., 2008) свидетельствуют о повышении экспрессии и повышении концентрации склеростина у животных и человека в ответ на воздействие высоких концентраций ГК и, соответственно, антитела к склеростину могут быть эффективными для лечения ГКО.

Для понимания изменений со стороны костного разрушения, были измерены сывороточные концентрации РАНКЛ и ОПГ. Исследования в культурах клеток, в том числе остеобластов человека, продемонстрировали подавление экспрессии ОПГ и активацию РАНКЛ при введении глюкокортикоидов (Hofbauer LC, et.al., 2004).

Уровень РАНКЛ был подавлен у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом по сравнению со здоровым контролем: 0.083 (0.075-0.093) пмоль/л vs 0.106 (0.089-0.131) пмоль/л $p<0.001$. РАНКЛ отрицательно коррелировал с уровнем свободного кортизола в моче $\rho_0= -0.452$ ($p=0.003$). При этом уровень остеопротегерина не отличался среди пациентов с гиперкортицизмом и здоровых людей (6.65 (4.92-7.66) пмоль/л vs 5.77 (5.00-6.40) пмоль/л $p=0.14$). Несколько исследований у пациентов с ЭГ продемонстрировали увеличение уровня ОПГ (Camoszi V.et.al, 2010, Dovio A. et.al. 2007), и уменьшение уровня РАНКЛ (Camoszi V.et.al, 2010), что наблюдалось и в нашей работе.

Концентрации РАНКЛ и ОПГ, измеренные в данном исследовании, могут иметь не только костное происхождение. РАНКЛ и ОПГ экспрессируются во многих тканях (Vogeser M, et.al, 2006). Подавление РАНКЛ может быть связано с негативным воздействием ГК на иммунную систему. Снижение иммунитета и инфекции распространены среди пациентов с ЭГ и является одной из наиболее частых причин летального исхода (Pivonello R, et.al, 2011). Результаты могут отличаться у пациентов, которые получают ГК из-за аутоиммунных заболеваний.

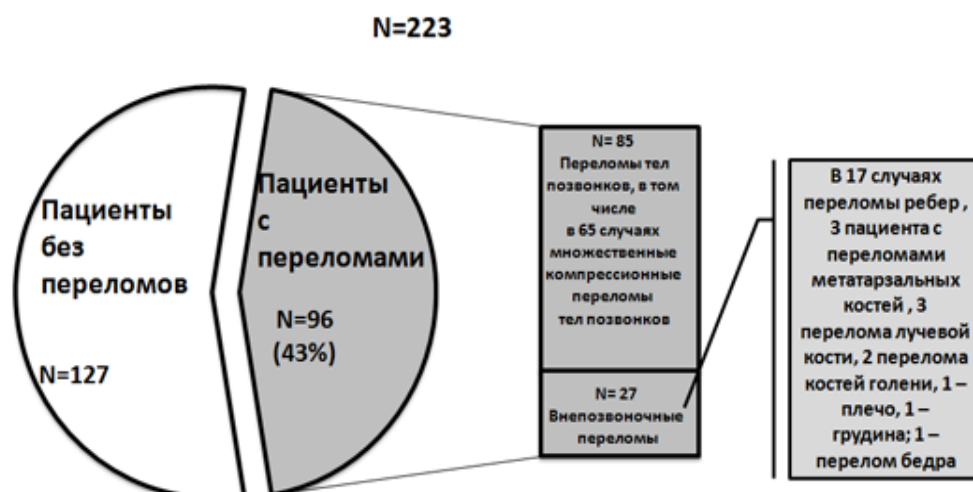
Раздел 7. Изучение распространенность низкотравматичных переломов, их предикторы и влияние на качество жизни у пациентов с ЭГ

Всего в исследование было включено 223 (182 (81,6%) женщины и 41 (18,4%) мужчины) пациента с активным ЭГ и доступной информацией по переломам. Медиана возраста составила 36 (26-48) лет. Минимальный возраст среди включенных в исследование был 18 лет и максимальный возраст 77 лет. Среди пациентов женского пола 46 женщин были в возрасте 50 лет и старше и они расценивались как постменопаузальные; среди женщин моложе 50 лет 78 (57%) пациенток имели стойкую аменорею, в остальных случаях наблюдались различные нарушения менструального цикла.

По этиологии эндогенного гиперкортицизма в 184 случаях у пациентов была диагностирована БИК, у 9 пациентов зарегистрировано первичное поражение надпочечников - синдром Кушинга (СК) и в 30 случаях АКТГ-эктопированный синдром (15 пациентов с бронхиальным карциноидом, 1 пациент с мелкоклеточной карциномой легких, 4 – карциноида тимуса, 1 карциноид аппендикса и у 9 больных новообразования найти не удалось).

Низкотравматичные переломы были зарегистрированы у 96 (43%) пациентов. Характер переломов и их распространенность представлены на Рисунке 12.

Рисунок 12. Низкотравматичные переломы у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом.



Данные по распространенности низкотравматичных переломов среди пациентов с ЭГ (n=223), полученные в настоящем исследовании совпадают с ранее описанными в работе Л.Я. Рожинской (n=80) (Рожинская Л.Я., 2001). Исследования были проведены с 10-летним интервалом времени и когорты включенных пациентов полностью отличались. Распространенность низкотравматичных переломов у больных с ЭГ по данным зарубежных исследователей варьирует от 30-76% (Futo L. et.al, 2008, Tauchmanova L. et.al, 2006, Vestergaard

P, et.al, 2002). Такой разброс данных, по-видимому, с одной стороны, обусловлен особенностями дизайна исследований: как правило, выборки не превышали 80 пациентов, проводился активный скрининг только на переломы позвонков или исследование, напротив, не ставило задач по анализу распространенности низкотравматичных переломов, то есть учитывались только те переломы, о которых активно говорили врачи и пациенты.

На сегодняшний день, представленное исследование является наиболее крупной работой по анализу распространенности низко-травматичных переломов у пациентов с активным ЭГ. При анализе общих клинических и лабораторных данных пациенты с переломами и без переломов статистически значимо отличались по целому ряду показателей. Данные сведены в Таблице 9.

Таблица 9. Общие характеристики пациентов с эндогенным гиперкортицизмом с низкотравматичными переломами и без на фоне заболевания

	Пациенты с переломами Me (Q25-Q75)	Пациенты без переломов Me (Q25-Q75)	P
N	96	127	
Пол ж(%) : м(%)	69(71%):27(29%)	113(89%) : 14(11%)	0,002
Возраст на момент диагноза ЭГ	37 (28-50)	35 (26-47)	0,361
Индекс массы тела (кг/м ²)	28,1 (25-33,3)	30,1 (27,1-33,9)	0,051
Уровень кальция в сыворотке крови (нмоль/л)	2,37 (2,27-2,43)	2,39 (2,30-2,48)	0,09
Уровень кортизола в суточной моче (нмоль/24 часа)	2500 (1489-4590)	1309 (843-2286)	<0,0001
Уровень кортизола в сыворотке крови в 23:00 (нмоль/л)	723 (612-1019)	494 (393-667)	<0,0001
МПК Шейки бедра (Neck Z-критерий)	-1,0 (-1,8 - -0,5)	-0,9 (-1,4 - -0,5)	0,135
МПК в целом бедро (Total Hip Z-критерий)	-0,9 (-1,7 - -0,2)	-0,4 (-0,9- 0,15)	0,01
МПК позвонков (L1-L4 Z-критерий)	-1,8 (-2,6 - -0,7)	-1,5 (-2,3 - -0,4)	0,225
Остеокальцин (нг/мл)	5,8 (3,2-7,9)	8,4 (5,2-12,7)	<0,0001
СТх (нг/мл)	0,41 (0,22-0,53)	0,36 (0,24-0,58)	0,60

После проведения многофакторного анализа с включением пола, возраста, ИМТ, МПК и остеокальцина, основными предикторами низкотравматичного перелома стали уровень кортизола в крови в вечернее время $p<0,001$ (ОШ=1,002 ДИ 1.001643 -1.003944 на каждую единицу увеличения) и отдельно проанализированный уровень кортизола в суточной моче $p<0,001$ (ОШ= 1,001 ДИ 1,000251-1.00062 на каждую единицу увеличения). Мужской пол

являлся существенным фактором риска низкотравматичных переломов, даже более важным по сравнению с низким уровнем остеокальцина. Однако, как суточный кортизол в моче, так и вечерний кортизол в крови оказывали влияние на вероятность развития перелома не зависимо от пола пациента (пол $p=0.247$; в то время как оба уровня кортизола $p < 0.001$). Непараметрическая зависимость уровня кортизола в суточной моче и уровня остеокальцина в сыворотке крови была достаточной сильной $\rho_0 = -0.534$ $p < 0.0001$. Такая же корреляционная зависимость была выявлена между уровнем кортизола вечером и остеокальцином $\rho_0 = -0.516$, $p < 0.0001$. Тем не менее, логистический регрессионный анализ позволил установить, что влияние остеокальцина на риск переломов было обусловлено повышением уровня кортизола в суточной моче и вечерней крови.

Анализ кривых операционных характеристик позволил выделить точки разделения для уровней кортизола. Для выделения групп риска низкотравматичных переломов у пациентов с ЭГ, можно предложить точку разделения 674 нмоль/л (отношение шансов (ОШ) 3.876, 95% ДИ 2.103-7.144) для уровня кортизола в вечерней крови и 1960 нмоль/24 ч (ОШ 3.22 (95% ДИ 1.738-5.971)) для уровня кортизола в суточной моче. То есть шансы испытать низкотравматичный перелом у пациента с уровнем кортизола в вечерней крови больше 674 нмоль/л и/или кортизол суточной мочи более чем 1960 нмоль/24ч в три раза выше, чем у пациента с более низкими цифрами кортизола в крови и моче.

Таким образом, по результатам данной работы именно тяжесть гиперкортицизма (уровень кортизола в крови вечером или содержание кортизола в суточной моче), а не снижение МПК оказывало влияние на риск низкотравматичных переломов. Интересно, что по данным крупных исследований и мета-анализов среди пациентов с экзогенным гиперкортицизмом единственным статистически значимым предиктором низкотравматичных переломов была именно доза глюкокортикоидов (Kanis JA, et.al., 2004, van Staa TP, et.al., 2000).

Пациенты с ЭГ традиционно являются тяжелыми больными с высокой коморбидностью. Низкотравматичные переломы сочетаются с артериальной гипертонией, сахарным диабетом, инфекционными осложнениями, депрессией и т.д.

В субпопуляции 139 больных (115 женщин и 24 мужчины) проведен анализ функциональных возможностей и качества жизни в зависимости от наличия или отсутствия переломов. Переломы были зарегистрированы у 61 больного (43,9%) из 139 обследованных.

По функциональным возможностям пациенты с переломами хуже удерживали равновесие в положении «тандем», но не отличались по тесту «подъем со стула» и тесту «встать и идти». Результаты тестов суммированы в Таблице 10.

Таблица 10. Результаты функциональных тестов у пациентов с переломами и без переломов

	Пациенты с переломами Me (Q25-Q75)	Пациенты без переломов Me (Q25-Q75)	P
N	61	78	
Тест «подъем со стула» (секунды)	14 (8-18)	12 (9-14)	0,28
Тест «тандем» (секунды)	24 (7-30)	30 (15-30)	0,02
Тест «встать и идти» (секунды)	11 (7,5 – 13)	9 (7-11)	0,41

Результат теста на равновесие «тандем» зависел от уровня кортизола в суточной моче $\rho_0 = -0,279$ ($p=0,018$); уровня кортизола в сыворотке крови вечером $\rho_0 = -0,379$ ($p=0,001$), уровня ИРФ-1 $\rho_0 = 0,363$ ($p= 0,003$) и остеокальцина $\rho_0 = 0,497$ ($p<0,001$), т.е. корреляции наблюдались с теми же показателями, от которых зависел риск перелома у пациентов с ЭГ, но не с уровнем калия в сыворотке крови.

При анализе качества жизни с использованием стандартного опросника EQ5D пациенты с переломами имели больше сложностей в повседневной деятельности, чаще и сильнее страдали от боли и хуже оценивали свое состояние здоровья, но не отличались по другим показателям опросника, результат суммирован в Таблице 11.

Таблица 11. Качество жизни пациентов с эндогенным гиперкортицизмом согласно опроснику EQ5D с переломами и без переломов

	Пациенты с переломами M (CO)	Пациенты без переломов M (CO)	P
N	61	78	
Подвижность	1,28 (0,49)	1,35 (0,86)	0,65
Уход за собой	1,34 (0,52)	1,20 (0,41)	0,17
Привычная повседневная деятельность	1,48 (0,57)	1,25 (0,48)	0,02
Боль/дискомфорт	1,42 (0,53)	1,23 (0,42)	0,03
Тревога/депрессия	1,43 (0,57)	1,38 (0,52)	0,67
Общий показатель визуально-аналоговой шкалы здоровья	46,7 (17,8)	55,4 (19,9)	0,01

Таким образом, пациенты с ЭГ с низкотравматичными переломами в большей степени страдают от болевого синдрома и испытывают больше сложностей в повседневной деятельности, а также хуже оценивают свое состояние здоровья по сравнению с пациентами с другими осложнениями ЭГ, которые низкотравматичные переломы не испытали. По другим доменам различий выявлено не было. Это первое исследование по влиянию переломов на качество жизни у пациентов с ЭГ.

ВЫВОДЫ

1) Значимыми клиническими проявлениями эндогенного гиперкортицизма (ЭГ) являются избыточная масса тела или ожирение (71%), жалобы на общую (70,6%) и мышечную (64,4%) слабость, артериальная гипертензия (63%), матронизм (54%), стрии (48%), низкотравматичные переломы (43%), сахарный диабет (31%). Обследование на ЭГ в группе лиц с ожирением наиболее целесообразно у пациентов, имеющих кроме избытка массы тела комбинацию вышеперечисленных симптомов.

2) Автоматизированное исследование уровня свободного кортизола в слюне, собранной в 23:00 методом ЭХЛА ($AUC=0,953$) по диагностическим возможностям сопоставимо с исследованием свободного кортизола в слюне методом ИФА ($AUC=0,964$) или проведением МПД ($AUC = 0,982$). Пациенты с алиментарно-конституциональным ожирением имеют более высокую точку разделения (9,4 нмоль/л) для уровня свободного кортизола в вечерней слюне по сравнению с лицами с нормальным ИМТ.

3) Для верификации эндогенного гиперкортицизма целесообразна комбинация однократного исследования свободного кортизола в слюне, собранной в 23:00, и малой пробы с дексаметазоном.

4) Определение остеокальцина ($AUC=0,859$) менее информативно ($p<0,05$) по сравнению с исследованием свободного кортизола в слюне в 23.00 ($AUC=0,961$) и малой пробой с дексаметазоном ($AUC = 0,977$) для выявления ЭГ среди пациентов с ожирением.

5) У женщин в постменопаузе с впервые установленным остеопорозом остеокальцин является информативным тестом (точка разделения 8,3 нг/мл; чувствительность 95,4%; специфичность 98,5%) для выявления ЭГ, по данным ретроспективного анализа.

6) Среди первых рутинных тестов лабораторной диагностики АКТГ- зависимого гиперкортицизма высокий уровень АКТГ в вечернее время (более 108,9 пг/мл) можно считать диагностически наиболее ценным показателем (чувствительность 70,6%; специфичность 81,7%) для решения вопроса о необходимости дальнейшего поиска АКТГ-эктопии.

7) Двухсторонний одномоментный селективный забор крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином 8мкг внутривенно позволяет добиться чувствительности - 90,4% и специфичности - 93,7% для диагностики БИК среди пациентов с

АКТГ-зависимым гиперкортицизмом и достаточно безопасен при проведении в высокоспециализированном учреждении.

8) Контроль положения катетера по градиенту пролактина (точка деления 1,5) и расчет АКТГ/пролактин нормализованного соотношения (точка деления 1,18) при проведении двухстороннего селективного забора крови на фоне стимуляции десмопрессином у пациентов с АКТГ-зависимым гиперкортицизмом в совокупности повышают диагностические возможности селективного забора крови из НКС на фоне стимуляции десмопрессином.

9) ЭГ поддерживает повышенный уровень склеростина с преимущественным распределением показателей белка по верхней границе нормы, что сочетается с выраженным подавлением остеокальцина, сниженным РАНКЛ. Сывороточные уровни других антагонистов Wnt-сигнала (диккоф 1, секреторный связывающий белок фризельда 1), а также ОПГ не отличаются от контроля. Склеростин представляется наиболее перспективным белком для терапевтического вмешательства при ГКО.

10) Пациенты с эндогенным гиперкортицизмом имеют высокий риск низкотравматичных переломов (43%), наиболее значимым предиктором которых является выраженность гиперкортицизма, определяемая по содержанию свободного кортизола в суточной моче и уровню вечернего кортизола в сыворотке крови. У пациентов с низкотравматичным переломом вследствие ГКО наблюдается снижение качества жизни и функциональных возможностей по сравнению с пациентами с ЭГ с другими осложнениями.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с ожирением или быстрым набором массы тела может быть рекомендовано обследование для исключения ЭГ при условии сопутствующих жалоб на общую и мышечную слабость, плохо-контролируемые проявления метаболического синдрома и особенно при наличии низкотравматичных переломов позвонков. Специфические изменения внешности (яркие стрии, матронизм) наблюдаются примерно у 50% пациентов и их отсутствие не может служить основанием для исключения диагноза.

2. Различные точки деления для вечернего кортизола в слюне (ЭХЛА) должны использоваться для диагностики ЭГ у лиц с нормальным индексом массы тела (6,85 нмоль/л) и пациентов с ожирением (9,4 нмоль/л).

3. Для диагностики ЭГ у больных с ожирением или избыточной массой тела оптимальна комбинация определения свободного кортизола в вечерней слюне (23:00) (ЭХЛА) в сочетании с МПД, дающие при конкордатном результате не более 2% вероятности ошибки

4. Исследование остеокальцина методом ЭХЛА на автоматизированном анализаторе может быть рекомендовано для диагностики эндогенного гиперкортицизма у пациентов с ожирением или избыточной массой тела в качестве дополнительного теста в сомнительных случаях

5. Сниженный уровень остеокальцина (8,3 нг/мл и ниже) у женщин в постменопаузе с остеопорозом, не получающих лечения ГК или препаратами, изменяющими костный обмен, является основанием для дальнейшего обследования с целью исключения эндогенного гиперкортицизма

6. Для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма при отсутствии визуализируемой аденомы или других сомнительных случаях рекомендовано проведение селективного забора крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином внутривенно в дозе 8мкг

7. Отсутствие градиента АКТГ при проведении селективного забора крови из НКС делает обязательным исследование градиента пролактина. В случае отсутствия градиента АКТГ и пролактина может быть рекомендовано повторное проведение забора крови из НКС, в то время как при отсутствии градиента АКТГ в сочетании с градиентом пролактина $>1,5$ оправдан поиск АКТГ-эктопии

8. Интерпретация результатов АКТГ/пролактин нормализованного соотношения, рассчитанного в ходе селективного забора крови из НКС на фоне стимуляции десмопрессином должна проводиться с осторожностью при высоких цифрах градиента пролактина или парадоксальном снижении градиента АКТГ после стимуляции десмопрессином по сравнению с исходным градиентом АКТГ, так как высока вероятность ложно-отрицательного результата.

9. Пациенты с ЭГ с высоким уровнем кортизола в вечернее время в крови (выше 674 нмоль/л) и/или в суточной моче (выше 1960 нмоль/24 часа) нуждаются в рентгенологическом исследовании позвоночника в боковой проекции для исключения низкотравматичных переломов тел позвонков, а также необходимо рассмотреть возможности профилактической терапии ГКО.

10. Пациенты с низкотравматичными переломами в результате ЭГ нуждаются в дополнительной социальной поддержке, так как у этих больных наблюдается значительное снижение качества жизни, главным образом, по доменам боли, дискомфорта, функциональных возможностей и привычной повседневной деятельности по сравнению с больными с ЭГ без переломов

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК

1. Значение метода селективного забора крови из нижних каменистых синусов в дифференциальной диагностике АКТГ-зависимого гиперкортицизма./ Дедов И.И., Белая Ж.Е., Ситкин И.И., Марова Е.И., Пржиялковская Е.Г., Ремизов О.В., Рожинская Л.Я.: // Ж. Проблемы Эндокринологии, 2009, Том. 55, стр. 35-40
2. Первый опыт использования селективного забора крови из нижних каменистых синусов в России (клиническое наблюдение)/Дедов И.И., Ситкин И.И., Белая Ж.Е., Марова Е.И., Пржиялковская Е.Г., Ремизов О.В., Рожинская Л.Я.// Ж. Проблемы эндокринологии, 2009, Том 55, стр.11-16
3. Клинический случай АКТГ-эктопированного синдрома /Белая Ж.Е. Рожинская Л.Я., Ситкин И.И., Карселадзе А.И., Аблицов Ю.А., Аблицов А.Ю., Лобода Ю.В., Ремизов О.В., Алексеева Т.Р., Горбунова В.А., Волова Н.Л.// Ж. Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, 2010, т. 21, №4, С. 46-51
4. Остеопороз – от редкого симптома эндокринных болезней до безмолвной эпидемии 20-21 века/ Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я.// Ж. Проблемы Эндокринологии, 2011, том 57, стр.35-45
5. Автоматизированный электрохемилюминисцентный метод определения кортизола в слюне для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением /Белая Ж.Е., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., Огнева Н.А., Бутрова С.А., Трошина Е.А, Колесникова Г.С., Дедов И.И.// Ж. Ожирение и метаболизм, 2011, том 27, № 2, стр. 56-63
6. Возможности маркера костного обмена – остеокальцина – для диагностики эндогенного гиперкортицизма и вторичного остеопороза. /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Ильин А.В., Драгунова Н.В., Колесникова Г.С., Бутрова С.А., Трошина Е.А // Ж. Остеопороз и Остеопатии, 2011, № 2, стр. 7-10
7. Определение уровня кортизола в слюне на автоматическом иммунохимическом анализаторе Cobas E601 (“Roche”) для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением. /Белая Ж.Е., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., Огнева Н.А., Бутрова С.А., Трошина Е.А., Колесникова Г.С., Дедов И.И.// Ж. Клиническая лабораторная диагностика, 2011, 12, стр. 7-12
8. Новые направления в терапии остеопороза – применение моноклональных человеческих антител к RANKL /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я. / Ж. Остеопороз и Остеопатии, 2011, № 2, стр. 19-22
9. Гиперкортицизм и метаболический синдром: сложности дифференциальной диагностики и лечения. /Дзеранова Л.К., Панкратова Ю.В., Белая Ж.Е., Пигарова Е.А., Манченко О.В., Рожинская Л.Я., Григорьев А.Ю., Колесникова Г.С.//Ж. Ожирение и Метаболизм, 2012, № 2, Том 31, стр. 57-61
10. Современный взгляд на скрининг и диагностику эндогенного гиперкортицизма. /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Дедов И.И.// Ж. Проблемы эндокринологии, 2012, том 58, стр. 35-41
11. Сывороточные концентрации белков регуляторов остеобластогенеза и остеокластогенеза у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом. /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Солодовников А.Г., Ильин А.В., Дзеранова Л.К., Мельниченко Г.А., Дедов И.И // Ж. Остеопороз и Остеопатии, 2012, №2, стр. 3-8
12. Состояние костно-мышечной системы при эндогенном гиперкортицизме. /Драгунова НВ, Белая ЖЕ, Рожинская ЛЯ. // Ж. Остеопороз и Остеопатии, 2012 №3, стр. 18-24
13. Метаболические осложнения эндогенного гиперкортицизма. Выбор пациентов для скрининга. /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., Марова Е.И., Арапова С.Д., Молитвословова Н.Н., Зенкова Т.С., Мельниченко Г.А., Дедов И.И.// Ж. Ожирение и Метаболизм, 2013, № 1, Том 32, стр 29-34

14. Низкотравматичные переломы у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом. Предикторы и факторы риска, влияние на качество жизни./ Белая Ж.Е., Драгунова Н.В., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Дзеранова Л.К., Дедов И.И. // Ж. Остеопороз и остеопатии, 2013, №1, стр.7-13

15. Двухсторонний селективный забор крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином в дифференциальной диагностике АКТГ-зависимого гиперкортицизма. /Ситкин И.И., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Дзеранова Л.К., Марова Е.И., Арапова С.Д., Молитвослова Н.Н., Пигарова Е.А., Григорьев А.Ю., Колесникова Г.С., Воронцов А.В., Дедов И.И. // Ж. Диагностическая и интервенционная радиология, 2013, №3, стр. 57

16. Роль градиента пролактина и АКТГ/пролактин нормализованного отношения для повышения чувствительности и специфичности селективного забора крови из нижних каменистых синусов для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Ситкин И.И., Дзеранова Л.К., Марова Е.И., Вакс В.В., Воронцов А.В., Ильин А.В., Колесникова Г.С., Дедов И.И. // Ж. Проблемы Эндокринологии, 2013, Том 59, №4, стр. 3-10

17. Serum extracellular secreted antagonists of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in patients with Cushing's syndrome. /Belaya ZE, Rozhinskaya LY, Melnichenko GA, Solodovnikov AG, Dragunova NV, Iljin AV, Dzeranova LK, Dedov II. //J. Osteoporosis International, 2013, Vol. 24, pp. 2191-2199 (DOI: 10.1007/s00198-013-2268-y)

18. Diagnostic performance of late-night salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay in obese and overweight patients referred to exclude Cushing's syndrome /Belaya ZE, Iljin AV, Melnichenko GA, Rozhinskaya LY, Dragunova NV, Dzeranova LK, Butrova SA, Troshina EA, Dedov II.// J. Endocrine 2012, Vol. 41, pp. 494-500 (DOI 10.1007/s12020-012-9658-3)

19. Practical evaluation of late-night salivary cortisol: a real-life approach. /Belaya ZE, Melnichenko GA.//J. Endocrine, 2012, Vol. 42, pp. 222-223 (DOI : 10.1007/s12020-012-9709-9)

Главы в книгах и руководствах.

20. Болезнь Иценко-Кушинга под редакцией И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. /Арапова СД, Белая Ж.Е., Бухман АИ, Воронцов АВ, Гончаров НП, Каменская ЕА, Кация ГВ, Колесникова ГС, Лапшина АМ, Марова ЕИ, Мановицкая АВ, Манченко ОВ, Ремизов ОВ, Роживанов РВ, Рожинская ЛЯ, Шипотыко МГ, Юшков ПВ.: Издательство «УП Принт», 2011, 343 стр.

21. Клиническая нейроэндокринология под редакцией Дедова И.И. /Арапова СД, Астафьева ЛИ, Бабарина МБ, Белая Ж.Е., Вакс В.В., Воронцов АВ, Гончаров НП, Григорьев АЮ, Дзеранова ЛК, Иловойская ИА, Кация ГВ, Колесникова ГС, Манченко ОВ, Молитвослова НН, Ростомян ЛГ, Рожинская ЛЯ, Пигарова ЕА, Тюльпаков АН, Шипотыко МГ// Москва 2011, УП-Принт., 344 стр.

22. Болезнь Иценко-Кушинга: клиника, диагностика, лечение под редакцией Дедова И.И., Мельниченко Г.А. /Марова Е.И., Арапова С.Д., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Колесникова Г.С., Воронцов А.В.// Практическое руководство для врачей, одобренное МЗ РФ, Москва 2012 (64 стр.)

23. Osteoporosis: Risk Factors, Symptoms and Management. edited by Pena AR, Perez VO /Tiossi R, Costa PP, Watanabe PCA, Unnanuntana A, Kleimeyer JP, Imai K, Bazarra-Fernandez A, Musumeci S, Musumeci M, Belaya ZE, Dragunova NV, Rozhinskaya LY, Melnichenko GA, Mendoza N, Martínez-Amat A, Hita F.//, Imprint Nova Biomedical, New-York, the USA, 2012, 177pages. ISBN: 978-1-62081-210-5

24. Glucocorticoid-induced osteoporosis: fractures and bone remodeling in patients with endogenous Cushing's syndrome. /Belaya ZE, Rozhinskaya LY, Solodovnikov AG, Dragunova NV, Melnichenko GA.// Series: Endocrinology Research and Clinical Developments. Online Book, Published by Nova Science Publishers, Inc New-York, 2013, 55 pp; ISBN: 978-1-62948-341-2

Тезисы, опубликованные в сборниках конференций

25. Возможности забора крови из нижних каменистых синусов в дифференциальной диагностике АКТГ-зависимого гиперкортицизма /Рожинская Л.Я., Белая Ж.Е., Ситкин И.И., Колесникова Г.С., Дзеранова Л.К., Арапова С.Д., Марова Е.И., Воронкова И.А., Абросимов А.Ю.// Сборник тезисов Всероссийский конгресс «Современные технологии в эндокринологии» 2009, стр. 126
26. Состояние костной ткани у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом /Белая Ж.Е., Сосунова Н.В., Рожинская Л.Я.// Ж. Остеопороз и остеопатии, 2010, IV Всероссийский Конгресс по Остеопорозу
27. Возможности остеокальцина – маркера костеобразования в диагностике эндогенного гиперкортицизма /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Ильин А.В., Драгунова Н.В., Колесникова Г.С., Бутрова С.А., Трошина Е.А.// VI Всероссийский конгресс эндокринологов (сборник тезисов) стр. 394-395
28. Диагностические возможности исследования свободного кортизола в слюне электрохемилюминисцентным методом у пациентов с ожирением и нормальным индексом массы тела /Белая Ж.Е., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., Огнева Н.А., Бутрова С.А., Трошина Е.А., Колесникова Г.С., Дедов И.И. // VI Всероссийский конгресс эндокринологов (сборник тезисов) стр. 428
29. Селективный забор крови из нижних каменистых синусов на фоне стимуляции десмопрессином в дифференциальной диагностике АКТГ-зависимого гиперкортицизма. Возможности оценки градиента пролактина и АКТГ/пролактин нормализованного соотношения для повышения чувствительности метода /Рожинская Л.Я., Белая Ж.Е., Ситкин И.И., Дзеранова Л.К., Арапова С.Д., Марова Е.И., Григорьев А.Ю., Колесникова Г.С., Мельниченко Г.А., Дедов И.И./ VI Всероссийский конгресс эндокринологов (сборник тезисов) стр. 453
30. Сигнальный путь остеокластогенеза у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом /Драгунова Н.В., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Ильин А.В., Мельниченко Г.А.// VI Всероссийский конгресс эндокринологов (сборник тезисов) стр. 439
31. Эндогенный гиперкортицизм как модель глюкокортикоидного остеопороза /Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Солодовников А.Г., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., Мельниченко Г.А., Дедов И.И./ Приложение к научно-практическому журналу Остеопороз и Остеопатии, 2013, стр. 106-107 V конгресс Российской ассоциации по остеопорозу
32. Bilateral Inferior sinus sampling (BIPSS) with desmopressin stimulation in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome /Rozhinskaya L.Ya, Belaya Zh.E., Sitkin I.I., Kolesnikova G.S., Dzeranova L.K., Marova E.I., Voronkova I.A., Melnichenko G.A.// ENEA Workshop on Cushing's syndrome, 2009 (abstract book)
33. Fractures and bone remodeling in patients with endogenous hypercorticism /Belaya Z, Sosunova N, Rozhinskaya L., Melnichenko G, Iljin A, Arapova S, Marova E.// European Neuroendocrine Association, 2010 abstract book, p. 117
34. Bone metabolism marker as a diagnostic test for endogenous hypercorticism /Belaya ZE, Dragunova NV, Iljin AV, Rozhinskaya LY, Melnichenko G.A.// J. Osteoporosis International, 2012, Vol. 23; suppl. 2, S 173-S174
35. Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG) levels in patients with Cushing's Syndrome / Belaya ZE, Dragunova NV, Iljin AV, Rozhinskaya L.Y, Melnichenko G.A./ MON-451, USA, 2012, p.172
36. Usefulness of Prolactin IPS/P ratio and dominant ACTH/Prolactin ratio in bilateral inferior petrosal sinus sampling with desmopressin stimulation in patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome /Belaya Z, Sitkin I, Rozhinskaya L, Dzeranova L, Marova E, Arapova S, Molitvoslova N, Kolesnikova G, Melnichenko G.// Austrian J. Clinical Endocrinology and Metabolism, 2012, Vol. 5, Special Issue 3, p. 21
37. Serum Sclerostin Level in Patients with Endogenous Cushing's Syndrome /Belaya Z, Rozhinskaya L, Dragunova N, Iljin A, Melnichenko G.// J. Bone and Mineral Research, 2012, 27 suppl 1. S339
38. Serum sclerostin level in patients with endogenous Cushing's syndrome /Belaya Z, Rozhinskaya L, Dragunova N, Iljin A, Dzeranova L, Melnichenko G, Dedov I.// Osteoporosis International, 2013, Vol. 24, suppl 1., S113-S114 Invited presentation from the ASMBR
39. Diagnostic performance of first line biochemical tests to differentiate ACTH-ectopic syndrome among ACTH dependent Cushing's syndrome./Belaya Z, Rozhinskaya L, Dragunova N, Dzeranova L, Arapova S, Marova E, Kolesnikova G, Melnichenko G.// Endocrine Abstracts (2013) Vol 32, DOI: 10.1530/endoabs.32. P32
40. Fracture predictors in patients with endogenous cortisol excess / Belaya Z, Dragunova N, Rozhinskaya L, Dzeranova L, Melnichenko G.//Bone Abstracts, 2013 1 PP490 | DOI:10.1530/boneabs.1

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренокортикотропин
БИК – болезнь Иценко-Кушинга
БПД – большая проба с дексаметазоном
ГК – глюкокортикоиды
ГКО – глюкокортикоидный остеопороз
ДИ – доверительный интервал
Дкк1 - диккопф 1
ИМТ – индекс массы тела
ИРФ1 – инсулиноподобный фактор роста 1
ИФА – иммуноферментный анализ
ИХЛА - иммунохемилюминесцентный анализ
Me – медиана
МПД - малая проба с дексаметазоном
МПК – минеральная плотность кости
МРТ – магнитнорезонансная томография
МСКТ - мультиспиральная компьютерная томография
НКС – нижние каменистые синусы
ОПГ – остеопротегерин
ОР – относительный риск
ОШ – отношение шансов
ПМО – постменопаузальный остеопороз
ПТГ – паратгормон
РАНК - рецептор активатор ядерного фактора каппа-бета
РАНКЛ – лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа-бета
СО – стандартное отклонение
СТх - С-концевой телопептид коллагена первого типа
сФРЗ1 - секреторный связывающий белок фризельда 1
ЭГ - эндогенный гиперкортицизм
ЭХЛА - электрохемилюминесцентный анализ
AUC – площадь под кривой операционной характеристики
DXA – рентгеновская двухэнергетическая остеоденситометрия
Q25-Q75 – 25-й и 75-й квартили
ROC-анализ - анализ кривых операционных характеристик
Wnt сигнал – канонический Wingless/ β -катенин сигнальный путь