

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

на правах рукописи

ГУБАЕВА ДИЛЯРА НАИЛЕВНА

«Фокальная форма врожденного гиперинсулинизма: клиническая,  
молекулярно-генетическая, радиоизотопная (ПЭТ с 18F-ДОФА) и  
гистологическая диагностика»

14.01.02 - Эндокринология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН  
В.А. Петеркова

Научный консультант:  
доктор медицинских наук, профессор РАН  
Д.В. Рыжкова

Москва – 2020

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1. Врожденный гиперинсулинизм: общие сведения .....	10
1.2. Фокальная форма врожденного гиперинсулизма .....	18
1.3. Методы топической предоперационной диагностики .....	20
1.4. Патоморфологические характеристики .....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	37
2.1. Дизайн исследования .....	37
2.3. Методы исследования .....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	53
3.1. Клинико-лабораторные данные пациентов с фокальной формой врожденного гиперинсулинизма .....	53
3.2. Результаты молекулярно-генетического исследования .....	61
3.3. Результаты ПЭТ с <sup>18</sup> F-ДОФА .....	66
3.4. Лечение и отдаленные наблюдения .....	81
3.5. Иммуногистохимическое исследование .....	87
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	110
ВЫВОДЫ.....	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	118

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность проблемы**

Врожденный гиперинсулинизм (ВГИ) является генетическим заболеванием с высоким риском развития тяжелых неврологических осложнений. Существуют две основные гистологические формы заболевания: диффузная и фокальная. Выбор тактики лечения зависит во многом от гистологической формы ВГИ. В случае отсутствия положительного эффекта от медикаментозной терапии пациентам с диффузной формой (ДФ) ВГИ проводится субтотальная панкреатэктомия. При фокальной форме (ФФ) заболевания возможно удаление участка гиперпродукции инсулина с дальнейшим полным выздоровлением пациента и исключением возможности развития сахарного диабета.

Учитывая различия в хирургической тактике лечения, чрезвычайно важным представляется своевременная предоперационная дифференциальная диагностика гистологических форм ВГИ. Клинико-лабораторная картина фармакорезистентного течения заболевания не различается у пациентов с диффузной и фокальной формами ВГИ. Для дифференциальной диагностики гистологических форм ВГИ используются молекулярно-генетический анализ, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с <sup>18</sup>F-L-диоксифенилаланином (ДОФА) и гистологическое исследование.

Определение критериев дифференциальной диагностики различных гистологических форм врожденного гиперинсулинизма имеет большое значение для практической медицины, так как форма заболевания напрямую влияет на тактику ведения и прогноз.

### **Степень разработанности темы исследования**

Несмотря на низкую распространенность заболевания (1 к 30000-50000), в мире проводится активное изучение механизмов развития ВГИ и разработка новых методик дифференциальной диагностики гистологических

форм заболевания. К настоящему времени выявлено 14 генов, мутации в которых приводят к развитию ВГИ. Молекулярно-генетический анализ крови в некоторых случаях позволяет предположить наличие той или иной формы заболевания. Тем не менее, предоперационная диагностика фокальной и диффузной форм заболевания остается актуальным вопросом практической медицины. Применение стандартных визуализирующих методов - ультразвуковое исследование (УЗИ), магнитно-резонансная томография (МРТ), компьютерная томография (КТ) - не дает возможности оценить наличие и определить расположение фокуса гиперпродукции инсулина. Более того, необходимость точной и своевременной диагностики продиктована тяжестью течения заболевания, его ранним дебютом (первые дни жизни) и высокой частотой развития неврологических осложнений.

С начала XXI века основным методом дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ было применение ПЭТ с 18F-ДОФА. Хотя у данного метода имеются неоспоримые преимущества, расчетные данные по ПЭТ с 18F-ДОФА не всегда позволяют точно предсказать гистологическую форму заболевания. Следовательно, необходим поиск новых критериев для дифференциальной диагностики.

«Золотым стандартом» в диагностике гистологической формы ВГИ является проведение морфологического исследования. Изучение патоморфологии поджелудочной железы с проведением иммуногистохимического исследования (ИГХ) позволяет не только визуализировать клеточные структуры и подтвердить наличие фокуса гиперсекреции инсулина, но и дает возможность понять патофизиологию заболевания.

Несмотря на множество исследований, посвященных диагностике ВГИ, остается открытым широкий спектр вопросов, связанных с диагностикой фокальной формы заболевания. Фокальная форма ВГИ встречается реже, чем диффузная, и чаще обуславливает тяжелое клиническое течение. Именно

поэтому в настоящий момент крайне актуальным является сбор и анализ информации о пациентах с фокальной формой ВГИ в российской популяции.

### **Цель исследования**

Изучение особенностей клинических проявлений, молекулярно-генетической основы, радиоизотопных и гистологических характеристик фокальной формы врожденного гиперинсулинизма.

### **Задачи**

1. Провести анализ клинических проявлений и генно-фенотипических корреляций у пациентов с фокальной формой ВГИ.
2. Изучить радиоизотопную семиотику различных форм ВГИ.
3. Оценить информативность ПЭТ с 18F-ДОФА в качестве метода дифференциальной диагностики фокальной и диффузной форм ВГИ.
4. Исследовать патоморфологические особенности фокальной формы ВГИ.
5. Разработать алгоритм дифференциальной диагностики гистологических форм ВГИ на основании результатов комплексного обследования.

### **Научная новизна**

В настоящей работе впервые в России было проведено сравнение клинических проявлений фокальной и диффузной форм ВГИ на основании относительно большой выборки пациентов. Также, по результатам молекулярно-генетического исследования, были выделены ранее не описанные мутации в генах, приводящих к развитию фокальной формы ВГИ.

Несмотря на длительный период использования ПЭТ с 18F-ДОФА для дифференциальной диагностики гистологических форм ВГИ в мировой практике, в РФ данный метод впервые был применен у пациентов с ВГИ в 2017 году. Обработка информации, полученной с помощью ПЭТ с 18F-

ДОФА у пациентов с ВГИ, позволила оценить диагностическую значимость метода и разработать новые критерии оценки его результатов.

Также были исследованы патоморфологические особенности различных гистологических форм ВГИ, подобные данные в отечественной литературе ранее не были опубликованы. Впервые в мире у пациентов с ВГИ было проведено сравнительное иммуногистохимическое исследование ткани поджелудочной железы с антителами к рецепторам глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1).

### **Теоретическая и практическая значимость**

По результатам настоящей работы было отмечено отсутствие разницы в клинических проявлениях у пациентов с фокальной и диффузной формами ВГИ, что указывает на невозможность установления гистологической формы заболевания только на основании клинической картины.

Молекулярно-генетическое исследование позволило выявить новые мутации в генах, кодирующих АТФ-зависимые калиевые каналы.

На основании радиоизотопных данных ПЭТ с <sup>18</sup>F-ДОФА в настоящей работе была предложена новая отрезная точка для расчетных показателей, что на практике поможет усилить точность метода при диагностике ФФ ВГИ.

Применение ИГХ-исследования с антителами к инсулину, к рецепторам ГПП-1 и к белку p57 способствовали получению новой информации о патоморфологии ВГИ и подтверждению возможности использования одного из маркеров для дифференциальной диагностики.

По совокупности полученных данных в настоящей диссертации был предложен алгоритм предоперационной дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ. Полученные знания об особенностях фокальной формы ВГИ и методах дифференциальной диагностики позволят в дальнейшем повысить качество помощи данной группе пациентов.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. У пациентов с ФФ ВГИ отмечается тяжелое течение заболевания с ранней манифестацией.
2. Клиническое течение заболевания у пациентов с ФФ и фармакорезистентным течением ДФ ВГИ не имеет значимых отличий, что не позволяет подтвердить ту или иную форму заболевания, основываясь только на клинических данных.
3. Развитие ФФ ВГИ отмечается у пациентов с гетерозиготной мутацией в генах, кодирующих АТФ-зависимые калиевые каналы, унаследованной от отца.
4. ПЭТ с 18F-ДОФА позволяет предположить ту или иную гистологическую форму ВГИ с достаточной точностью на дооперационном этапе диагностики.
5. Предложенная в настоящей работе отрезная точка для панкреатического индекса при проведении ПЭТ с 18F-ДОФА позволяет с большей точностью проводить дифференциальную диагностику гистологических форм ВГИ по сравнению со стандартными критериями.
6. Наибольшую диагностическую точность при интерпретации результатов ПЭТ с 18F-ДОФА дает совокупная оценка расчетных параметров и визуальной картины исследования.
7. Морфологические характеристики островков Лангерганса вне фокуса у пациентов с ФФ ВГИ и у пациентов с ДФ заболевания имеют значимые различия.
8. ИГХ-исследования с антителами к p57 и к ГПП-1 позволяют определить наличие фокуса гиперсекреции инсулина.

### **Степень достоверности**

Достоверность изложенных в настоящем исследовании положений, выводов и рекомендаций подтверждаются тщательным анализом научно-исследовательских работ по ВГИ; проведением стандартного обследования

пациентам, исходя из общепринятых методик; применением подходящих методов статистического анализа для оценки результатов и формирования выводов.

### **Апробация результатов**

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 16 апреля 2020 года на расширенной межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава Российской Федерации. Промежуточные результаты работы доложены на VIII (XXVI) Национальном конгрессе эндокринологов «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение» (Москва, май 2019), на 57й Ежегодной конференции европейского сообщества детских эндокринологов (ESPE) (Афины, Греция, сентябрь 2018) и на 58й Ежегодной конференции европейского сообщества детских эндокринологов (ESPE) (Вена, Австрия, сентябрь 2019).

### **Благодарности**

Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю, главному научному консультанту института детской эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии», академику РАН Петерковой Валентине Александровне за предоставленную интересную тему для исследований, доброе наставничество и помощь в работе. Также хочу поблагодарить ведущего научного сотрудника детского отделения опухолей эндокринной системы Меликян Марию Арменаковну и научного консультанта, главного научного сотрудника НИО ядерной медицины и тераностики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, профессора РАН Рыжкову Дарью Викторовну за безграничную помощь и искреннюю поддержку. Отдельно выражаю признательность старшим научным сотрудникам лаборатории развития нервной системы НИИ «Морфологии человека» РАН Прошиной Александре Евгеньевне и Кривовой Юлии Сергеевне, а также ведущему научному сотруднику патологоанатомического отделения МОНИКИ, профессору Гуревич Ларисе Евсеевне за возможность проведения ИГХ-исследования, интерес к работе и ценные советы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### **1.1. Врожденный гиперинсулинизм: общие сведения**

ВГИ является наиболее частой причиной гипогликемии в детском возрасте [1,2]. Данное заболевание относится к генетически-детерминированным и развивается вследствие неадекватной гиперсекреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы [3]. Частота заболеваемости ВГИ в России составляет примерно 1 на 50000 живых новорожденных.

В норме гликемия поддерживается на оптимальном уровне благодаря балансу между поступлением глюкозы в кровь и ее поглощением тканями. Повышение глюкозы обеспечивается тремя процессами: абсорбция с пищей, гликогенолиз и глюконеогенез. Гликогенолиз и глюконеогенез запускаются через 2-5 часов после приема пищи, что позволяет поддерживать требуемый уровень гликемии. При нарушении процессов гликогенолиза и глюконеогенеза снижение гликемии обычно возникает через 5-12 часов после приема пищи [4]. В случае ВГИ развитие гипогликемии обычно не зависит от приема пищи и может наблюдаться ранее, чем через 2 часа после еды.

В большинстве случаев ВГИ манифестирует в первый год жизни. Клиническая картина ВГИ обусловлена реакцией организма на персистирующую гипогликемию и может быть разделена на вегетативные и нейрогликопенические проявления. К вегетативным симптомам относятся повышенное потоотделение, бледность кожных покровов, тремор конечностей, повышенная возбудимость, тахикардия. Нейрогликопенические проявления включают мышечную гипотонию, вялость, головную боль, сонливость, потерю сознания, судороги. Более того, физиологическое действие инсулина связано с подавлением кетогенеза, что блокирует пути создания альтернативных источников энергии для нервной системы. Также в связи с повышенной секрецией инсулина у таких пациентов чаще отмечается макросомия при рождении [5]. Стоит отметить высокий риск

неврологических осложнений у пациентов с данным заболеванием. Выраженное снижение уровня глюкозы негативно отражается на развивающейся нервной системе детей и может приводить к задержке психомоторного развития, церебральному параличу, эпилепсии и слепоте за счет поражения головного мозга в области затылочной доли [6,7].

### **Лабораторная диагностика**

Основополагающими критериями диагностики ВГИ являются развитие гипокетотической гипогликемии и отсутствие подавления выработки инсулина. Для подтверждения диагноза ВГИ проводится проба с голоданием. Международным стандартом диагностики заболевания является определение гипогликемии (менее 3,0 ммоль/л) с неадекватно высоким уровнем инсулина (более 2,0 мкМЕ/мл) и относительно низким уровнем 3-гидроксибутирата (менее 1,3 ммоль/л) [8,9]. Также ВГИ может быть подтвержден большой потребностью во внутривенной дотации глюкозы (более 8,0 мг/кг/мин) и положительной реакцией на введение глюкагона в момент гипогликемии (подъем гликемии на 1,5 ммоль/л или выше) [8,10].

Дифференциальную диагностику заболевания следует проводить с гипокортицизмом, дефицитом соматотропного гормона, болезнями нарушения обмена веществ, ятрогенными гипогликемиями, а также инсулин-продуцирующими образованиями поджелудочной железы у детей старше 5 лет [11].

### **Эволюция представлений о врожденном гиперинсулинизме**

Представления о ВГИ претерпевали изменения с течением времени. Первое описание клинической картины врожденного гиперинсулинизма представил Irvine McQuarrie в своем президентском послании на съезде Американского Общества Педиатров в 1953 году [12]. Профессор McQuarrie продемонстрировал серию случаев идиопатической спонтанной гипогликемии у детей. Он был одним из первых, кто указал на

существование эндогенной гипогликемии, противопоставляя ее гипогликемии, вызванной передозировкой инсулина. Ученый акцентировал внимание на необходимость своевременной диагностики идиопатической спонтанной гипогликемии ввиду развития необратимого поражения головного мозга у детей с хроническими гипогликемиями.

В течение последующих 12 лет в Университетской больнице Миннесоты было обследовано 25 детей со спонтанной идиопатической гипогликемией. Более того, схожая клиническая картина заболевания наблюдалась у 11 родственников обследованных детей. Данные наблюдения позволили выдвинуть предположение о наследственном характере заболевания. Доктор McQuarrie полагал, что развитие гипогликемии не связано с повышенным уровнем инсулина, так как у данной группы пациентов не было обнаружено опухолей поджелудочной железы, а по результатам гистологии не определялась гиперплазия островков Лангерганса. Однако впоследствии оказалось, что эти предположения были ошибочны [13]. В свою очередь, другие выводы, сделанные профессором McQuarrie, остаются актуальными и по настоящее время. Так, к примеру, он отмечал, что у детей с ВГИ ввиду несвоевременной диагностики и поздно начатого лечения возникает поражение головного мозга. Его замечание было подтверждено дальнейшими исследованиями на больших группах пациентов [6].

В 1970-80-х годах термин «идиопатическая спонтанная гипогликемия у детей» был заменен на «незидиобластоз». Данный термин обозначает особенность эмбрионального развития с пролиферацией бета-клеток из эпителия протоков поджелудочной железы. Последующие исследования Rahier и соавт. указали на ошибочность отождествления незидиобластоза с врожденным гиперинсулинизмом, так как незидиобластоз является нормальной гистологической находкой у пациентов неонатального возраста [14].

Развитие медицины неразрывно связано с эволюцией диагностических методик. Так и в случае с врожденным гиперинсулинизмом открытие ДНК, развитие методик молекулярно-генетического анализа и внедрение других современных методов диагностики позволили лучше понять патофизиологию заболевания. В 1995 году эволюция в анализе ДНК привела к открытию одной из генетических причин развития врожденного гиперинсулинизма: были обнаружены инактивирующие мутации в генах, кодирующих формирование аденозинтрифосфат (АТФ)-зависимых калиевых каналов на мембране бета-клеток поджелудочной железы [15,16]. Последующие исследования в данной области привели к открытию еще 12 генов, ответственных за развитие ВГИ [3].

### **Молекулярно-генетический метод диагностики**

После постановки диагноза ВГИ на основании типичной клинико-лабораторной картины возможно проведение молекулярно-генетического анализа крови. Данное исследование позволяет определить патогенные мутации, приводящие к нарушению баланса инсулина и глюкозы. Данный анализ позволяет выявить первопричину ВГИ, выдвинуть предположение о наиболее вероятной гистологической форме заболевания и предсказать эффективность терапии. К настоящему времени описано 14 генов (*ABCC8*, *KCNJ11*, *GLUD1*, *GCK*, *HADH*, *HNF4A*, *HNF1A*, *SLC16A1*, *UCP2*, *HK1*, *PGM1*, *PMM2*, *SACNAID*, *FOXA2*), мутации в которых могут приводить к развитию ВГИ [17–23].

Молекулярно-генетическую причину заболевания удастся обнаружить у 50% пациентов с ВГИ [24,25]. Около 60% пациентов с генетически-подтвержденным диагнозом ВГИ имеют мутации в генах *ABCC8* и *KCNJ11*, которые кодируют АТФ-зависимые калиевые каналы [18,19,24]. Примерно в половине случаев у пациентов с мутациями в генах *ABCC8/KCNJ11* не удастся достичь эугликемии с помощью медикаментозной терапии и необходимо принимать решение о хирургическом лечении. Более того, у 88-

97% пациентов с фармакорезистентным течением заболевания выявляются мутации именно в этих генах [18,19]. Имеющиеся данные указывают на критическую роль АТФ-зависимых калиевых каналов в секреции инсулина.

Реже встречаются пациенты с мутациями в генах *GLUD1* (кодирует глутаматдегидрогеназу) и *GCK* (кодирует глюкокиназу). При наличии мутаций в *GLUD1* медикаментозная терапия диазоксидом дает хороший положительный эффект и сочетается с рекомендациями по диете [26]. Клиническая картина заболевания в группе пациентов с мутациями в гене глюкокиназы широко варьирует от бессимптомного течения до тяжелого фармакорезистентного течения с персистирующей гипогликемией [27,28]. Другие генетические причины ВГИ описаны в литературе в единичных случаях. Стоит отметить, что пациенты с невыявленными генетическими мутациями, в целом, имеют более легкое течение заболевания и сохраняют эугликемию на фоне применения медикаментозной терапии [8].

Патологические генетические события (появление мутаций, потеря участка на материнской аллели и др.) детерминируют гистологическую форму заболевания. В настоящее время описаны две основные гистологические формы: диффузная (с поражением всей поджелудочной железы) и фокальная (с ограниченным участком гиперсекреции инсулина). Диффузные формы ВГИ обусловлены гомозиготными, компаундными и доминантными мутациями в вышеописанных генах. Возникновение фокуса гиперсекреции инсулина связано с патогенными мутациями на отцовской аллели в генах, кодирующих АТФ-зависимые калиевые каналы, и потерей соответствующего участка на материнской аллели.

### **Механизм развития гиперсекреции инсулина при дефектах АТФ-зависимых калиевых каналов**

Ключевую роль в регуляции секреции инсулина играют АТФ-зависимые калиевые каналы. Канал представляет собой октомер из четырех субъединиц Kir6.2, которые формируют пору, и четырех субъединиц

рецептора сульфонилмочевины SUR1. При увеличении концентрации АТФ в клетке калиевые каналы закрываются и приводят к деполяризации мембраны. В связи с изменением заряда клетки открываются потенциал-зависимые кальциевые каналы, содержание кальция в клетке повышается и происходит стимуляция экзоцитоза инсулина.

Большинство патогенных мутаций в генах *ABCC8/KCNJ11* обуславливают дефекты биосинтеза субъединиц каналов или нарушение их доставки до мембраны клетки. Снижение активности АТФ-зависимых калиевых каналов или их полное отсутствие, как правило, приводит к усиленной или постоянной деполяризации, что запускает процессы секреции инсулина даже при отсутствии гипергликемии и повышения АТФ внутри клетки [29].

### **Лечение пациентов с ВГИ**

До момента подбора оптимальной дозы терапии многие пациенты нуждаются в непрерывном внутривенном введении растворов глюкозы в стационарных условиях. Согласно международному протоколу, терапию пациентов с ВГИ принято начинать с диазоксидом [3]. В случае его неэффективности назначается терапия второй линии – аналоги соматостатина (октреотид). Частое дробное кормление или допаивание сладкими жидкостями также способствует поддержанию эугликемии, однако может приводить к увеличению массы тела пациентов и повышать риск развития кариеса.

При отсутствии положительного эффекта от консервативной терапии решается вопрос об оперативном вмешательстве.

### **Медикаментозная терапия ВГИ**

Диазоксид является препаратом первой линии для лечения пациентов с ВГИ. Его действие заключается в открытии АТФ-зависимых калиевых

каналов, что приводит к реполяризации мембран клеток и снижает интенсивность экзоцитоза инсулина, опосредованного кальциевыми каналами. Препарат наиболее эффективен у пациентов со структурно интактными АТФ-зависимыми калиевыми каналами. Дозы препарата для лечения ВГИ у детей варьируют от 5 до 15 мг/кг/сут, период полураспада препарата при пероральном применении у детей составляет 9-24 часов. Частыми побочными эффектами являются повышенное оволосение по типу лануго и задержка жидкости, что зачастую требует применения диуретиков [30].

У пациентов с сохраняющейся на фоне приема diazоксида гипогликемией назначается октреотид, который также снижает выработку инсулина. Основными недостатками при применении октреотида являются неудобные способы введения препарата (многократные подкожные инъекции до 4-8 раз в сутки или непрерывное введение через помповый дозатор), а также развитие тахифилаксии [31]. Период полураспада октреотида составляет примерно 2 часа, доза назначается из расчета 5-30 мкг/кг/сут. При применении данного препарата необходимо контролировать состояние желудочно-кишечного тракта, так как возможны повышение печеночных ферментов, диспепсия, замедление экскреции желчи. У пациентов неонатального возраста описаны случаи некротического энтероколита [31].

В качестве терапии скорой помощи применяется глюкагон, позволяющий кратковременно повысить уровень глюкозы в крови. Постоянное использование данного препарата ограничено его нестойкостью в растворенном виде.

### **Хирургическая тактика при ВГИ**

Проведение хирургического лечения возможно только после предоперационной диагностики гистологической формы заболевания. Для этого оцениваются результаты молекулярно-генетического анализа и ПЭТ с <sup>18</sup>F-ДОФА. Также во время операции принято проводить гистологическое

исследование тканей экспресс-методом для подтверждения гистологического диагноза и изучения края резецированного участка. Пациентам с ФФ ВГИ проводится резекция фокуса, в котором происходит гиперпродукция инсулина. Сложности при проведении оперативного вмешательства могут представлять фокусы, расположенные в области головки поджелудочной железы и эктопированные фокусы в стенке двенадцатиперстной кишки, что связано с близостью расположения общего желчного протока и главного панкреатического протока.

В случае ДФ ВГИ необходимо проведение субтотальной резекции с удалением до 95-98% ткани железы. К сожалению, попытки резецировать меньший процент ткани не приводили к элиминации гипогликемических состояний [32].

### **Неврологический статус**

Отмечено, что пациенты, у которых заболевание обусловлено патогенными мутациями в генах, кодирующих АТФ-зависимые калиевые каналы, имеют более тяжелое течение заболевания, и у них чаще отмечаются неврологические осложнения [26]. Так, задержка психомоторного развития зафиксирована у 30% пациентов с мутациями в генах *ABCC8/KCNJ11*. Также частота неврологических осложнений выше у пациентов с фармакорезистентным течением заболевания, требующем хирургического вмешательства, чем у пациентов с хорошим эффектом от медикаментозной терапии [6]. Спектр неврологических осложнений включает моторные нарушения, задержку речевого и психологического развития, проблемы с обучением, эпилепсию и атрофию зрительного нерва.

### **Исходы ВГИ**

Тяжесть течения ВГИ имеет тенденцию к уменьшению по мере взросления пациента. Также отмечено, что у части пациентов через 10 лет после начала медикаментозной терапии снижается потребность в частом

кормлении. Более того, подобный эффект отмечен и у пациентов, перенесших хирургическое лечение. У ряда пациентов с доминантными мутациями в генах *ABCC8/KCNJ11* к подростковому возрасту снижается доза диазоксида и даже полностью уходит потребность в инсулиностатической терапии. Переход ВГИ в сахарный диабет встречается крайне редко и описан только при определенных мутациях в генах *HNF4a* и *ABCC8* [33,34].

Отдельную группу составляют пациенты после субтотальной панкреатэктомии. В послеоперационном периоде у пациентов может сохраняться как персистирующая гипогликемия, так и развитие сахарного диабета. Как правило, сахарный диабет развивается в среднем через 7 лет после операции ввиду истощения резерва бета-клеток [35]. Еще одним осложнением субтотальной панкреатэктомии является экзокринная недостаточность поджелудочной железы [32,36].

В случае проведения резекции фокуса гиперсекреции инсулина у пациентов с фокальной формой ВГИ не развивается сахарный диабет и происходит полное выздоровление.

## **1.2 Фокальная форма врожденного гиперинсулизма**

### **Механизм развития фокальной формы ВГИ**

Развитие диффузной или фокальной формы ВГИ определяется количеством клеток с патогенными мутациями в искомым генах. При наличии патогенной мутации во всех бета-клетках поджелудочной железы возникает ДФ ВГИ. Механизм возникновения фокуса гиперсекреции инсулина более сложен.

Формирование ограниченной области с повышенной секрецией инсулина у пациентов с фокальной формой ВГИ возможно за счет совокупности двух событий (Рисунок 1). Первое событие представляет собой наследование мутации в генах *ABCC8/KCNJ11*, расположенных на отцовской аллели на коротком плече 11 хромосомы участка 15.1. Данная область содержит как гены *ABCC8* и *KCNJ11*, ответственные за развитие АТФ-

зависимых калиевых каналов, так и гены *IGF2*, *CDKN1C* и *H19*, влияющие на пролиферацию клеток [19]. Второе событие заключается в потере здорового участка 11p15 на материнской аллели и формированию гомозиготной мутации на отдельном участке хромосомы с удвоенной копией отцовского генетического материала.

В норме на материнской аллели 11p15.1 располагаются гены *H19* и *CDKN1C*, которые подавляют пролиферацию клеток. В то же время на отцовской аллели данные гены метилированы и являются неактивными, однако на ней экспрессируется ген *IGF2*, который стимулирует пролиферацию. В совокупности нарушение баланса в количестве супрессоров и активаторов деления клеток приводит к повышенной пролиферации клеток с патогенной мутацией в *ABCC8/KCNJ11*, что и формирует фокус гиперсекреции инсулина [15].

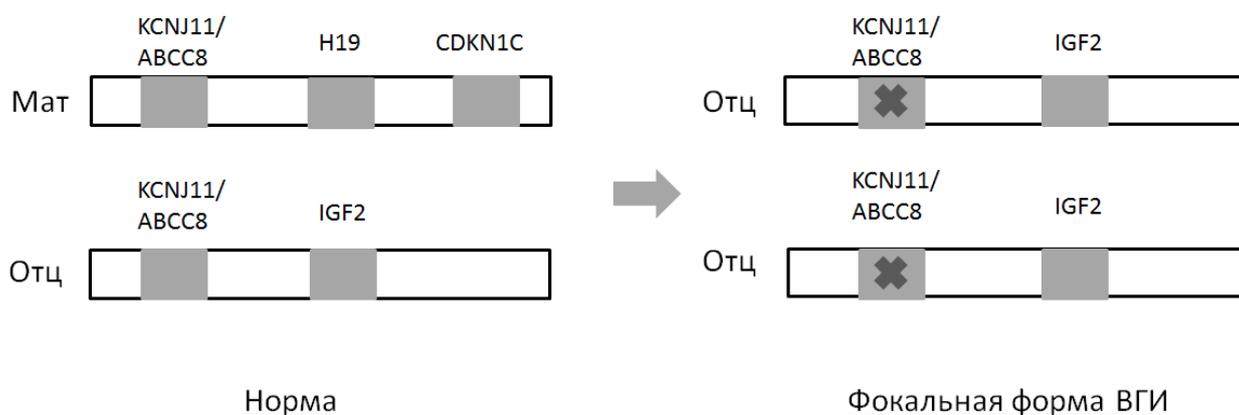


Рисунок 1 – Схематическое изображение генетических событий, приводящих к развитию ФФ ВГИ.

### Клинические особенности

Учитывая генетические механизмы развития ФФ ВГИ, данная гистологическая форма заболевания возникает спорадически и является несколько более редкой, чем диффузная форма [32,37]. У пациентов с ФФ ВГИ отмечается более тяжелое течение заболевания с манифестацией в первые дни жизни. Более того, у 96% пациентов отсутствует положительный

эффект от медикаментозной терапии, и они нуждаются в проведении оперативного вмешательства с целью удаления патологического очага гиперсекреции инсулина. Проведение операции с резекцией фокуса позволяет излечить пациента и сохранить функцию поджелудочной железы [32]. Принимая во внимание тяжесть течения ФФ ВГИ, можно предположить, что в данной группе пациентов чаще развиваются неврологические осложнения.

ДФ заболевания обычно имеет более благоприятную клиническую картину и в большинстве случаев поддается медикаментозной терапии (диазоксид/октреотид) [38]. Однако, в случае фармакорезистентного течения заболевания у пациентов с ДФ ВГИ требуется проведение субтотальной панкреатэктомии (резекция 95-98% ткани поджелудочной железы), что в дальнейшем в большинстве случаев приводит к развитию сахарного диабета [32].

В настоящее время в отечественной литературе отсутствуют данные, позволяющие сравнить клиническую картину и неврологические осложнения двух гистологических форм заболевания.

### **1.3 Методы топической предоперационной диагностики**

Учитывая радикальные различия в исходах операции, предоперационная диагностика гистологической формы ВГИ представляется крайне необходимой. Визуализировать очаг фокального аденоматоза с помощью УЗИ, МРТ, КТ и ПЭТ с 18F-фтордезоксиглюкозой не представляется возможным. До первой декады 2000-х годов для дифференциальной диагностики ДФ и ФФ в клинической практике использовались достаточно инвазивные методики. Они были основаны на определении концентрации инсулина сыворотки крови, оттекающей от разных участков поджелудочной железы: чрескожно-чреспеченочный забор крови из ветвей воротной вены (ЧЧЗКВ) [39] и забор крови из правой

печеночной вены после внутриартериальной стимуляции (АСЗК) кальцием [40]. Согласно статистическим подсчетам, чувствительность ЧЧЗКВ и АСЗК составляет 87 и 71%, соответственно [41]. Специфичность данных методов варьирует в различных литературных источниках. Точность локализации фокуса гиперинсулинемии при АСЗК (82% (95% ДИ: 72-90%)) несколько выше, чем при проведении ЧЧЗКВ (76% (95% ДИ: 65-85%)) у пациентов с ФФ ВГИ [41]. Однако, ввиду инвазивности и недостаточной точности этих исследований были проведены исследования по поиску нового способа визуализации для дифференциальной диагностики диффузной и фокальной форм ВГИ. Среди них наибольший интерес представляет технология совмещенной позитронной эмиссионной и компьютерной томографии (ПЭТ) с <sup>18</sup>F-L-флюоридигидроксифенилаланином (18F-ДОФА). Впервые о применении ПЭТ с 18F-ДОФА с целью дифференциальной диагностики диффузной и фокальной форм гиперинсулинизма сообщили Riberio и соавт. в 2005 году [42]. Помимо большей информативности, ПЭТ с 18F-ДОФА обладает неоспоримыми преимуществами: малой инвазивностью и относительной безопасностью по сравнению с ЧЧЗКВ и АСЗК.

### **Принципы работы и патофизиологическое обоснование применения ПЭТ с 18F-ДОФА**

ПЭТ представляет собой метод радиозотопной диагностики, который основан на определении концентрации радиоактивного изотопа в тканях организма. При столкновении с тканями радиоизотоп переходит из неустойчивого состояния в устойчивое за счет аннигиляции, что сопровождается выбросом энергии. Благодаря регистрированию сигнала несколькими детекторами одновременно, возможно топическое определение области аннигиляции. Применение различных короткоживущих радиоизотопов, структурно схожих с биологическими веществами, позволяет проследить их поглощение и выведение из организма для изучения метаболических процессов.

$^{18}\text{F}$ -L-дигидроксифенилаланин ( $^{18}\text{F}$ -ДОФА) является радиофармацевтическим препаратом и синтетическим аналогом фенилаланина, меченным позитрон-излучающим изотопом  $^{18}\text{F}$ . Возможность использования данного радиофармпрепарата основана на способности островковых клеток поджелудочной железы захватывать L-дигидроксифенилаланин с последующим его превращением в допамин с помощью L-аминокислотной декарбоксилазы [43,44]. Таким образом, метаболизм  $^{18}\text{F}$  - ДОФА во многом имитирует биологические превращения фенилаланина (Рисунок 2).

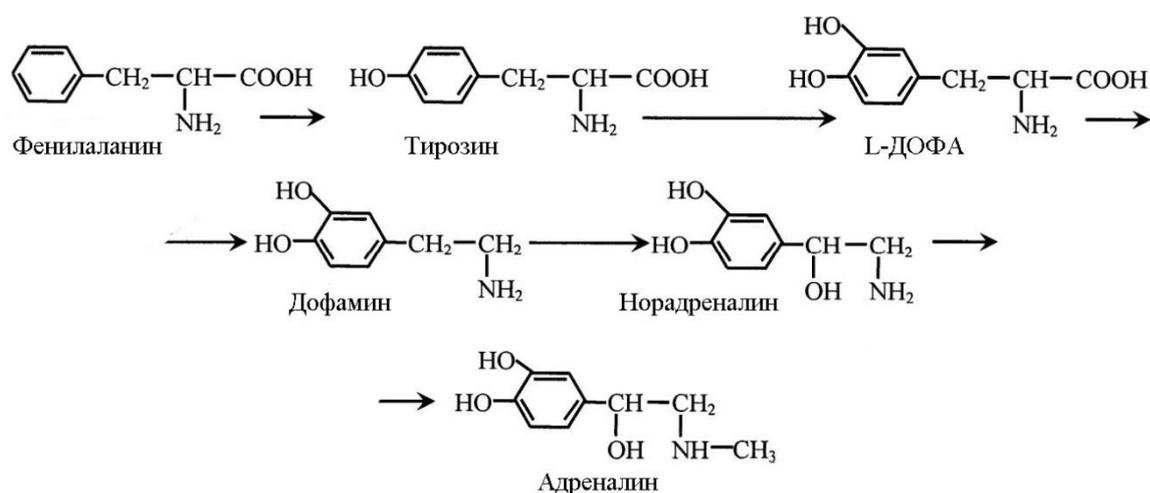


Рисунок 2 – Схема биологических превращений фенилаланина

Фенилаланин конвертируется в L-тирозин, затем L-тирозин превращается в L-ДОФА с помощью тирозингидроксилазы, после чего L-ДОФА посредством L-аминокислотной декарбоксилазы конвертируется в допамин [45].

Подобно естественному процессу,  $^{18}\text{F}$  -ДОФА транспортируется в опухолевую клетку, используя трансмембранный переносчик аминокислот L-типа. Далее радиофармпрепарат претерпевает метаболическое превращение в  $^{18}\text{F}$ -фтордопамин под действием L-аминокислотной декарбоксилазы и депонируется в секреторных гранулах [44,46]. В настоящее время известно,

что процессы синтеза и хранения допамина и L-ДОФА происходят в центральной нервной системе и в островках поджелудочной железы [46]. Более того, в бета-клетках имеются допаминовые рецепторы [47], которые необходимы для ингибирования секреции инсулина с помощью допамина и L-ДОФА [46,48]. ПЭТ с 18F-ДОФА хотя и не отражает напрямую факт гиперсекреции инсулина, однако дает представление о функциональной активности бета-клеток поджелудочной железы. Благодаря повышенной активности L-аминокислотной декарбоксилазы у пациентов с органическим гиперинсулинизмом, в клинической практике возможна визуализация захвата 18F-ДОФА бета-клетками поджелудочной железы.

Применение ПЭТ с 18F-ДОФА у детей при ВГИ имеет большее значение, чем использование этого метода у взрослых пациентов при инсулиноме. В организме взрослого человека система L-декарбоксилазы ароматических аминокислот работает достаточно активно, что может мешать детекции очага гиперпродукции инсулина. У взрослых пациентов с инсулиномой возможно проведение ПЭТ с 18F-ДОФА, однако в связи с высокой стоимостью исследования методами выбора остаются МРТ, КТ с контрастным усилением или эндоскопическим УЗИ [49,50].

Напротив, у детей отмечается незрелость L-декарбоксилазы ароматических аминокислот, что позволяет более четко визуализировать область с наличием гиперактивных клеток при наличии патологии [49]. В случае фокальной формы гиперинсулинизма аккумуляция 18F-ДОФА  $\beta$ -клетками происходит гораздо интенсивнее в области очага поражения по сравнению с нормальной тканью поджелудочной железы [42,51–53]. При диффузной форме ВГИ захват радиофармпрепарата повышен во всей ткани поджелудочной железы с небольшим преобладанием активности в области головки, что является нормальной физиологической находкой [52–55].

### **Методика проведения ПЭТ с 18F-ДОФА**

Важность правильной дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ диктует необходимость строгого выполнения стандартной методики проведения ПЭТ с 18F-ДОФА. До исследования пациентам рекомендована отмена инсулиностатических препаратов (диазоксид, октреотид, глюкагон) для минимизации рисков некорректной интерпретации результатов [54]. Также в связи с малым возрастом пациентов ПЭТ с 18F-ДОФА проводится с наркозом с целью избежания образования артефактов вследствие двигательной активности. Для поддержания эугликемии на фоне отмены консервативной терапии и длительного голодного промежутка перед наркозом пациентам устанавливается центральный венозный катетер и проводится внутривенная инфузия раствора глюкозы. Внутривенное введение радиофармпрепарата проводится через отдельный катетер, установленный в периферической вене. Сканы ПЭТ с 18F-ДОФА осуществляется через определенные промежутки времени после введения радиофармпрепарата в течение часа. В дальнейшем проводится оценка визуальных данных и расчетных показателей на каждом отрезке времени.

### **Дифференциальная диагностика гистологической формы ВГИ по результатам ПЭТ с 18F-ДОФА**

Применение ПЭТ с 18F-ДОФА значительно облегчило дифференциальную и топическую диагностику при ВГИ. Ключевым фактором в дифференциальной диагностике гистологической формы ВГИ является интерпретация результатов ПЭТ с 18F-ДОФА. Качественный анализ изображения начинается с исходной оценки в трех проекциях. Также используется полуколичественный метод с подсчетом стандартизированного уровня накопления (СУН) радиофармпрепарата. Данный показатель отражает отношение радиоактивности в конкретной области к величине радиоактивности введенной на массу тела пациента и выражается в Бк/мл. По данным ряда зарубежных авторов, у пациентов с ФФ ВГИ в области

аденоматоза СУНмакс примерно на 50% больше, чем искомый показатель в здоровой части поджелудочной железы [49,56]. В клинической практике для дифференциальной диагностики гистологических форм ВГИ предложено вычисление панкреатического индекса (ПИ), который представляет собой отношение максимального стандартизированного уровня накопления радиофармпрепарата (СУНмакс) к следующему меньшему по значению стандартизированному уровню накопления [54]. Таким образом, у пациентов с ФФ ВГИ при делении СУНмакс в области повышенного захвата 18F-ДОФА на СУНмакс в области здоровой ткани имел бы значение примерно равное 1,5. Имеющиеся данные повлияли на определение порогового значения ПИ. Подсчет СУН и ПИ происходит через определенные временные промежутки после введения 18F-ДОФА. В последующем избирается максимальное значение ПИ и проводится интерпретация результата: при максимальном ПИ более 1,5 считается более вероятным наличие ФФ заболевания, при максимальном ПИ менее 1,3 подозревается ДФ заболевания [49].

В дополнение к ПЭТ с 18F-ДОФА возможно одновременное использование КТ с контрастированием для уточнения локализации фокуса гиперсекреции инсулина по отношению к основным анатомическим ориентирам (селезеночные и верхние брыжеечные артерии, общий желчный проток и двенадцатиперстная кишка).

### **Точность и ограничения ПЭТ с 18F-ДОФА**

По данным литературы, чувствительность ПЭТ с 18F-ДОФА при ВГИ колеблется в пределах 89% (95% ДИ:81-95%), специфичность – 98% (95% ДИ: 89-100%) [57]. Подсчитано, что точность локализации аденоматоза при фокальной форме ВГИ при проведении ПЭТ с 18F-ДОФА соответствует 82% [41].

Тем не менее, при оценке результатов ПЭТ с 18F-ДОФА могут возникнуть определенные сложности. Правильной интерпретации результата часто препятствует физиологическое повышенное накопление

радиофармпрепарата головкой поджелудочной железы, что может привести к ложному диагностированию как фокальной, так и диффузной формы ВГИ. Например, возможно ложное определение ФФ в области головки поджелудочной железы в связи с физиологически увеличенным СУН. В данном случае ПИ при расчете будет приближаться к 1,5 у пациента с ДФ ВГИ. С другой стороны, этот же феномен может помешать верной диагностике ФФ в других участках, так как разница между СУН в области аденоматоза в теле или хвосте будет недостаточно выражена по сравнению с физиологически повышенным СУН в области головки поджелудочной железы. Таким образом, при расчете ПИ будет получаться результат значительно меньший, чем 1,5 [58], и пациенту с ФФ ВГИ может быть ошибочно установлена ДФ заболевания с дальнейшим проведением субтотальной панкреатэктомии с вытекающими последствиями. Более того, выявление мелких очагов гиперсекреции инсулина остается трудновыполнимой задачей. Таким образом, в настоящее время не представляется возможным полагаться лишь на общепринятый объективный расчётный показатель в виде максимального ПИ, так как при его использовании возможны ошибки.

### **Безопасность ПЭТ/КТ с 18F-ДОФА**

ПЭТ с 18F-ДОФА является достаточно безопасным методом исследования. До настоящего момента не было зафиксировано каких-либо осложнений после проведения ПЭТ/КТ с 18F-ДОФА у детей с ВГИ. Радиационное облучение при совмещенном использовании ПЭТ и КТ и использовании силы тока 80 мАм в секунду с пиковым напряжением в 140 кВ составляет примерно от 3 до 5 мЗв [41]. Подсчитанный риск потенциальной смерти от радиационно-индуцированной онкологии в педиатрии равен 1 к 1000 при эффективной дозе 10 мЗв [59,60]. В целях безопасности рекомендуется снижать дозу лучевой нагрузки до минимально эффективной.

Дополнительными рисками к радиационному облучению являются выполнение венопункции, повышенная кислотность раствора  $^{18}\text{F}$ -ДОФА, длительное голодание перед исследованием, введение препаратов для индуцирования, гипогликемии вследствие отмены инсулиностатических препаратов до выполнения ПЭТ, а также проведение постоянной внутривенной инфузии во время  $^{18}\text{F}$ -ДОФА для поддержания эугликемии. Выбор оптимального времени проведения сканирования после введения радиофармпрепарата способен уменьшить продолжительность исследования и снизить некоторые из вышеперечисленных рисков.

#### **1.4 Патоморфологические характеристики**

##### **Этапы пренатального развития поджелудочной железы**

Поджелудочная железа состоит из экзокринной части, отвечающей за пищеварение, и эндокринной части, необходимой для секреции гормонов. По объему экзокринная часть органа занимает большую долю, однако оба отдела развиваются из общего эпителиального зачатка, который берет начало от первичной кишки. Экзокринная порция формирует ацинарные клетки, которые продуцируют пищеварительные ферменты (трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, амилаза, липаза и другие). Данные ферменты расщепляют крупные молекулы на более мелкие для облегчения абсорбции. Эндокринные клетки в поджелудочной железе укомплектованы в группы - островки Лангерганса - или расположены одиночно. В островках Лангерганса находятся 5 групп эндокринных клеток: альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон и ПП-клетки. Данные группы клеток производят глюкагон, инсулин, соматостатин, грелин и панкреатический полипептид, соответственно.

Первичная морфологическая структура (предшественник) поджелудочной железы образуется на 26-31 день эмбриогенеза из

вентрального и дорсального зачатков первичной кишки [61]. В дальнейшем обе части соединяются и формируют целый орган [62]. Созревание эндокринных клеток происходит раньше, чем экзокринных. В исследованиях обнаружено, что в первую очередь появляются альфа-клетки и бета-клетки [63]. Дифференцировка клеток проходит под воздействием множества транскрипционных факторов (Рисунок 3). Исследование клеточных линий показало, что все зрелые клетки поджелудочной железы происходят от предшественников, экспрессирующего *Pdx1* и/или *Ptf1a*. В дальнейшем экспрессия *Ptf1a* необходима для созревания ацинарных клеток, а *Ngn3* – для дифференциации эндокринных клеток.

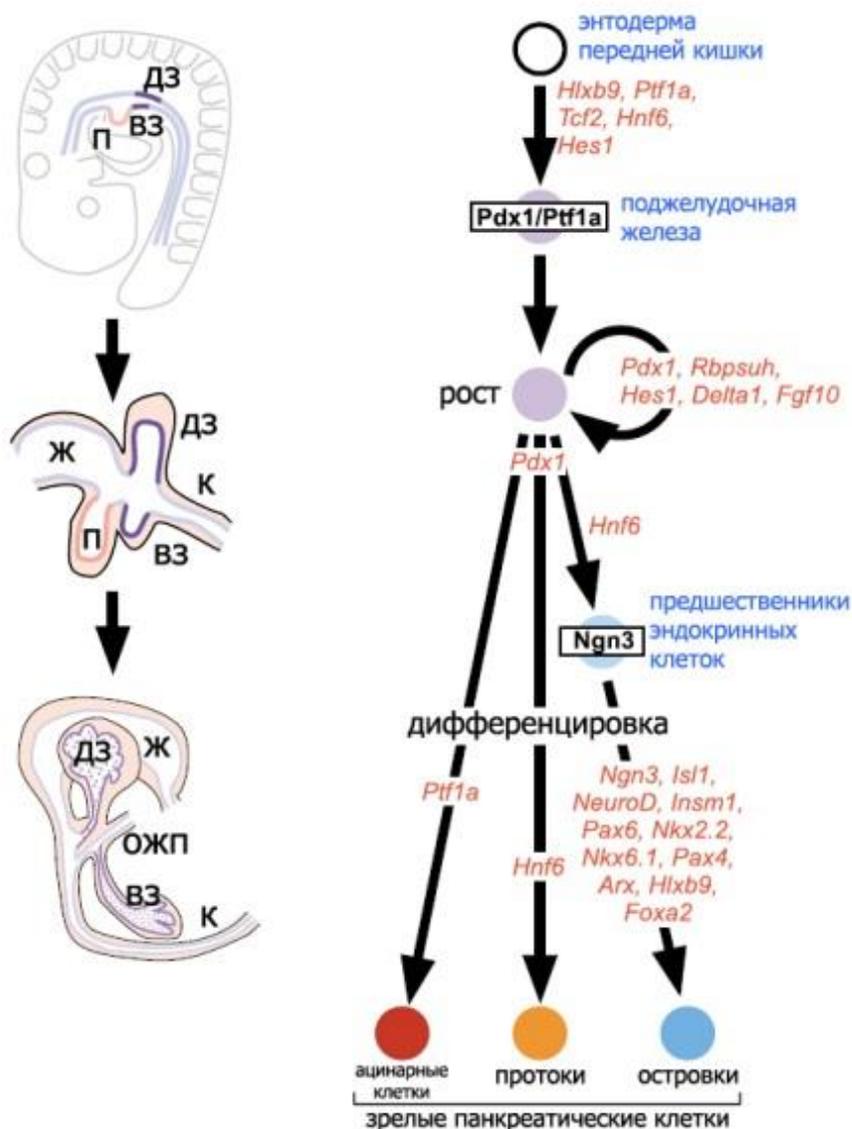


Рисунок 3 – Адаптированное схематическое изображение эмбриогенеза поджелудочной железы с указанием ключевых транскрипционных факторов [64]. Дорсальный и вентральный панкреатические зачатки (ДЗ, ВЗ) появляются у человека примерно на 30-й день эмбриогенеза из кишечной энтодермы и расположены рядом с зачатком печени (П). Далее (середина рисунка) зачаток поджелудочной железы внедряется в мезенхиму и находится между желудком (Ж) и кишечником (К). Последующая ротация кишечника на 55 дне эмбриогенеза приближает два зачатка железы, хотя у каждого из них остается свой собственный проток, объединенный с общим желчным протоком (ОЖП) или напрямую с двенадцатиперстной кишкой [65].

### **Структура островков Лангерганса в норме морфология**

Бета-клетки представляют собой динамическую структуру, которая может меняться в течение жизни [66]. Первые бета-клетки определяются уже на 49-52 дне эмбриогенеза. Имеются данные, что медленное увеличение количества бета-клеток продолжается до подросткового периода [67]. Размеры, количество и функция бета-клеток также претерпевают изменения при таких состояниях, как инсулинорезистентность, беременность, ожирение, адаптируясь под новые потребности организма [68]. По данным некоторых исследований, основным механизмом увеличения числа бета-клеток после рождения является пролиферация, а не неогенез [69,70]. В эпителии экзокринных протоков также имеется временный пул предшественников бета-клеток.

Ткань зрелой поджелудочной железы, в основном, состоит из ацинарных клеток и разветвленной сети протоков, в то время как эндокринные клетки занимают меньшую часть и распределены центрально. У здорового взрослого человека объем островковых клеток занимает

примерно 2% от всего объема органа. Островки представляют собой округлые кластеры клеток до 3000 штук размером от 100 до 500 мкм. В структуре островков Лангерганса большая доля принадлежит бета-клеткам (примерно 48-59%) [71]. Морфологические различия центра и периферии островков выражены слабо, хотя бета-клетки обычно расположены ближе к центру островка, тогда как другие группы клеток имеют тенденцию располагаться на периферии. Альфа-клетки занимают второе место по распространенности в островках Лангерганса (33-46% от всего объема островка). Менее 10% составляют дельта-клетки и менее 1% ПП- и эpsilon-клетки [64,72]. При этом имеет место неравномерность распределения клеток в разных островках. В ряде случаев могут встречаться островки Лангерганса с меньшим количеством бета-клеток и преобладанием альфа-клеток.

Островки Лангерганса имеют богатое кровоснабжение и иннервацию. Интересен тот факт, что сосуды пенетрируют центр эндокринного островка и затем разветвляются по направлению к периферии. Учитывая особенности хода сосудов и наличие в центре островков Лангерганса большого количества бета-клеток, выдвигается предположение, что секреция инсулина оказывает паракринное влияние на все типы эндокринных клеток [73,74].

### **Патоморфологические характеристики фокальной и диффузной форм врожденного гиперинсулинизма**

С 1970 года при морфологическом исследовании препаратов поджелудочной железы пациентов с ВГИ рядом авторов было отмечено увеличение размера ядер бета-клеток. Данный факт указывал на функциональные нарушения бета-клеток поджелудочной железы. Более тщательный морфологический анализ послеоперационных препаратов поджелудочной железы в дальнейшем позволил выделить фокальную и диффузную формы заболевания [14]. Первые данные о гистологических формах ВГИ были опубликованы профессором Rahier в 1989 году [14]. При этом было выявлено, что при ВГИ не происходит увеличения общей массы

эндокринных клеток и островков Лангерганса, а происходят качественные морфо-функциональные изменения бета-клеток.

В 1970-80-х годах термин «идиопатическая спонтанная гипогликемия у детей» был заменен на «незидиобластоз». Данный термин обозначает особенность эмбрионального развития с пролиферацией бета-клеток из эпителия протоков поджелудочной железы за счет влияния транскрипционного фактора *NGN3* [75]. Последующие исследования Rahier и соавт. указали на ошибочность отождествления незидиобластоза с врожденным гиперинсулинизмом, так как незидиобластоз является нормальной гистологической находкой у пациентов неонатального возраста [14].

Патоморфологическая картина ткани поджелудочной железы у пациентов с фокальной и диффузной формами ВГИ отличается от нормальной (Рисунок 4 [76]). Фокальная форма ВГИ развивается за счет наличия отцовской изодисомии с патогенной мутацией в генах *ABCC8/KCNJ11* в ограниченной группе клеток поджелудочной железы. Патоморфологически в большинстве случаев визуализируется очаг скопления бета-клеток размером не более 1 см. Также отмечаются изменения объема ядер и цитоплазмы бета-клеток. Для сравнительной оценки размеров ядер бета-клеток используют ядра ацинарных клеток: в норме они имеют примерно одинаковые размеры. Некоторые ядра в фокусе имеют размер, превышающий таковой у ацинарных клеток, а также увеличенный объем цитоплазмы. Напротив, оставшиеся бета-клетки с нормальным генотипом не имеют подобной структуры: размеры их ядер в норме или даже ниже нормы, цитоплазма имеет уменьшенный объем [76]. По периферии фокус окаймляют альфа-клетки. В отличие от инсулиномы поджелудочной железы, фокус аденоматоза имеет менее четкие границы [77].

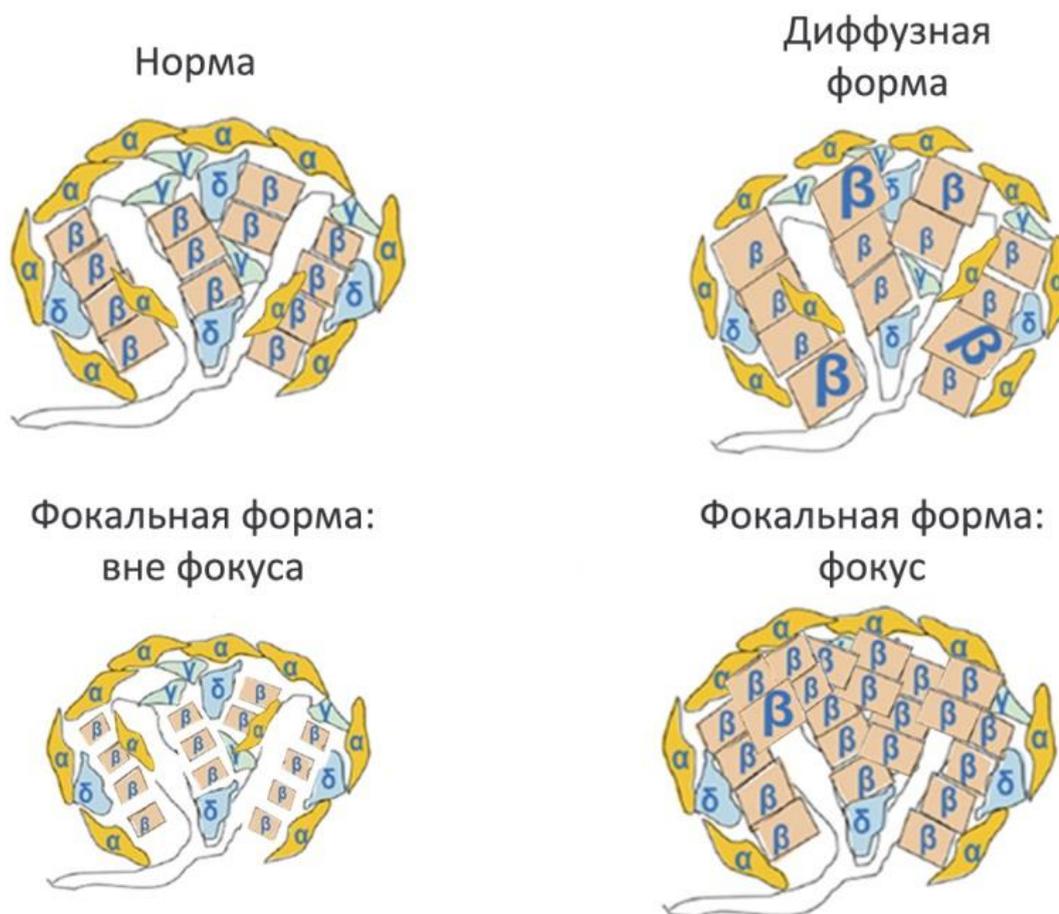


Рисунок 4 – Адаптированное схематическое изображение островков Лангерганса в норме, при ФФ и ДФ ВГИ [76]. У пациентов с ФФ в фокусе увеличивается количество бета-клеток в островках. Вне фокуса архитектура островков Лангерганса напоминает норму, однако размер бета-клеток уменьшен. Для ДФ характерно значительное увеличение ядер бета-клеток.

В случае диффузной формы ВГИ изменения затрагивают всю ткань поджелудочной железы. При морфологическом исследовании обнаруживаются значительно увеличенные ядра бета-клеток (в 3-4 раза больше ядер ацинарных клеток) [77,78]. Стоит отметить, что количество островков и бета-клеток не отличается от нормы [26,77]. По данным проведенного гистологического исследования, площадь крупных ядер бета-клеток при ДФ ВГИ в среднем составляет  $100 \text{ мкм}^2$ , что в 4 раза больше, чем

средняя площадь ядер контрольной группы эндокринных клеток от относительно здоровых пациентов и в 5 раза больше, чем площадь ядер экзокринных клеток. В контрольной группе относительно здоровых пациентов только 0,1% островков имели клетки с нуклеомегалией, тогда как при ДФ ВГИ эта цифра составила 0,7%. Также в клетках с крупными ядрами отмечалось меньшее количество секреторных гранул [79]. Также было доказано, что нуклеомегалия не связана с повышенной пролиферацией (рассчитан индекс Ki67) и апоптозом (окраска на расщепляющую каспазу) [26]. Основные патоморфологические характеристики пациентов с ФФ и ДФ ВГИ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительные патоморфологические характеристики поджелудочной железы у пациентов с различными гистологическими формами ВГИ

Характеристика	Здоровая ткань	Фокус	Вне фокуса	ДФ ВГИ	Ссылки
Размер островков	≈0,1 мм	Нормальный	Меньше нормы	Нормальный	[80,81]
Распределение клеток в островках Лангерганса	Бета-клетки в центре островков, альфа-клетки и в центре, и по периферии	Бета-клетки в центре, альфа-клетки по периферии	Схоже со здоровой тканью	Схоже со здоровой тканью, но много одиночных бета-клеток	[76, 81]
Количество бета-клеток	≈50% от объема островка	Увеличено, бета-клетки занимают до 90% объема	Норма или меньше 15-20% от объема островка	Нормальное	[77,81]
Размер ядра в бета-клетках	≈5-7 мкм	Нормальный и иногда нуклеомегалия	Нормальный или уменьшен	Около 45% островков имеют более 2 бета-клеток с нуклеомегалией	[77,79]
Цитоплазма бета-клеток	Норма	Увеличена	Уменьшена	Увеличена	[77,82,83]

Индекс Ki67	≈0,5-3%	Повышен (≈3-5%)	Повышен (≈4%)	Повышен (≈4%)	[81,84,85]
Уровень апоптоза (ИГХ с расщепляющей каспазой)	≈0,05%	Данные разнятся: выше нормы или ниже нормы			[81,86]

### Роль рецепторов к глюкагоноподобному пептиду-1

Глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1) является одним из важнейших факторов углеводного обмена. ГПП-1 относится к группе инкретинов и синтезируется кишечными L-клетками в ответ на прием пищи. Его действие заключается в стимуляции выброса инсулина, а также ингибировании секреции глюкагона и глюконеогенеза в печени [87]. ГПП-1 играет роль не только в качестве постпрандиального регулятора гликемии, но также и влияет на углеводный обмен в период голодания; обнаружилось, что нарушение функционирования его рецептора ведет к гипергликемии натощак [88].

Рецепторы к ГПП-1 экспрессируются в инсулин- и соматостатин-продуцирующих клетках здоровой поджелудочной железы, и, в меньшем количестве, в ацинарных клетках. Также отмечено, что ГПП-1 рецепторы активно экспрессируются в доброкачественных инсулиномах [89]. Данный рецептор представляет все больший клинический интерес. С одной стороны, агонисты рецептора ГПП-1 используются для терапии пациентов с сахарным диабетом (эксендин-4, лираглутид). С другой стороны, рецептор ГПП-1 применяется в качестве мишени для радиоизотопных исследований у пациентов с подозрением на инсулиномы [89, 90].

Секрецию инсулина и ГПП-1 объединяет не только их влияние на углеводный обмен, но и то, что продукция этих гормонов требует слаженной

работы АТФ-зависимых калиевых каналов. В случае ВГИ, работа АТФ-зависимых калиевых каналов зачастую нарушается. При ДФ ВГИ патогенные мутации отмечаются во всех клетках организма, а, значит, могут затрагивать и работу интестинальных L-клеток, вырабатывающих ГПП-1 [91]. При фокальной форме не должно наблюдаться нарушения работы клеток кишечника, так как генетические изменения затрагивают только ограниченное количество клеток в поджелудочной железе. Соответственно, было выдвинуто предположение, что экспрессия рецепторов к ГПП-1 у пациентов с различными формами ВГИ не одинакова.

Представляет интерес тот факт, что у некоторых пациентов с тяжелым течением ВГИ, обусловленным мутациями в генах *ABCC8/KCNJ11*, отмечается парадоксальное снижение потребности во внутривенной дотации глюкозы на фоне голодания, и, наоборот, развитие рецидивирующих гипогликемий после еды [92]. Учитывая эти данные, было предположено, что роль в усугублении гипогликемии после еды играет избыточная секреция ГПП-1 у пациентов с ДФ ВГИ. Более того, применение антагониста ГПП-1 (эксендин-(9-39)) у пациентов с ДФ ВГИ и мутациями в гене *ABCC8* привело к повышению уровня глюкозы крови в недавнем клиническом исследовании [91]. Однако остаются нераскрытыми некоторые вопросы касательно патофизиологической роли ГПП-1 при ВГИ. Проведение иммуногистохимического исследования с антителом к рецептору ГПП-1 позволило бы подтвердить или опровергнуть наличие повышенной экспрессии рецепторов ГПП-1 в ткани поджелудочной железы у пациентов с ДФ заболевания по сравнению с ФФ ВГИ.

### **Белок p57**

На коротком плече 11 хромосомы расположено несколько генов с разной экспрессией на материнской и отцовской аллелях. Одним из этих генов является *CDKN1C*, кодирующий 335-аминокислотный белок p57. Белок представляет собой ингибитор циклинзависимой киназы. Действие данной

группы белков направлено на подавление процессов опухолевого роста. Более того, p57 также задействован в процессах дифференцировки и апоптоза клеток [93]. В эндокринологии иммуногистохимическое исследование с антителами к p57 используется для дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ, в онкологии данное исследование проводится для определения формы пузырьного заноса. Интерес к данному белку связан с его влиянием на клеточный цикл, а также с наличием геномного импринтинга.

У взрослого человека данный белок экспрессируется в скелетных мышцах, поджелудочной железе, сердце, почках, головном мозге и плаценте [94]. Во многих тканях взрослого человека (печень, селезенка и др.) он полностью отсутствует. По имеющимся данным, в поджелудочной железе p57 обнаружен в эндокринных клетках, и преимущественно экспрессируется бета-клетками [95]. При проведении ИГХ-исследований с антителами к p57 окрашивание ацинарных и протоковых клеток фиксировалось в редких случаях. Экспрессия p57 различается в зависимости от типа ткани и возраста пациента. Уровень экспрессии p57 колеблется во время эмбриогенеза, в течение жизни, а также зависит от стадии клеточного цикла.

Наличие экспрессии белка p57 исключительно на материнской аллели в области 11p15.5 позволяет использовать данный маркер для определения потери гетерозиготности клетки, что и происходит в случае ФФ ВГИ. При проведении ИГХ-исследования с антителами к p57 у пациентов с ФФ ВГИ в области фокуса окрашивание ядер бета-клеток не наблюдается. Напротив, ядра бета-клеток визуализируются при применении данного метода у пациентов с ДФ ВГИ, а также в ткани поджелудочной железы вне фокуса у пациентов с ФФ ВГИ. Соответственно, отсутствие окраски антителом к p57 ткани железы подтверждает фокальную форму ВГИ. В настоящее время в отечественной литературе отсутствуют данные о применении этого метода у пациентов с ВГИ, а имеющиеся сведения получены из иностранных источников.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящее исследование было проведено согласно общепринятым стандартам [96] с использованием методов статистического анализа. Проведенное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ (протокол №18 от 11.10.17). Предметом исследования являлась ФФ ВГИ. Объектом исследования выступали клинические, молекулярно-генетические, радиоизотопные (ПЭТ с <sup>18</sup>F-ДОФА) и гистологические характеристики ФФ ВГИ. Целевую популяцию составили все пациенты с доказанной ФФ ВГИ по гистологическому заключению, поступившие в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ в течение одиннадцатилетнего периода с января 2008 по январь 2019 года. Также с целью улучшения качества исследования проводилось сравнение различных характеристик в группах пациентов с ФФ ВГИ и фармакорезистентным течением ДФ ВГИ. Выбор группы сравнения был продиктован схожестью клинической картины и необходимостью проведения хирургического лечения в обеих группах.

### **2.1 Дизайн исследования**

Данное исследование является одноцентровым, наблюдательным, ретроспективным. В начале работы были выделены все пациенты детского возраста с диагнозом ВГИ, находившиеся под наблюдением в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» с января 2008 по январь 2019.

В исследование были включены все пациенты, прошедшие оперативное лечение по поводу ВГИ и получившие гистологическое заключение, подтверждающее фокальную или диффузную формы заболевания. Основную группу составляли пациенты с ФФ ВГИ. Группу сравнения составляли пациенты с ДФ ВГИ и фармакорезистентным течением заболевания. Набор пациентов в группы проводился на основании

соответствия критериям включения и при отсутствии критериев исключения.

В основную группу были включены пациенты детского возраста с подтвержденной ФФ ВГИ.

Критерии включения:

- возраст на момент обследования менее 18 лет;
- наличие гипокетотической гипогликемии с повышенным уровнем инсулина;
- гистологически подтвержденная ФФ ВГИ;
- информированное добровольное согласие законных представителей пациента об участии в исследовании.

Критерии исключения:

- возраст на момент обследования более 18 лет;
- отсутствие гистологического подтверждения диагноза;
- отсутствие согласия законных представителей пациента об участии в исследовании.

В группу сравнения были включены пациенты детского возраста с подтвержденной ДФ ВГИ.

Критерии включения:

- возраст на момент обследования менее 18 лет;
- наличие гипокетотической гипогликемии с повышенным уровнем инсулина;
- гистологически подтвержденная ДФ ВГИ;
- информированное добровольное согласие законных представителей пациента об участии в исследовании.

Критерии исключения:

- возраст на момент обследования более 18 лет;
- отсутствие гистологического заключения послеоперационных препаратов;
- отсутствие согласия законных представителей пациента в участии исследования.

Всего в основную группу пациентов с ФФ ВГИ было включено 30 детей, в группу сравнения – 32 пациента с фармакорезистентным течением ДФ ВГИ.

Первый этап исследования включил в себя проведение клинической и лабораторной диагностики пациентов для подтверждения диагноза ВГИ. Дифференциальная диагностика ВГИ, идиопатических кетотических гипогликемий, вторичных гипогликемий в результате надпочечниковой недостаточности и дефицита соматотропного гормона, болезней накопления гликогена проводилась всем пациентам, поступившим в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ по поводу эпизодов гипогликемии. Диагноз ВГИ устанавливался на основании результатов стандартной пробы с голоданием: обнаружение в венозной крови неадекватно повышенного уровня инсулина (более 2,0 мкМЕ/мл) на фоне гипокетотической гипогликемии (кетонемия менее 1,0 ммоль/л, гликемия менее 3,0 ммоль/л). Фармакорезистентное течение заболевания определялось отсутствием положительного эффекта в виде удлинения периода эугликемии на пробе с голоданием. Контрольная проба с голоданием на фоне лечения диазоксидом (препарат первой линии) проводилась при применении терапии в течение не менее 7 дней с максимальной дозой не менее 7 мг/кг/сут. В случае использования октреотида (препарат второй линии) контрольная проба с голоданием проводилась при применении терапии в течение не менее 2 суток с максимальной дозой не менее 8 мкг/кг/сут.

На втором этапе диагностики пациентам были проведены молекулярно-генетическое исследование и ПЭТ с 18F-ДОФА для предварительного определения гистологической формы ВГИ. На основании полученных данных, у пациентов предполагалась фокальная или диффузная формы заболевания. При подозрении на ФФ ВГИ, согласно общепринятым стандартам, пациентам была рекомендована частичная резекция поджелудочной железы. В случае наличия данных, указывающих на ДФ ВГИ, пациентам предлагалось выполнение субтотальной резекции

поджелудочной железы. Для верификации гистологической формы заболевания во время операций выполнялось гистологическое исследование операционного материала экспресс-методом.

На третьем этапе выполнялась окончательная гистологическая диагностика послеоперационных препаратов поджелудочной железы, что позволило достоверно выделить группу пациентов с ФФ ВГИ и группу пациентов с ДФ заболевания (последняя была использована для сравнения). Гистологическое заключение относительно формы заболевания было сформировано специалистом-патоморфологом, работающим на базе стационара, где было проведено оперативное вмешательство. Все специалисты-патоморфологи, оценивавшие окончательный гистологический диагноз, осуществляют работу в медицинских организациях II-III уровня, имеют докторскую научную степень и опыт работы с тканью поджелудочной железы. ФФ ВГИ была диагностирована по результатам иммуногистохимического исследования с инсулином или хромограннином А при выявлении очага слияния островков Лангерганса. ДФ заболевания была подтверждена у пациентов с равномерным распределением эндокринных островков в ткани поджелудочной железы. У одного пациента гистологическое заключение не содержало мнения специалиста по поводу формы заболевания, поэтому данный пациент был исключен из исследования.

На четвертом этапе результаты проведенной работы были структурированы и проанализированы с использованием методов статистического анализа.

### **Материалы для иммуногистохимического исследования**

Для отбора препаратов ткани поджелудочной железы с целью проведения дальнейшего иммуногистохимического исследования были получены 40 формалиновых блоков от 10 пациентов с ФФ ВГИ и 7 пациентов с фармакорезистентной ДФ ВГИ, давших информированное письменное

согласие. Материалы официально были запрошены в следующих медицинских организациях: ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург, Россия), детской городской больнице имени З.А. Башляевой (Москва, Россия), Морозовской детской городской клинической больнице (Москва, Россия). В качестве группы контроля были взяты 7 аутопсийных препаратов поджелудочной железы от 7 пациентов детского возраста, не имевших клинических признаков ВГИ и погибших в результате других причин. Препараты группы контроля были предоставлены лабораторией ФГБНУ «Научный институт морфологии человека» (г. Москва, Россия). На проведение исследования в группе контроля получено разрешение Этического комитета ФГБНУ «Научный институт морфологии человека» (протокол №3 А от 17.01.2006 г.). Все препараты в формалиновых блоках хранились в патоморфологических отделениях в условиях, согласующихся принятым нормам лечебных учреждений.

## **2.3 Методы исследования**

### **Клиническое обследование пациентов**

Клиническое обследование проводилось на базе Института детской эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ. В него входили сбор анамнеза (гестационный возраст, росто-весовые показатели при рождении, наличие сопутствующих заболеваний, наследственный анамнез, получаемые лекарственные средства и наличие побочных явлений), антропометрия (оценка росто-весовых показателей) и физикальное обследование (осмотр врачом детским-эндокринологом с использованием полного комплекса общепринятых мероприятий, осмотр врачом-неврологом с использованием полного комплекса общепринятых мероприятий). Оценка показателей роста, веса при рождении с учетом срока гестации, а также измерение роста, веса и окружности головы на момент обследования проводилась с использованием профессионального калькулятора «Aukology» (версия 1.0 b176, Pfizer, США).

### Лабораторно-инструментальная диагностика

Всем пациентам был выполнен спектр лабораторно-инструментальных исследований на базе биохимической лаборатории и отделения функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ (зав. Никанкина Л.В.). Перечень исследований с указанием методики проведения указан в таблице 2.

Таблица 2 – Спектр лабораторно-инструментальных исследований с указанием используемой аппаратуры

Гликемический профиль	
Оценка уровня глюкозы в капиллярной крови не менее 8 раз в сутки, до еды и через 2-3 часа после приема пищи, а также в случае клинических признаков гипогликемии.	Глюкометр «OneTouch Verio Pro+», Lifescan, США
Проба с голоданием	
Проба с голоданием в течение общепринятого установленного времени для каждого возраста с оценкой гликемии, кетонемии, инсулина и С-пептида в венозной крови в конце пробы.	Глюкометр («OneTouch Verio Pro+», Lifescan, США) и кетометр («Freestyle Optimum», Abbott, США); измерение инсулина и С-пептида венозной крови – метод усиленной электро-хемилюминесценции на анализаторе «Cobras 6000», La Roche, Франция.

Биохимический анализ крови	
АЛТ, АСТ, общий холестерин, щелочная фосфатаза, мочевины, креатинин, общий кальций, фосфор, калий и натрий.	Анализатор «Hitachi 912», Hitachi, Япония. Стандартные наборы La Roche, Франция.
Гормональный анализ крови	
Инсулин, С-пептид, кортизол, СТГ, АКТГ венозной крови.	Метод усиленной электрохемилюминесценции на анализаторе «Cobras 6000», La Roche, Франция.
ИФР1 венозной крови.	Метод электрохемилюминесценции на анализаторе «Liason», DiaSorin, Германия.
ТТГ, свободный Т4.	Метод электрохемилюминесценции на анализаторе «Architect», Abbott, США.
УЗИ органов брюшной полости	
Исследование проводилось натощак, либо через 1-2 часа после приема пищи в случае стойкой гипогликемии.	УЗ-аппарат «Toshiba Aplio 790», Toshiba, Япония.

### Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование крови пациентов проводилось в лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной медицины ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ (зав. Тюльпаков А.Н.). Предварительный забор венозной крови объемом 1 - 3

мл выполнялся в пробирки с ЭДТА. Для выделения ДНК из лейкоцитов использовался набор «PureLink® Genomic DNA Mini Kit» (Thermo Fisher Scientific, США), согласно методике производителя.

В группе пациентов с ФФ ВГИ и в группе сравнения молекулярно-генетический анализ методом секвенирования нового поколения был проведен 21 и 28 пациентам, соответственно. Секвенирование нового поколения (NGS) проводилось на основании разработанной в отделении панели с включением следующих генов: *GCG*, *GLUD1*, *WFS1*, *HNFI1A*, *GCK*, *INS*, *HNFI1B*, *ABCC8*, *HNFI4A*, *RFX6*, *PTFI1A*, *NEUROD1*, *AKT2*, *ZFP57*, *INSR*, *EIF2AK3*, *PPARG*, *PAX4*, *PDX1*, *GLIS3*, *KCNJ11*, *SLC16A1*, *FOXP3*, *BLK*, *CEL*, *KLF11*, *SCHAD* и *GCGR* (модуль «Torrent Suite 4.2.1», Ion Torrent, Life Technologies, США).

Оставшимся 9 пациентам с фокальной формой и 4 пациентам с фармакорезистентным течением ДФ ВГИ проводился анализ генов *ABCC8*, *KCNJ11* и *GLUD1* методом Сэнгера. Выбор метода молекулярно-генетического исследования был связан с доступностью той или иной технологии на момент выполнения. В 26 случаях также проводилось исследование искомой мутации у родителей пациентов методом прямого секвенирования.

Для валидации полученных результатов проводился биоинформатический анализ с помощью программного модуля Torrent Suite 4.2.1 (Ion Torrent, Life Technologies, США) и пакета программ Annovar (версия 2015-2016 гг.) [97]. Популяционная частота выявленных нуклеотидных вариантов оценивалась с использованием выборки проекта Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org>). Также для оценки значимости найденной мутации проводился анализ базы данных Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/index.php>), OMIM (<http://www.omim.org/>) и данных литературы. Решение о патогенности нуклеотидных изменений принималось согласно международным рекомендациям [98].

### **Позитронно-эмиссионная томография с 18F-ДОФА**

ПЭТ с 18F-ДОФА проводилась 25 пациентам с ФФ ВГИ и 21 пациенту группы сравнения. Исследование выполнено на базах научно-исследовательского отдела ядерной медицины и тераностики ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» (зав. Рыжкова Д.В., Санкт-Петербург, Россия) (n=27), отделения лучевой диагностики Университетского Госпиталя (Оденс, Дания) (n=16) и отделения радионуклидной диагностики клиники «Европейский Медицинский Центр» (зав. Пузакин Е.В., Москва, Россия) (n=3). Маскирования результатов молекулярно-генетического исследования при переводе пациентов в центры проведения ПЭТ с 18F-ДОФА не проводилось.

Подготовка пациентов к исследованию осуществлялась в стационаре и включала в себя наблюдение за общим состоянием, контроль гликемии, поддержание эугликемии методом внутривенной инфузии раствора глюкозы. В обязательном порядке минимум за 48 часов до исследования осуществлялась отмена терапии инсулиностатическими препаратами (диазоксид, октреотид, глюкагон).

Непосредственно во время исследования пациенты пребывали в состоянии медикаментозной седации с использованием пропофола, контроль гликемии проводился каждые 30 минут. Радиофармпрепарат 18F-ДОФА вводился пациентам внутривенно медленно, препарат использовался не позднее 60 минут с момента синтеза 18F-ДОФА. ПЭТ с 18F-ДОФА выполнялась на совмещенной системе «Discovery 710», General Electric, США. Доза радиофармпрепарата рассчитывалась по формуле 4 МБк на 1 килограмм массы тела пациента. Регистрация данных ПЭТ проводилась на серии временных интервалов в зависимости от момента введения 18F-ДОФА:

- первый интервал – сканирование через 10-20 минут,
- второй – через 30-40 минут,
- третий – через 40-50 минут,
- четвертый – через 50-60 минут.

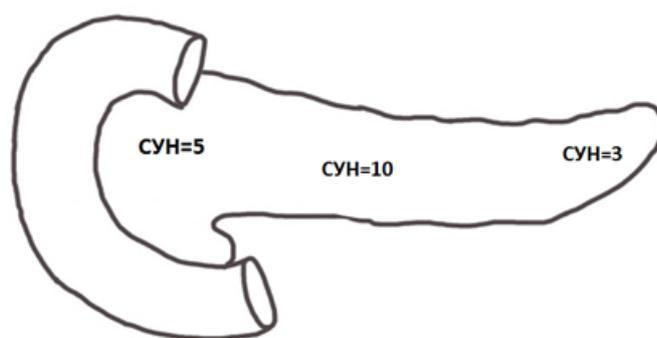
Для объективизации результатов исследования, производилась оценка соотношения СУН в разных участках поджелудочной железы. В исследовании использовались два метода расчета панкреатического индекса (ПИ): классический и альтернативный. Классический метод расчета ПИ представляет собой отношение СУН<sub>макс</sub> к следующему по значению СУН в другом участке поджелудочной железы:

- $PI = \text{СУН}_{\text{макс}} / \text{СУН}$  (второй максимальный по величине)

При альтернативной методике расчета, панкреатический индекс равнялся отношению СУН<sub>макс</sub> к средней арифметической СУН каждой части поджелудочной железы (головка, тело, хвост). Данный индекс был условно обозначен ПИ\*:

- $PI^* = \text{СУН}_{\text{макс}} / \text{среднее от всех СУН}$ .

ПИ рассчитывался для каждого временного интервала отдельно по обеим формулам, также избирались максимальный ПИ и максимальный ПИ\*. Для наглядности пример расчета ПИ и ПИ\* представлен на рисунке 5. Также проводилась визуальная оценка ПЭТ изображений в режиме 3D-реконструкции.



$$\text{Классический ПИ} = \frac{10}{5} = 2$$

$$\text{Альтернативный} = \text{ПИ}^* = \frac{10}{(5+10+3)/3} = \frac{10}{6} = 1,6$$

Рисунок 5 – Пример расчета ПИ и ПИ\* на отдельно взятом временном интервале

Учитывая возможность ошибок при проведении дифференциальной диагностики по ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -ДОФА общепринятым методом, нами был проведен поиск более подходящих отрезных точек. Выбор оптимальной отрезной точки для диагностирования гистологической формы был продиктован различиями в тактике лечения пациентов с фокальной и диффузной формами ВГИ. При подозрении на ФФ единственной возможной тактикой является оперативное лечение, при наличии данных за ДФ заболевания продолжается подбор консервативной терапии и только в случаях, не поддающихся терапии, – субтотальная панкреатэктомия [3]. Таким образом, наибольшим негативным клиническим эффектом является ложное диагностирование ФФ, поскольку оно неминуемо приведет к хирургическому лечению без попыток подбора консервативной терапии. Поэтому при поиске оптимальной отрезной точки мы ориентировались на наибольшую специфичность и диагностическую точность метода.

Нами были построены ROC-кривые для значений ПИ и ПИ\* на каждом временном интервале, а также для максимальных ПИ и ПИ\* (всего 10 графиков, 4 графика на отдельные временные интервалы и один – для максимального значения). Отрезные точки избирались на пересечении наибольшего возможного значения чувствительности при 95-100% специфичности. Пример ROC-кривой с выбором оптимальной отрезной точки представлен на рисунке 6.

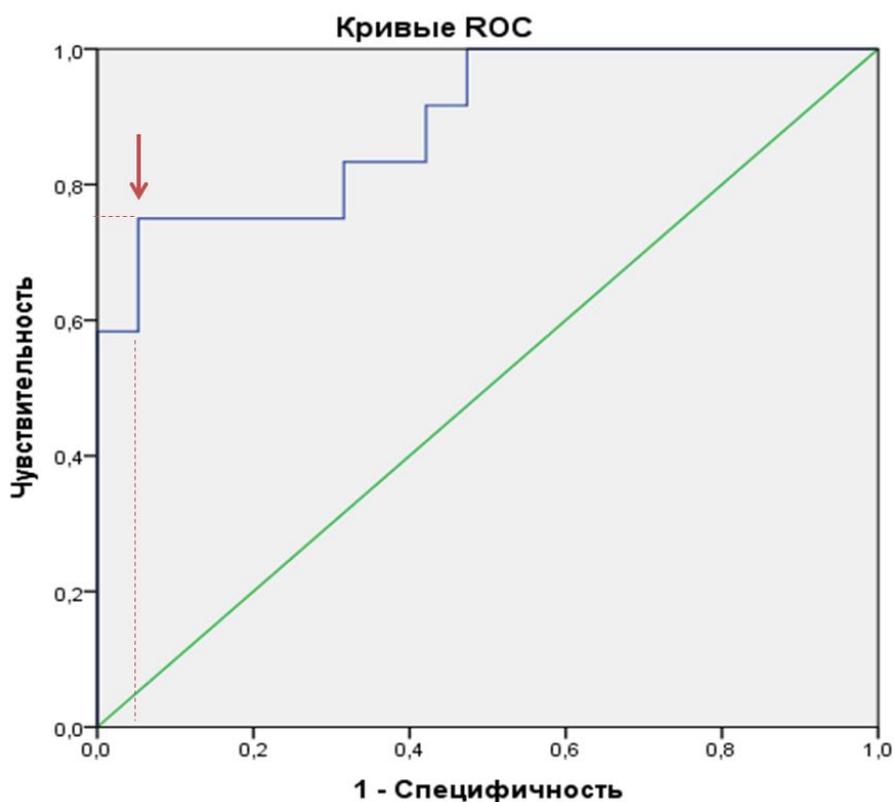


Рисунок 6 – Пример построения ROC-кривой и алгоритма выбора отрезной точки. Наилучшей отрезной точкой признавалась та, которая имела координаты специфичности, стремящейся к 100%, и наибольшей соответствующей ей чувствительности. Условные обозначения: синяя линия – кривая теста; зеленая линия – диагональ; красная стрелка – пересечение специфичности близкой к 100% и наибольшей возможной чувствительности.

Полученные отрезные точки для ПИ и ПИ\* оценивались по специфичности, чувствительности, вероятности наличия ФФ при отрицательном результате и диагностической точности. Далее, предложенные отрезные точки с максимальной суммой специфичности и диагностической точности сравнивались со стандартным методом постановки диагноза ФФ и с комплексным подходом (оценка как расчетных, так и визуальных данных) по следующим критериям: специфичность, чувствительность, вероятности фокальной формы при отрицательном результате и диагностическая точность (Таблица 3).

Таблица 3 – Методы установки ФФ ВГИ и их критерии

Методы определения наличия ФФ ВГИ	Условия для постановки диагноза ФФ ВГИ
Стандартный (общепринятый) метод	Значение максимального ПИ более 1,5
Тестируемый метод оценки по ПИ	Значения ПИ на определенном временном интервале более рассчитанной отрезной точки
Тестируемый метод оценки по альтернативному ПИ*	Значения альтернативного ПИ* на определенном временном интервале более рассчитанной отрезной точки
Комплексная оценка	Значение максимального ПИ более 1,0 И наличие явной визуальной картины очагового захвата радиофармпрепарата (оценивалось не менее чем двумя специалистами-радиологами со стажем работы не менее 10 лет)

### **Иммуногистохимическое исследование**

Материал фиксировали в 10%-м растворе кислого или нейтрального формалина. Срезы препаратов толщиной в 3 мкм были получены с помощью микротомы Leica RM2235 («Leica Microsystems ltd», Великобритания). В отделе фундаментальной патоморфологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (зав. Абросимов А.Ю.) была проведена предварительная окраска препаратов поджелудочной железы гематоксилином и эозином с целью подтверждения морфологической формы заболевания, оценки наличия фокуса в срезе и качества препаратов. После отбора материала в лаборатории НИИ «Морфологии человека» РАН (зав. Савельев С.В.) были проведены ИГХ-исследования с моноклональными антителами к инсулину, рецепторам ГПП-1 и белку p57 на послеоперационном материале 17 пациентов с ВГИ (10 пациентов с ФФ ВГИ и 7 пациентов с ДФ ВГИ). При использовании антител

к инсулину на препаратах поджелудочной железы у пациентов с ВГИ применялась система визуализации Multi Vision Polymer Detection System (Multi Vision anti-rabbit/HRP and anti-mouse/AP polymers, LV Blue and LV Red, «Thermo Fisher Scientific Inc.»). В группе контроля при проведении ИГХ с антителами к инсулину, а также у всех пациентов при окраске антителами к рецептору ГПП-1 и p57 использовалась визуализирующая система Ultra Vision ONE Detection System (TL-015-HDJ, «Thermo Fisher Scientific Inc.»). Все системы визуализации применялись согласно протоколу производителя. Характеристики используемых антител и условия проведения реакции представлены в таблице 4.

ИГХ-исследование с антителами к инсулину было проведено для лучшей визуализации точек расположения островков Лангерганса, а также фокуса гиперсекреции инсулина. Новые данные о морфологии ВГИ были получены при проведении исследования с антителами к рецептору ГПП-1 и p57, которые в последующем сравнивались с уже полученными результатами ИГХ с антителами к инсулину на идентичных препаратах. С целью лучшей визуализации тканей, прореагировавших с антителами, отсканированные препараты изучались в программном обеспечении для просмотра патоморфологических слайдов Aperio ImageScope («Leica Microsystems ltd», Великобритания). В ходе исследования проводилась оценка месторасположения клеток тканей, вступивших в реакцию с антителом, по отношению к фокусу гиперпродукции инсулина при ФФ ВГИ и по отношению к островкам Лангерганса при ДФ заболевания.

Таблица 4 – Характеристика использованных антител при проведении ИГХ

Название	Фирма производитель, страна	Первичный хозяин	Разведение	Демаскирование антитела
Антитела к инсулину	Sigma-Aldrich, США	Мышь	Группа пациентов с	Кипячение срезов в 0,01М цитратном буфере

I2018			ВГИ 1:8000	(рН6,0) в течение 10 мин с последующим остыванием срезов в буфере в течение 20 мин.
			Группа контроля 1:8000-1:32000	Не проводилось
Антитела к рецептору ГПП-1 3F52	Developmental Studies Hybridoma Bank, США	Мышь	1:10	Кипячение срезов в 0,01М цитратном буфере (рН 6,0) в течение 10 мин с последующим остыванием срезов в буфере в течение 20 мин.
Антитела к белку р57 457М-94	Cell Marque, США	Мышь	1:100	Кипячение срезов в 0,01М цитратном буфере (рН 6,0) в течение 10 мин с последующим остыванием срезов в буфере в течение 20 мин.

### Анализ полученных данных

Таблица данных создавалась с помощью программы Excel (Microsoft, США) без введения персональных данных пациентов. Статистический анализ данных проводился с использованием специализированных программ «Statistica version 13.0» (StatSoft Inc., США) и «SPSS Statistics version 17.0» (IBM, США).

В исследовании использовались непараметрические методы. В связи с ненормальным распределением количественных данных в описательной статистике использовалась медиана (Me), а также 25-й и 75-й квартили, представленные в квадратных скобках. Для сравнения двух независимых выборок был использован U-критерий Манна-Уитни. Критический уровень значимости различий принимался равным 0,05.

Качественные данные выборки представлялись с указанием абсолютной и относительной частот признака, выраженной в процентах. Ширина распределения относительной частоты признака была представлена в виде 95% доверительного интервала (ДИ), рассчитанного с помощью хи-квадрата, с указанием нижней и верхней границы.

Для оценки диагностической значимости ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -ДОФА составлялись таблицы сопряженности, также был использован ROC-анализ с подсчетом площади под кривой (AUC).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### **3.1 Клинико-лабораторные данные пациентов с фокальной формой врожденного гиперинсулинизма**

#### *Доля пациентов с фокальной формой ВГИ*

Всего за период с января 2008 по январь 2019 в институте детской эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ диагноз ВГИ был установлен у 241 пациента. В 78 случаях отсутствовала положительная динамика в виде стабилизации гликемии на фоне медикаментозной терапии, что указывало на фармакорезистентное течение. По данным гистологического исследования ФФ заболевания была подтверждена у 30 пациентов. ДФ ВГИ среди пациентов с фармакорезистентным течением была установлена в 32 случаях. Оставшиеся пациенты не имели достоверного гистологического подтверждения, также у них не было обнаружено патогенных мутации, приводящих к развитию той или иной формы заболевания.

Таким образом, доля пациентов с фокальной формой ВГИ составила 12 % (95 % ДИ: 9-17 %) от всех пациентов с данным заболеванием, в то время как среди пациентов с фармакорезистентным течением ВГИ ФФ встречалась в 38% случаев (95% ДИ: 28-50%) (Рисунок 7).

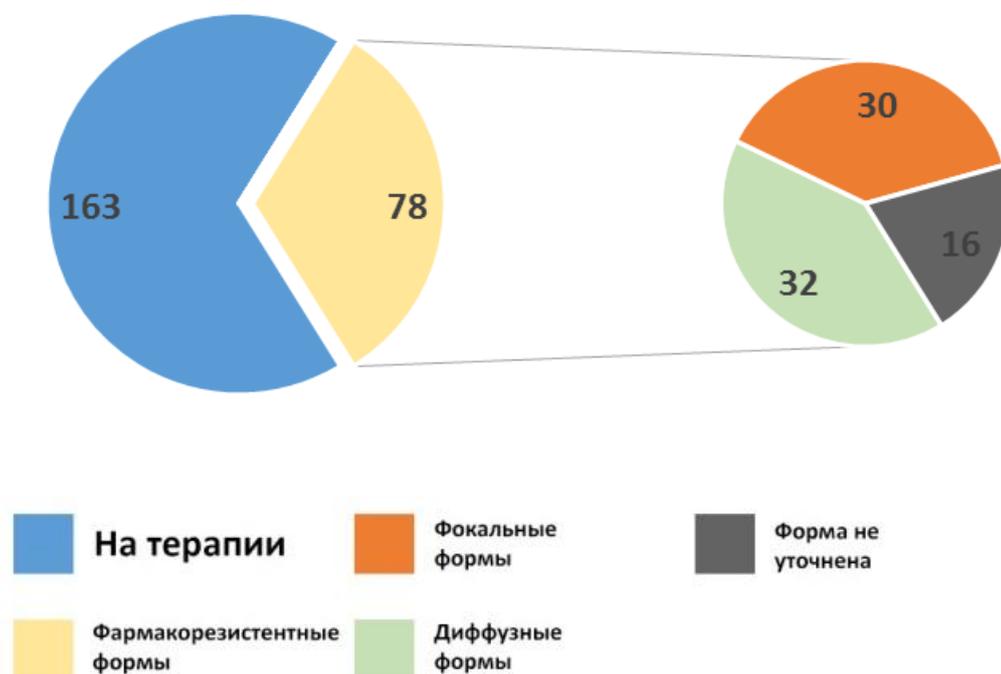


Рисунок 7 – Структура пациентов с ВГИ в зависимости от ответа на консервативную терапию и распределение гистологических форм заболевания

### *Манифестация*

По нашим данным, у всех пациентов с ФФ ВГИ, за исключением одного ребенка, отмечалась неонатальная манифестация заболевания. Возраст манифестации составил 2 дня [1; 3] и варьировал от 1 дня до 3 месяцев (n=30). Наиболее часто первым проявлением заболевания были судороги (Таблица 5).

Таблица 5 – Клинические проявления манифестации заболевания у пациентов с фокальной формой ВГИ (n=30)

Жалобы в дебюте заболевания	Количество пациентов	% (95%ДИ)
Судороги	21	68% (49-83%)
Апноэ и другие	11	35%

нарушения дыхания		(19-55%)
Угнетение сознания	7	23% (10-41%)
Вялость, мышечная слабость	3	10% (2-26%)
Вялое сосание	2	6% (0-21%)
Тахикардия/ брадикардия	2	6% (0-21%)

#### *Неонатальный анамнез*

Большая часть пациентов родилась в срок: 28/30 детей были рождены на 37-40 неделях гестации и по одному пациенту - на 33 и 36 неделях. Данные о весе при рождении были доступны у 29/30 пациентов. SDS веса при рождении на срок гестации составило 1,2 [0,1; 1,99] и колебалось от -0,14 до 1,99. Необходимо отметить, что более половины детей - 56% (95% ДИ: 37-75%, 17/29) - имели нормальный вес при рождении, тогда как крупный вес отмечался реже (38%, 95% ДИ: 21-58%, 11/29). Осложнения и сопутствующие патологические состояния в перинатальном периоде представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Структура осложнений и сопутствующей патологии в перинатальном периоде у пациентов с фокальной формой ВГИ

Осложнение	Количество пациентов, n
Баллы по Апгар $\leq 7$	6/28
Дыхательная недостаточность,	2/30

потребовавшая искусственной вентиляции легких	
Внутриутробная инфекция	2/30
Геморрагический синдром	1/30

### *Задержка в постановке диагноза*

Данные о возрасте постановки диагноза были доступны в 28/30 случаях. При этом возраст диагностирования заболевания составил 2 недели [14 дней; 30 дней] и варьировал от 6 дней до 4 месяцев (Рисунок 8). Необходимо указать, что разница во времени между возрастом манифестации и возрастом выявления заболевания составила 14 дней [12 дней; 32 дня] (минимально 3 дня – максимально 130 дней).



Рисунок 8 – Возраст манифестации и возраст постановки диагноза ВГИ

Условные обозначения: синяя полоса – межквартильный размах, красная точка – медиана.

### *Потребность в инфузионной терапии раствором глюкозы*

У подавляющего большинства пациентов (29/30) отмечалась потребность во внутривенном введении раствора глюкозы для поддержания оптимальной гликемии. Скорость утилизации внутривенно вводимой глюкозы сверх энтеральной нагрузки составила 12,3 мг/кг/минуту [8,7; 15,0] и варьировала от 3,8 до 19,0 мг/кг/минуту.

### *Показатели гликемии и инсулина*

Минимальные значения гипогликемии у пациентов с ФФ ВГИ равнялись 0,9 ммоль/л [0,7; 1,4], в то время как уровень инсулина на фоне гипогликемии соответствовал 15,5 мкМЕ/мл [8,9; 28,1]. На рисунке 9 представлены значения инсулина в момент гипогликемии.

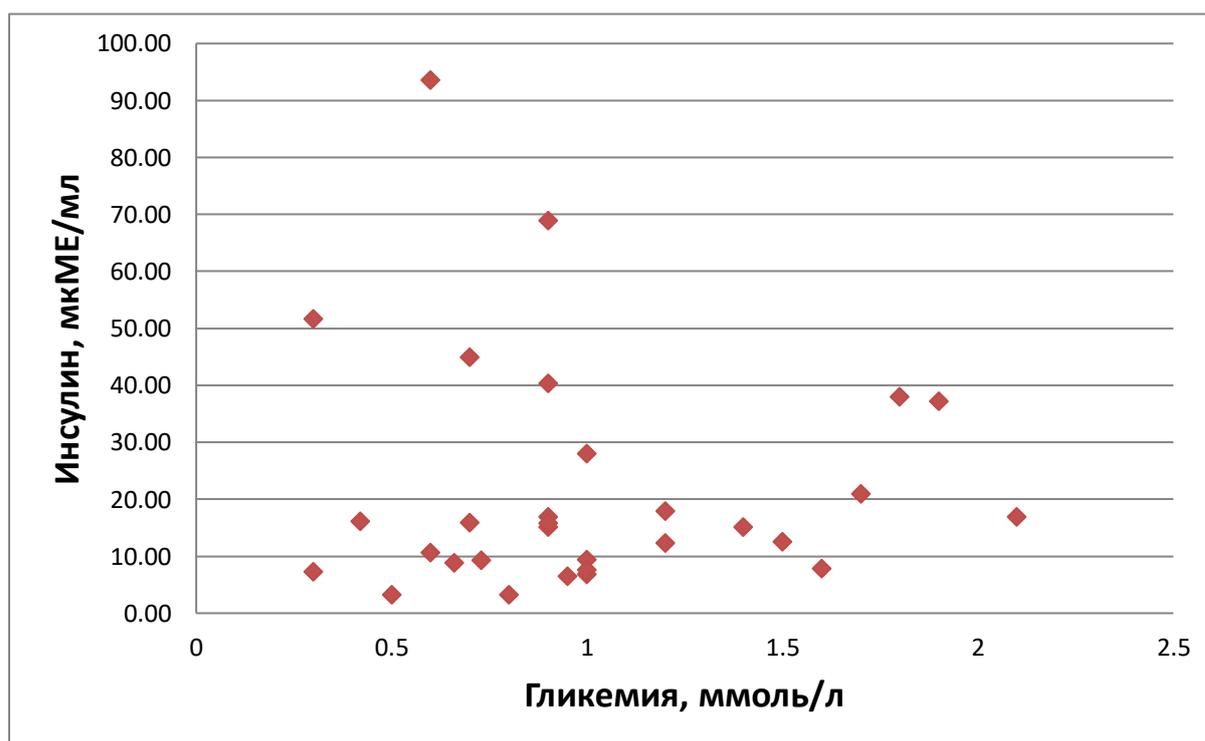


Рисунок 9 – Значения инсулина венозной крови в момент гипогликемии у пациентов с ФФ ВГИ

*Сравнение анамнестических и клинических параметров у пациентов с ФФ ВГИ и фармакорезистентным течением ДФ ВГИ*

Статистически значимой разницы между пациентами с ФФ и фармакорезистентным течением ДФ ВГИ по весу при рождении, возрасту манифестации, потребности во внутривенной терапии растворами глюкозы, минимальному значению гипогликемии и уровню инсулина во время гипогликемии не было обнаружено. Клинико-лабораторные данные двух групп пациентов представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Клинико-лабораторные показатели пациентов с фокальной формой ВГИ и фармакорезистентным течением диффузной формы ВГИ

Клинико-лабораторные характеристики	Фокальная форма ВГИ, Ме [межквартильный размах]	Диффузная форма ВГИ, фармакорезистентное течение, Ме [межквартильный размах]	Сравнение двух независимых групп по U – критерию Манна-Уитни
Возраст манифестации, дни	2 [1; 3], n=30	1 [1; 3], n=32	p= 0,30
Возраст постановки диагноза, дни	14 [14; 30], n=28	13 [4; 66], n=31	p= 0,41
Разница между возрастом манифестации и постановки диагноза, дни	14 [12; 32], n=28	14 [2; 65], n=31	p= 0,36
SDS веса при рождении по отношению к сроку гестации	1,0 [0,06; 1,99], n=30	1,40 [0,97; 2,35], n=26	p= 0,38
Минимальная зафиксированная гликемия, ммоль/л	0,9 [0,7; 1,4], n=30	1,0 [0,6; 1,1], n=32	p= 0,90
Инсулин плазмы на фоне гипогликемии,	15,5 [8,9; 28,1], n=30	15,5 [6,5; 27,7], n=32	p= 0,66

мкЕд/мл			
Скорость утилизации в/в вводимой глюкозы до достижения эугликемии, мг/кг/мин	12,3 [8,7; 15,0], n=22	11,0 [ 9,8; 15,0], n=18	p= 0,82

### *Неврологические осложнения заболевания*

Неврологические осложнения были выявлены у 19/30 пациентов с ФФ заболевания и у 17/32 у пациентов с фармакорезистентным течением ДФ ВГИ. Структура осложнений представлена на гистограмме ниже (Рисунок 10).

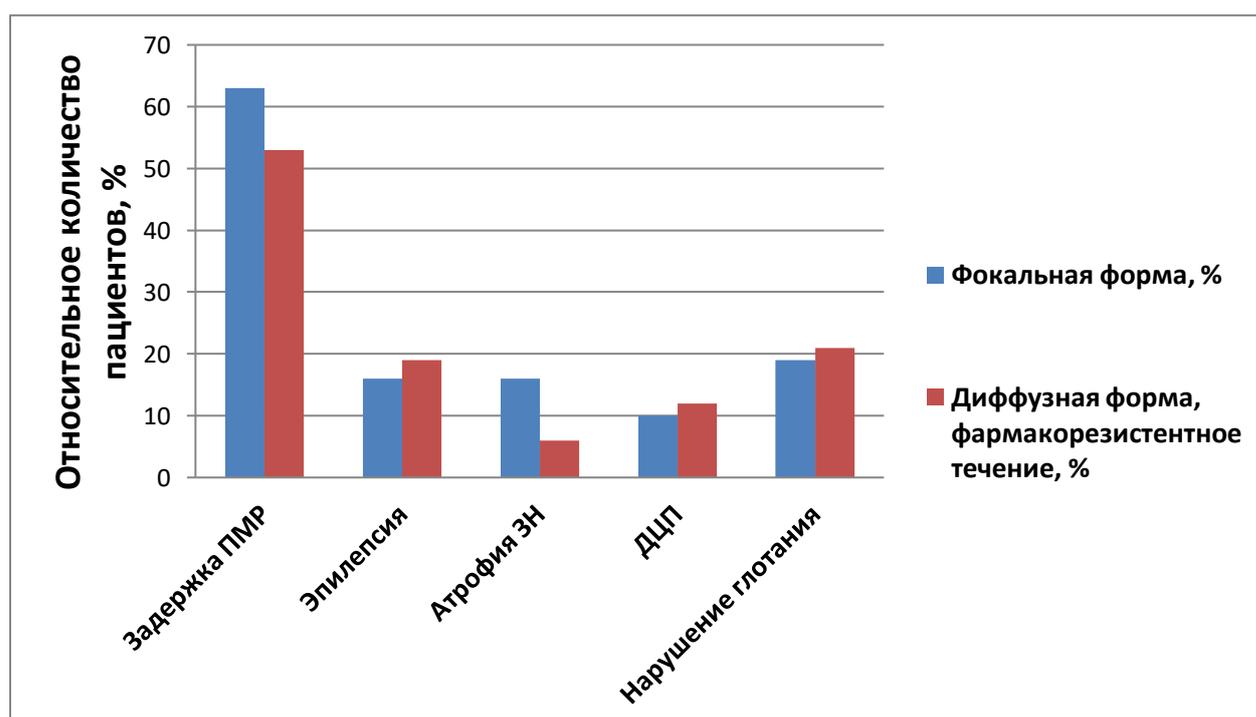


Рисунок 10 – Структура неврологических осложнений у пациентов с ФФ гиперинсулинизма и с фармакорезистентным течением ДФ заболевания

### *Факторы риска развития неврологических осложнений*

По результатам исследования не удалось выявить статистически значимых факторов риска развития неврологических осложнений. В качестве предполагаемых факторов риска были проанализированы недоношенность,

вес при рождении, минимальный уровень гликемии, уровень инсулина на фоне гипогликемии, а также разница между возрастом манифестации и возрастом начала терапии. При проведении сравнения двух независимых групп с помощью критерия Манна-Уитни (пациенты с наличием неврологических осложнений и пациенты без них) р-значение было больше 0,05 (Таблица 8).

Таблица 8 – Сравнение клинических и лабораторных показателей у пациентов с наличием и отсутствием неврологических осложнений

Клинико-лабораторные характеристики	Пациенты без неврологических осложнений, Ме [межквартильный размах]	Пациенты с неврологическими осложнениями, Ме [межквартильный размах]	Сравнение двух независимых групп по U – критерию Манна-Уитни
Срок гестации при рождении, нед	38,0 [38,0; 40,0], n=11	39,0 [38,0; 40,0], n=13	p= 0,69
SDS веса при рождении по отношению к сроку гестации	1,03 [0,48; 1,46], n=10	1,04 [0,9; 1,5], n=17	p= 0,98
Минимальный уровень гликемии, ммоль/л	0,7 [0,6; 1,0], n=11	1,0 [0,9; 1,5], n=19	p= 0,08
Уровень инсулина на фоне гипогликемии, мкМЕ/мл	12,4 [8,9; 28,1], n=11	15,8 [7,9; 37,2], n=19	p= 0,61
Разница между возрастом манифестации и возрастом начала терапии, дни	13 [7; 29], n=10	13 [12; 28], n=18	p= 0,56

### 3.2 Результаты молекулярно-генетического исследования

В проведенном исследовании причиной развития фокальной формы ВГИ в подавляющем большинстве случаев являлись гетерозиготные мутации в гене *ABCC8* (23/30, 77%, 95% ДИ: 67-90%). В сумме было выявлено 21 различные мутации, 11 из которых ранее не были описаны.

Патогенные и вероятно патогенные мутации в гене *KCNJ11* были обнаружены у 4/30 пациентов (13%, 95% ДИ: 4-231%). Данные мутации были унаследованы по отцовской линии, одна из мутаций ранее не была описана в литературе.

У 3/30 неродственных пациентов на отцовской аллели было выявлено идентичное сочетание мутаций в генах *ABCC8* и *KCNJ11*: патогенной мутации с.1038C>G: р.Y344X и вероятно патогенной мутации с.1096G>A, р.G366R.

В группе пациентов с ФФ ВГИ не было кровных родственников, также в семьях пробандов не было зарегистрировано близкородственных браков и отягощенного наследственного анамнеза по ВГИ. Обследование родителей пробандов было возможным в 20 семьях у пациентов с мутацией в гене *ABCC8* и у всех пациентов с мутацией в гене *KCNJ11*, а также с сочетанными мутациями. Было доказано, что у всех обследуемых мутации наследовались от отца.

Различий в клинико-лабораторных показателях у пациентов с ФФ ВГИ при наличии мутации в том или ином гене не обнаружено ( $p > 0.05$ ) (Таблица 9).

Таблица 9 – Сравнение клинико-лабораторных характеристик в группах пациентов с различными молекулярными причинами ФФ ВГИ (n=30)

Клинико-лабораторные характеристики	<i>ABCC8</i> (n=23) Me [межквартильный	<i>KCNJ11</i> (n=4) Me [межквартильный	<i>ABCC8+KCNJ11</i> (n=3) Me [межквартильный

	размах]	размах]	размах]
Возраст манифестации	2 дня [1 день; 3 дня]	2 дня [1 день; 51 день]	2 дня [1 день; 3 дня]
SDS веса при рождении по отношению к сроку гестации	1,1 [-0,1; 2,2]	0,48 [0,1; 0,8]	1,50 [1,0; 2,0]
Минимальная зафиксированная гликемия, ммоль/л	0,9 [0,7; 1,2]	1,2 [0,8; 1,7]	1,0 [0,9; 1,0]
Инсулин плазмы на фоне гипогликемии, Ед/л	16,0 [8,9; 38,0]	12,9 [8,6; 26,2]	15,8 [7,7; 28,1]
Скорость утилизации в/в вводимой глюкозы до достижения эугликемии, мг/кг/мин	9,0 [8,0; 15,0]	13,3 [12,5; 14,1]	12,7 [10,0; 18,0]

Результаты молекулярно-генетического исследования и клинические данные пациентов с фокальной формой ВГИ представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Спектр генетических нарушений и клинические данные пациентов с фокальной формой ВГИ

Ген	Но мер	Мутация	Клиническа я значимость	Пол	Возраст манифестац ии, дни	Потребность во в/в глюкозе, мг/кг/мин	Гликемия, ммоль/л	Инсулин, мкМЕ/мл	Неврологические нарушения
KCNJ11	1	c.400insG: p.R136AFsX5	Пат	м	2	14,1	1,9	37,2	ЗПМР, эпилепсия, АЗН, ДЦП
	2	c.560C>T: p.A187V	Пат	м	1	12,5	0,6	10,7	нет
	3	c.C761T: p.P254L	Пат	м	90	н/д	0,95	6,5	ЗПМР
	4	*c.A419G: p.E140G	н/д	м	3	13,3	1,4	15,2	ЗПМР, нарушение глотания
ABCC8	5	c.G1332T: p.Q444H	н/д	ж	2	12	0,7	45	нет
	6	c.G1332T: p.Q444H	н/д	ж	3	15	1,5	12,6	ЗПМР, нарушение глотания
	7	c.G1332T: p.Q444H	н/д	м	1	16,6	0,6	93,6	ЗПМР, эпилепсия, ДЦП
	8	c.G1332T: p.Q444H	н/д	ж	1	14	0,9	15,16	ЗПМР, нарушение глотания
	9	*c.1332+1delG	Пат	м	2	9	1,2	12,4	нет
	10	*c.G1705C: p.A569P	Неоп	м	6	9	1	6,9	ЗПМР
	11	*c1923+2T>A	Пат	ж	1	19	0,7	16	нет

12	*с.С2113Т:р.Р705Х	Пат	ж	1	н/д	1,8	38	нет
13	с.2521С>Т: р.Р841Х	н/д	ж	3	3,8	0,9	17	нет
14	с.2522G>C: р.Р841Р	н/д	м	2	18,2	2,1	17	ЗПМР, эпи
15	*с.2691С>G: р.Д897Е	Неоп	ж	1	15	0,3	7,27	нет
16	*с.3324dupС: р.М1109fs	Пат	ж	1	н/д	0,5	3,3	нет
17	*с.3330-13G>А	Неоп	м	1	н/д	0,8	3,24	ЗПМР
18	*с.3557+1G>А	Пат	м	1	н/д	0,66	8,91	нет
19	*с.Т3629С: р.Л1210Р	н/д	м	2	8	0,9	69	ЗПМР, АЗН, ДЦП
20	с.С3640Т: р.Р1215W	н/д	м	3	9	0,9	40,4	ЗПМР, АЗН
21	с.3989-9G>А	н/д	м	1	н/д	1	9,4	ЗПМР
22	*с.С4059А: р.У1353Х	н/д	ж	3	6,6	0,3	51,7	ЗПМР, эпи, наруш глотания

	23	c.C4238T: p.P1413L	н/д	ж	3	8	0,73	9,3	нет
	24	c.C4306G: p.R1436G	н/д	ж	2	н/д	1,2	18	ЗПМР
	25	c.G4411A: p.D1471N	н/д	ж	3	н/д	1,7	21	ЗПМР
	26	c.C4477T: p.R1493W	н/д	ж	1	7,7	0,42	16,2	ЗПМР, наруш глотания
	27	*c.4545+1G>C	Пат	ж	3	8,7	1,6	7,9	ЗПМР, эпи, АЗН
ABCC8 + KCNJ11	28	*ABCC8 c.1032C>G: p.Y344X *KCNJ11 c.1096G>A: p.G366R	ABCC8 – Пат KCNJ11 – Неоп	ж	3	12,7	0,9	15,8	ЗПМР, АЗН, наруш глотания
	29	*ABCC8 c.1032C>G: p.Y344X *KCNJ11 c.1096G>A: p.G366R	ABCC8 – ПатKCNJ11 – Неоп	ж	2	18	1	28,9	нет
	30	*ABCC8 c.1032C>G: p.Y344X *KCNJ11 c.1096G>A: p.G366R	ABCC8 – Пат KCNJ11 – Неоп	ж	1	10	1	7,7	ЗПМР

м – мужской пол, ж – женский пол, в/в – внутривенный, \* – мутация ранее не описана, пат – патогенный, неоп – неопределенной значимости, н/д – нет данных, ЗПМР – задержка психомоторного развития, ДЦП – детский центральный паралич, эпи – эпилепсия, наруш глот – нарушения глотания

В группе сравнения, у пациентов с ДФ ВГИ, у 72% (23/32, 95% ДИ: 53-86%) пациентов были обнаружены мутации в гене *ABCC8* и у 22% - в гене *KCNJ11* (7/32, 95% ДИ: 9-40%). Стоит отметить, что в 13 случаях мутации были гетерозиготными и имели доминантный характер наследования. У одного ребенка патогенная мутация была найдена в гене *GSK*. Также у одного пациента с ДФ ВГИ патогенных мутаций в исследованных генах не было обнаружено.

### **3.3 Результаты ПЭТ с 18F-ДОФА**

Всего ПЭТ с 18F-ДОФА была проведена 46 пациентам с ВГИ. Из них, для изучения радиоизотопной семиотики различных форм ВГИ были проанализированы результаты ПЭТ с 18F-ДОФА у 44 пациентов, так как у 2 пациентов отсутствовало морфологическое заключение о гистологической форме заболевания. Возраст проведения исследования составил 4 месяца [2; 5]. Количество пациентов в группах с ФФ и ДФ ВГИ представлено на рисунке 11.



Рисунок 11 – Схематическое описание групп пациентов с ВГИ, которым было проведено ПЭТ с 18F-ДОФА.

*Описание размеров и расположения фокусов гиперсекреции инсулина*

Информация о расположении и размере фокуса была доступна у 24/25 пациентов с ФФ ВГИ. При этом фокусы гиперсекреции инсулина у пациентов располагались в головке поджелудочной железы в 13 случаях из 24 (Рисунок 12). Максимальный размер фокуса гиперсекреции по данным ПЭТ с 18F-ДОФА варьировал от 7 до 46 мм (медиана 11 мм [8; 12,3 мм]).

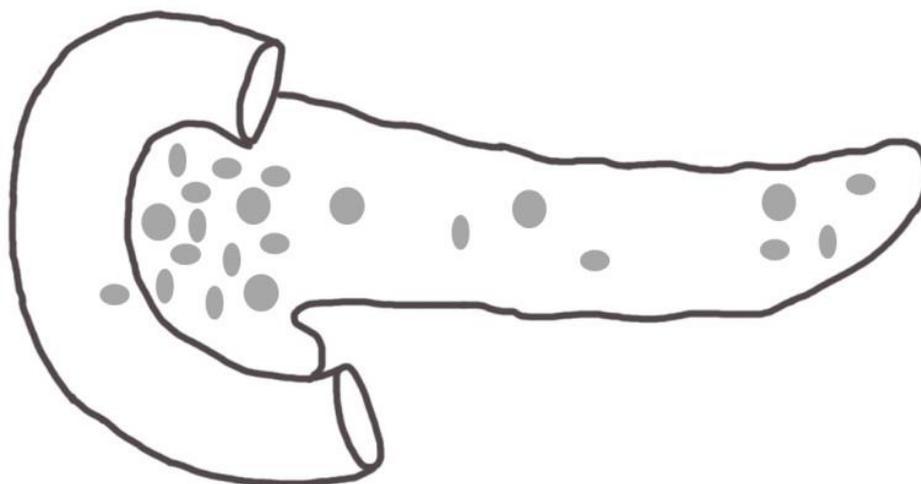


Рисунок 12 – Схематическое расположение фокусов у пациентов с ФФ ВГИ (n=24). В большинстве случаев (13/24) участок повышенного синтеза инсулина располагался в головке поджелудочной железы. У одного пациента фокус располагался на границе головки и тела, у 3 – в теле, у 4 – в хвосте поджелудочной железы [96].

В исследуемой группе пациентов у одного ребенка (пациент 17) при проведении ПЭТ с <sup>18</sup>F-ДОФА был визуализирован гигантский очаг повышенного захвата. Позднее, по результатам гистологического исследования, была установлена мультифокальная форма ВГИ. Представляет интерес тот факт, что пациент имел относительную компенсацию заболевания на фоне дробного кормления без применения медикаментозной терапии.

У другого пациента (пациент 22) диагностировано эктопическое расположение фокуса гиперинсулинизма в двенадцатиперстной кишке.

#### *Нежелательные явления*

Во время и после проведения ПЭТ с <sup>18</sup>F-ДОФА ухудшения общего состояния, аллергических реакций, развития флебита зарегистрировано не было. Побочным действием наркоза была сонливость в день проведения исследования.

*Оценка различия показателей ПЭТ с 18F-ДОФА при фокальной и диффузной формах ВГИ*

Подробные данные ПЭТ с 18F-ДОФА с СУН в разных временных промежутках, а также изображения радиоизотопного исследования были доступны у 14/25 пациентов с ФФ и у 19/19 пациентов с ДФ ВГИ. Однако, при исследовании в ряде случаев отмечались артефакты, обусловленные движениями пациентов, поэтому количество пациентов с рассчитанным СУН в каждом конкретном временном интервале могло отличаться от общего числа исследуемых. Нами были рассчитаны ПИ и альтернативный ПИ\* для каждого из пациентов в различные временные промежутки после введения радиофармпрепарата (Таблица 11).

Таблица 11 – Значения ПИ и ПИ\* у пациентов с фокальной и диффузной формами ВГИ

Номер пациента	Значение ПИ					Значение альтернативного ПИ*				
	1й интервал	2й интервал	3й интервал	4й интервал	Максимальное значение ПИ	1й интервал	2й интервал	3й интервал	4й интервал	Максимальное значение ПИ*
ФФ 2	1,84	1,96	1,83	2,04	2,04	1,46	1,52	1,51	1,56	1,56
ФФ 4	1,12	1,25	1,14		1,25	1,21	1,28	1,23		1,28
ФФ 5	2,66	3,18		3,59	3,59	1,72	1,88		1,95	1,95
ФФ 9		1,68	1,65	1,73	1,73		1,38	1,38	1,39	1,39
ФФ 10	1,82	2,01	1,87	2,05	2,05	1,44	1,51	1,46	1,53	1,53
ФФ 11	2,55	2,55	2,76	2,97	2,97	1,71	1,70	1,75	1,82	1,82
ФФ 12	1,39	1,59			1,59	1,27	1,40			1,40
ФФ 13	1,26	1,33	1,44		1,44	1,21	1,26	1,33		1,33
ФФ 15	1,59	1,68	1,86	1,85	1,86	1,35	1,40	1,47	1,48	1,48
ФФ 16	1,24	1,41	1,37	1,40	1,41	1,26	1,33	1,32	1,34	1,34
ФФ 17	1,06	1,01	1,12	1,16	1,16	1,13	1,09	1,14	1,12	1,14
ФФ 19	1,66	1,66	1,77	1,80	1,80	1,38	1,39	1,44	1,44	1,44
ФФ 24	1,10	1,16	1,16		1,16	1,14	1,19	1,20		1,20
ФФ 28	2,34	2,63	2,62	2,58	2,63	1,62	1,73	1,77	1,76	1,77
ДФ 1	1,19	1,27	1,27		1,27	1,14	1,20	1,20		1,20
ДФ 2	1,11	1,15	1,18		1,18	1,08	1,15	1,16		1,16
ДФ 3	1,02	1,09	1,11	1,07	1,11	1,04	1,08	1,11	1,08	1,11
ДФ 4	1,04	1,04	1,00	1,25	1,25	1,05	1,08	1,12	1,22	1,22
ДФ 5	1,01	1,05	1,03	1,00	1,05	1,02	1,03	1,02	1,01	1,03
ДФ 6	1,06		1,15		1,15	1,05		1,14		1,14
ДФ 7	1,01	1,01	1,01	1,02	1,02	1,08	1,07	1,10	1,08	1,10
ДФ 8	1,17	1,12	1,13	1,16	1,17	1,11	1,09	1,08	1,11	1,11
ДФ 9	1,17	1,01	1,03	1,01	1,17	1,25	1,05	1,07	1,06	1,25
ДФ 10	1,02	1,10	1,09	1,22	1,22	1,07	1,17	1,17	1,21	1,21
ДФ 11	1,24	1,27	1,31	1,23	1,31	1,16	1,17	1,21	1,15	1,21
ДФ 12	1,26	1,11	1,47	1,43	1,47	1,24	1,13	1,36	1,39	1,39

ДФ 13	1,01	1,04	1,04	1,38	1,38	1,03	1,09	1,09	1,33	1,33
ДФ 14	1,19	1,29	1,30	1,28	1,30	1,12	1,20	1,20	1,22	1,22
ДФ 15	1,22	1,30	1,18		1,30	1,21	1,24	1,21		1,24
ДФ 16	1,21	1,24	1,15	1,22	1,24	1,15	1,17	1,14	1,18	1,18
ДФ 17	1,16	1,06	1,11	1,18	1,18	1,10	1,06	1,10	1,13	1,13
ДФ 18	1,02	1,00	1,01	1,01	1,02	1,03	1,01	1,01	1,02	1,03
ДФ 19	1,01	1,03	1,06	1,10	1,10	1,03	1,02	1,05	1,08	1,08
Сравнение показателей И/ПИ* у пациентов с ФФ и ДФ ВГИ по U-критерию Манна-Уитни	p<0,001									

ФФ – пациенты с фокальной формой ВГИ (выделены зеленым цветом), ДФ – пациенты с диффузной формой ВГИ (выделены синим цветом).

По полученным данным, при ФФ заболевания отмечались более высокие значения ПИ и ПИ\* в каждом из временных интервалов и при сравнении максимальных значений (Рисунок 13).

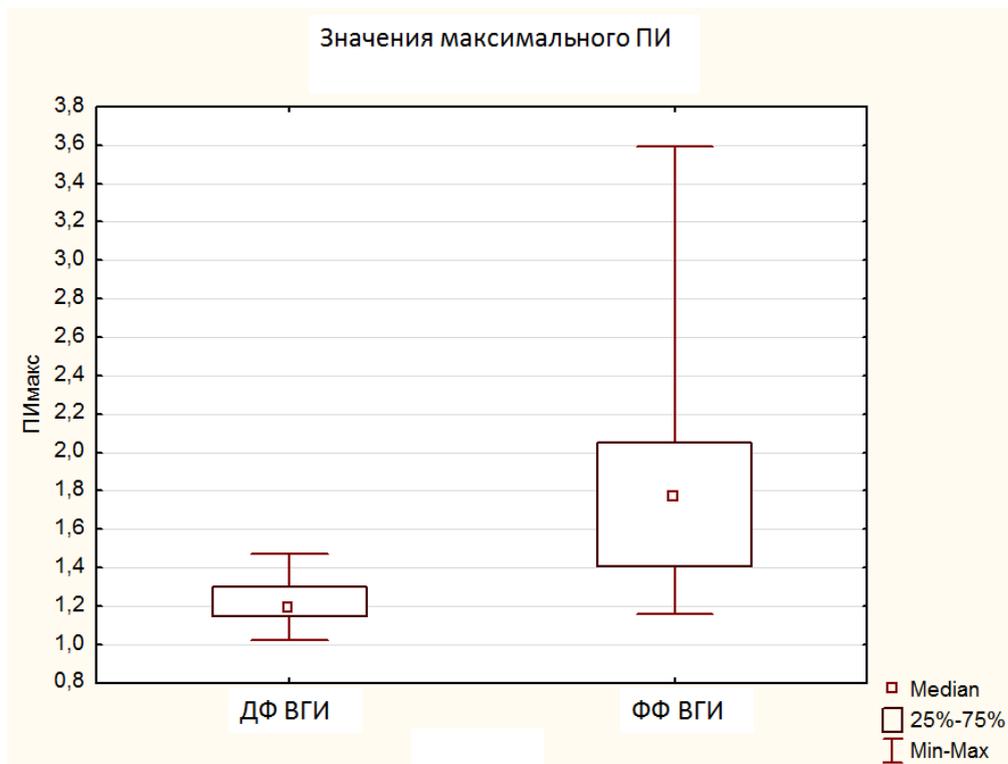


Рисунок 13 – Иллюстрация разброса максимального значения ПИ при ДФ и ФФ ВГИ по результатам ПЭТ с 18F-ДОФА.

Несмотря на очевидные различия в значениях ПИ и ПИ\* ( $p < 0,001$ ) в группах сравнения, сложность дифференциальной диагностики гистологической формы заболевания определяет широкий диапазон значений ПИ/ПИ\* при ФФ. Для примера приведена гистограмма колебаний значения ПИ у пациентов на первом временном промежутке после введения радиофармпрепарата (Рисунок 14).

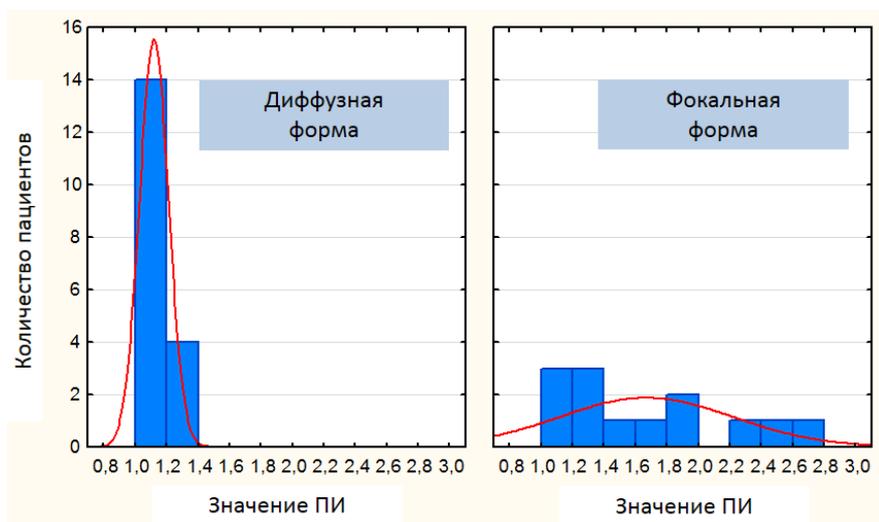


Рисунок 14 – Гистограмма колебания значений ПИ у пациентов с ДФ и ФФ через 10-20 минут после введения радиофармпрепарата.

Значение ПИ у пациентов с ДФ остается менее 1,4 в данном промежутке времени. Однако тот же параметр у пациентов с ФФ широко варьирует от 1,0 до 2,8, что представляет сложность для дифференциальной диагностики данных форм.

#### *Диагностическая точность ПЭТ с 18F-ДОФА при расчете ПИ*

Оценка диагностической точности ПИ для дифференциации той или иной формы заболевания проводилась методом построения ROC-кривых и расчета площади под кривой (AUC). Результаты расчетов представлены в Таблице 12. Полученные данные указывают на высокую точность метода на всех временных интервалах ( $AUC > 0,85$ ).

Таблица 12 – Значение AUC при оценке ПИ по результатам ПЭТ с 18F-ДОФА

Расчет ПИ	AUC	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% ДИ	Число пациентов, n
Первый временной интервал	0,872	0,001	0,74 – 1,00	32

Второй временной интервал	0,901	0,001	0,77 – 1,00	32
Третий временной интервал	0,890	0,001	0,77 – 1,00	31
Четвертый временной интервал	0,937	0,001	0,82 – 1,00	25
Максимальное значение ПИ	0,870	0,001	0,73-1,00	33

*Диагностическая точность ПЭТ с 18F-ДОФА при расчете ПИ\**

По полученным результатам, расчетные показатели ПИ\*, так же как и ПИ, имеют существенную диагностическую ценность (AUC>0,90) (Таблица 13).

Таблица 13 – Значение AUC при оценке ПИ\* по результатам ПЭТ с 18F-ДОФА

Расчет ПИ*	AUC	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% ДИ	Число пациентов, n
Первый временной интервал	0,933	0,001	0,85 – 1,00	32
Второй временной интервал	0,952	0,001	0,88 – 1,00	32
Третий временной интервал	0,934	0,001	0,85 – 1,00	31
Четвертый временной интервал	0,937	0,001	0,83 – 1,00	25
Максимальное значение ПИ*	0,906	0,001	0,80-1,00	33

*Диагностическая значимость метода при использовании общепринятых расчетных показателей*

В настоящее время в международной практике [49] расчетным критерием диагностики ФФ ВГИ является максимальный ПИ со значением более 1,5. Мы провели оценку специфичности, диагностической точности и других параметров данного способа диагностики в нашей группе пациентов.

В случае выбора критерия ПИ  $>1,5$  для постановки диагноза ФФ ВГИ отмечается относительно высокая специфичность. Однако, учитывая колебания доверительного интервала, диагностическая точность метода является недостаточной (85%, 95% ДИ: 67-94%). Также из-за низкой чувствительности (64%, 95% ДИ: 35-87%) нельзя исключить возможность ложноотрицательных результатов теста, что может привести к неверному выбору объема хирургического лечения, а именно, к субтотальной панкреатэктомии у пациентов с ФФ ВГИ. Мы обратили внимание, что в нашем исследовании у трети пациентов с ФФ ВГИ (5/14) значение максимального ПИ было менее 1,5, что не согласуется с общепринятыми критериями. Подробные результаты подсчета представлены в Таблице 14.

Таблица 14 – Диагностические параметры ПЭТ с 18F-ДОФА при использовании стандартного метода установки ФФ ВГИ

	Специфичность	Чувствительность	Вероятность наличия ФФ при отрицательном результате	Диагностическая точность
Значение, (95% ДИ), число пациентов	100 % (66- 100%), 19/19	64 % (35-87%), 9/14	21% (8-43%), 5/24	85% (67-94%), 28/33

*Оценка диагностической ценности метода при использовании предложенных отрезных точек ПИ*

На основании построенных ROC-кривых мы выбрали оптимальные отрезные точки ПИ для проведения дифференциальной диагностики двух морфологических форм ВГИ. Выбор той или иной отрезной точки по ROC-

кривым был обусловлен необходимостью достижения максимальной специфичности при установке ФФ заболевания (алгоритм выбора отрезных точек описан в разделе «Материалы и методы»). Данная тактика позволила выделить отрезные точки, выше которых с достаточной уверенностью возможно диагностирование ФФ ВГИ на основании объективных данных. Оптимальные отрезные точки ПИ для каждого из временных промежутков представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Диагностическая ценность метода для предложенных отрезных точек ПИ

Предлагаемая отрезная точка ПИ, выше которой диагностируется ФФ, ниже или равно – ДФ ВГИ	Специфичность (95% ДИ), число пациентов	Чувствительность (95% ДИ), число пациентов	Вероятность ФФ при отрицательном результате теста (95% ДИ), число пациентов	Диагностическая точность (95% ДИ), число пациентов
1,32 на первом временном интервале	100% (82-100%), 19/19	62% (32-86%), 8/13	21% (8-43%), 5/24	84% (66-94%), 27/32
1,31 на втором временном интервале	100% (81-100%), 18/18	79% (49-95%), 11/14	14% (4-37%), 3/12	91% (74-98%), 29/32
1,45 на третьем временном интервале	95% (74-100%), 18/19	58% (28-85%), 7/12	22% (8-44%), 5/23	81% (62-92%), 25/31
1,41 на четвертом временном интервале	93% (68-100%), 14/15	80% (44-98%), 8/10	13% (2-40%), 2/16	88% (68-97%), 22/25
1,45 (максимальное значение ПИ)	95% (74-100%), 18/19	64% (35-87%), 9/14	22% (8-44%), 5/12	82% (64-92%), 27/33

По результатам анализа, оптимальной отрезной точкой для ПИ оказалось значение 1,31 через 30-40 минут после введения радиофармпрепарата. При ПИ выше данной точки с высокой специфичностью можно определить ФФ, а также отмечается относительно высокая диагностическая точность.

*Оценка диагностической ценности метода при использовании предложенных отрезных точек ПИ\**

Также нами были предложены альтернативные отрезные точки при расчёте ПИ\* и проведена оценка специфичности, чувствительности и вероятности наличия ФФ ВГИ при отрицательных результатах теста. Методика выбора отрезной точки ПИ\* совпадала с описанной выше для ПИ. Результаты анализа представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Диагностическая ценность метода при предложенных отрезных точках для альтернативного ПИ\*

Предлагаемая отрезная точка ПИ*, выше которой диагностируется ФФ, ниже или равно -ДФ	Специфичность (95% ДИ), число пациентов	Чувствительность (95% ДИ), число пациентов	Вероятность ФФ при отрицательном результате теста (95% ДИ), число пациентов	Диагностическая точность (95% ДИ), число пациентов
1,26 на первом временном интервале	100% (82-100%), 19/19	69% (39-91%), 9/13	17% (0-38%), 4/13	88% (70-96%), 28/32
1,22 на втором временном интервале	94% (73-100%), 17/18	86% (57-99%), 12/14	11% (0-36%), 2/19	91% (74-98%), 29/32

1,37 на третьем временном интервале	100% (82-100%), 19/19	58% (28-85%), 7/12	21% (8-43%), 5/24	84% (66-94%), 26/31
1,37 на четвертом временном интервале	93% (68-100%), 14/15	80% (44-98%), 8/10	13% (0-40%), 2/16	88% (68-97%), 22/25
1,36 (максимальное значение ПИ)	95% (74-100%), 18/19	64% (35-87%), 9/14	22% (0-54%), 5/13	82% (64-92%), 27/33

Исходя из полученных данных, при оценке ПИ\* оптимальной отрезной точкой представляется 1,26 на первом интервале исследования. Выше данной отрезной точки ФФ ВГИ может быть диагностирована с высокой специфичностью. Диагностическая точность при использовании данной отрезной точки составляет 88% (95% ДИ: 70 - 96%).

*Оценка диагностической ценности метода при использовании комплексной оценки*

В связи с широким разбросом ПИ у пациентов с ФФ заболевания, в клинической практике приходится полагаться не только на объективные показатели, но и на визуальную картину исследования. Также, по полученному опыту, у некоторых пациентов с ФФ ВГИ значение ПИ может не превышать стандартный порог в 1,5. В связи с этим было принято решение снизить пороговое значение ПИ до 1,0 и провести анализ диагностической ценности метода при комплексной оценке. Так, ФФ ВГИ устанавливалась при значении максимального ПИ более 1,0 в совокупности с наличием дискретного очага повышенного накопления радиофармпрепарата (Таблица 17).

Таблица 17 – Диагностическая ценность метода при комплексной оценке ПИ с учетом визуальной картины исследования

	Специфичность (95% ДИ), число пациентов	Чувствительность (95% ДИ), число пациентов	Вероятность ФФ при отрицательном результате теста (95% ДИ), число пациентов	Диагностическая точность (95% ДИ), число пациентов
Значение в %, (95% ДИ), число пациентов	95% (74-100%), 18/19	100% (77-100%), 14/14	0% (0-18%), 0/18	97% (82-100%), 32/33

*Сравнительная диагностическая точность ПЭТ с 18F-ДОФА при оценке различных расчетных параметров и при комплексной оценке*

Суммируя полученные данные, мы провели сравнительный анализ диагностической ценности радиоизотопного исследования для дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ с использованием различных методов (Рисунок 15):

- Стандарт: при значении максимального ПИ выше 1,5 устанавливается ФФ ВГИ;
- Точка 1: предлагаемая отрезная точка ПИ 1,31 на втором временном интервале, выше которой устанавливается ФФ ВГИ;
- Точка 2: предлагаемая отрезная точка ПИ\* 1,26 на первом временном интервале, выше которой устанавливается ФФ ВГИ;
- Комплексная оценка: совокупная оценка математических расчетов и визуальных данных (значение максимального ПИ > 1,0 и наличие очага повышенного захвата радиофармпрепарата предполагают ФФ).

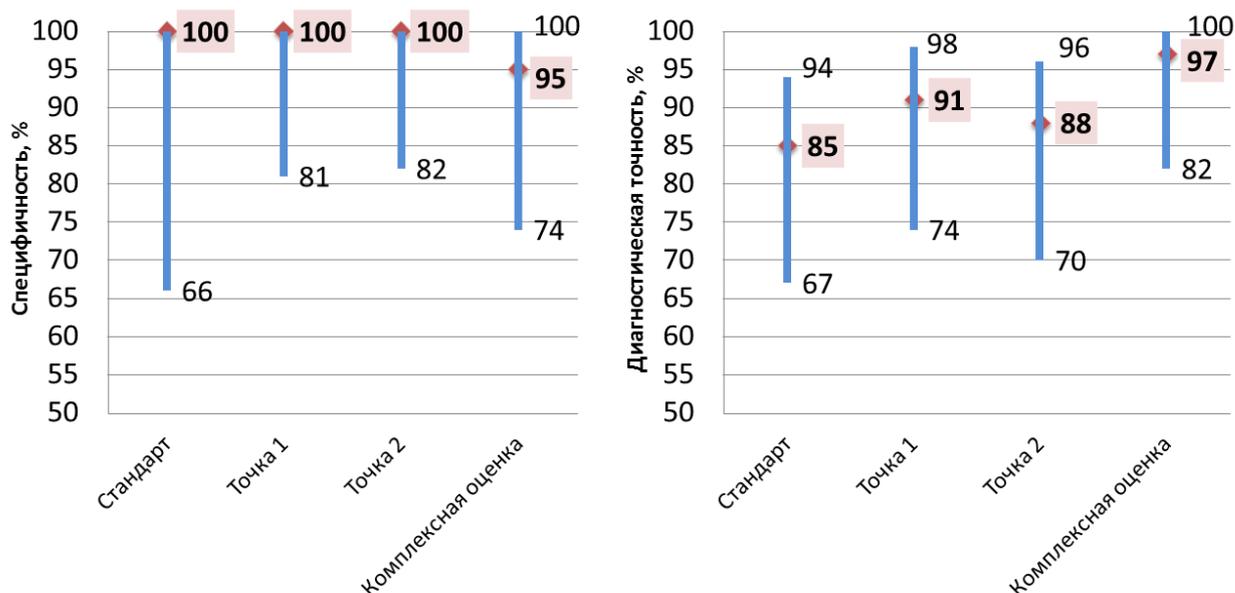


Рисунок 15 – Сравнительная оценка диагностической ценности ПЭТ с 18F-ДОФА для дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ с использованием различных методов. Условные обозначения: красная точка – процентное значение параметра, синяя полоса – 95% ДИ исходного параметра.

Каждый из методов в целом обладает хорошими показателями для дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ. По результатам сравнения предложенные нами отрезные точки и комплексная оценка имеют ряд преимуществ перед стандартным методом: 1) более узкие доверительные интервалы для специфичности; 2) более высокая диагностическая точность; 3) меньшая вероятность ФФ при отрицательном результате теста. Также нами было отмечено, что среди объективных методов исследования оптимальной отрезной точкой для установки ФФ заболевания является значение 1,31 через 30-40 минут после введения 18F-ДОФА. Однако, наибольшей диагностической точностью (97%, 95%ДИ: 82-100%) и наименьшей вероятностью ФФ при отрицательном результате теста (0%, 95%ДИ: 0-18%) обладает комплексная оценка расчетных и визуальных данных.

### 3.4 Лечение и отдаленные наблюдения

#### *Медикаментозная терапия*

С целью достижения эугликемии до момента определения морфологической формы ВГИ, помимо внутривенного введения растворов глюкозы, пациентам проводилась инсулиностатическая терапия (диазоксид – 19/30, октреотид – 30/30). Максимальная доза диазоксида составила 14,9 мг/кг/сут. [12,8; 15,6]. Максимальная суточная доза октреотида составила 13,7 мкг/кг [8,0; 20,0]. Терапия диазоксидом была отменена у всех получавших его пациентов в связи с отсутствием положительного эффекта (17/19) либо из-за развития таких побочных эффектов, как отеки, анорексия, рвота (2/19). Применение октреотида оказалось более успешным, у 9/30 пациентов (30%, 95%ДИ: 15-49%) удалось достичь субкомпенсации заболевания без внутривенной инфузии глюкозы. У одного пациента отмечались приемлемые показатели гликемии с сохранением эпизодов гипогликемии на фоне частого дробного кормления, медикаментозная терапия оказалась неэффективной.

#### *Оперативное лечение*

Несмотря на относительную эугликемию на фоне диетотерапии и лечения октреотидом, у части пациентов наблюдались периодические эпизоды гипогликемии. В дальнейшем, в связи с предположением о наличии фокальной формы ВГИ по результатам молекулярно-генетического исследования и ПЭТ с 18F-ДОФА, всем пациентам было проведено оперативное лечение (30/30). Необходимость проведения хирургического вмешательства была обусловлена высоким риском развития гипогликемии на фоне пропуска приема пищи, тахифилаксией при применении октреотида, а также возможностью полного излечения после проведения резекции фокуса [23]. Данные о терапии до операции и ее исходах представлены в таблице 18.

Большой части детей была выполнена резекция участка аденоматоза

(25/30) с проведением интраоперационной гистологической диагностики для оценки формы заболевания. Некоторым пациентам (5/30) была проведена субтотальная панкреатэктомия. Выбор данного объема оперативного вмешательства был продиктован отсутствием возможности проведения ПЭТ/КТ с 18F-ДОФА на момент операции. Пациенту 22 (Таблица 10) была проведена резекция фокуса в головке поджелудочной железы с удалением части двенадцатиперстной кишки, где располагался эктопированный очаг гиперпродукции инсулина.

Продолжительность наблюдения за пациентами составила 20 месяцев [10; 35]. В группе пациентов после резекции фокуса у 21/25 отмечалась эугликемия на фоне обычного режима кормления, у 2/25 пациентов отмечалась потребность в частом кормлении, в остальных случаях (2/25) данные об отдаленном исходе операции не были доступны. У пациента 9 в послеоперационном периоде сохранялись гипогликемические состояния в течение 1 года, потребовавшие применения непрерывного подкожного введения октреотида. При последующем обследовании в возрасте 1 года 4 месяцев у него была констатирована ремиссия ВГИ с кетотическими гипогликемиями, что потребовало частого кормления и введения в рацион кукурузного крахмала. У пациента 24 (Таблица 10) после хирургического лечения были зафиксированы гипогликемические состояния. Неадекватная гиперсекреция инсулина была исключена лабораторно, однако генез гипогликемических состояний остается неясным. В настоящий момент данному пациенту рекомендовано кормление по требованию в течение дня и прием кукурузного крахмала на ночь.

После проведения субтотальной панкреатэктомии более чем у половины пациентов развился сахарный диабет (3/5), у всех пациентов отмечалась экзокринная недостаточность поджелудочной железы (5/5).

Таблица 18 – Данные по медикаментозному и хирургическому лечению у пациентов с фокальной формой ВГИ

Ген	Номер	Гетерозиготные патогенные мутации	Расположение фокуса	Размер фокуса, мм	Терапия до операции	Возраст операции	Операция	Возраст на момент последнего обследования	Терапия на момент последнего обследования
KCNJ11	1	c.400insG: p.R136AFsX5	н/д	не делали	н/д	2 мес.	с/т ПЭ	9 лет 10 мес.	б/т
	2	c.560C>T:p.A187V	головка	10,7x8,9x7,7	октр	4 мес.	резекция фокуса	7 мес.	б/т
	3	c.C761T: p.P254L	головка	н/д	октр	2 года 6 мес.	резекция фокуса	6 лет 8 мес.	б/т
	4	*c.A419G: p.E140G	тело	12,3x9,6x9,7	диета+октр	1 год 10 мес.	резекция фокуса	3 года 3 мес.	б/т
ABCC8	5	c.G1332T:p.Q444H	головка	12x12x10	диета+октр	5 мес.	резекция фокуса	1 год 10 мес.	н/д
	6	c.G1332T:p.Q444H	н/д	н/д	н/д	4 мес.	резекция фокуса	8 лет 10 мес.	б/т
	7	c.G1332T:p.Q444H	н/д	не делали	глюк	3 мес.	с/т ПЭ	15 лет 9 мес.	инсулин
	8	c.G1332T:p.Q444H	тело	2x4x7	глюк+октр	3 мес.	резекция фокуса	3 года 8 мес.	б/т
	9	*c.1332+1delG	н/д	н/д	глюк+октр	4 мес.	резекция фокуса	2 года 4 мес.	диета
	10	*c.G1705C:p.A569P	головка	9,4x10x12,4	диета+октр	3 мес.	резекция фокуса	1 год 10 мес.	б/т
	11	*c.1923+2T>A	головка	12,8x15,56x22	глюк+октр	4 мес.	резекция фокуса	1 год 9 мес.	б/т

12	*с.С2113Т:p.R705X	хвост	н/д	диаз+октр	7 мес.	резекция фокуса	2 года 6 мес.	б/т
13	с.2521С>Т: p.R841X	головка	11,9x12x9,3	диета+октр	2 мес.	резекция фокуса	1 год 9 мес.	н/д
14	с.2522G>С: p.R841P	н/д	не делали	глюк	1 мес.	с/т ПЭ	9 лет 5 мес.	инсулин
15	*с.2691С>G:p.D897E	тело	13,6	глюк+октр	н/д	резекция фокуса	1 год 4 мес.	б/т
16	*с.3324dupC:p.M1109fs	головка	13,2x11,4x12,94	диета+октр	12 мес.	резекция фокуса	1 год 11 мес.	б/т
17	*с.3330-13G>A	мультифокус	46,5x21,5x20	диета	5 мес.	резекция фокуса	1 год 9 мес.	б/т
18	*с.3557+1G>A	головка	8	глюк+октр	3 мес.	резекция фокуса	3 года 5 мес.	б/т
19	*с.Т3629С:p.L1210P	головка	11x10,4x11	октр	6 мес.	резекция фокуса	2 года	б/т
20	с.С3640Т:p.R1215W	н/д	не делали	глюк	5 мес.	с/т ПЭ	8 лет 5 мес.	инсулин
21	с.39989-9G>A	хвост	6x8x5	диета+октр	1 год 9 мес.	резекция фокуса	7 лет 6 мес.	б/т
22	*с.С4059А:p.Y1353X	Эктопия в 12пк	н/д	октр	1 год 6 мес.	резекция фокуса	4 года 9 мес.	б/т

	23	c.C4238T:p.P1413L	хвост	н/д	глюк+октр	4 мес.	резекция фокуса	3 года 3 мес.	б/т
	24	c.C4306G:p.R1436G	головка и тело	8,2x7,1x6,0	диета+октр	12 мес.	резекция фокуса	2 года 5 мес.	диета
	25	c.G4411A:p.D1471N	головка	н/д	октр	2 года 4 мес.	резекция фокуса	8 лет 3 мес.	б/т
	26	c.C4477T:p.R1493W	н/д	н/д	диета+октр	н/д	резекция 27фокуса	4 года 1 мес.	б/т
	27	*c.4545+1G>C	хвост	7	глюк+октр	1 мес.	резекция фокуса	5 лет	б/т
	ABCC8 + KCNJ11	28	*ABCC8 c.1032C>G: p.Y344X *KCNJ11 c.1096G>A: p.G366R	головка	8,3x10x11	глюк+октр	2 мес.	резекция фокуса	4 мес.
29		*ABCC8 c.1032C>G: p.Y344X *KCNJ11 c.1096G>A: p.G366R	головка	7	глюк+октр	3 мес.	резекция фокуса	2 года 5 мес.	б/т

	30	*ABCC8 c.1032C>G: p.Y344X *KCNJ11 c.1096G>A: p.G366R	н/д	не делали	глюк	1 год 6 мес.	с/т ПЭ	8 лет 11 мес.	б/т

мес – месяцев; б/т – без терапии; октр – октреотид; глюк – глюкоза; с/т ПЭ – субтотальная панкреатэктомия; н/д – нет данных

### 3.5 Иммуногистохимическое исследование

ИГХ-исследование было проведено на препаратах поджелудочной железы 10 пациентам с ФФ ВГИ, 7 пациентам с фармакорезистентным течением ДФ ВГИ и 7 пациентам без признаков нарушения углеводного обмена (Таблица 19).

Таблица 19 – Основные характеристики пациентов, которым было проведено ИГХ-исследование

Пациент	Пол	Вес при рождении, гр	Ген	Мутация	Возраст операции, мес	ИГХ инсулин	ИГХ ГПП-1	ИГХ p57
ФФ 4	м	4770	KCNJ11	*с.А419G: р.Е140G, гетероз, отц	22	+	+	+
ФФ 24	ж	2700	ABCC8	с.С4306G: р.Р1436G, гетероз, отц	12	+	+	-
ФФ 16	ж	2750	ABCC8	*с.3324dupC: р.М1109fs, гетероз, отц	12	+	+	+
ФФ 17	м	4220	ABCC8	*с.3330-13G>A, гетероз, отц	5	+	-	-
ФФ 15	ж	3750	ABCC8	*с.2691C>G: р.Д897Е, гетероз, отц	2	+	+	+
ФФ 11	ж	4300	ABCC8	*с.1923+2Т>А, гетероз, отц	4	+	+	+
ФФ 19	м	3300	ABCC8	*с.Т3629С: р.L1210P, гетероз, отц	6	+	+	+
ФФ 12	ж	4060	ABCC8	*с.С2113Т: р.Р705Х, гетероз, отц	7	+	+	+
ФФ 5	ж	4770	ABCC8	с.G1332T: р.Q444H, гетероз, отц	5	+	+	+
ФФ 10	м	4040	ABCC8	*с.G1705C: р.A569P, гетероз, отц	3	+	+	-
ДФ1	ж	3750	GCK	с.1361_1363dupCGG гетероз	19	+	+	+

ДФ2	ж	4450	ABCC8	p.Q444H и p.R1250X гетероз, компаундная	26	+	+	+
ДФ3	ж	4770	нд	нд	5	+	+	-
ДФ4	ж	2260	KCNJ11	c.1037C>T: p.A346V, гомоз	8	+	+	+
ДФ5	ж	3430	ABCC8	p.Y1286X/p.N786del, комп гетероз	34	+	-	-
ДФ6	ж	4380	KCNJ11	c.405dupG : p.R136AfsX 5, гомоз	2	+	+	+
ДФ7	ж	5550	ABCC8	p.C87R, гомоз	3 и 5	+	+	+
Контроль			Посмертный диагноз		Возраст смерти			
K1	ж	2900	<p>Множественные врожденные пороки развития: омфалоцеле, дистрофия миокарда, стеноз легочной артерии, гипоплазия легких, дефект развития позвоночника, укорочение трубчатых костей конечностей.</p> <p>Причина смерти: множественные врожденные пороки развития несовместимые с жизнью в сочетании с асфиксией новорожденного, возникшей в результате преждевременной частичной острой отслойки базальной пластинки плаценты и плодных оболочек на фоне декомпенсированной формы хронической плацентарной недостаточности.</p>		40 нед+ 1 день	+	-	-
K2	м	2860	<p>Множественные врожденные пороки развития: трахеопищеводный свищ, открытый артериальный проток, открытое овальное окно, недостаточность трикуспидального клапана, мультикистозная трансформация правой почки.</p> <p>Оперативное лечение: задняя торакотомия справа, перевязка трахеопищеводного свища, пластика пищевода.</p> <p>После операции развилась острая почечная недостаточность, нарастание сердечно-легочной недостаточности, неподдающееся медикаментозной коррекции.</p>		40 нед + 8 дней	+	-	-
K3	ж	н/д	<p>Низкодифференцированная гепатобластома и мальформация кровеносных сосудов правой доли печени, осложнившихся послеоперационным кровотечением с развитием геморрагического шока</p>		3 месяца	+	-	-
K4	м	1720	<p>ДВС-синдром с массивными кровоизлияниями и развитием гемморагического инфаркта вещества головного мозга на фоне бактериального сепсиса</p>		34нед+2 8 дней	+	-	+

K5	м	3080	Внутриутробный сепсис, септикопиемия в сочетании с врожденным пороком сердца (открытое овальное окно, открытый артериальный проток, правостороннее расположение дуги аорты, дополнительная диагональная хорда левого желудочка)	36 нед+7 дней	+	-	+
K6	д	1410	ДВС-синдром с массивными кровоизлияниями в мягкие мозговые оболочки и вещество полушарий мозжечка с кровотечением в заднюю черепную ямку на фоне сепсиса, септикопиемии, дыхательная недостаточность	30 нед+16 дней	+	-	+
K7	м	1640	ДВС-синдром с массивными кровоизлияниями в сосудистые сплетения и кровотечением в желудочки головного мозга на фоне сепсиса, септикопиемии	33 нед+9 дней	+	-	+

м – мужской пол, ж – женский пол; гетероз – гетерозиготная мутация; гомоз – гомозиготная мутация; комп гетероз – компаундная гетерозиготная мутация; отц – мутация наследована от отца; н/д – нет данных; ФФ – фокальная форма; ДФ – диффузная форма; К – группа контроля; знак «+» – ИГХ-исследование проводилось; знак «-» – ИГХ-исследование не проводилось; зеленым цветом выделены пациенты с ФФ ВГИ; синим цветом выделены пациенты с ДФ ВГИ; серым цветом выделены пациенты из группы контроля.

#### *ИГХ-исследование с антителами к инсулину*

При проведении исследования участок гиперсекреции инсулина (фокус) был визуализирован у 4/10 пациентов с ФФ ВГИ, у оставшихся пациентов препарат поджелудочной железы был представлен тканью вне фокуса. В фокусе отмечалась интенсивная сплошная окраска антителами к инсулину на протяжении всего участка без возможности выделить отдельные островки Лангерганса, что ярко отличало данный участок.

Вне фокуса визуализировались отдельные эндокринные островки, а также одиночные эндокринные клетки. В целом, ткань поджелудочной железы вне фокуса была схожа с тканью поджелудочной железы у пациентов с ДФ ВГИ и у пациентов без признаков нарушения углеводного обмена. Однако, имелось заметное различие в форме островков Лангерганса в группах пациентов: у 9/10 пациентов с ФФ ВГИ (90%, 95% ДИ: 56 – 100%) островки Лангерганса вне фокуса аденоматоза имели неровные края и неправильную продолговатую форму, в то время как эндокринные островки

у пациентов с ДФ заболевания и в группе детей с предположительно здоровой тканью поджелудочной железы имели ровную округлую или овальную форму с четкими краями (Рисунок 16).

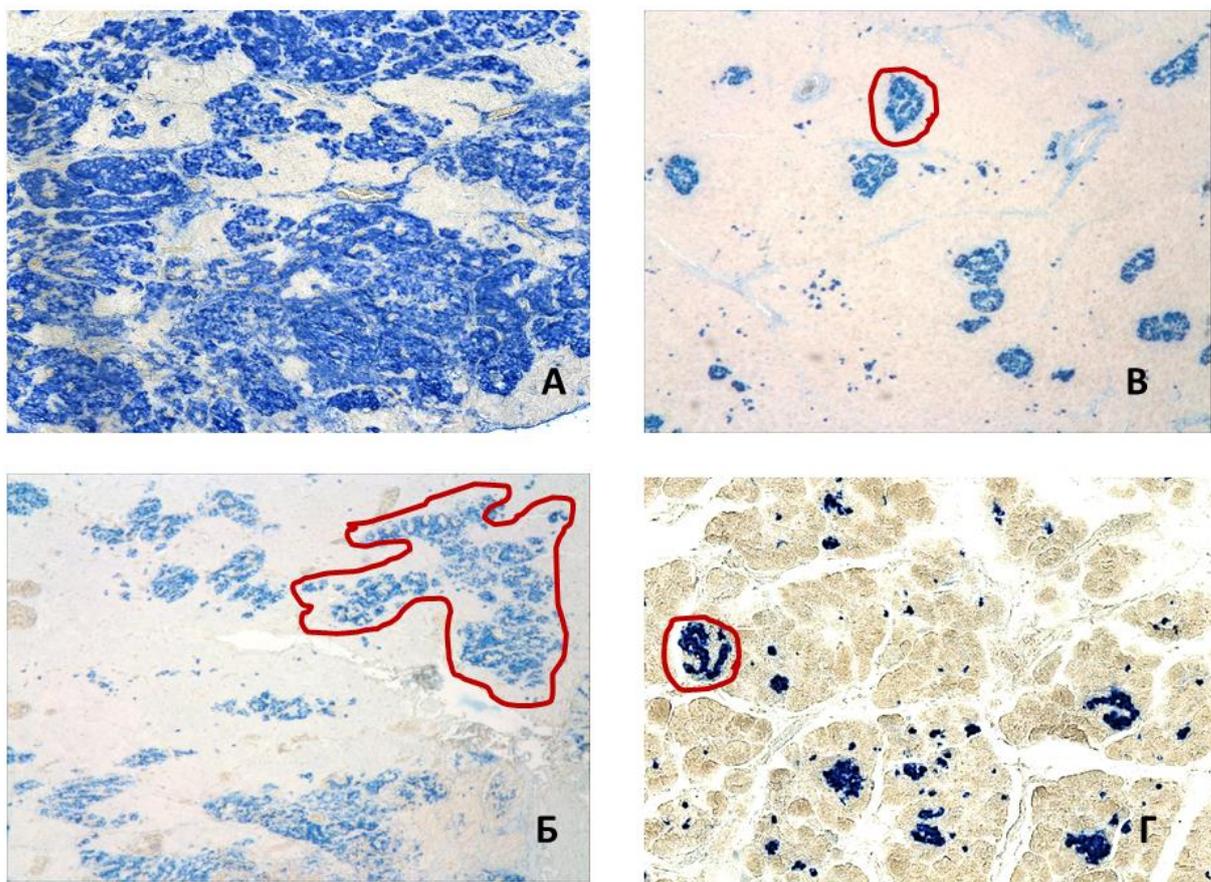


Рисунок 16 – Разница в форме островков у пациентов с ФФ по сравнению с пациентами с ДФ ВГИ и пациентов без признаков нарушения углеводного обмена. Некоторые островки Лангерганса выделены красной линией. Слайд А: фокус гиперсекреции инсулина у пациента с ФФ ВГИ, прооперированного в 22 месяца (ИГХ с антителом к инсулину, синяя окраска, увеличение x5). Отдельные островки Лангерганса не визуализируются, большая часть препарата представлена бета-клетками. Слайд Б: ткань поджелудочной железы пациента с ФФ ВГИ вне очага аденоматоза, прооперированного в 5 месяцев (ИГХ с антителом к инсулину, синяя окраска, увеличение x5). Эндокринные островки на препарате имеют неправильную продолговатую форму и неровные края. Слайд В: патоморфологическая картина пациента с ДФ ВГИ, прооперированного в 26 месяцев (ИГХ с антителом к инсулину,

*синяя окраска*, увеличение x5). Слайд Г: пациент без признаков нарушения углеводного обмена, погибший в 3 месяца (ИГХ исследование с антителами к инсулину для окрашивания островков Лангерганса, *синяя окраска*, и s-100 для визуализации ацинарных клеток и протоков, *коричневая окраска*, увеличение x5). Островки Лангерганса у пациента с ДФ ВГИ и у ребенка без нарушения углеводного обмена представляются округлыми, овальными и имеют четкие границы.

*Иммуногистохимическое исследование с антителами к рецептору ГПП-1*

Во всех группах пациентов реакция с антителом отмечалась в большей степени в области эндокринных островков и эндокринных клеток. Значимой разницы между степенью и характером окрашивания эндокринных клеток вне фокуса, в ткани поджелудочной железы при ДФ заболевания и в группе контроля не выявлено. Однако в связи высокой концентрацией эндокринных клеток в области фокуса реакция с антителом к рецептору ГПП-1 позволила четко дифференцировать фокус гиперсекреции инсулина от оставшейся ткани поджелудочной железы.

В меньшей степени во всех группах наблюдалось окрашивание ацинарных клеток (Рисунок 17).

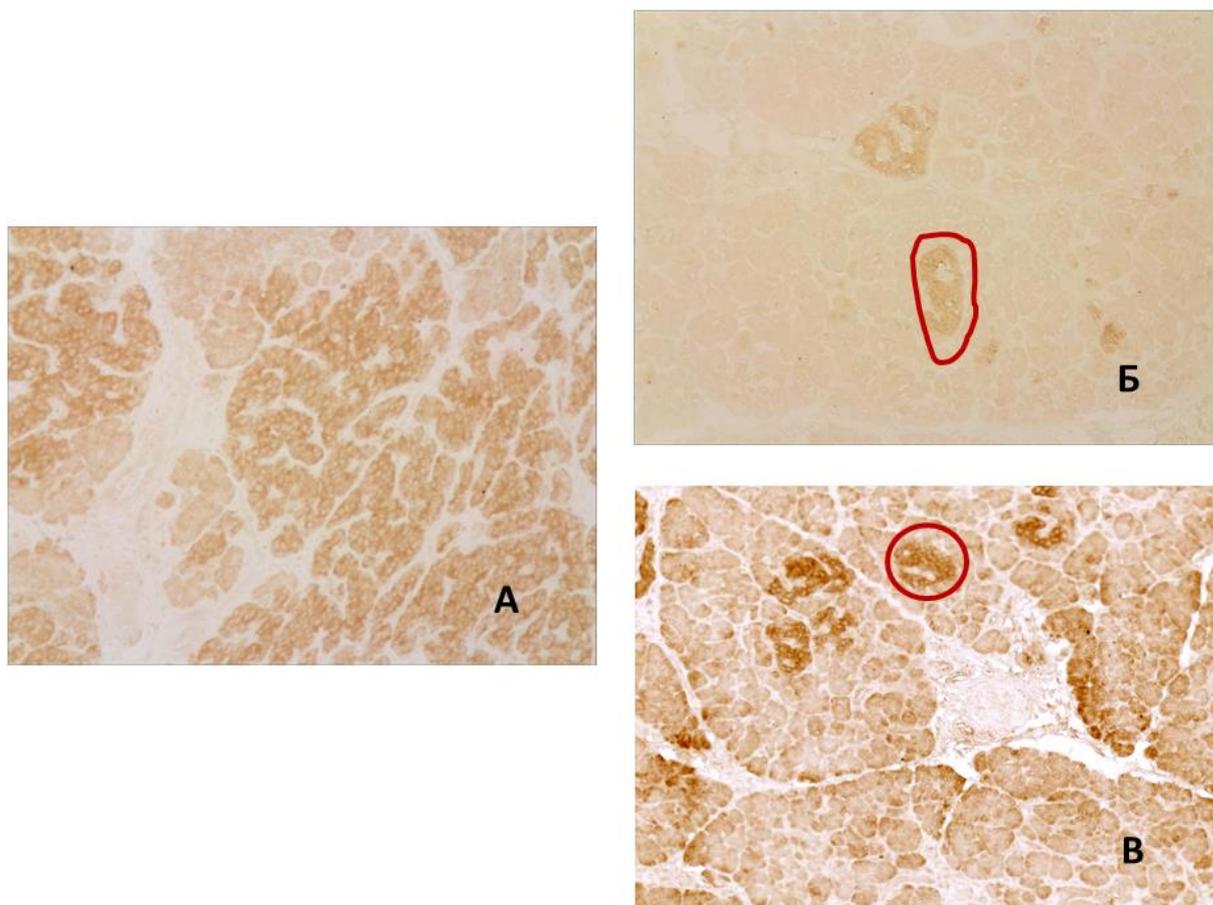


Рисунок 17 – Результаты иммуногистохимического исследования с антителом к рецептору ГПП-1.

Некоторые островки Лангерганса выделены красной линией. Слайд А: область гиперсекреции инсулина, поджелудочная железа пациента с ФФ ВГИ, прооперированного в 22 месяца (*коричневая окраска*, увеличение x10). Визуализируется интенсивная окраска эндокринных клеток, которые занимают большую часть площади фокуса. Слайд Б: участок вне очага аденоматоза у того же пациента с ФФ ВГИ (*коричневая окраска*, увеличение x10). Визуализируются отдельные островки Лангерганса, а также слабое окрашивание ацинарных клеток. Слайд В: пациент с ДФ ВГИ, прооперированный в 2 месяца (*коричневая окраска*, увеличение x10). Отмечается яркое окрашивание островков Лангерганса. В ткани поджелудочной железы у всех пациентов отмечается более выраженное окрашивание эндокринных островков и менее интенсивное равномерное окрашивание ацинарных клеток.

*Иммуногистохимическое исследование с антителами к белку p57*

ИГХ-исследование с тканеспецифическим антителом p57 было проведено 7/10 пациентам с ФФ ВГИ. По полученным результатам, удалось дифференцировать очаг аденоматоза от оставшейся ткани поджелудочной железы у пациентов с ФФ ВГИ, поскольку в данной области окрашивания ядер не происходило. В остальных же случаях отмечалась положительная реакция с антителом: ядра бета-клеток у пациентов с ДФ ВГИ, у группы контроля, а также вне аденоматоза у пациентов с ФФ ВГИ (Рисунок 18).

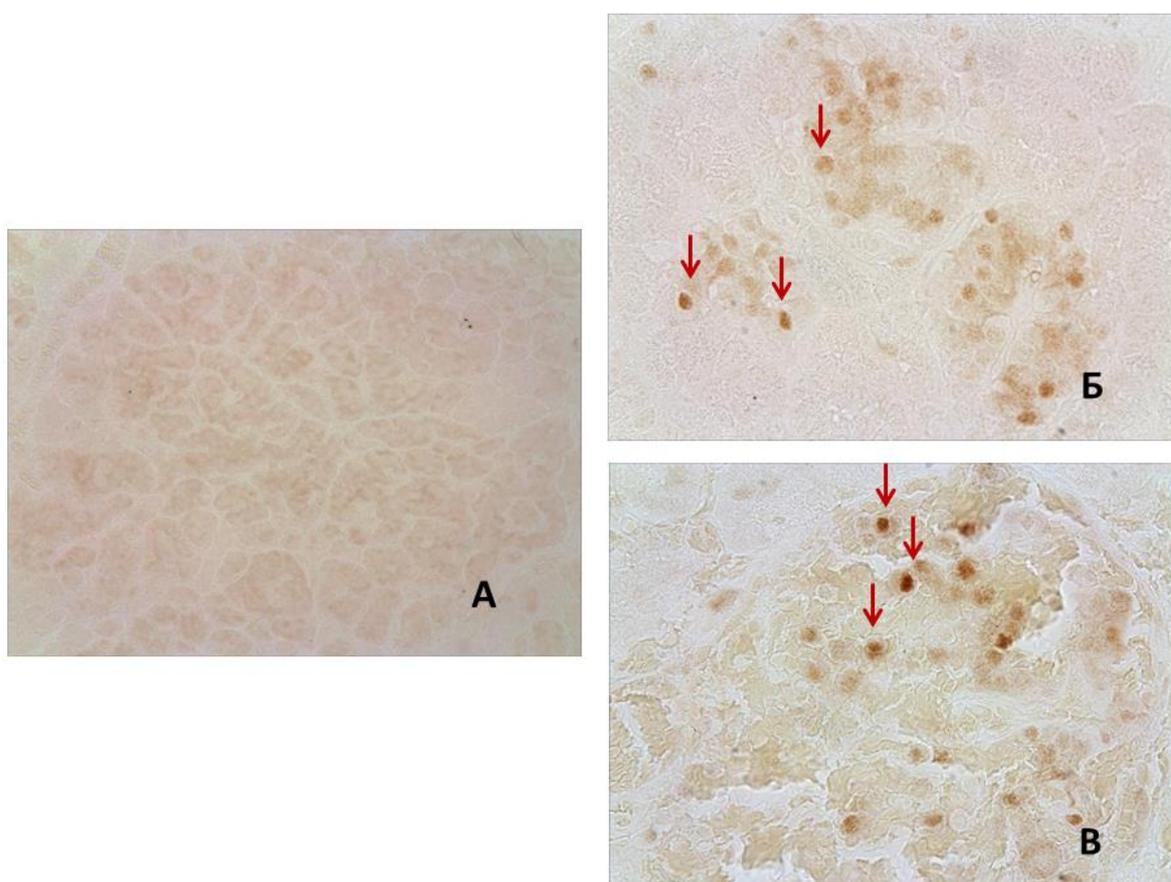


Рисунок 18 – Результаты ИГХ-исследования с антителом к p57

Примеры окрашивания ядер эндокринных клеток выделены красными стрелками. Слайд А: область гиперсекреции инсулина, поджелудочная железа пациента с ФФ ВГИ, прооперированного в 22 месяца (*коричневая окраска*, увеличение x10). Окрашивание ядер бета-клеток полностью

отсутствует. Слайд Б: участок вне очага аденоматоза у того же пациента с ФФ ВГИ (*коричневая окраска, увеличение x40*). Слайд В: ткань поджелудочной железы у пациента с ДФ ВГИ, прооперированного в 2 месяца (*коричневая окраска, увеличение x40*). На слайдах Б и В отмечается интенсивное окрашивание ядер эндокринных клеток, в то время как на слайде А оно отсутствует.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВГИ является наиболее частой причиной персистирующих гипогликемий у новорожденных детей [3]. Актуальным вопросом остается дифференциальная диагностика гистологических форм заболевания. В нашем исследовании примерно половина пациентов с фармакорезистентным течением ВГИ имели ФФ заболевания, что соответствует статистическим данным других стран (45-51%) [32,36,37].

Несколько меньшая частота встречаемости ФФ ВГИ, в отличие от ДФ, обусловлена генетическими особенностями. Формирование ДФ заболевания происходит за счет доминантных, гомозиготных либо компаундных гетерозиготных мутаций в 14 известных генах. Напротив, для возникновения ФФ ВГИ необходимо одновременное осуществление двух событий: возникновение мутации в генах *KCNJ11* или *ABCC8* на отцовской аллели и потеря гетерозиготности в области 11p15.5. В случае отсутствия одного из этих феноменов фокус гиперсекреции инсулина не будет сформирован. Более того, подсчитано, что вероятность возникновения повторного случая ФФ ВГИ у sibсов пациентов равняется 1/600 [26].

По данным нашего исследования, повторных случаев возникновения ФФ ВГИ в одной семье не обнаружено. В литературе имеется единичный случай описания ФФ ВГИ у sibсов. Интересно, что у них отмечалась различная локализация (головка и перешеек поджелудочной железы) [100]. Также описан семейный клинический случай различных форм ВГИ: ДФ ВГИ диагностирована у пациента с гомозиготной мутацией, ФФ ВГИ – у его sibса с идентичной гетерозиготной мутацией на отцовской аллели в гене *ABCC8*; оба ребенка были рождены в близкородственном браке [101].

В настоящее время отсутствуют убедительные данные о возможности диагностирования ФФ, основываясь только на клинические данные [3,26]. Однако, по заключению ряда авторов, у пациентов с ФФ ВГИ зафиксирована

меньшая частота наличия крупного веса при рождении, более поздняя манифестация и меньшая скорость утилизации глюкозы при внутривенной инфузии [37]. Вероятно, что малая выборка в нашем исследовании не позволила выявить данные особенности. Тем не менее, SDS веса при рождении у пациентов с ФФ действительно было меньше, чем у пациентов с ДФ заболевания. Также возраст манифестации в исследуемой группе составил 2 суток, в то время как у группы сравнения клинические проявления возникали чаще уже в 1 день жизни. Различия в скорости инфузии раствора глюкозы для поддержания эугликемии в обеих группах были минимальны (12,3 против 11,0 мг/кг/мин). Потребность в дотации глюкозы у пациентов с ВГИ значительно выше нормы, как при ФФ, так и при фармакорезистентном течении ДФ заболевания. Данная особенность также является одним из диагностических критериев постановки ВГИ. [3,8,13].

Неонатальная манифестация заболевания характерна для ВГИ, в редких случаях у пациентов с ФФ описана более поздняя манифестация в возрасте 5-6 месяцев [102]. В нашем исследовании среди обследованных пациентов только у одного ребенка заболевание манифестировало после 1-ого месяца жизни. Наиболее частыми проявлениями заболевания в дебюте являлись судороги и дыхательные нарушения. Эти данные демонстрируют скорее особенности клинических проявлений гипогликемии у детей раннего возраста, так как у взрослого населения тяжелая гипогликемия чаще ассоциируется с комой [103].

Необходимо отметить, что низкая специфичность клинических проявлений гипогликемии затрудняет своевременную диагностику их причины. В связи с наличием судорог пациентам может быть ложно установлен диагноз эпилепсии [7,104]. Поэтому по ряду российских и зарубежных рекомендаций, пациентам с впервые выявленным судорожным синдромом необходимо проводить анализ крови на глюкозу [105–107].

Наличие повышенного уровня инсулина на фоне гипогликемии является важнейшим диагностическим критерием ВГИ [8,12,108]. В нашей

группе пациентов значения инсулина колебались от 3 до 93 мкМЕ/мл, при этом более низкие или более высокие показатели инсулина не влияли на тяжесть клинических проявлений. Данный факт объясняется тем, что симптомы ВГИ, в основном, обусловлены гипогликемией, тогда как сама гиперинсулинемия определяет лишь некоторые характеристики (например, крупный вес при рождении) [12,108,109].

Персистирующая гипогликемия обуславливает поражение нервной системы и повышает риски развития неврологических осложнений. У пациентов с ФФ ВГИ развитие задержки психомоторного развития наблюдалось более чем в 60% случаев. Тем не менее, другими исследователями были получены более обнадеживающие данные. Так, в одном из исследований [110] неврологические осложнения были отмечены у 45% (всего 121 пациент с ВГИ, перенесшие хирургическое лечение), в другом [6] – у 32% (35 пациентов с ВГИ, перенесшие хирургическое лечение), в третьем [111] – у 39% (67 пациентов с ВГИ).

Остается открытым вопрос о разнице между частотой неврологических осложнений у пациентов с ФФ и ДФ заболевания. Предполагается, что ФФ ВГИ должна реже приводить к неврологическим осложнениям, поскольку после проведения оперативного вмешательства у детей сохраняется эугликемия в течение жизни [110]. Напротив, у пациентов после субтотальной панкреатэктомии по поводу ДФ ВГИ гипогликемии зачастую сохраняются некоторое время после операции. В нашем исследовании подобных различий в развитии неврологических осложнений выявлено не было, что может быть связано с небольшим количеством включенных пациентов и относительно непродолжительным периодом отдаленных наблюдений. Ряд исследователей также пришел к выводу об отсутствии значимой разницы в частоте возникновения неврологической патологии в группах пациентов с ФФ и ДФ ВГИ [6,104,112]. Более того, некоторые исследователи не отмечают значимых различий в отношении психомоторного отставания в группе пациентов, ответивших на

консервативную терапию, и среди пациентов, перенесших хирургическое лечение [111,113]. Основными факторами, негативно влияющими на нервную систему, являются ранняя манифестация гипогликемии, частота эпизодов гипогликемии и позднее начало терапии [6,104,110–114]. Принято считать, что эпизоды гипогликемии важно диагностировать не позднее 1 недели после манифестации. По нашим данным, задержка между дебютом заболевания и постановкой диагноза составила 2 недели, что, в свою очередь, могло привести к более высокой частоте неврологических осложнений у пациентов.

Одним из методов дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ является молекулярно-генетическое исследование. Поскольку при фокальной и диффузной формах заболевания отмечаются различные типы наследования, то при обнаружении гетерозиготной мутации в генах *ABCC8/KCNJ11* на отцовской аллели можно предположить наличие ФФ ВГИ. Подсчитано, что положительная предсказательная ценность наличия рецессивной мутации на отцовской аллели в генах, кодирующих АТФ-зависимые калиевые каналы, равняется 94% [18]. Однако, стоит учесть, что в группе сравнения с пациентами с ДФ заболевания также отмечались гетерозиготные мутации, в том числе и на отцовской аллели. Развитие ДФ ВГИ в таких случаях было обусловлено доминантным характером данных мутаций. Из вышеизложенного факта следует, что не стоит полагаться исключительно на молекулярно-генетический анализ крови, особенно, при необходимости решения вопроса об объеме оперативного вмешательства.

В нашей группе пациентов с ФФ ВГИ у большинства были выявлены гетерозиготные мутации в гене *ABCC8* (23/30; 80%). Всего было обнаружено 11 мутаций в данном гене, которые ранее не были описаны. С меньшей частотой встречались мутации в гене *KCNJ11* (4/30; 18%), одна из мутаций ранее не была описана у других пациентов с ВГИ. Ни одного семейного случая ФФ ВГИ не было отмечено, что согласуется со спорадичностью данной формы заболевания. Обращает на себя внимание тот факт, что у 3

пациентов были обнаружены идентичные сочетания мутаций: с.1038C>G: р.Y344X в гене *ABCC8* и с.1096G>A, р.G366R в гене *KCNJ11*. Мутация с.1038C>G является патогенной, в то время как мутация с.1096G>A имеет неопределенное значение. По имеющимся данным, такое сочетание мутаций было описано только в отечественной литературе [53]. Таким образом, у всех пациентов с ФФ ВГИ были обнаружены гетерозиготные мутации в генах, кодирующих АТФ-зависимые калиевые каналы.

ПЭТ с 18F-ДОФА применяется для предоперационной диагностики формы ВГИ и для топической визуализации области аденоматоза. В нашем исследовании был проведен анализ локализации фокусов у 24/25 пациентов с ФФ ВГИ. Стоит отметить, что у 54% пациентов исследуемой группы фокус располагался в головке поджелудочной железы. Осложняет объяснение данного феномена тот факт, что большее количество эндокринных островков и бета-клеток в норме обнаруживается в области хвоста поджелудочной железы [115–117], что должно увеличивать шансы возникновения мутации в клетках данной области. Несмотря на то, что причина этого явления до конца не изучена, схожие данные с превалированием локализации очага гиперсекреции инсулина в головке поджелудочной железы отмечены и в других исследованиях с большим количеством участников [32].

Также в основной группе пациентов отмечались два необычных случая расположения фокуса. У одного пациента ткань поджелудочной железы с повышенной секрецией инсулина была эктопирована в двенадцатиперстную кишку. Данное расположение фокуса возможно благодаря эмбриогенетической связи поджелудочной железы с двенадцатиперстной кишкой. Также у одного пациента был диагностирован мультифокус по результатам гистологического исследования, который на ПЭТ с 18F-ДОФА визуализировался как обширный очаг захвата радиофармпрепарата. В целом, мультифокальное и эктопическое расположение фокусов у пациентов с ВГИ встречается достаточно редко [118–120].

По результатам радиоизотопного исследования можно сделать вывод о том, что ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -ДОФА является достаточно точным методом для дифференциальной диагностики гистологических форм ВГИ (AUC колеблется от 0,870 до 0,952). Значимой разницы между эффективностью классического и альтернативного метода расчета панкреатического индекса не выявлено, но отмечаются несколько более высокие значения площади под кривой при расчете альтернативного ПИ\* (AUC при расчете ПИ колеблется от 0,870 до 0,937, при расчете ПИ\* - от 0,906 до 0,952). Однако в связи с широким разбросом расчетных показателей панкреатического индекса у пациентов с ФФ ВГИ имеется риск ошибочного диагностирования ДФ заболевания. Такая ситуация может привести к необратимым последствиям, а именно, к проведению субтотальной панкреатэктомии, которая в подавляющем большинстве случаев осложняется сахарным диабетом и экзокринной недостаточностью поджелудочной железы. Ситуация ложной диагностики ФФ ВГИ также имеет свои негативные последствия: поспешное направление на оперативное лечение без проведения дальнейших попыток консервативной терапии, резекция недостаточного объема поджелудочной железы, персистенция гипогликемии в послеоперационном периоде и необходимость повторного оперативного вмешательства [12,26,32].

Для лучшей интерпретации исследования следует учитывать возможные причины ложноположительного результата. К ним относятся ошибки при сопоставлении снимков ПЭТ и КТ, физиологически обусловленные закономерности распределения радиофармпрепарата: повышенное поглощение  $^{18}\text{F}$ -ДОФА головкой поджелудочной железы, накопление радиофармпрепарата в области почек, мочеточников, желчных путях и желчном пузыре [55]. Существует также ряд обстоятельств, которые могут привести к ложноотрицательным результатам: большие или малые размеры фокуса, мультифокальность, плоская форма очага, наложение на фокус сигнала захвата  $^{18}\text{F}$ -ДОФА от левой почки, желчного пузыря, двенадцатиперстной кишки [56,121]. По данным литературы, наименьший

идентифицированный размер фокуса был равен 5x4 мм [54]. Вышеперечисленные аспекты должны быть в обязательном порядке учтены при оценке результатов ПЭТ с 18F-ДОФА.

В настоящее время общепринятым методом дифференциальной диагностики форм ВГИ по данным ПЭТ с 18F-ДОФА является использование отрезной точки 1,5 следующих рекомендованных отрезных точек: при значении максимального ПИ более 1,5 диагностируется ФФ ВГИ, при значении максимального ПИ менее 1,3 диагностируется ДФ заболевания. Промежуточные значения максимального ПИ (1,3 – 1,5) могут трактоваться по-разному и для них нет однозначных рекомендаций. Согласно полученным нами данным, эти критерии не полностью удовлетворяют потребность в максимально точной дифференциальной диагностике (диагностическая точность 85%, вероятность ФФ при отрицательном результате теста - 21%). В клинической практике от интерпретации результатов ПЭТ с 18F-ДОФА зависит объем оперативного вмешательства. Нами были предложены альтернативные методы расчета ПИ и альтернативные отрезные точки. Оптимальной отрезной точкой при расчете ПИ оказалось значение 1,31 во втором временном промежутке. При ПИ выше данной точки мы предлагаем диагностировать ФФ ВГИ (диагностическая точность 91%, вероятность ФФ при отрицательном результате теста - 14%). Однако, лучшим способом дифференциальной диагностики гистологической формы по данным радиоизотопного метода исследования оказалось сочетание визуальной оценки поглощения радиофармпрепарата и анализа расчетных параметров – комплексный подход (диагностическая точность 97%, вероятность ФФ при отрицательном результате теста – 0%).

Например, у пациента 16 (Таблица 11) с фокальной формой ВГИ максимальный ПИ был равен 1,41. В случае оценки результатов ПЭТ с 18F-ДОФА по международным расчетным критериям, ребенку могла бы быть установлена ДФ заболевания. Поскольку по визуальным данным четко определялся очаг интенсивного захвата 18F-ДОФА, использование

комплексного подхода позволило верно установить диагноз ФФ ВГИ. Позже данная форма была подтверждена морфологическим исследованием. Необходимо отметить, что ПИ на втором временном промежутке имел значение более 1,31. Таким образом, при использовании предложенной нами отрезной точки, этот объективный показатель также изначально указывал бы на верный диагноз. На рисунке 19 представлены результаты ПЭТ с 18F-ДОФА у данного пациента и у пациента с ДФ ВГИ для сравнения.

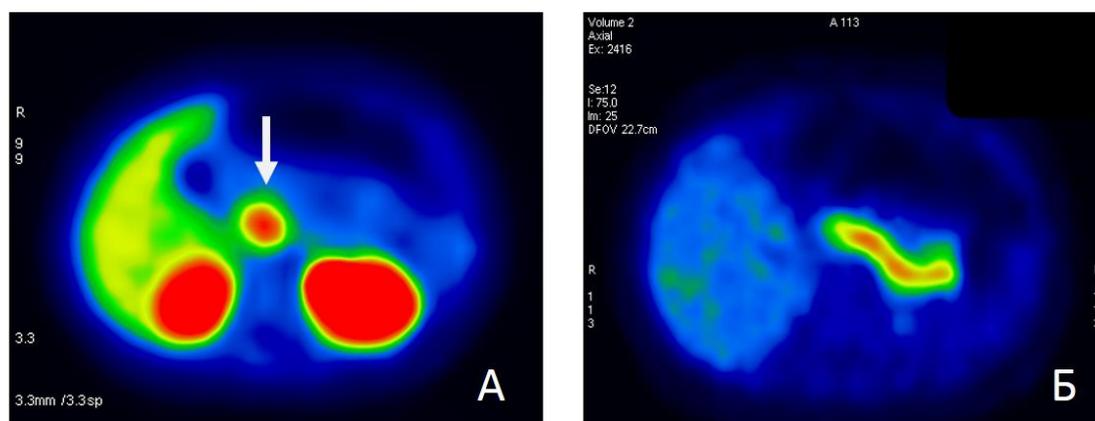


Рисунок 19 – ПЭТ с 18F-ДОФА у пациентов с фокальной и диффузной формой ВГИ.

Слайд А: Пациент 16 с ФФ ВГИ. По результатам ПЭТ с 18F-ДОФА максимальный ПИ был менее 1,50, однако ПИ на втором временном промежутке был более 1,31. Стрелкой указана область аденоматоза. По бокам визуализируется накопление в области почек. Слайд Б: пациент с ДФ ВГИ, представлен для сравнения. Исследование проведено в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» (зав. Рыжкова Д.В., Санкт-Петербург, Россия).

Также у некоторых пациентов с ДФ заболевания могла бы быть неверно установлена ФФ при использовании стандартных методов оценки результатов ПЭТ с 18F-ДОФА (Рисунок 20). Так, у одного из детей (ДФ13, Таблица 11) максимальный ПИ равнялся 1,47, что достаточно близко к показателю 1,5 и могло быть расценено как наличие фокуса гиперпродукции инсулина. Тем не менее, на втором временном промежутке ПИ равнялся 1,11,

что по предложенному нами критерию указывает на наличие ДФ заболевания. При визуальной оценке картины ПЭТ отмечалось равномерное накопление радиофармпрепарата. В конечном итоге гистологическое исследование подтвердило наличие ДФ ВГИ у пациента.

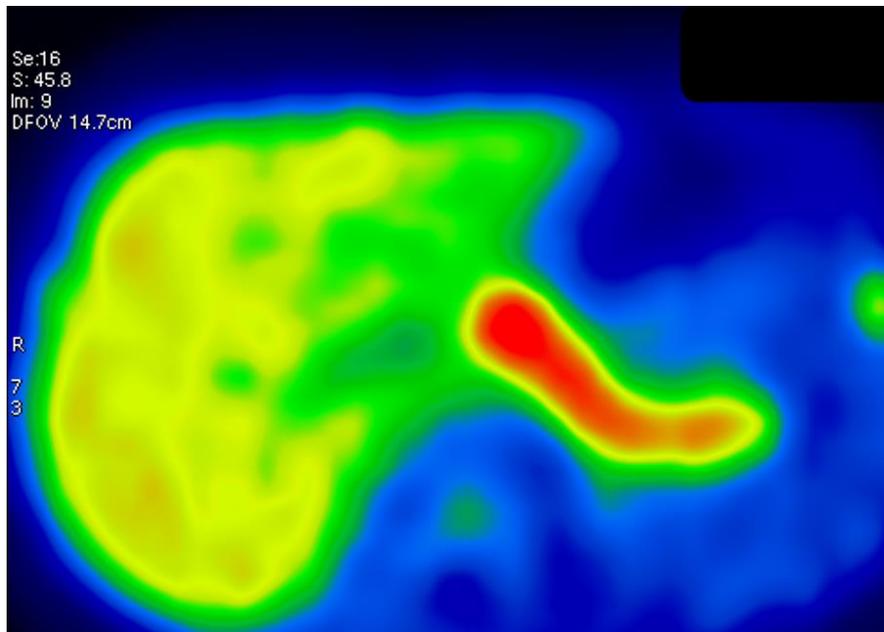


Рисунок 20 – ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -ДОФА у пациента с диффузной формой ВГИ.

Максимальный ПИ у данного пациента равен 1,47, ПИ на втором временном промежутке соответствует 1,11, отмечается относительно равномерное накопление радиофармпрепарата. Исследование проведено в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» (зав. Рыжкова Д.В., Санкт-Петербург, Россия).

Основным ограничением исследования было небольшое число пациентов, что связано с редкостью заболевания. Исходя из этого, проведенный статистический анализ результатов не позволяет с полной уверенностью судить об однозначной эффективности какого-то отдельного подхода при дифференциальной диагностике форм ВГИ с помощью ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -ДОФА. В качестве объективного критерия предпочтителен расчет ПИ через 30-40 минут после введения радиофармпрепарата с учетом отрезной точки 1,31, выше которой диагностируется ФФ ВГИ. Мы рекомендуем обязательную оценку как визуальных, так и расчетных параметров на всех

временных промежутках после введения 18F-ДОФА. Вышеизложенный в данной работе алгоритм позволит улучшить предоперационную дифференциальную диагностику гистологических форм ВГИ у пациентов с фармакорезистентным течением заболевания.

Поскольку пациенты с ФФ ВГИ в подавляющем большинстве случаев не поддаются консервативной терапии, ситуация вынуждает принимать решение о хирургическом лечении. Интересно, что в литературе описаны редкие случаи положительного эффекта от терапии диазоксидом у пациентов с ФФ ВГИ [122] и даже наблюдения самостоятельного разрешения ФФ ВГИ [123]. В нашей группе пациентов таких случаев не встречалось, хотя у одного ребенка отмечалась субкомпенсация гипогликемии на фоне частого кормления, что, тем не менее, потребовало резекции фокуса.

Всем пациентам в основной группе было проведено хирургическое лечение. Выбор объема хирургического вмешательства зависел от возможностей дооперационной диагностики. Субтотальная панкреатэктомия была проведена лишь 5 пациентам в связи с отсутствием возможности выполнить ПЭТ с 18F-ДОФА к моменту операции для подтверждения ФФ. В подавляющем большинстве случаев была выполнена резекция участка аденоматоза. Стоит отметить, что у всех пациентов, перенесших субтотальную панкреатэктомию, развилась экзокринная недостаточность поджелудочной железы, а у 3 из 5 детей также манифестировал сахарный диабет. Подсчитано, что сахарный диабет развивается у 93-96% пациентов после удаления более 95% ткани поджелудочной железы [35,110] с медианой возраста возникновения данного осложнения 7,7 лет [110]. В целом, риск развития эндокринной недостаточности поджелудочной железы у пациентов с ВГИ без оперативного лечения не выше, чем в общей популяции [113].

По итогам оперативного лечения у подавляющего большинства пациентов (92%) после резекции участка гиперпродукции инсулина отмечалась эугликемия. В двух случаях зафиксированы гипогликемии, но по результатам комплексного обследования рецидив ВГИ у детей был

исключен. У одного ребенка отмечались кетотические гипогликемии, которые, в целом, чаще встречаются у детей с ВГИ [124]. Данные состояния не имеют отношения к повышенной продукции инсулина и представляют меньшую опасность, чем ВГИ. Обычно кетотические гипогликемии нуждаются только во временной диетической коррекции.

Изучение патоморфологической картины поджелудочной железы у пациентов с ВГИ являлось ключевым моментом в понимании заболевания [14]. Данный метод позволяет объяснить патологические процессы, протекающие у пациентов с ВГИ, предположить возможные новые методы лечения, а также ответить на многие другие вопросы. По результатам ИГХ с антителами к инсулину, в данном исследовании удалось четко дифференцировать очаг аденоматоза от оставшейся ткани поджелудочной железы. Фокус представлял собой участок ткани со сплошным окрашиванием в связи с высокой концентрацией эндокринных клеток. Данный метод позволяет однозначно ответить на вопрос о форме заболевания: при фокальной форме ВГИ визуализируется ограниченный очаг аденоматоза, которого не отмечается при диффузной форме. Идентичные наблюдения ранее были опубликованы и в других исследованиях [77, 78]. Однако данное наблюдение помогает лишь в том случае, если при интраоперационной биопсии ткани поджелудочной железы был захвачен участок фокуса. В проведенном исследовании также удалось выявить закономерность, которая ранее не была отмечена в публикациях и которая позволяет дифференцировать ткань вне фокуса при ФФ ВГИ и ткань при ДФ ВГИ. Ключевым моментом оказалась форма островков вне фокуса при ФФ и в ткани железы при ДФ заболевания. При оценке полученных результатов у пациентов с ФФ ВГИ вне фокуса гиперсекреции инсулина эндокринные островки имели нечеткие границы и продолговатую неправильную форму. Напротив, форма островков у пациентов с ДФ заболевания и у пациентов без признаков нарушения углеводного обмена была округлой и имела четкие края.

Стоит отметить, что не так давно в зарубежной литературе появилось описание морфологически разных видов фокусов на группе из 25 пациентов с ФФ ВГИ. Авторы утверждают, что фокусы гиперсекреции инсулина различаются по четкости границ и наличию капсулы [102]. Более того, была обнаружена статистическая связь между формой фокуса и клиническими проявлениями заболевания. Так, при инкапсулированном аденоматозе манифестация заболевания возникала позже, чем у пациентов с нечеткими границами фокуса. Наши результаты не могут подтвердить данной находки, так как ни у одного из пациентов не наблюдалось капсулы вокруг фокуса гиперсекреции инсулина. Дебют заболевания после первого месяца жизни был зарегистрирован только у одного пациента, в подавляющем большинстве отмечалась неонатальная манифестация гипогликемического синдрома. Морфологическое исследование ткани поджелудочной железы в случае пациента с поздним дебютом не представлялось возможным, поскольку операция была выполнена за границей, хотя данное исследование представляло бы большой интерес.

Помимо инсулина, важным фактором, влияющим на углеводный обмен, является ГПП-1. Интерес в проведении ИГХ-исследования с антителом к рецепторам ГПП-1 был продиктован связью ГПП-1 с синтезом инсулина, наличием данных об эффективности проведения терапии антагонистами ГПП-1 у пациентов с ВГИ, а также отсутствием в литературе публикаций с подобной тематикой. До начала исследования были проанализированы источники литературы для подбора наиболее качественного антитела к рецепторам ГПП-1. Как оказалось, большинство имеющихся антител к рецепторам ГПП-1 имеют малую специфичность [125,126]. При сравнении ряда моноклональных антител к рецепторам ГПП-1 единственным специфичным антителом оказался образец 3F52 («DSHB», США) [126]. Достоверность результатов была подтверждена данными радиоавтографии. Результаты оценки специфичности коммерческих моноклональных антител к рецепторам ГПП-1 представлены на рисунке 21.

Таким образом, для проведения ИГХ в настоящем исследовании было выбрано антитело 3F52 («Developmental Studies Hybridoma Bank», США).

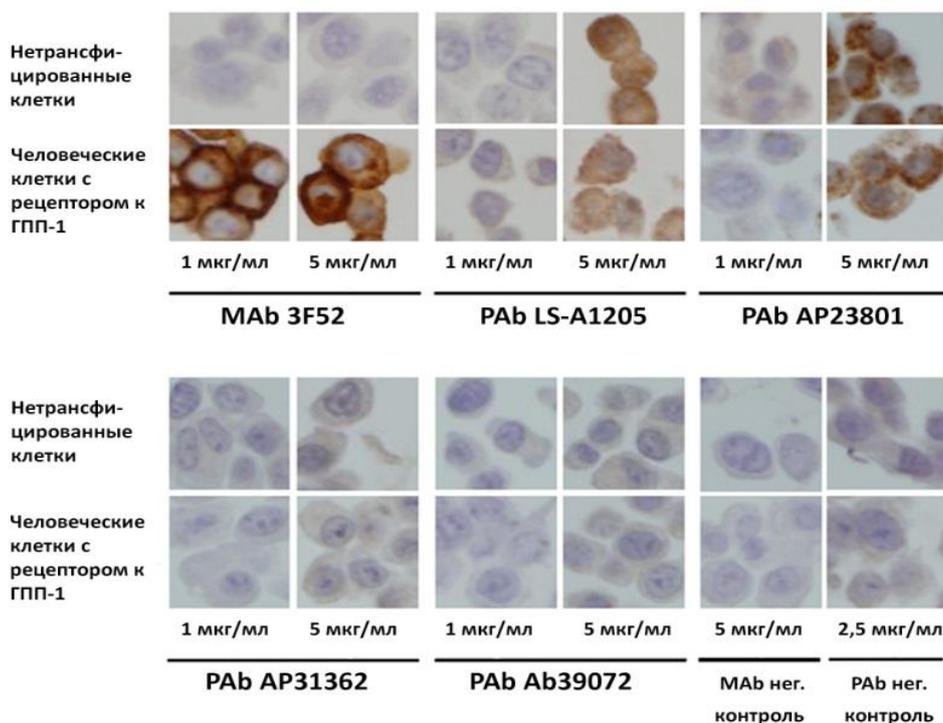


Рисунок 21 – Результаты оценки специфичности коммерческих моноклональных антител к рецепторам ГПП-1 с положительным и отрицательным контролем. Рисунок адаптирован из [126].

Условные обозначения: MAb – моноклональные антитела, PAb – поликлональные антитела.

При ИГХ-исследовании с антителом к рецепторам ГПП-1 отмечалось яркое окрашивание эндокринных клеток при всех формах ВГИ, а также в группе контроля. Наравне с использованием антител к инсулину, данное антитело позволило четко определить фокус гиперпродукции инсулина у пациентов с ФФ ВГИ. Данное наблюдение связано с тем, что ГПП-1 через рецепторы на бета-клетках стимулирует выброс инсулина. С практической точки зрения, более простым методом выявления очага аденоматоза является ИГХ-исследование с инсулином.

Изначально выдвигалось предположение, что экспрессия рецепторов в ткани поджелудочной железы у пациентов с ДФ ВГИ выше, чем при ФФ ВГИ. Такое предположение основывалось на знаниях о патофизиологических и генетических особенностях ВГИ. Продукция как инсулина, так и ГПП-1 напрямую связана с работой АТФ-зависимых калиевых каналов. При ДФ заболевания генетические нарушения касаются всех клеток, в том числе бета-клеток, продуцирующих инсулин, и интестинальных L-клеток, продуцирующих ГПП-1. Парадоксальное повышение потребности во внутривенной дотации глюкозы после еды, описанное у некоторых пациентов с ДФ ВГИ, может быть связано с гиперсекрецией ГПП-1 интестинальными L-клетками [92]. Также в литературе отмечено положительное влияние антагониста ГПП-1 (эксендин-(9-39)) у пациентов с ДФ ВГИ [92]. При ФФ заболевания интестинальные L-клетки остаются интактными и генетические нарушения затрагивают только область фокуса. Тем не менее, значимой разницы в экспрессии рецепторов к ГПП-1 вне очага гиперсекреции инсулина у пациентов с ФФ ВГИ и в ткани поджелудочной железы у пациентов с ДФ ВГИ и в контрольной группе не получено. Идентичных исследований в научной литературе не описано. Несколько схожее ИГХ-исследование с проведением аутографии у пациентов с гиперинсулинемической гипогликемией после шунтирования желудка также не выявило значимого увеличения экспрессии рецепторов к ГПП-1 по сравнению с пациентами с доброкачественной инсулиномой [132].

При проведении ИГХ-исследования с антителами к рецептору ГПП-1 в меньшей степени наблюдалось окрашивание ацинарных клеток во всех группах. Однако реакция с ацинарными клетками признана не всеми исследователями, так как по ряду публикаций получены противоречивые результаты [127–129]. Больше данных за то, что экспрессия рецепторов ГПП-1 в ацинарных клетках имеет место быть. Подтверждающие данный факт исследования были проведены с использованием радиоавтографии и/или ИГХ с качественными антителами [127,128,130], в то время как

отрицательные результаты были получены в исследовании с использованием сомнительного антитела [129]. На сегодняшний день роль влияния ГПП-1 на ацинарные клетки неясна. Полученные в ходе исследования данные ставят под сомнение точность проведения ПЭТ с использованием агонистов ГПП-1 (эксендин-4) у пациентов с инсулиномами и ФФ ВГИ. Клиническое применение данной методики визуализации уже проводится у пациентов с инсулиномами [89,131], эффективность ее использования у пациентов с ВГИ пока изучается. Экспрессия рецепторов ГПП-1 в ацинарных клетках может помешать правильной оценке результатов.

ИГХ-исследование с антителами к белку p57 применяется при подозрении на потерю гетерозиготности клеток, что и происходит в случае ФФ ВГИ. Поскольку данный белок экспрессируется исключительно на материнской аллели в области 11p15.5, то внутри границ фокуса гиперпродукции инсулина данный маркер будет отсутствовать. Нам удалось подтвердить этот факт с помощью проведения ИГХ-исследования. По полученным результатам, окрашивание было отрицательным в области фокуса, но отмечалось в ядрах эндокринных клеток у пациентов с ДФ ВГИ и у группы контроля, а также вне аденоматоза у пациентов с ФФ ВГИ. Применение ИГХ-исследования с антителами к белку p57 можно считать достоверным методом для дифференциальной диагностики гистологических форм ВГИ, что также было подтверждено и другими исследованиями [26,95].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВГИ является тяжелым наследственным заболеванием с высоким риском неврологических осложнений. По нашим данным, более чем в трети случаев у пациентов отсутствовала положительная динамика на фоне приема консервативной терапии, что потребовало проведения хирургического вмешательства. Примерно в половине случаев фармакорезистентного течения у пациентов регистрируется ФФ заболевания. Учитывая различия в объеме хирургического вмешательства и прогнозе при ФФ и ДФ ВГИ, необходимо проведение своевременной предоперационной диагностики гистологической формы ВГИ.

Согласно полученным результатам, клиническая картина заболевания не отличается у пациентов с фокальной и диффузной формами ВГИ. Для уточнения диагноза необходимо как проведение молекулярно-генетического, так и радиоизотопного исследований. Факт наличия гетерозиготной мутации в генах *ABCC8/ KCNJ11* не позволяет точно дифференцировать форму заболевания, так как при рецессивном характере данные мутации приводят к ФФ заболевания, а при доминантном – к ДФ заболевания. В ходе нашей работы были выявлены ранее не описанные мутации в генах, ответственных за развитие ВГИ. Также по результатам исследования были проанализированы расчетные параметры ПЭТ с 18F-ДОФА и предложены более точные критерии для дифференциальной диагностики. Патоморфологическое исследование позволило получить новые данные о гистологических изменениях в тканях поджелудочной железы у пациентов с ВГИ, что может способствовать более глубокому пониманию патогенеза заболевания. Таким образом, результаты настоящей работы позволяют сделать выводы о семиотике заболевания и предложить новые практические подходы к его диагностике.

## ВЫВОДЫ

1. Доля пациентов с фокальной формой заболевания составила 12 % (95% ДИ: 9-17%) от общего числа пациентов с врожденным гиперинсулизмом и 38% (95% ДИ: 28-50%) – от пациентов с фармакорезистентным течением ВГИ. Клиническая картина и лабораторные данные у пациентов с фокальной формой заболевания и фармакорезистентным течением диффузной формы врожденного гиперинсулинизм не имели статистически значимых различий, что не позволяет дифференцировать эти две формы по клинико-лабораторным показателям.

2. У всех пациентов с фокальной формой ВГИ отмечались патогенные гетерозиготные мутации в генах, кодирующих АТФ-зависимые калиевые каналы (*ABCC8*, *KCNJ11*). Нами были выявлены 12 ранее не описанных мутаций в данных генах, а также одно ранее не описанное сочетание мутаций. Наличие гетерозиготной мутации в генах *ABCC8/ KCNJ11* не позволяет точно дифференцировать форму заболевания, так как существуют доминантные мутации, приводящие к диффузной форме ВГИ.

3. Результаты ПЭТ с 18F-ДОФА статистически значимо различаются у пациентов с фокальной и диффузной формами ВГИ. Среди расчетных параметров, для диагностирования фокальной формы ВГИ наиболее оптимальной представляется отрезная точка панкреатического индекса 1,31 через 30-40 минут после введения 18F-ДОФА (специфичность – 100% (95% ДИ: 81-100%), диагностическая точность – 91% (95% ДИ: 74-98%)). Наибольшую точность интерпретации результатов ПЭТ с 18F-ДОФА дает совокупность применения расчетных параметров и визуальной оценки (специфичность – 95%(95% ДИ: 74 - 100%), диагностическая точность – 97% (95% ДИ: 82-100%)).

4. Отмечаются морфологические различия по гистологической картине у пациентов с фокальной и диффузной формами ВГИ. Фокус гиперсекреции

инсулина представляет собой обширное скопление бета-клеток. Островки Лангерганса у пациентов с фокальной формой ВГИ вне участка гиперсекреции инсулина имеют неровные края и неправильную продолговатую форму. У пациентов с диффузной формой ВГИ и детей без признаков нарушения углеводного обмена наблюдается округлая правильная форма эндокринных островков с четкими границами.

5. Использование ИГХ-исследования с антителом к ГПП-1 позволяет достоверно определить наличие фокуса гиперсекреции инсулина. Разницы в экспрессии рецепторов ГПП-1 в ткани поджелудочной вне фокуса у пациентов с фокальной формой ВГИ, у пациентов с диффузной формой ВГИ и у детей без признаков нарушения углеводного обмена не получено.

6. Использование ИГХ-исследования с антителом к p57 позволяет определить наличие или отсутствие фокуса гиперсекреции инсулина у пациентов с ВГИ. Реакция отрицательна непосредственно в ядрах клеток в области фокуса, тогда как вне фокуса у пациентов с фокальной формой ВГИ и у пациентов с диффузной формой ВГИ ядра эндокринных клеток окрашиваются.

7. Наилучшие результаты лечения у пациентов с фокальной формой ВГИ зарегистрированы при резекции участка гиперпродукции инсулина. Данная тактика позволила полностью излечить большинство пациентов (84%, 95% ДИ: 64 – 95%) без риска развития эндокринной и экзокринной панкреатической недостаточности.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В случае отсутствия положительного эффекта от терапии диазоксидом пациентам с ВГИ рекомендуется проводить молекулярно-генетический анализ крови с исследованием генов *ABCC8* и *KCNJ11*.
2. При необходимости проведения оперативного вмешательства пациентам с фармакорезистентным течением ВГИ рекомендуется предварительное определение гистологической формы заболевания с помощью молекулярно-генетического анализа крови и ПЭТ с <sup>18</sup>F-ДОФА.
3. В качестве объективного критерия дифференциальной диагностики гистологической формы по результатам ПЭТ предпочтительна отрезная точка панкреатического индекса 1,31 через 30-40 минут после введения <sup>18</sup>F-ДОФА, выше которой предполагается ФФ ВГИ, ниже или равно – ДФ ВГИ. При финальной интерпретации результатов ПЭТ с <sup>18</sup>F-ДОФА рекомендуется оценивать совокупность расчетных параметров и визуальных данных.

На основании полученных данных, мы предлагаем следующий алгоритм предоперационной дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ (Рисунок 22).

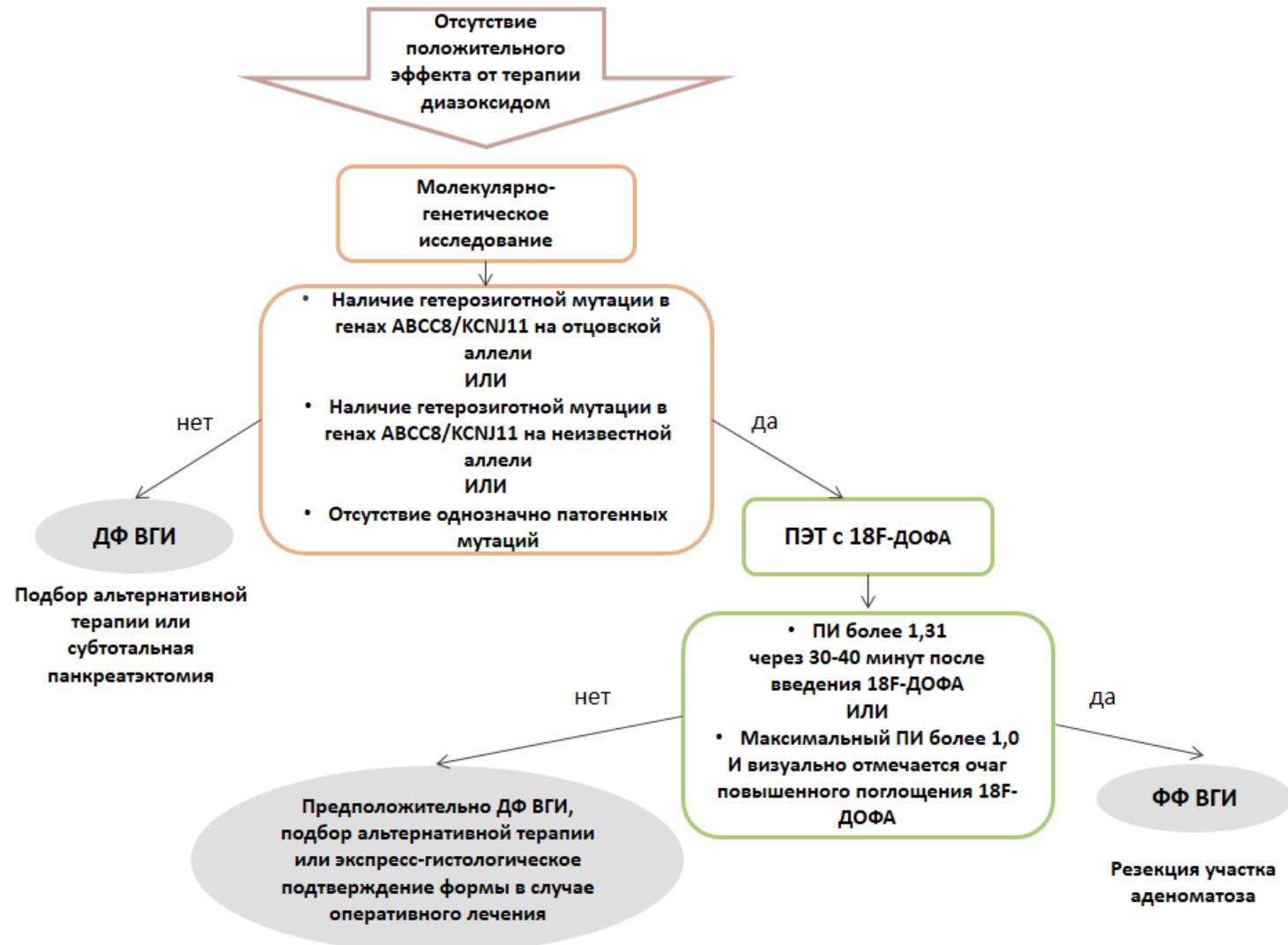


Рисунок 22 – Алгоритм предоперационной дифференциальной диагностики гистологической формы ВГИ

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

[ ; ] – межквартильный размах

\* – мутация ранее не была описана у других пациентов

+ – пациенту было проведено исследование

– – пациенту не проводилось исследование

18F-ДОФА – 18-фтор-L-дигидроксифенилаланин

AUC – площадь под кривой

CGMS – система постоянного мониторинга уровня глюкозы

Ki-67 – маркер пролиферативной активности клетки

ROC – анализ - анализ зависимости количества верно классифицированных положительных объектов от количества неверно классифицированных отрицательных объектов

SUR1 – рецептор сульфонилмочевины-1

A3H – атрофия зрительного нерва

АСЗК – забор крови из правой печеночной вены после внутриартериальной стимуляции

АТФ – аденозинтрифосфат

Б/т – без терапии

ВГИ – врожденный гиперинсулинизм

ВЗ – вентральный зачаток

Гетероз – гетерозиготная мутация

Гомоз – гомозиготная мутация

ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид 1

ДВС – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания

ДЗ – дорсальный зачаток

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДФ – диффузная форма

ДЦП – детский центральный паралич

ж – женский пол

Ж – желудок

Зав – заведующий

ЗПМР – задержка психомоторного развития

ИГХ – иммуногистохимия

К – кишечник

КТ – компьютерная томография

М – мужской пол

Мес – месяц

МРТ – магнитно-резонансная томография

Н/д – нет данных

Наруш глот – нарушение глотания

неопр – мутация с неопределенным значением патогенности

НИИ – национальный исследовательский институт

ОЖП – общий желчный проток

Отц – мутация наследована от отца

П – печень

Пат – патогенная мутация

ПИ – панкреатический индекс

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РФ – Российская Федерация

С/т ПЭ – субтотальная панкреатэктомия

СУН – стандартный уровень накопления

СУНмакс – максимальный стандартный уровень накопления

США – Соединенные Штаты Америки

УЗ – ультразвуковой

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФГБНУ – федеральное государственное бюджетное научное учреждение

ФГБУ – федеральное государственное бюджетное учреждение

ФФ – фокальная форма

ЧЧЗВ – чрескожно-чреспеченочный забор крови из ветвей воротной вены

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Эпи – эпилепсия

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez JA, James RF, Johnson PR, et al. Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N Engl J Med*. 1997 Mar 6;336(10):703–6.
2. Stanley CA. Hyperinsulinism in infants and children. *Pediatr Clin North Am*. 1997 Apr;44(2):363–74.
3. Banerjee I, Salomon-Estebanez M, Shah P, Nicholson J, Cosgrove KE, Dunne MJ. Therapies and outcomes of congenital hyperinsulinism-induced hypoglycaemia. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2019;36(1):9–21.
4. Parikh NS, Ahlawat R. Glycogen Storage Disease Type I (Von Gierke Disease). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [cited 2019 Oct 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534196/>
5. Hoegsberg B, Gruppuso PA, Coustan DR. Hyperinsulinemia in macrosomic infants of nondiabetic mothers. *Diabetes Care*. 1993 Jan;16(1):32–6.
6. Steinkrauss L, Lipman TH, Hendell CD, Gerdes M, Thornton PS, Stanley CA. Effects of hypoglycemia on developmental outcome in children with congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Nurs*. 2005 Apr;20(2):109–18.
7. Щедеркина И.О., Меликян М.А., Заваденко А.Н., Козлова Е.В., Заваденко Н.Н. Неврологические пароксизмальные нарушения у детей с гипогликемией на фоне врожденного гиперинсулинизма: полиморфизм клинических проявлений. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2015;7(2):49-58.
8. Yorifuji T. Congenital hyperinsulinism: current status and future perspectives. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2014 Jun;19(2):57–68.
9. Hussain K. Diagnosis and management of hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Horm Res*. 2008;69(1):2–13.
10. Mohamed Z, Arya VB, Hussain K. Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia: Genetic Mechanisms, Diagnosis and Management. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2012 Oct 1;4(4):169–81.

11. Bromiker R, Perry A, Kasirer Y, Einav S, Klinger G, Levy-Khademi F. Early neonatal hypoglycemia: incidence of and risk factors. A cohort study using universal point of care screening. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* 2019 Mar;32(5):786–92.
12. Stanley CA. Perspective on the Genetics and Diagnosis of Congenital Hyperinsulinism Disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Mar 1;101(3):815–26.
13. Stanley CA, Baker L. Hyperinsulinism in infants and children: diagnosis and therapy. *Adv Pediatr.* 1976;23:315–55.
14. Rahier J. Relevance of endocrine pancreas nesidioblastosis to hyperinsulinemic hypoglycemia. *Diabetes Care.* 1989 Feb;12(2):164–6.
15. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, González G, et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science.* 1995 Apr 21;268(5209):423–6.
16. Thomas P, Ye Y, Lightner E. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet.* 1996 Nov;5(11):1809–12.
17. Banerjee I, Skae M, Flanagan SE, Rigby L, Patel L, Didi M, et al. The contribution of rapid KATP channel gene mutation analysis to the clinical management of children with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2011 May;164(5):733–40.
18. Snider KE, Becker S, Boyajian L, Shyng S-L, MacMullen C, Hughes N, et al. Genotype and phenotype correlations in 417 children with congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Feb;98(2):E355-363.
19. Kapoor RR, Flanagan SE, Arya VB, Shield JP, Ellard S, Hussain K. Clinical and molecular characterisation of 300 patients with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2013 Apr;168(4):557–64.
20. Flanagan SE, Vairo F, Johnson MB, Caswell R, Laver TW, Lango Allen H, et al. A CACNA1D mutation in a patient with persistent hyperinsulinaemic

hypoglycaemia, heart defects, and severe hypotonia. *Pediatr Diabetes*. 2017;18(4):320–3.

21. Cabezas OR, Flanagan SE, Stanescu H, García-Martínez E, Caswell R, Lango-Allen H, et al. Polycystic Kidney Disease with Hyperinsulinemic Hypoglycemia Caused by a Promoter Mutation in Phosphomannomutase 2. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017;28(8):2529–39.

22. Giri D, Vignola ML, Gualtieri A, Scagliotti V, McNamara P, Peak M, et al. Novel FOXA2 mutation causes Hyperinsulinism, Hypopituitarism with Craniofacial and Endoderm-derived organ abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2017 15;26(22):4315–26.

23. Ferrara CT, Boodhansingh KE, Paradies E, Fiermonte G, Steinkrauss LJ, Topor LS, et al. Novel Hypoglycemia Phenotype in Congenital Hyperinsulinism Due to Dominant Mutations of Uncoupling Protein 2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 01;102(3):942–9.

24. Vajravelu ME, De León DD. Genetic Characteristics of Patients with Congenital Hyperinsulinism. *Curr Opin Pediatr*. 2018 Aug;30(4):568–75.

25. Gubaeva D, Melikyan M, Vasiliev E, Petrov V, Tiulpakov A. Next Generation Sequencing Results in 142 Patients with Congenital Hyperinsulinism. In *European Society for Paediatric Endocrinology*; 2018 [cited 2019 Nov 15]. Available from: <http://abstracts.eurospe.org/hrp/0089/hrp0089rfc7.1>

26. Stanley CA, De Leon DD, editors. *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders* [Internet]. S. Karger AG; 2012. (Frontiers in Diabetes; vol. 21). Available from: <http://www.karger.com/Book/Home/255677>

27. Cuesta-Muñoz AL, Huopio H, Otonkoski T, Gomez-Zumaquero JM, Näntö-Salonen K, Rahier J, et al. Severe Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia due to a De Novo Glucokinase Mutation. *Diabetes*. 2004 Aug 1;53(8):2164–8.

28. Morishita K, Kyo C, Yonemoto T, Kosugi R, Ogawa T, Inoue T. Asymptomatic Congenital Hyperinsulinism due to a Glucokinase-Activating Mutation, Treated as Adrenal Insufficiency for Twelve Years. *Case Rep*

- Endocrinol [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 28];2017. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5253496/>
29. Nichols CG, Koster JC, Remedi MS. beta-cell hyperexcitability: from hyperinsulinism to diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2007 Nov;9 Suppl 2:81–8.
30. Proglycem (Diazoxide Capsules): Side Effects, Interactions, Warning, Dosage & Uses [Internet]. RxList. [cited 2019 Oct 28]. Available from:  
<https://www.rxlist.com/proglycem-drug.htm>
31. McMahon AW, Wharton GT, Thornton P, De Leon DD. Octreotide use and safety in infants with hyperinsulinism. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2017 Jan;26(1):26–31.
32. Adzick NS, Leon DDD, States LJ, Lord K, Bhatti TR, Becker SA, et al. Surgical treatment of congenital hyperinsulinism: Results from 500 pancreatectomies in neonates and children. *J Pediatr Surg*. 2019 Jan 1;54(1):27–32.
33. Kapoor RR, Flanagan SE, James CT, McKiernan J, Thomas AM, Harmer SC, et al. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia and diabetes mellitus due to dominant ABCC8/KCNJ11 mutations. *Diabetologia*. 2011 Oct;54(10):2575–83.
34. McGlacken-Byrne SM, Hawkes CP, Flanagan SE, Ellard S, McDonnell CM, Murphy NP. The evolving course of HNF4A hyperinsulinaemic hypoglycaemia--a case series. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2014 Jan;31(1):e1-5.
35. Arya VB, Senniappan S, Demirbilek H, Alam S, Flanagan SE, Ellard S, et al. Pancreatic Endocrine and Exocrine Function in Children following Near-Total Pancreatectomy for Diffuse Congenital Hyperinsulinism. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 May 19 [cited 2019 Oct 28];9(5). Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026387/>
36. Arya VB, Guemes M, Nessa A, Alam S, Shah P, Gilbert C, et al. Clinical and histological heterogeneity of congenital hyperinsulinism due to paternally inherited heterozygous ABCC8/KCNJ11 mutations. *Eur J Endocrinol*. 2014 Dec;171(6):685–95.
37. Lord K, Dzata E, Snider KE, Gallagher PR, De León DD. Clinical Presentation and Management of Children With Diffuse and Focal

- Hyperinsulinism: A Review of 223 Cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Nov;98(11):E1786–9.
38. de Lonlay P, Fournet J-C, Touati G, Groos M-S, Martin D, Sevin C, et al. Heterogeneity of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia. A series of 175 cases. *Eur J Pediatr.* 2002 Jan;161(1):37–48.
39. Dubois J, Brunelle F, Touati G, Sebag G, Nuttin C, Thach T, et al. Hyperinsulinism in children: diagnostic value of pancreatic venous sampling correlated with clinical, pathological and surgical outcome in 25 cases. *Pediatr Radiol.* 1995;25(7):512–6.
40. Ferry RJ, Kelly A, Grimberg A, Koo-McCoy S, Shapiro MJ, Fellows KE, et al. Calcium-stimulated insulin secretion in diffuse and focal forms of congenital hyperinsulinism. *J Pediatr.* 2000 Aug;137(2):239–46.
41. Blomberg BA, Moghbel MC, Saboury B, Stanley CA, Alavi A. The value of radiologic interventions and (18)F-DOPA PET in diagnosing and localizing focal congenital hyperinsulinism: systematic review and meta-analysis. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging.* 2013 Feb;15(1):97–105.
42. Ribeiro M-J, De Lonlay P, Delzescaux T, Boddaert N, Jaubert F, Bourgeois S, et al. Characterization of hyperinsulinism in infancy assessed with PET and 18F-fluoro-L-DOPA. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2005 Apr;46(4):560–6.
43. de Lonlay P, Simon-Carre A, Ribeiro M-J, Boddaert N, Giurgea I, Laborde K, et al. Congenital hyperinsulinism: pancreatic [18F]fluoro-L-dihydroxyphenylalanine (DOPA) positron emission tomography and immunohistochemistry study of DOPA decarboxylase and insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):933–40.
44. Koopmans KP, Neels ON, Kema IP, Elsinga PH, Links TP, de Vries EGE, et al. Molecular imaging in neuroendocrine tumors: molecular uptake mechanisms and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009 Sep;71(3):199–213.
45. Губаева Д.Н., Меликян М.А., Рыжкова Д.В., Никитина И.Л. ПЭТ/КТ с 18F-ДОФА при врожденном гиперинсулинизме. *REJR* 2017; 7(3):144-152.

46. Lindström P, Sehlin J. Aromatic amino acids and pancreatic islet function: a comparison of L-tryptophan and L-5-hydroxytryptophan. *Mol Cell Endocrinol*. 1986 Dec;48(2–3):121–6.
47. Santhanam P, Taïeb D. Role of (18) F-FDOPA PET/CT imaging in endocrinology. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Dec;81(6):789–98.
48. Yang J, Yuan L, Meeks JK, Zhang N, Li C, Hao R. 18F-DOPA positron emission tomography/computed tomography application in congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 2012;25(7–8):619–22.
49. Meintjes M, Endozo R, Dickson J, Erlandsson K, Hussain K, Townsend C, et al. 18F-DOPA PET and enhanced CT imaging for congenital hyperinsulinism: initial UK experience from a technologist's perspective. *Nucl Med Commun*. 2013 Jun;34(6):601–8.
50. Imperiale A, Sebag F, Vix M, Castinetti F, Kessler L, Moreau F, et al. 18F-FDOPA PET/CT imaging of insulinoma revisited. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015 Mar;42(3):409–18.
51. Ericson LE, Håkanson R, Lundquist I. Accumulation of dopamine in mouse pancreatic B-cells following injection of L-DOPA. Localization to secretory granules and inhibition of insulin secretion. *Diabetologia*. 1977 Apr;13(2):117–24.
52. Chondrogiannis S, Grassetto G, Marzola MC, Rampin L, Massaro A, Bellan E, et al. 18F-DOPA PET/CT biodistribution consideration in 107 consecutive patients with neuroendocrine tumours. *Nucl Med Commun*. 2012 Feb;33(2):179–84.
53. Gubaeva DN, Наилевна ГД, Melikyan MA, Арменаковна ММ, Ryzhkova DV, Викторовна РД, et al. Differential diagnosis of morphological forms of congenital hyperinsulinism using [18F]-DOPA PET/CT. *Probl Endocrinol*. 2018 Dec 29;64(5):306–11.
54. Mohnike K, Blankenstein O, Christesen HT, De Lonlay J, Hussain K, Koopmans KP, et al. Proposal for a standardized protocol for 18F-DOPA-PET (PET/CT) in congenital hyperinsulinism. *Horm Res*. 2006;66(1):40–2.

55. Hardy OT, Hernandez-Pampaloni M, Saffer JR, Scheuermann JS, Ernst LM, Freifelder R, et al. Accuracy of [18F]fluorodopa positron emission tomography for diagnosing and localizing focal congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Dec;92(12):4706–11.
56. Otonkoski T, Näntö-Salonen K, Seppänen M, Veijola R, Huopio H, Hussain K, et al. Noninvasive diagnosis of focal hyperinsulinism of infancy with [18F]-DOPA positron emission tomography. *Diabetes.* 2006 Jan;55(1):13–8.
57. Treglia G, Sadeghi R, Annunziata S, Caldarella C, Bertagna F, Giovanella L. Diagnostic performance of fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the postchemotherapy management of patients with seminoma: systematic review and meta-analysis. *BioMed Res Int.* 2014;2014:852681.
58. Barthlen W, Blankenstein O, Mau H, Koch M, Höhne C, Mohnike W, et al. Evaluation of [18F]Fluoro-l-DOPA Positron Emission Tomography-Computed Tomography for Surgery in Focal Congenital Hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Mar 1;93(3):869–75.
59. Brenner D, Elliston C, Hall E, Berdon W. Estimated risks of radiation-induced fatal cancer from pediatric CT. *AJR Am J Roentgenol.* 2001 Feb;176(2):289–96.
60. Fahey FH, Treves ST, Adelstein SJ. Minimizing and communicating radiation risk in pediatric nuclear medicine. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2011 Aug;52(8):1240–51.
61. Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, et al. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol.* 2004 Apr;181(1):11–23.
62. Wessells NK, Cohen JH. Early Pancreas Organogenesis: Morphogenesis, Tissue Interactions, and Mass Effects. *Dev Biol.* 1967 Mar;15(3):237–70.
63. Guney MA, Gannon M. Pancreas Cell Fate. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev.* 2009 Sep;87(3):232–48.
64. Murtaugh LC. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Dev Camb Engl.* 2007 Feb;134(3):427–38.

65. Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA. Human pancreas development. *Development*. 2015 Sep 15;142(18):3126–37.
66. Bonner-Weir S, Sharma A. Are there pancreatic progenitor cells from which new islets form after birth? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006 May;2(5):240–1.
67. Bonner-Weir S, Li W-C, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A.  $\beta$ -Cell Growth and Regeneration: Replication Is Only Part of the Story. *Diabetes*. 2010 Oct;59(10):2340–8.
68. Genevay M, Pontes H, Meda P. Beta cell adaptation in pregnancy: a major difference between humans and rodents? *Diabetologia*. 2010 Oct;53(10):2089–92.
69. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004 May 6;429(6987):41–6.
70. Georgia S, Bhushan A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest*. 2004 Oct;114(7):963–8.
71. Brelje TC, Scharp DW, Sorenson RL. Three-dimensional imaging of intact isolated islets of Langerhans with confocal microscopy. *Diabetes*. 1989 Jun;38(6):808–14.
72. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2334–9.
73. Stagner JJ, Samols E. Retrograde perfusion as a model for testing the relative effects of glucose versus insulin on the A cell. *J Clin Invest*. 1986 Mar;77(3):1034–7.
74. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, et al. Unique Arrangement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cells in Human Islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010 May 1;59(5):1202–10.
75. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 15;97(4):1607–11.

76. Delonlay P, Simon A, Galmiche-Rolland L, Giurgea I, Verkarre V, Aigrain Y, et al. Neonatal hyperinsulinism: clinicopathologic correlation. *Hum Pathol*. 2007 Mar;38(3):387–99.
77. Rahier J, Guiot Y, Sempoux C. Morphologic analysis of focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism. *Semin Pediatr Surg*. 2011 Feb;20(1):3–12.
78. Suchi M, Thornton PS, Adzick NS, MacMullen C, Ganguly A, Stanley CA, et al. Congenital hyperinsulinism: intraoperative biopsy interpretation can direct the extent of pancreatectomy. *Am J Surg Pathol*. 2004 Oct;28(10):1326–35.
79. Han B, Newbould M, Batra G, Cheesman E, Craigie R, Mohamed Z, et al. Enhanced Islet Cell Nucleomegaly Defines Diffuse Congenital Hyperinsulinism in Infancy but Not Other Forms of the Disease. *Am J Clin Pathol*. 2016 Jun;145(6):757–68.
80. Suchi M, MacMullen CM, Thornton PS, Adzick NS, Ganguly A, Ruchelli ED, et al. Molecular and immunohistochemical analyses of the focal form of congenital hyperinsulinism. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2006 Jan;19(1):122–9.
81. Islet Organisation And Proliferation In Congenital Hyperinsulinism | Research Explorer | The University of Manchester [Internet]. [cited 2019 Nov 20]. Available from: [https://www.research.manchester.ac.uk/portal/en/theses/islet-organisation-and-proliferation-in-congenital-hyperinsulinism\(521a11e3-64bd-4836-8d5b-bc6053a82038\).html](https://www.research.manchester.ac.uk/portal/en/theses/islet-organisation-and-proliferation-in-congenital-hyperinsulinism(521a11e3-64bd-4836-8d5b-bc6053a82038).html)
82. Sempoux C, Guiot Y, Lefevre A, Nihoul-Fékété C, Jaubert F, Saudubray JM, et al. Neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia: heterogeneity of the syndrome and keys for differential diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 May;83(5):1455–61.
83. Sempoux C, Guiot Y, Jaubert F, Rahier J. Focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism: the keys for differential diagnosis. *Endocr Pathol*. 2004;15(3):241–6.
84. Beta-cell development and maintenance : disruption of the normal processes in the disease state, hyperinsulinism of infancy - UQ eSpace [Internet]. [cited 2019 Nov 20]. Available from: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:243102>

85. Hesselton D, Anderson RM, Beinat M, Stainier DYR. Distinct populations of quiescent and proliferative pancreatic beta-cells identified by H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>cre mediated labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 1;106(35):14896–901.
86. Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, Glaser B. Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes*. 2000 Aug;49(8):1325–33.
87. Nauck MA. Unraveling the science of incretin biology. *Am J Med*. 2009 Jun;122(6 Suppl):S3–10.
88. Waser B, Blank A, Karamitopoulou E, Perren A, Reubi JC. Glucagon-like-peptide-1 receptor expression in normal and diseased human thyroid and pancreas. *Mod Pathol*. 2015 Mar;28(3):391–402.
89. Luo Y, Pan Q, Yao S, Yu M, Wu W, Xue H, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor PET/CT with <sup>68</sup>Ga-NOTA-Exendin-4 for Detecting Localized Insulinoma: A Prospective Cohort Study. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2016 May;57(5):715–20.
90. Nicolaus M, Brödl J, Linke R, Woerle H-J, Göke B, Schirra J. Endogenous GLP-1 regulates postprandial glycemia in humans: relative contributions of insulin, glucagon, and gastric emptying. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jan;96(1):229–36.
91. Calabria AC, Li C, Gallagher PR, Stanley CA, De León DD. GLP-1 receptor antagonist exendin-(9-39) elevates fasting blood glucose levels in congenital hyperinsulinism owing to inactivating mutations in the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Diabetes*. 2012 Oct;61(10):2585–91.
92. Reimann F, Gribble FM. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes*. 2002 Sep;51(9):2757–63.
93. Pateras IS, Apostolopoulou K, Niforou K, Kotsinas A, Gorgoulis VG. p57KIP2: “Kip”ing the cell under control. *Mol Cancer Res MCR*. 2009 Dec;7(12):1902–19.

94. Chan FK, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2682–8.
95. Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Hussain K, Smith V, Lindley KJ, et al. p57KIP2 Expression in Normal Islet Cells and in Hyperinsulinism of Infancy. *Diabetes.* 2001 Dec 1;50(12):2763–9.
96. Research C for DE and. E6(R2) Good Clinical Practice: Integrated Addendum to ICH E6(R1) [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. FDA; 2019 [cited 2020 Apr 29]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/e6r2-good-clinical-practice-integrated-addendum-ich-e6r1>
97. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep;38(16):e164.
98. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405–23.
99. Губаева Д.Н., Меликян М.А., Рыжкова Д.В., и др. Клинические, генетические и радионуклидные характеристики пациентов с фокальной формой врожденного гиперинсулинизма // Проблемы Эндокринологии. - 2019. - Т. 65. - №5. - С. 319-329.
100. Ismail D, Smith VV, de Lonlay P, Ribeiro M-J, Rahier J, Blankenstein O, et al. Familial focal congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jan;96(1):24–8.
101. Valayannopoulos V, Vaxillaire M, Aigrain Y, Jaubert F, Bellanné-Chantelot C, Ribeiro M-J, et al. Coexistence in the Same Family of Both Focal and Diffuse Forms of Hyperinsulinism. *Diabetes Care.* 2007 Jun 1;30(6):1590–2.
102. Craigie RJ, Salomon-Estebanez M, Yau D, Han B, Mal W, Newbould M, et al. Clinical Diversity in Focal Congenital Hyperinsulinism in Infancy Correlates

With Histological Heterogeneity of Islet Cell Lesions. *Front Endocrinol* [Internet]. 2018 Oct 17 [cited 2019 Dec 1];9. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6199412/>

103. Halawa I, Zelano J, Kumlien E. Hypoglycemia and risk of seizures: A retrospective cross-sectional study. *Seizure - Eur J Epilepsy*. 2015 Feb 1;25:147–9.

104. Menni F, de Lonlay P, Sevin C, Touati G, Peigné C, Barbier V, et al. Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia. *Pediatrics*. 2001 Mar;107(3):476–9.

105. Баранов А.А., Багненко С.Ф., Намазова-Баранова Л.Р., Александрович Ю.С., Пшениснов К.В., Алексеева Е.А., Селимзянова Л.Р. Клинические рекомендации по оказанию скорой медицинской помощи при острых отравлениях у детей // ПФ. 2015. №6. URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-rekomendatsii-po-okazaniyu-skoroy-meditsinskoj-pomoschi-pri-ostryh-otravleniyah-u-detey>

106. Иванов Д.О., Петренко Ю.В., Шабалов Н.П. Диагностика и лечение гипогликемии новорожденных // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. 2014. №1 (3). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/diagnostika-i-lechenie-gipoglikemii-novorozhdennyh> .

107. Thornton PS, Stanley CA, De Leon DD, Harris D, Haymond MW, Hussain K, et al. Recommendations from the Pediatric Endocrine Society for Evaluation and Management of Persistent Hypoglycemia in Neonates, Infants, and Children. *J Pediatr*. 2015 Aug;167(2):238–45.

108. Меликян М.А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, лечению и ведению детей и подростков с врожденным гиперинсулинизмом // Пробл. эндокр.. 2014. №2. URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/federalnye-klinicheskie-rekomendatsii-po-diagnostike-lecheniyu-i-vedeniyu-detey-i-podrostkov-s-vrozhdennym-giperinsulinizmom>

109. Thornton PS, MacMullen C, Ganguly A, Ruchelli E, Steinkrauss L, Crane A, et al. Clinical and Molecular Characterization of a Dominant Form of

Congenital Hyperinsulinism Caused by a Mutation in the High-Affinity Sulfonylurea Receptor. *Diabetes*. 2003 Sep 1;52(9):2403–10.

110. Lord K, Radcliffe J, Gallagher PR, Adzick NS, Stanley CA, De León DD. High Risk of Diabetes and Neurobehavioral Deficits in Individuals With Surgically Treated Hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Nov;100(11):4133–9.

111. Avatapalle HB, Banerjee I, Shah S, Pryce M, Nicholson J, Rigby L, et al. Abnormal Neurodevelopmental Outcomes are Common in Children with Transient Congenital Hyperinsulinism. *Front Endocrinol [Internet]*. 2013 May 20 [cited 2019 Dec 1];4. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3657691/>

112. Mazor-Aronovitch K, Gillis D, Lobel D, Hirsch HJ, Pinhas-Hamiel O, Modan-Moses D, et al. Long-term neurodevelopmental outcome in conservatively treated congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol*. 2007 Oct;157(4):491–7.

113. Meissner T, Wendel U, Burgard P, Schaetzle S, Mayatepek E. Long-term follow-up of 114 patients with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol*. 2003 Jul;149(1):43–51.

114. Helleskov A, Melikyan M, Globa E, Shcherderkina I, Poertner F, Larsen A-M, et al. Both Low Blood Glucose and Insufficient Treatment Confer Risk of Neurodevelopmental Impairment in Congenital Hyperinsulinism: A Multinational Cohort Study. *Front Endocrinol [Internet]*. 2017 Jul 10 [cited 2019 Jun 7];8.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5502348/>

115. Wang X, Misawa R, Zielinski MC, Cowen P, Jo J, Periwal V, et al. Regional Differences in Islet Distribution in the Human Pancreas - Preferential Beta-Cell Loss in the Head Region in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE [Internet]*. 2013 Jun 24 [cited 2019 Jun 15];8(6). Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3691162/>

116. Hellman B. The frequency distribution of the number and volume of the islets Langerhans in man. I. Studies on non-diabetic adults. *Acta Soc Med Ups*. 1959;64:432–60.

117. Wittingen J, Frey CF. Islet concentration in the head, body, tail and uncinata process of the pancreas. *Ann Surg.* 1974 Apr;179(4):412–4.
118. Hussain K, Seppänen M, Näntö-Salonen K, Adzick NS, Stanley CA, Thornton P, et al. The diagnosis of ectopic focal hyperinsulinism of infancy with [18F]-dopa positron emission tomography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Aug;91(8):2839–42.
119. Peranteau WH, Bathaii SM, Pawel B, Hardy O, Alavi A, Stanley CA, et al. Multiple ectopic lesions of focal islet adenomatosis identified by positron emission tomography scan in an infant with congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Surg.* 2007 Jan;42(1):188–92.
120. Ismail D, Kapoor RR, Smith VV, Ashworth M, Blankenstein O, Pierro A, et al. The Heterogeneity of Focal Forms of Congenital Hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jan 1;97(1):E94–9.
121. Maines E, Giacomello L, D’Onofrio M, Salgarello M, Gaudino R, Baggio L, et al. Images from 18F-DOPA Scan in Congenital Hyperinsulinism: Not Always a Clue for Diagnosis. *Nucl Med Mol Imaging.* 2017 Dec;51(4):362–3.
122. Maiorana A, Barbetti F, Boiani A, Rufini V, Pizzoferro M, Francalanci P, et al. Focal congenital hyperinsulinism managed by medical treatment: a diagnostic algorithm based on molecular genetic screening. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014 Nov;81(5):679–88.
123. Salomon-Estebanez M, Flanagan SE, Ellard S, Rigby L, Bowden L, Mohamed Z, et al. Conservatively treated Congenital Hyperinsulinism (CHI) due to K-ATP channel gene mutations: reducing severity over time. *Orphanet J Rare Dis [Internet].* 2016 Dec 1 [cited 2019 Dec 1];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5133749/>
124. Patil P, Giri D, Didi M, Senniappan S. Ketotic Hypoglycemia in Children with Previous Transient Congenital Hyperinsulinism. *Indian Pediatr.* 2018 15;55(2):167–8.
125. Drucker DJ. Incretin Action in the Pancreas: Potential Promise, Possible Perils, and Pathological Pitfalls. *Diabetes.* 2013 Oct;62(10):3316–23.

126. Pyke C, Knudsen LB. The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor—or Not? *Endocrinology*. 2013 Jan 1;154(1):4–8.
127. Körner M, Stöckli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2007 May;48(5):736–43.
128. Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov C, Reedtz-Runge S, Kaastrup P, et al. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology*. 2014 Apr;155(4):1280–90.
129. Gier B, Matveyenko AV, Kirakossian D, Dawson D, Dry SM, Butler PC. Chronic GLP-1 Receptor Activation by Exendin-4 Induces Expansion of Pancreatic Duct Glands in Rats and Accelerates Formation of Dysplastic Lesions and Chronic Pancreatitis in the KrasG12D Mouse Model. *Diabetes*. 2012 May;61(5):1250–62.
130. Reubi JC, Perren A, Rehmann R, Waser B, Christ E, Callery M, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors are not overexpressed in pancreatic islets from patients with severe hyperinsulinaemic hypoglycaemia following gastric bypass. *Diabetologia*. 2010 Dec 1;53(12):2641–5.
131. Sowa-Staszczak A, Trofimiuk-Müldner M, Stefańska A, Tomaszuk M, Buziak-Bereza M, Gilis-Januszczyńska A, et al. 99mTc Labeled Glucagon-Like Peptide-1-Analogue (99mTc-GLP1) Scintigraphy in the Management of Patients with Occult Insulinoma. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 Aug 15 [cited 2019 Nov 29];11(8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4985165/>