

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭНДОКРИНОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.И. ДЕДОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МАЛЫГИНА Анастасия Андреевна

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

3.1.19. ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени

Кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Профессор, д.м.н.

Белая Жанна Евгеньевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Классификация, эпидемиология и клиническая картина эндогенного гиперкортицизма	11
1.2. Лабораторная диагностика эндогенного гиперкортицизма.....	13
1.3. Тесты первой линии при диагностике ЭГ	13
1.3.1. Малая проба с дексаметазоном.....	13
1.3.2. Исследование кортизола в слюне в 23:00	15
1.3.3. Исследование свободного кортизола в суточной моче.....	19
1.4. Другие лабораторные методы диагностики ЭГ	20
1.4.1. Исследование кортизола сыворотки крови в 23:00	20
1.4.2. Сорокавосьми-часовая проба с дексаметазоном 2 мг в день.....	21
1.4.3. Сорокавосьми-часовая проба с дексаметазоном 2 мг в день и стимуляцией КРГ.....	21
1.4.4. Тест со стимуляцией десмопрессином.....	22
1.4.5. Исследование кортизола в волосах	22
1.4.6. Мультистероидный анализ.....	23
1.4.7. Исследование остеокальцина в крови.....	24
1.4.8. Применение искусственного интеллекта.....	24
1.5. Дифференциальная диагностика ЭГ и функционального гиперкортицизма.....	25
1.6. Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимых и АКТГ-независимых форм ЭГ	28

1.7. Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимых форм ЭГ	28
1.7.1. Селективный забор крови из НКС.....	29
1.7.2. Большая проба с дексаметазоном.....	32
1.7.3. Периферическая проба с кортиколиберином	33
1.8. МикроРНК - новая страница в диагностике неоплазий.....	33
1.8.1. МикроРНК, участвующие в клеточной регуляции гипофиза в норме и патологии.	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1. Пациенты, включенные в исследование	42
2.2. Дизайн исследования	43
2.3. Методика забора биологического материала и проведения фармакологических проб.....	47
2.4. Лабораторные методы исследования	49
2.5. Инструментальные методы исследования.....	50
2.6. Гистологические и иммуногистохимические исследования	50
2.7. Генетические методы исследования	51
2.8. Статистическая обработка данных.....	53
2.9. Этическая экспертиза.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	56
3.1. Изучение диагностических возможностей исследования кортизола слюны в ходе МПД методом ЭХЛА	56
3.2. Исследование микроРНК у пациентов болезнью Иценко-Кушинга и АКТГ-эктопированным синдромом.....	69
3.2.1. Определение микроРНК в образцах плазмы крови, оттекающей от гипофиза у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС	69

3.2.2. Валидизация микроРНК-кандидатов на расширенной выборке пациентов с БИК и АКТГ-ЭС методом RT-qPCR	73
3.3. Обсуждение полученных результатов	77
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ВЫВОДЫ	88
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Эндогенный гиперкортицизм (ЭГ) – тяжелое нейроэндокринное заболевание, при естественном течении которого смертность достигает 50% за пять лет наблюдения [1], что определяет важность своевременной диагностики и выбора оптимальной тактики лечения. Несмотря на яркую клиническую картину изменения внешности, далеко не всегда диагноз ЭГ устанавливается своевременно из-за неспецифичности многих симптомов. Так, например, классические стрии и матронизм встречаются лишь в 50% случаев, преимущественно у лиц молодого возраста. Кроме того, диагностика ЭГ объективно сложна для амбулаторных врачей, так как определение кортизола крови и АКТГ неинформативно [2], сбор суточной мочи на свободный кортизол сопряжен с ошибками пациента, а определение кортизола в сыворотке крови в вечерние часы требует госпитализации. Сведение инвазивности к минимуму и повышение простоты и точности лабораторно-диагностических мероприятий может стать важным звеном в совершенствовании диагностики ЭГ. Анализ слюны на свободный кортизол, собранной в 23:00, доказал свою эффективность для диагностики ЭГ и вошел в международные и российские рекомендации [2,3]. Этот метод исследования также отличается рядом технических преимуществ: пациент может выполнить сбор слюны самостоятельно, в домашних условиях, методика безболезненная, что минимизирует вероятность стресса; слюна содержит свободный, стабильный при комнатной температуре до 7 дней кортизол, что делает возможным дистанционное проведение анализа (отправление материала по почте); уровень кортизола в слюне не зависит от содержания кортизол-связывающего глобулина (КСГ), что дает возможность проводить анализ в группе пациентов, принимающих заместительную гормональную терапию, а также данный анализ имеет преимущество перед определением свободного кортизола в суточной моче, так как количество слюны не влияет на результат [4]. Вместе с тем, одного теста недостаточно для установления ЭГ, поэтому рекомендуется обязательное

дополнительное проведение пробы с 1 мг дексаметазона или сбор суточной мочи на свободный кортизол [2,3]. До настоящего времени не существует точки разделения для проведения МПД с определением кортизола по слюне, хотя таковая определена для кортизола в крови (50 нмоль/л) [5]. Определение подобной точки разделения для кортизола в слюне позволила бы сделать первый этап диагностики ЭГ полностью неинвазивным. Следует также учитывать, что существует вариабельность референтного интервала для различных методов определения кортизола как в крови, так и в слюне особенно для масс-спектрометрии и иммуноферментного анализа, поэтому и точка разделения на фоне МПД, наиболее вероятно, должна различаться.

Среди причин ЭГ наиболее частой является кортикотропинома (60-70% случаев), более редко встречаются кортикостеромы (~20%) и АКТГ-эктопированный синдром (5-10%) [6].

На данном этапе имеется ограниченная информация, касающаяся биологических особенностей нейроэндокринных новообразований, секретирующих АКТГ [7,8,9,10]. В качестве перспективного и уже доказавшего свою значимость для диагностики многих других патологий, маркера предлагается исследовать определенные наборы микроРНК как в периферической крови, так и в других биологических жидкостях и тканях [11,12,13]. МикроРНК – это класс малых (состоящих примерно из 22 нуклеотидов) некодирующих высококонсервативных одноцепочечных РНК, осуществляющих регуляцию на посттранскрипционном уровне таких процессов как клеточная пролиферация, дифференциация, выживаемость и апоптоз [14]. Ранее было выявлено, что разные опухоли экспрессируют различные микроРНК, в том числе карциноидные опухоли и кортикотропиномы [15,16]. Разница в экспрессии miR-145, miR-21, miR-141, let-7a, miR-150, miR-15a, miR-16 и miR-143 ранее наблюдалась в кортикотропиномах по сравнению с интактным гипофизом. В крупных обзорах были обобщены микроРНК и таргетные гены в различных типах аденом гипофиза [15,17]. В

нескольких исследованиях сообщалось о разнице в экспрессии микроРНК в нейроэндокринных опухолях, включая карциноидные опухоли легких [17,18,19].

Таким образом, проведенное в рамках данной научной работы исследование актуально, так как актуальными являются разработка и внедрение неинвазивных методов диагностики ЭГ, а также изучение новых биомаркеров. Изучение профилей экспрессии микроРНК также является актуальной задачей, приближающей нас к пониманию патофизиологических процессов, стоящих за формированием кортикотропином и разработке принципиально новых тестов для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимых форм ЭГ.

Цель работы

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

Задачи исследования

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

4. Выполнить валидизацию конкретных микроРНК в образцах периферической крови пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом методом ПЦР в реальном времени (RT-qPCR).

Научная новизна

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

Личное участие автора в получение научных результатов

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

Основные положения, выносимые на защиту

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

Степень достоверности и апробация полученных результатов

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

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

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

Публикации

По теме кандидатской диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе в рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России медицинских журналах – 2; тезисы, опубликованные за рубежом – 2, тезисы, опубликованные в сборниках российских конференций – 2, патент – 1, учебно-методических пособий – 2.

Объем и структура диссертации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Классификация, эпидемиология и клиническая картина эндогенного гиперкортицизма

Эндогенный гиперкортицизм (ЭГ) – редкая тяжелая патология, в основе которой лежит хроническая избыточная продукция кортизола, приводящая к развитию серьезных осложнений и снижению продолжительности и качества жизни [21]. Наиболее частой причиной ЭГ является болезнь Иценко-Кушинга (БИК) (до 70% случаев), патогенез которой связан с гиперстимуляцией надпочечников высоким уровнем АКТГ, секретируемым кортикотропиновой гипофиза, значительно реже (до 20%) встречается первичная патология надпочечников (кортикостерома, аденокортикальный рак, двусторонняя микро- и макронодулярная гиперплазия надпочечников), оставшиеся 10% приходятся на АКТГ-эктопированный синдром (АКТГ-ЭС), при котором источником гиперпродукции АКТГ является нейроэндокринное образование внегипофизарной локализации [5,6,22]. БИК и АКТГ-ЭС относятся к АКТГ-зависимым формам, первичная патология надпочечников – к АКТГ-независимым [23]. Заболеваемость ЭГ соответствует 0,7-2,4 случаев на миллион населения ежегодно [24], распространенность БИК 39,1 на миллион человек [25]. ЭГ может наблюдаться в любых возрастных категориях, но наиболее часто с четвертого по шестой десяток жизни, при этом наиболее часто болеют женщины в соотношении 3:1 [5,24,26], тенденция несколько отличается в случае АКТГ-ЭС, при котором женщины и мужчины болеют одинаково часто [24,27].

Течение ЭГ характеризуется достаточно быстрым развитием серьезных осложнений со стороны различных органов и систем, что приводит в итоге к повышенной смертности среди этой группы пациентов [28]. Впервые характерный симптомокомплекс ЭГ был описан канадским хирургом Харви Кушингом в 1912 году, позже, в 1932 году, он связал развитие такой клинической картины с патологией гипофиза, которая была обозначена как гипофизарный базофилизм. Х. Кушинг обратил внимание на совокупность симптомов у группы пациентов, у

которых наблюдались ожирение с характерным перераспределением подкожно-жировой клетчатки в области лица и туловища на фоне относительно худых конечностей с мышечной слабостью и общей быстрой утомляемостью, наличием багровых стрий в области живота, телеангиоэктазий области щек, быстрым образованием геморрагий и кровоизлияний, артериальной гипертензией, сахарным диабетом, остеопорозом, депрессией, склонностью к инфекционным заболеваниям, нарушением менструальной функции у женщин и снижением либидо у мужчин [26,29]. В 1924 году советским невропатологом Николаем Михайловичем Иценко была описана серия клинических случаев из 15 пациентов с характерной клинической картиной, в связи с чем в отечественной практике ЭГ центрального генеза носит название двух выдающихся врачей и ученых [31]. Классическая клиническая картина при ЭГ достаточно узнаваема и специфична за счет таких проявлений как характерное перераспределение подкожно-жировой клетчатки, широкие багровые стрии и легкое образование геморрагий и экхимозов, тем не менее, такие проявления могут отсутствовать у пациентов с ЭГ, особенно старших возрастных групп, что делает диагностику затруднительной, отчего пациенты длительно находятся без лечения [5,32]. В мета-анализе Г. Рубинштейна и соавторов, на основании данных 5367 пациентов [33] было изучено сколько времени требуется для постановки диагноза ЭГ. Выявлено, что это во многом зависит от генеза ЭГ и составляет 14 месяцев при АКТГ-ЭС, 30 месяцев при АКТГ-независимом гиперкортицизме, а наиболее долго диагностика занимает у пациентов с БИК и составляет в среднем 38 месяцев.

По данным исследования, проведенного на базе Эндокринологического научного центра [31], в которое было включено 259 пациентов с ЭГ к наиболее частым их жалобам относятся: общая слабость (70,6%), набор веса (67,3%), мышечная слабость (64,4%), матронизм (55,4%), широкие багровые стрии (48%), головная боль (38%), гирсутизм (34%); более редко наблюдались жалобы на сухость кожи или, наоборот, потливость, эмоциональную лабильность, головокружение, сонливость, снижение остроты зрения, мраморность кожи,

выпадение волос, нарушение сна, гиперпигментация, снижение памяти. Хроническая гиперкортизолемиа приводит к значительному снижению качества жизни, даже спустя годы после успешного лечения [34] и, что самое важное, увеличению смертности в основном за счет острых сердечно-сосудистых событий в активную стадию болезни (стандартизированный коэффициент смертности (SMR) = 1,9-4,8) [24,30,36]. По данным ряда исследований смертность пациентов после ремиссии не отличается от средне популяционной [22,24], тем не менее, авторы других работ указывают на повышенную смертность в течение 10 лет после ремиссии (SMR=1,6; 95% ДИ 1,23–2,12; $p=0.0001$) [35,36].

1.2. Лабораторная диагностика эндогенного гиперкортицизма

Перед тем как приступить к диагностике ЭГ, необходимо исключить экзогенный прием глюкокортикоидов (ГКС), которые с большой частотой назначаются по поводу ревматологических, инфекционных, аллергических, онкологических, дерматологических и других заболеваний [37]. В некоторых случаях, пациент не подозревает, что принимает ГКС, в связи с чем необходим обстоятельный и тщательный опрос по поводу всех мазей, спреев, препаратов и инъекций, которые он получал за последние несколько месяцев. Диагностика ЭГ осуществляется в два этапа: на первом подтверждается наличие ЭГ, на втором определяется его генез [2,3]. К тестам первой линии для диагностики ЭГ относятся малая проба с 1 мг дексаметазона, свободный кортизол суточной мочи и свободный кортизол в слюне, собранной в 23:00. Так как ни один из предложенных тестов сам по себе не отличается высокими показателями чувствительности и специфичности, для проведения диагностики необходимо выполнить как минимум 2 скрининговых теста первой линии [2,21,23,31,37].

1.3. Тесты первой линии при диагностике ЭГ

1.3.1. Малая проба с дексаметазоном

Первоначально применялась, малая проба с дексаметазоном, суть которой заключалась в исследовании базального уровня кортизола в 1-й день, после чего в тот же день вечером в 23:00 пациент принимал 1 мг дексаметазона с последующим

контролем уровня кортизола на следующий день в утренние часы (08:00-09:00). В результате оценивалось снижение уровня (дельта) кортизола в процентном отношении, при этом снижение уровня кортизола менее чем на 50% свидетельствовало в пользу ЭГ. В последующем стало понятно, что однократное исследование кортизола после приема дексаметазона с отрезной точкой подавления кортизола менее 50 нмоль/л показывает такую же эффективность. В Российской Федерации терминологически ночной подавляющий тест (НПТ) с 1 мг дексаметазона и МПД являются синонимами и предполагают определение кортизола утром после приема 1 мг дексаметазона. В данной диссертационной работе термин НПТ заменен на МПД. Патофизиологический смысл данного теста заключается в утрате отрицательной обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси при экзогенном введении ГКС [5]. Если в нормальном состоянии при экзогенном введении ГКС выработка эндогенного кортизола должна снижаться, при ЭГ этого не происходит. Проведение теста предполагает прием 1 мг дексаметазона в 23:00-00:00 с последующим анализом крови на кортизол в 08:00-09:00 на следующие сутки, при этом подавление уровня кортизола ниже 50 нмоль/л свидетельствует об отсутствии ЭГ [2,3,5]. Точка разделения в 50 нмоль/л позволяет достичь значительного для скринингового теста уровня чувствительности (более 95%), при удовлетворительном уровне специфичности (~80%) [2,3]. Тем не менее, существуют риски ложноположительного результата у пациентов с мальабсорбцией, при которой возможно снижение всасывания дексаметазона, при приеме некоторых препаратов, воздействующих на печеночный клиренс (карбамазепин, фенитоин, фенobarбитал, рифампицин и др.), а также в случае, если пациент забыл или испугался принять дексаметазон [38,39]. Ложноположительные результаты могут наблюдаться при беременности, а также при приеме комбинированных оральных контрацептивов (КОК), за счет увеличения концентрации кортизол-связывающего глобулина (КСГ). Так как при анализе кортизола крови исследуются как свободный, так и связанный с белком, биологически инертный, кортизол, это может приводить к получению завышенных значений кортизола крови. Таким образом, имеет смысл проводить тест только

после 4-6 недель отмены КОК и тест не рекомендуется проводить во время беременности [38]. Необходимо учитывать, что у 3-8% пациентов с ЭГ сохраняется отрицательная обратная связь и будет наблюдаться подавление уровня кортизол менее 50 нмоль/л [38,40]. К особой группе пациентов, у которых также могут наблюдаться ложноположительные результаты МПД относятся пациенты с ожирением, сопровождающимся зачастую функциональным гиперкортицизмом за счет активизации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [41,42].

1.3.2. Исследование кортизола в слюне в 23:00

Цель исследования кортизола слюны в вечернее время – выявить нарушение характерного циркадного ритма выработки кортизола, при котором его секреция максимальна в утренние часы (07-09:00) и минимальна при отходе ко сну [2,3,43,44,45]. Исследование вечерней слюны вошло в перечень рекомендуемых скрининговых тестов в последнюю очередь, но достаточно быстро получило широкое распространение за счет простоты выполнения и достаточно высоких показателей чувствительности и, особенно, специфичности (при отрезной точке 9,4 нмоль/л чувствительность составляет 84,4%, специфичностью - 92,3%) [43]. Забор материала слюны может быть выполнен в домашних условиях, является неинвазивным и безболезненным, что снижает уровень стресса, к которому кортизол чувствителен; при этом анализ слюны на кортизол может быть использован для диагностики ЭГ у пациенток, принимающих КОК, так как при анализе исследуется свободный кортизол, уровень которого не зависит от КСГ [2,3,5,43]. Материал стабилен при комнатной температуре в течение 7 дней и более, что делает возможной отправку материала почтой при отсутствии возможности выполнить анализ по месту жительства [46]. В отличие от анализа суточной мочи на кортизол, где утрата 50 мл материала приводит к непоказательным результатам исследования, количество собранной слюны не влияет на результат [47].

Впервые исследование кортизола в слюне описано в 80-х годах XX века, при этом использован метод радиоиммунного анализа (РИА) [48]. Длительное время данный диагностический анализ не находил широкого клинического применения в

связи с широким разбросом точек разделения как при применении РИА, так и более современного иммуноферментного анализа (ИФА) [43,44]. Позже введена в практику масс-спектрометрия, имеющая преимущество в связи со способностью анализировать отдельно кортизол и инактивный кортизон [49]. Тем не менее, метод достаточно дорогостоящий. Масс-спектрометрия и ИФА рекомендуются в качестве предпочтительных методов анализа в клинических рекомендациях Европейской ассоциации эндокринологов 2008 года, так применение этих методов позволяет достигнуть высоких уровней чувствительности (92-100%) и специфичности (93-100%) [2]. Основные преимущества ИФА заключаются в простоте, низкой стоимости, а также в возможности проводить исследование при достаточно маленьком объеме материала. В России на базе Эндокринологического научного центра научным коллективом под руководством Н.П. Гончаровым был разработан вариант ИФА – иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА) [3,50]. В настоящее время достаточно широко внедрен электрохемилюминесцентный метод (ЭХЛА). Исследование на автоматизированных анализаторах выполняется быстро, результат может быть получен в день сдачи анализа. Это возможно благодаря тому, что, в отличие от ИФА, нет необходимости копить материал и замораживать его до проведения исследования большой серии образцов [43,44]. Для изучения слюны методом ЭХЛА предпочтительно использовать специальную систему Salivette (Sarstedt, Germany) для забора материала, представляющую из себя пробирку с ватным швабом внутри (рис. 1). Чтобы собрать материал, пациенту необходимо поместить ватный шваб в ротовую полость и подержать в течение 2-3 минут для достаточного пропитывания. Затем ватный шваб помещается обратно в пробирку и хранится на дверце холодильника. В лаборатории пробирки центрифугируются на скорости 1000 оборотов в минуту в течение 2-3 минут, ватный шваб удаляется, а материал слюны, выделенный на дно пробирки после центрифугирования, отправляется на анализ (см. рисунок 1).



Рисунок 1 – Методология забора слюны при помощи системы Salivette (адаптировано из <https://immunocap.ru>).

1 – Открывание крышки. 2 – Изъятие ватного шваба. 3 – Помещение в ротовую полость на 2-3 минуты. 4 – Возвращение ватного шваба в пробирку. 5 – Герметичное закупоривание крышки. 6- Центрифугирование образца. 7 – Выделенный в ходе центрифугирования образец слюны. 8 – Утилизация ватного шваба.

Не смотря на простоту сбора материала, пациент должен быть проинформирован о том, как правильно в домашних условиях осуществить сбор слюны. Прежде всего, необходимо начинать сбор материала как минимум через 30 минут после последнего приема пищи и чистки зубов, чтобы предотвратить контаминацию материала кровью, которая потенциально может привести к завышенному значению кортизола в результате анализа [51]. Тем не менее, в некоторых исследованиях доказано, что примесь небольшого количества крови на результат не повлияет [52]. В случае серьезного инфекционного поражения ротовой полости, следует отдавать предпочтение другим скрининговым методам

исследования. У курильщиков в среднем уровень кортизола слюны выше, чем у некурящих, что может быть связано с активизацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [53,54], в некоторых исследованиях предположен дозозависимый эффект [55,56]. Некоторые вещества, такие как лакрица, жевательный табак содержат в своем составе глицирризиновую кислоту, ингибирующую 11-бета-гидроксистероиддегидрогеназу 2 типа, выделяющуюся в слюнных железах и конвертирующую кортизол в неактивный кортизон, что может привести к ложно-завышенному результату анализа [5,43,57]. Также следует отметить, что у пациентов с нестандартным режимом сна и бодрствования (ночная работа, частые перелеты со сменами часовых поясов) исследование кортизола слюны нецелесообразно, потому что у таких пациентов другой циркадный ритм выработки АКТГ и, соответственно, кортизола [2,3]. В случае, если у пациента запланирован также НПТ, ему следует подробно разъяснить последовательность его действий, чтобы предотвратить несвоевременный прием дексаметазона и контаминацию им материал слюны.

Необходимо отметить, что точки разделения свободного кортизола слюны вечером значительно отличаются между методами, различия существуют и среди исследований, в которых использовался один и тот же метод, что связано, в первую очередь, с разными объемами выборки и дизайном. В ходе научных работ с использованием РИА точка разделения варьировалась в пределах 2,8-15,2 нмоль/л, с чувствительностью 92-100% и специфичностью 93-100% [46,47,58-61]. В исследованиях с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией cut-off значение находилось в промежутке 1,9-5,1 нмоль/л, с чувствительностью 75-100% и специфичностью 92-98% [62-66]. Для ЭХЛА значения точек разделения отличались в зависимости от того, были ли включены в исследование пациенты с ожирением (у которых мы можем наблюдать состояние функционального гиперкортицизма) и по какому принципу избиралось cut off значение. В нашей стране точка разделения для свободного кортизола слюны в 23:00 методом ЭХЛА разработана в стенах Эндокринологического научного

центра Белой Ж.Е. и соавторами, в исследование были включены пациенты с ожирением, cut off значение для дифференциальной диагностики ЭГ у пациентов с ожирением составило 9,4 нмоль/л (чувствительность 84,4%, специфичность 92,3%) [67]. В исследовании зарубежных коллег, где также включена группа пациентов с ожирением, точка разделения для диагностики ЭГ у пациентов данной группы методом ЭХЛА составила 10,9 нмоль/л с показателями чувствительности и специфичности 67,6% и 78,3%, соответственно [68]. Референсный интервал значений кортизола слюны напрямую зависит от выборки, на основании которой производится расчет, при этом наибольший интерес представляет определение точки разделения для пациентов с ожирением, у которых в ходе диагностики эндокринных причин набора веса необходимо исключать ЭГ. При этом диагностику нередко затрудняет функциональный гиперкортицизм, который часто наблюдается у этой группы пациентов.

1.3.3. Исследование свободного кортизола в суточной моче

В нормальном состоянии около 10% кортизола в сыворотке крови является свободным и биологически активным несмотря на то, что бóльшая часть реабсорбируется в почках, 1% в неизменном виде выделяется с мочой [69,70]. Таким образом, исследование позволяет оценить суточную экскрецию кортизола [2,3]. Будучи внедренным с 1970х годов, до сих пор входит в скрининговый тест первой линии. Так как кортизол выделяется в свободном, не связанном с КСГ виде, этот анализ может применяться у пациенток, принимающих КОК [71]. Критерием для диагностики служит значение, превышающее верхнюю границу референсного интервала для данного метода на 30-50% [2], при этом рекомендуется также определять уровень креатинина мочи для того, чтоб убедиться в адекватном объеме собранного материала [2]. Анализ характеризуется высокими показателями чувствительности (до 98%) и относительно высоким уровнем специфичности (до 92%) [69,72]. Тем не менее, диагностика умеренного гиперкортицизма при помощи кортизола суточной мочи может быть затруднена за счет того, что избыточное количество кортизола попадает в мочу только после того как исчерпывается

связывающая способность крови [69]. Таким образом, при небольшом повышении кортизола крови, значение свободного кортизола суточной мочи может оказаться нормальным. Вероятно, частично из-за этого, результаты некоторых исследований указывают на менее удовлетворительные показатели диагностических характеристик этого исследования [69,73]. Для получения адекватного результата, пациента необходимо в устной или письменной форме проинструктировать о том, как правильно осуществить сбор мочи: первую утреннюю порцию следует пропустить, а далее собирать весь материал вплоть до первой утренней порции мочи следующего дня [2,3]. В течение суток собранный материал следует хранить в холодильнике, но не подвергать заморозке [2]. Следует отметить, что значения кортизола суточной мочи - переменный параметр, в связи с чем при подозрении на ЭГ и получении отрицательного результата, необходимо повторить тест как минимум еще раз (ранее рекомендовалось трехкратное проведение анализа [74]), чтобы исключить мягкую форму ЭГ или циклическое течение [2,69]. Существует ряд факторов, способных повлиять на результат: утрата более 50 мл мочи, избыточное потребление жидкости (более 5 л) [75], нарушение функции почек (при клиренсе креатинина менее 60 мл/мин), а также прием некоторых препаратов [2,3]. Довольно распространенной ошибкой при проведении анализа является сбор суточной мочи на фоне проведения пробы с 1 мг дексаметазона, что делает результат абсолютно неинформативным [76]. Как в случае с исследованием слюны, для изучения кортизола суточной мочи используются разные диагностические методы [5], от которых зависит чувствительности и специфичность. В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о преимуществе жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией [5,77,78].

1.4. Другие лабораторные методы диагностики ЭГ

1.4.1. Исследование кортизола сыворотки крови в 23:00

Как и в случае с исследованием кортизола в слюне в 23:00, анализ кортизола крови позволяет сделать вывод о нарушении циркадного ритма выработки кортизола, характерного для пациентов с ЭГ [2,3]. Тем не менее, в отличие от

исследования слюны, для анализа крови требуется госпитализация пациента, что может быть сопряжено с повышенным стрессом. Во избежание ложноположительного результата рекомендуется проводить исследование не ранее чем на 3-и сутки пребывания в стационаре [2,43]. Были исследованы диагностические возможности теста при заборе крови во время сна и бодрствования, тем не менее убедительных данных в пользу проведения теста в состоянии сна получено не было [2,43]. Так как проводить забор крови у бодрствующего пациента технически намного проще, было принято решение отдать предпочтение этой методике. При точке разделения 207 нмоль/л радиоиммунным методом, тест обладает достаточно высокими показателями чувствительности и специфичности (более 96%), тогда как, при исследовании у пациентов с ожирением наблюдалось снижение показателей специфичности до 83% [79]. Тем не менее, в комбинации с НПТ и исследованием суточной мочи на кортизол, этот тест может улучшить диагностическую точность [80].

1.4.2. Сорокавосьмичасовая проба с дексаметазоном 2 мг в день

В отличие от классического варианта малой пробы с 1 мг дексаметазона, в данном случае препарат принимается в дозе 0,5 мг каждые 6 часов в течение 48 часов, после чего через 6 часов (в некоторых модификациях через 2 часа) после последнего приема дексаметазона осуществляется забор крови с определением кортизола [81,82]. В отличие от первоначальных данных, где была выявлена улучшенная специфичность данного теста по сравнению с МПД (более 95% при точке разделения 50 нмоль/л), более поздние исследования, наоборот, свидетельствуют о более низких показателях диагностических возможностей теста [83-85]. Учитывая более сложную технику выполнения, проба в таком виде редко применяется в клинической практике.

1.4.3. Сорокавосьмичасовая проба с дексаметазоном 2 мг в день и стимуляцией КРГ

Подобная модификация для пробы была предложена с целью увеличения диагностических возможностей. Так как кортизол на пробе подавляется ниже 50

нмоль/л как у здоровых, так и у некоторых пациентов с ЭГ, дополнительное введение КРГ позволит снизить количество ложноотрицательных результатов, за счет того, что экзогенное введение КРГ значительно усилит выработку АКТГ и, соответственно, выброс кортизола [2]. Первоначально, на относительно небольших выборках пациентов, были получены высокие показатели чувствительности и специфичности [86]. Тем не менее, в дальнейших исследованиях это не подтвердилось [85,87], диагностические возможности уступали тесту со стимуляцией десмопрессином, а наилучшие результаты получены при комбинации сорокавосьмичасового теста с приемом дексаметазона 2 мг в сутки со стимуляцией десмопрессином вместо КРГ, особенно в случае дифференциальной диагностики ЭГ с функциональным гиперкортицизмом [88]. Из-за недоступности КРГ в РФ и неудобства проведения 2-х дневной пробы, ее не применяют при диагностическом поиске.

1.4.4. Тест со стимуляцией десмопрессином

Как в случае с КРГ, десмопрессин обладает стимулирующим действием на кортикотрофы. При его введении наблюдается значительный выброс АКТГ и кортизола у пациентов с БИК. При этом тест не представляет интереса для проведения у пациентов с надпочечниковым генезом ЭГ или АКТГ-ЭС [89]. В ходе пробы исходно исследуется уровень АКТГ, вводится 10 мкг десмопрессина и контролируется изменение концентрации АКТГ в динамике через 10, 20 и 30 мин после введение стимуляционного агента. В литературе встречается и измененная методология забора крови, при которой концентрация АКТГ контролировалась также через 45, 60, 90 и 120 мин [89]. В целом тест не показал высоких уровней чувствительности и специфичности, в связи с чем широко не применяется.

1.4.5. Исследование кортизола в волосах

Впервые результаты исследования уровня кортизола в волосах были описаны в 2004 году [90]. Этот анализ делает возможным ретроспективную оценку гиперкортизолемии, благодаря чему можно оценить длительность течения заболевания, а также диагностировать циклическое течение ЭГ. Исследование

неинвазивное, что удобно как пациенту, так и медицинскому персоналу, может быть интересным в научных и в практических целях [91]. Материал настолько стабилен, что даже в волосах человеческих останков, найденных в районе Наска в Перу (1-1000 лет до н.э.) удалось измерить уровень кортизола [92]. Изначально предполагалось, что волосы в среднем растут по 1 см в месяц, тем не менее оказалось, что существует значительная разница в скорости роста волос как среди разных этнических групп, так и индивидуально [93]. Также скорость роста зависит от области черепа, из которой берется материал, в связи с чем рекомендуют использовать волосы из верхней части затылочной области. Под воздействием УФ-излучения концентрация кортизола в волосе может снизиться до 50%, что может затруднить диагностику [94]. В исследовании сравнения когорты пациентов с ЭГ со здоровыми добровольцами, было выявлено, что у пациентов с ЭГ уровень кортизола в волосах значительно выше [95].

1.4.6. Мультистероидный анализ

С распространением метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией, появились новые возможности для диагностики и изучения патофизиологии ЭГ [96]. Мультистероидный анализ предполагает изучение стероидного профиля, способный включать в себя до 15-18 параметров. Изначально предполагалось, что у пациентов с ЭГ разного генеза стероидный профиль отличается, последующие исследования дали интересные результаты, при этом в качестве материала исследовалась моча [97]. В исследовании Eisenhofer G. и коллег [98] было включено 222 пациента, у которых предполагалось наличие ЭГ, а также 277 здоровых добровольца, подобранных по половозрастным характеристикам с артериальной гипертензией и без нее. В 138 случаях ЭГ был исключен, у 51 пациента выявлен БИК, у 12и – АКТГ-ЭС, еще у 12-и был выявлен первичный ЭГ. У всех участников были изучены 15 параметров стероидного профиля плазмы крови, было выявлено, что использование панели из 10 метаболитов (11-дезоксикортизол, кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортикостерон, андростендион, 18-оксикортизол, ДГЭА, ДГЭА-сульфат и альдостерон) позволяет дифференцировать пациентов с ЭГ, а также с высокой доли

вероятности предположить его генез. Площадь под кривой операционных характеристик составила 0,965 у пациентов, у которых ЭГ был исключен, и максимально приближена к 1,0 у пациентов с АКТГ-ЭС. Процент неправильно установленных диагнозов при использовании теста составил 9,5%, при комбинации с МПД значение снизилось до 4,5%. Тем не менее, для введения мультистероидного анализа в клиническую практику требуются дальнейшие исследования.

1.4.7. Исследование остеокальцина в крови

Одним из характерных симптомов ЭГ является остеопороз, возникающий за счет угнетения костеобразования, маркером которого является остеокальцин [43,103]. В ходе многочисленных исследований было доказано снижение уровня остеокальцина у пациентов, принимающих ГКС [99,100], а также у пациентов с ЭГ [101-103]. В исследовании Sereg M. и соавторов [104] было выявлено, что исследование остеокальцина крови может быть полезным при диагностике ЭГ (площадь под кривой операционных характеристик 0,922) а также усилить точность диагностики мягких форм гиперкортицизма. В исследовании Белой Ж.Е. [105] площадь под кривой операционных характеристик для остеокальцина при диагностике ЭГ была сопоставима и составила 0,859, но все же уступала площади под кривой для МПД или кортизола слюны в 23:00. Тем не менее, тест может быть полезен для пациентов, у которых требуется исключить ЭГ или в случае диагностики ЭГ у женщин постменопаузального возраста с остеопорозом.

1.4.8. Применение искусственного интеллекта

В последнее время использование искусственного интеллекта и машинного обучения в медицине набирает обороты и доказывает свою пользу, как по части разработки новых лекарственных препаратов, так и с точки зрения диагностики и прогнозирования течения заболеваний [106-108]. Были проведены исследования с использованием специальных компьютерных программ, позволяющих по изображению лица пациента предположить у него наличие ЭГ [109,110]. В исследованиях использовать две фотографии (в профиль и анфас), автоматически

размещались метки на разные участки лица, позволяющие программе математически оценить геометрию каждого пациента. Далее алгоритмы программы анализировали результаты и делали вывод о возможном наличии у пациента ЭГ. Метод изначально не претендовал на замещение необходимого биохимического скрининга, но, судя по результатам, может оказаться полезным в качестве вспомогательного метода скрининга, особенно на уровне неспециализированных центров, а также при мониторинге ремиссии у пациента с доказанным ЭГ после радикального или консервативного лечения [109,110]. В пилотном исследовании [109] чувствительность метода составила 85%, специфичность – 95%, тем не менее в повторном исследовании на расширенной выборке пациентов диагностические возможности теста показали значительно более низкие результаты [110].

1.5. Дифференциальная диагностика ЭГ и функционального гиперкортицизма

Так как кортизол относится к гормонам стресса, его повышение может наблюдаться при ряде состояний и заболеваний, что может серьезно затруднить диагностику. Причиной функционального гиперкортицизма наиболее часто является активизация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, при этом визуально могут наблюдаться некоторые симптомы ЭГ, а также соответствующие результаты анализов и проб [2,3]. Состояния, при которых может наблюдаться функциональный гиперкортицизм, и их возможные проявления сведены в таблице 1.

Таблица 1. Наиболее частые причины функционального гиперкортицизма и возможные проявления соответствующих изменений в работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [111,112].

Причины функционального гиперкортицизма	Проявления нарушения работы гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы
Нейропсихические заболевания	<ul style="list-style-type: none"> - Усиленный выброс кортизола после пробуждения - Высокие показатели кортизола крови в вечернее время у некоторых пациентов - Повышенный, или, наоборот, пониженный уровень КРГ - Отсутствие подавление кортизола в ходе МПД. - Снижение активности инактивирующих кортизол ферментов
Синдром поликистозных яичников	<ul style="list-style-type: none"> - Умеренное повышение свободного кортизола суточной мочи ~50% пациентов - Сниженный уровень КСГ - Увеличение концентрации андростендиона, общего и свободного тестостерона - Снижение глобулина, связывающего половые гормоны
Ожирение	<ul style="list-style-type: none"> - Усиленный выброс кортизола на физический и психосоциальный стресс - Усиление активности 5α-редуктазы в печени - Увеличение выделения кортизола за счет более выраженной экспрессии 11β-гидроксистероиддегидрогеназы 1 типа

Алкоголизм	<ul style="list-style-type: none"> - Увеличение выработки КРГ с повышением уровня АКТГ - Более высокие значения кортизола крови в 08:30 - Нарушение клиренса кортизола за счет печеночной дисфункции - Абнормальная супрессия кортизола в ходе МПД
Беременность	<ul style="list-style-type: none"> - Увеличение концентрации эстрогенов, сопровождающее беременность, приводит к активации синтеза КСГ печенью. - Увеличение кортизола крови, свободного кортизола суточной мочи - Ткань плаценты способна синтезировать АКТГ

Диагностика ЭГ является обязательным этапом обследования при исключении гормональных причин ожирения, и именно такая ситуация наиболее распространена в практике как эндокринолога, так и врачей первичного звена [44]. При этом, необходимо учесть возможность ложноположительных результатов тестов на фоне ожирения, при котором, как упоминалось ранее, возможно состояние функционального гиперкортицизма. Это в первую очередь касается МПД и свободного кортизола слюны в 23:00. Тем не менее, получение отрицательных результатов этих тестов, делает наличие ЭГ маловероятным [113]. В ходе исследования диагностических возможностей кортизола слюны в 23:00 на 123 пациентах с ожирением, 10 из которых имели избыточную массу тела, было выявлено, что при точке разделения 9,4 нмоль/л чувствительность составила 84,4% (95% ДИ 71,2–92,2%); специфичность - 92,3% (95% ДИ 84,2–96,4%) [44]. Из альтернативных тестов наилучшие результаты при функциональном гиперкортицизме показали сорокавосемичасовой тест с 2 мг дексаметазона в сутки с последующей стимуляцией КРГ (чувствительность доходила до 100%, специфичность 63-100%) [82], а также тест со стимуляцией десмопрессином

(чувствительность 82%, специфичность – 90%) [83]. Тем не менее, до сих пор проводятся дополнительные исследования, признанные оптимизировать диагностику ЭГ у пациентов с возможным развитием функционального гиперкортицизма.

1.6. Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимых и АКТГ-независимых форм ЭГ

После подтверждения ЭГ следует приступить к установлению его причин [3]. В первую очередь необходимо выяснить является ли ЭГ АКТГ-зависимым или АКТГ-независимым. Этот этап не сопряжен с диагностическими трудностями и заключается в исследовании уровня АКТГ утром [23]. Значение АКТГ менее 10 пг/мл (или менее референсного интервала лаборатории) позволяет с высокой долей вероятности исключить АКТГ-зависимые формы ЭГ и направить усилия на поиск образования в надпочечниках [114]. Не смотря на кажущуюся простоту, у анализа крови на АКТГ есть свои особенности, в первую очередь, касающиеся преаналитического этапа: АКТГ быстро разрушается протеазами плазмы, в связи с чем кровь должна помещаться в охлажденные пробирки с ЭДТА, правильно храниться и в максимально быстрые сроки отправляться в лабораторию для анализа во избежание ложноотрицательных результатов [5,115]. Было выявлено, что в случаях АКТГ-ЭС значения АКТГ превышают таковые у пациентов с БИК, тем не менее, исследование АКТГ не дает возможности дифференцировать этих пациентов [5,6].

1.7. Дифференциальная диагностика АКТГ-зависимых форм ЭГ

К АКТГ-зависимым формам ЭГ относится БИК, при которой очаг гиперпродукции АКТГ находится в гипофизе (~80% случаев), и АКТГ-ЭС, при котором источником гиперпродукции АКТГ является нейроэндокринное образование (НЭО) иной локализации (10-20% случаев) [37,38]. Первоначально, Лиддл, описавший эктопическую продукцию АКТГ, считал, что ее причиной является мелкоклеточный рак легких [116], со временем список возможных локализаций пополнялся, было выявлено, что АКТГ-секретирующие НЭО могут

быть обнаружены также в щитовидной железе, тимусе, поджелудочной железе, надпочечниках (как правило в сочетании с феохромоцитомой), а также в органах малого таза [117].

При подтверждении АКТГ-зависимого ЭГ, следующим шагом является проведение МРТ гипофиза с контрастным усилением. Подавляющее большинство выявленных в ходе исследования кортикотропином являются микроаденомами (средний диаметр ~ 6 мм), что связано с относительно быстрым развитием клинической картины, в отличие, например, от акромегалии, при которой на этапе диагностики выявляют чаще макроаденомы [30,118]. В связи с небольшим размером образования, а также техническими особенностями МРТ области турецкого седла, до 20-30% кортикотропином не визуализируются при контрастном усилении, несмотря на развернутую клиническую картину [119]. Ситуация также осложняется тем, что примерно у 10% здорового населения может быть обнаружено гормонально-неактивное образование до 6 мм в диаметре [6]. В исследовании Yogi-Morren D. и соавторов в ходе дифференциальной диагностики БИК (n=104) и АКТГ-ЭС (n=26), использование диагностического критерия диаметра аденомы гипофиза больше или меньше 6 мм позволило достичь чувствительности 96% при диагностике БИК [120]. Таким образом, при обнаружении образования равного или менее 6 мм в диаметре, нельзя с точностью установить центральный генез ЭГ, необходимо проведение уточняющих тестов, желательно – одномоментный двусторонний селективный забор крови из НКС с применением стимулирующего агента [120,122].

1.7.1. Селективный забор крови из НКС

Селективный забор крови из НКС является «золотым» стандартом дифференциальной диагностики АКТГ-зависимых форм ЭГ, позволяет напрямую установить источник гиперпродукции АКТГ на основании его градиента между кровью, оттекающей от гипофиза (НКС) и кровью из периферических вен (нижняя полая вена) [2,6,120]. Чувствительность метода составляет 88-100%, специфичность - 67-100% [121,122]. Процедура селективного забора крови была

предложена в 1970-е годы [123], и изначально проводилась с одной стороны, или же с двух сторон, но не одномоментно и без применения стимуляционного агента [121,124], позже Олдфилдом и соавторами был разработан метод двустороннего селективного забора крови из НКС [125] с использованием латерализации в качестве выбора объема хирургического вмешательства на гипофизе. В середине 1980х было предложено введение КРГ в качестве стимулирующего агента, что улучшило чувствительность метода [126]. Несмотря на то, что со временем ценность латерализации оттока АКТГ при выборе тактики аденомэктомии была поставлена под вопрос, метод до сих пор признан оптимальным для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимых форм ЭГ. В РФ процедура селективного забора крови из НКС проводится с 2008 года. В 2009 году коллективом отделения нейроэндокринологии и остеопатий ЭНЦ был опубликован успешный опыт первых процедур [127].

Технически процедура проводится следующим образом: доступ осуществляется через бедренные вены, затем под рентгенологическим контролем осуществляется установка катетеров в правый и левый нижние каменистые синусы. Один из катетеров также устанавливается в нижней полой вене для оценки периферического уровня АКТГ. После правильного позиционирования катетеров под контролем контрастного усиления начинается одномоментный забор крови, который выполняется за 5 минут до, во время, а также через 3,5 и 10 минут после введения стимулирующего агента (в РФ в этих целях применяется десмопрессин 8 мкг) [122]. Одной из частых ошибок при проведении селективного забора крови из НКС является неправильное позиционирование катетеров. Для предотвращения подобных ошибок на преаналитическом этапе до введения десмопрессина также проводится исследование градиента пролактина, так как выработка пролактина не характеризуется импульсной секрецией и не подавляется при болезни Иценко-Кушинга. После получения результатов, проводится подсчет градиентов АКТГ между центром и периферией, при этом градиент ≥ 2 до стимуляции и ≥ 3 после

стимуляции свидетельствует о центральном генезе гиперкортицизма [43,121,122,128].

В РФ проведение селективного забора крови из НКС показано во всех случаях, когда нельзя с большой долей вероятности судить о генезе АКТГ-зависимого гиперкортицизма, а именно: при отсутствии визуализации аденомы гипофиза по данным МРТ или же при выявлении аденомы менее 6 мм в диаметре, а также при рецидиве гиперкортицизма после ТА и отсутствии данных гистологического и ИГХ исследований послеоперационного материала, подтверждающих диагноз кортикотропиномы гипофиза [122]. Тем не менее, несмотря на то что критерий диаметра аденомы более 6 мм с высокой долей вероятности свидетельствует о центральном генезе гиперкортицизма, встречаются случаи сочетания АКТГ-эктопированного синдрома и гормонально-неактивной аденомы гипофиза диаметром более 6 мм [121,122]. Неправильные выводы, основанные на данных МРТ, неизбежно ведут по ложному диагностическому пути и приводят к заведомо неэффективным нейрохирургическим вмешательствам. Тем не менее, проводить селективный забор крови из НКС всем пациентам с подтвержденным АКТГ-зависимым гиперкортицизмом экономически нецелесообразно, к тому же, даже не смотря на высокие показатели чувствительности и специфичности процедуры, они таковы только в специализированных центрах, где ее проводит опытный сосудистый хирург. При выполнении процедуры хирургом без опыта проведения селективного забора крови из НКС, диагностическая ценность результатов неизбежно снижается.

Даже при проведении процедуры в специализированном центре существует риск получения неправильного результата, при этом, ложноотрицательные заключения встречаются гораздо чаще [121]. Наиболее частая причина ложных заключений состоит в технических ошибках установки катетеров, в случаях умеренного гиперкортицизма, циклических форм заболевания или при приеме ингибиторов стероидогенеза [129].

Наиболее частым побочным эффектом процедуры является паховая гематома (встречается в ~4% случаев), частота серьезных неврологических осложнений не превышает 1% [121]. И тем не менее, описаны случаи повреждений ствола головного мозга [130], субарахноидального кровотечения [131], паралича VI черепного нерва и тромбоэмболии легочной артерии [133,134].

1.7.2. Большая проба с дексаметазоном

Патофизиологический смысл проведения пробы заключается в том, что кортикотропиномы, в отличие от НЭО, в большинстве случаев сохраняют чувствительность к более высоким дозам дексаметазона и, исходя из принципов отрицательной обратной связи, снижают выработку АКТГ и подавляют синтез кортизола надпочечниками [5]. Согласно протоколу проведения пробы, первоначально исследуют утреннюю концентрацию кортизола крови, в 23:00 пациент принимает 8 мг дексаметазона, в 08:00-09:00 следующего дня повторно исследуют концентрацию кортизола крови. Также возможна другая схема, при которой пациент принимает 2 мг дексаметазона каждые 6 часов (при этом суммарная доза также равна 8 мг), но такая схема менее удобна для пациента и увеличивает вероятность технических ошибок. Подавление уровня кортизола более чем на 60% от исходного свидетельствует о центральном генезе гиперкортицизма [3]. Тем не менее, нередки случаи стойкой утраты кортикотропиномой отрицательной обратной связи, вследствие чего даже большие дозы дексаметазона не способны подавить ее секрецию, тогда как некоторые НЭО, напротив, снижают выработку АКТГ в ответ на введение 8 мг дексаметазона. Из-за этого диагностические возможности пробы значительно ухудшаются, чувствительность и специфичность составляют 65-80% и 60-80%, соответственно [135]. В связи с этим, не смотря на относительное удобство и неинвазивность пробы, ее применение в клинической практике ограничено. Тем не менее, при невозможности проведения селективного забора крови из НКС, выполнение пробы может помочь снизить вероятность диагностической ошибки.

1.7.3. Периферическая проба с кортиколиберином

В качестве малоинвазивного теста для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма также используется проба с кортиколиберином. При этом рекомбинантный человеческий или овечий КРГ вводится внутривенно болюсно из расчета 1 мг/кг массы тела или, что чаще, в суммарной дозе 100 мг. При этом, в случае центрального генеза гиперкортицизма, будет наблюдаться усиление синтеза АКТГ и, соответственно, кортизола, чего обычно не наблюдается при эктопической секреции АКТГ [38]. Диагностические возможности пробы варьируются в зависимости от происхождения кортиколиберина, выбранного cut-off значения кортизола и протокола пробы, который в различных центрах может несколько отличаться [38,136,137]. В РФ кортиколиберин не доступен, поэтому данный тест в рутинной практике не применяется.

Были разработаны и другие малоинвазивные тесты для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма (такие как проба с метирапоном, с десмопрессином), тем не менее, их возможностей недостаточно для установки точного диагноза в связи с высокой частотой как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов [138]. «Золотым» стандартом дифференциальной диагностики остается селективный забор крови из НКС, дорогой и малодоступный инвазивный метод.

1.8. МикроРНК - новая страница в диагностике неоплазий

МикроРНК — класс малых (~23 нуклеотида) некодирующих молекул РНК, играющий важную роль в посттранскрипционной регуляции генов через связывание с матричной РНК (мРНК). Как правило, связь микроРНК с мРНК приводит к ее деградации или препятствует считыванию белок-кодирующей последовательности [139]. Первые микроРНК были открыты около 20 лет назад, однако прошло более 10 лет, прежде чем эти молекулы из области фундаментальной медицины стали переходить в клинические исследования в качестве потенциальных онкомаркеров и даже терапевтических мишеней для

нового класса лекарственных препаратов [140-145]. В 2002 г. впервые описано влияние измененного уровня экспрессии специфических микроРНК на канцерогенез — было выявлено, что сниженный уровень экспрессии miR-15 и miR-16, возникающий при делеции 13q14.3, приводит к развитию хронического лимфолейкоза [146]. Далее последовал целый ряд исследований по поиску изменений в экспрессии микроРНК, характерных для различных неоплазий, и на данный момент найдены специфические изменения профилей микроРНК при раке предстательной [147], молочных желез [148], шейки матки [149], легких [150] и др.

Биосинтез начинается с транскрипции ДНК при участии РНК-полимеразы II, в результате чего образуется при-микроРНК (первичная микроРНК). Далее при помощи ферментного комплекса, включающего белки Drosha (из семейства РНКазы III) и DGCR8 распознаются и отрезаются самокомплементарные участки, способные сформировать шпильку на транскрибируемой РНК. В результате образуется фрагмент РНК длиной 60-70 нуклеотидов, называемый пре-микроРНК. Этот фрагмент содержит две самокомплементарные области, соединенные петлей и небольшой одноцепочечный участок на 3'-конце. Эти структуры распознает экспортин-5 совместно с малой ГТФазой Ran. После их объединения происходит перенос комплекса через ядерную мембрану в цитоплазму. В цитоплазме фрагменты пре-микроРНК распознаются ферментом Dicer. Этот фермент имеет в своем составе PAZ (распознает неспаренный конец шпильки), хеликазный домен, РНК-связывающий домен, а также два домена с активностью РНКазы III. После связывания и позиционирования Dicer на молекуле пре-микроРНК РНКазные домены вносят два разрыва в РНК возле петли, отрезая ее от шпильки. Образованный 22-нуклеотидный двухцепочечный РНК-продукт связывается белком Ago2 из семейства Argonaute. Из двух цепей РНК только одна (ведущая) остается в комплексе с Ago2, тогда как вторая («пассажирская») диссоциирует от комплекса и, как правило, деградирует. Комплекс Ago2 с единичной цепью РНК и белком GW182 обозначаются как RISC. Именно RISC комплекс обеспечивает основной эффект микроРНК — блокирование экспрессии генов, мРНК которой

имеет комплементарный данной микроРНК участок. Схематически стадии процесса биосинтеза микроРНК отображены на рисунке 2.

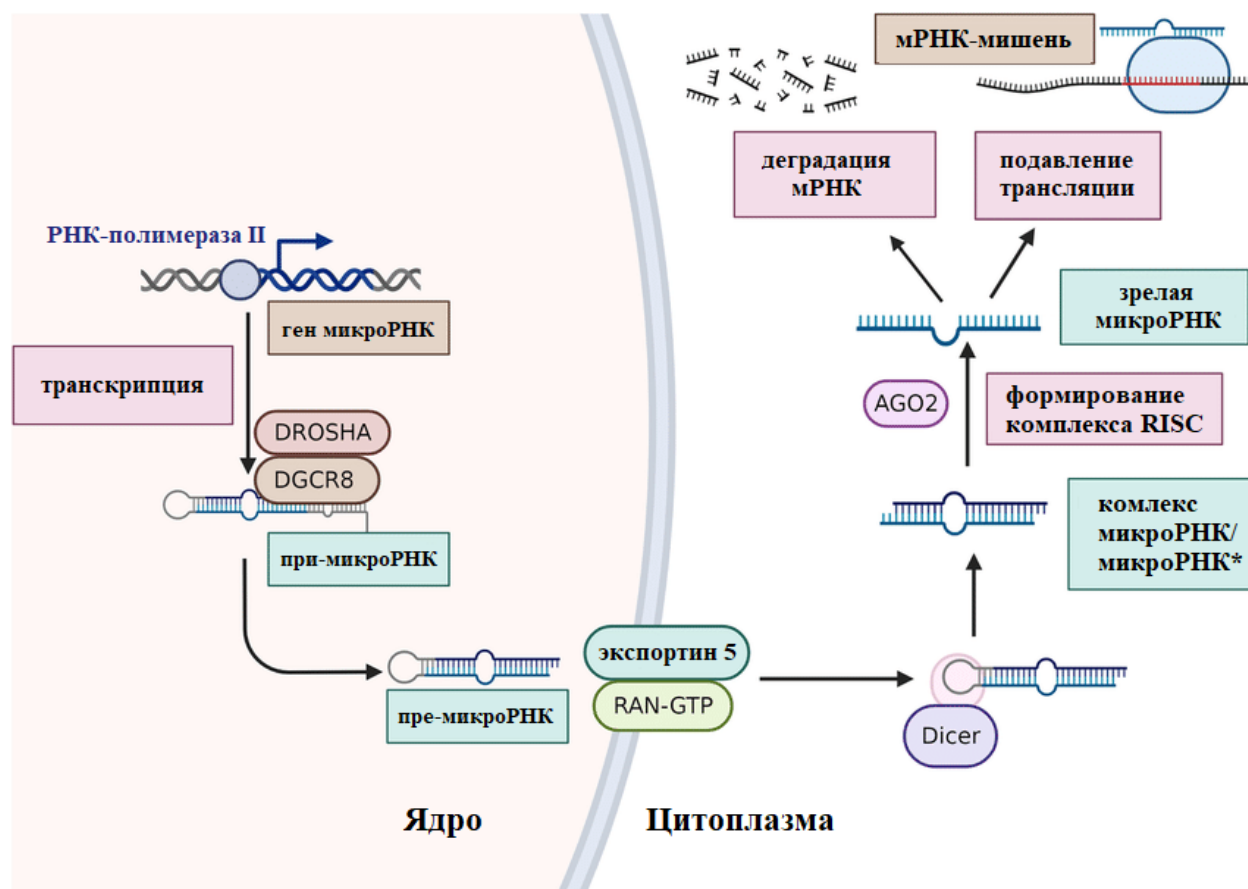


Рисунок 2. Схема биосинтеза микроРНК. Адаптировано по [151].

1.8.1. МикроРНК, участвующие в клеточной регуляции гипофиза в норме и патологии.

Первая публикация результатов исследования уровня экспрессии микроРНК в тканях аденом гипофиза относится к 2005 году, на основании изучения 10 образцов соматотропином и 10 пролактином методом нозерн-блот. Была выявлена гипэкспрессия miR-15a и miR-16-1 в тканях аденом по сравнению с тканью здорового гипофиза [152]. Далее, тем же научным коллективом проведено исследование уровня экспрессии микроРНК методом анализа микрочипов с верификацией ПЦР в реальном времени на более расширенной выборке пациентов (n-32), включавшей 6 соматотропином, 5 пролактином, 4 кортикотропином, 17 пациентов с гормонально-неактивной аденомой гипофиза (ГНАГ) и 6 образцов ткани здорового гипофиза. Выявлено, что микроРНК могут не только служить

маркерами тех или иных аденом гипофиза, но также указывать на их размер и даже наличие или отсутствие лечения агонистами дофамина ранее [153]. В результате, выявлены 30 микроРНК, отличающихся у пациентов с аденомами гипофиза по сравнению с интактным гипофизом, при этом наиболее репрезентативными были miR-212, miR-26a, miR-150, miR-152, miR-191 и miR-192, уровень экспрессии которых выше у пациентов с аденомами, тогда как miR-24-1 и miR-98, наоборот, подавлены в тканях аденом гипофиза. Авторы акцентируют внимание на том, что профиль экспрессии микроРНК в тканях кортикотропином значительно отличался от других гистотипов, при этом наибольшее значение придавалось miR-30a, miR-30b, miR-30c и miR-30d, уровень экспрессии которых повышен в кортикотропиномах. Следует отметить очевидный факт, что данное исследование проводилось на небольшой выборке пациентов, тем не менее, это послужило отправной точкой для дальнейших научных изысканий и публикаций. В 2009 г. опубликованы первые результаты исследования экспрессии микроРНК в тканях кортикотропином при сравнении со здоровой тканью гипофиза [154]. При анализе данных 14 пациентов с БИК методом количественной ПЦР в реальном времени выявлено снижение уровня экспрессии let-7a, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-141, miR-143, miR-145 и miR-150. При этом не было выявлено корреляции между уровнем экспрессии данных микроРНК и размером аденомы, а также вероятностью послеоперационной ремиссии. В 2010 году опубликовано исследование Stilling G и соавторов, в котором описаны результаты исследования ткани аденом и карцином гипофиза, а также материала здорового гипофиза методами ПЦР в реальном времени и гибридизации *in situ* [155]. В исследование экспрессии микроРНК методом ПЦР в реальном времени включены 24 пациента с аденомами гипофиза, при этом наибольшую группу составили пациенты с БИК (n=8), а также 2 пациента с карциномой и 6 образцов здоровой ткани гипофиза. Методом гибридизации *in situ* изучен 21 образец аденом гипофиза, 6 из которых составили кортикотропиномы, а также 8 карцином и 4 материала здорового гипофиза. В результате, по данным обоих методов исследования выявлено повышение экспрессии miR-122 в тканях кортикотропином и карцином, также

была зафиксирована гиперэкспрессия miR-493 в тканях карцином по сравнению с тканью кортикотропином. При анализе возможных таргетов miR-493, выявлено, что он, вероятно, взаимодействует с генами *LGALS3* и *RUNX2*, каждый из которых предположительно играет роль в процессах пролиферации клеток гипофиза. В 2013 году опубликовано исследование Gentilin E. и коллег, где были исследованы 10 микроРНК, полученные в ходе работы Battoni A. и соавторов [152,153]. Исследование проводили на культуре мышинных клеток АКТГ-секретирующих аденом гипофиза и образцах ткани человеческих кортикотропином, полученной в ходе ТА. В. Выявлено, что miR-26a наиболее значимо отличается в ткани АКТГ-продуцирующих аденом гипофиза, где наблюдается ее выраженная гиперэкспрессия [156]. При поиске возможных таргетов этой микроРНК выявлено, что ее прямой мишенью является протеинкиназа C δ (*PRKCD*) и при ингибировании miR-26a происходит замедление G1-фазы клеточного цикла. Авторы предполагают, что данная микроРНК могла бы быть полезным субстратом для разработки принципиально новой группы препаратов для лечения пациентов с БИК.

В 2015 г. на базе ФГБУ ЭНЦ Минздрава России выполнено исследование уровня экспрессии ранее описанных в литературе микроРНК в плазме крови пациентов с АКТГ-зависимым ЭГ [29]. В исследовании участвовал 41 пациент с АКТГ-зависимым ЭГ (БИК n=28, АКТГ-ЭС n=13) и 11 человек из группы контроля. У всех участников выполнен забор плазмы крови натощак, проведен анализ 21 микроРНК (miR-10b-5p, miR-129-5p, miR-133a-5p, miR-141-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-150-3p, miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-146a-5p, miR-185-3p, miR-191-5p, miR-203a-5p, miR-210-5p, miR-211-5p, miR-31-5p, miR-409-3p, miR-409-5p, miR-431-5p, miR-488-3p, miR-7g-5p) методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Статистически значимая разница уровня экспрессии между пациентами с БИК и АКТГ-ЭС обнаружена по уровням miR-16-5p [45,04 (95% доверительный интервал (ДИ) 28,77–61,31) у пациентов с БИК vs 5,26 (95% ДИ 2,65–7,87) в группе АКТГ-ЭС, p<0,001; q=0,001], miR-145-5p

[0,097 (95% ДИ 0,027–0,167) у пациентов с БИК vs. неопределяемый уровень у пациентов с АКТГ-ЭС, $p=0,008$; $q=0,087$] и miR-7g-5p [1,842 (95% ДИ 1,283–2,400) у пациентов с БИК vs 0,847 (95% ДИ 0,187–1,507) в группе АКТГ-ЭС, $p=0,02$; $q=0,14$]. Таким образом, выявлено 3 микроРНК, статистически значимо отличающихся у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС, при этом наибольшие различия показала miR-16-5p, уровень экспрессии которой отличался не только между пациентами с разным генезом АКТГ-зависимого ЭГ, но также между пациентами с разными формами АКТГ-зависимого ЭГ и здоровыми добровольцами.

В 2017 году в журнале *Pituitary* опубликованы результаты исследования уровня экспрессии кластера микроРНК miR-106b~25 в 25 образцах ткани АКТГ-секретирующих аденом гипофиза методом ПЦР в реальном времени [158]. Данный кластер кодирован в гене *MCM7* (компонент 7 комплекса поддержания минихромосом), и включает в себя miR-106b-5p, miR-93-5p, miR-93-3p и miR-25-3p. При выборе микроРНК для исследования, авторы опирались на литературные данные, указывающие на повышенный уровень экспрессии гена *MCM7* в инвазивных АКТГ-секретирующих аденомах гипофиза [159], а также на повышенный уровень кластера miR-106b~25 в разных типах неоплазий [158,160,161]. В результате исследования выявлено, что ген *MCM7* наравне с индексом Ki-67 обнаруживался в тканях инвазивных кортикотропином. Также гиперэкспрессия *MCM7* и кластера miR-106b~25 более выражена в тканях кортикотропином из круковских клеток, которые, как известно, характеризуются более высоким риском послеоперационных рецидивов [158]. Комбинация исследования *MCM7* и кластера miR-106b~25 позволяла дифференцировать инвазивные аденомы от неинвазивных, внося свой вклад в прогнозирование риска послеоперационных рецидивов у пациентов с БИК.

В 2018 году в Польше проведено исследование 75 образцов ткани аденом гипофиза (НАГ из гонадотрофов $n=34$, соматотропиномы $n=30$, кортикотропиномы $n=5$, ноль-клеточные аденомы $n=3$, плюригормональные аденомы $n=3$) [162]. Методом ПЦР в реальном времени исследован уровень экспрессии miR-410-3p,

которая, как было выявлено по данным предыдущих исследований и публикаций, вероятно, играет роль онкосупрессора при раке желудка, поджелудочной железы, молочных желез и костей [162]. Было выявлено, что экспрессия miR-410-3p отличается у пациентов с разными типами аденом гипофиза: в клеточных линиях кортикотропином и НАГ из гонадотрофов эта микроРНК, вероятно, стимулирует пролиферацию и усиливает инвазивность, тогда как в клеточных линиях соматотропином она, наоборот, имела ингибирующую функцию. Таким образом, одна и та же микроРНК при разных типах аденом может быть как онкосупрессором, как в случае с соматотропинами, так и онкогеном, в случае кортикотропином и НАГ из гонадотрофов [162]. Далее выполнен поиск возможных мишеней miR-410-3p. Выявлено, что она активирует сигнальный путь MAPK, PTEN/AKT и STAT3 в клеточных линиях кортикотропином и НАГ из гонадотрофов, при этом ослабляя их активность в клеточных линиях соматотропином. В том же году опубликовано исследование Vicchio T.M. и коллег, где выполнено сравнение 20-и микроРНК методом ПЦР в реальном времени в ткани аденом пациентов с НАГ (n=12) и гормонально-активными аденомами гипофиза (5-соматотропином, 5-кортикотропином, 3-пролактиномы), в качестве группы контроля взято 5 образцов ткани здорового гипофиза (аутопсийный материал) [163]. МикроРНК-кандидаты отобраны на основании данных литературы. Выявлено, что профиль экспрессии микроРНК отличается у пациентов с НАГ и гормонально-активными аденомами, в частности обнаружена гипозэкспрессия miR-149-3p ($p = 0.036$), miR-130a-3p ($p = 0.014$) и miR-370-3p у пациентов с НАГ по сравнению с гормонально-активными аденомами. По данным Ren и соавторов, значимую роль в формировании кортикотропином гипофиза может играть TSP-1 (тромбоспондин-1), выявлено, что уровень его экспрессии значительно ниже в тканях кортикотропином гипофиза по сравнению с тканью здорового аденогипофиза) [164]. Тромбоспондин-1 - адгезивный белок, регулирующий взаимодействие клеток между собой и с внеклеточным матриксом, играющий роль в процессе агрегации тромбоцитов, ангио- и туморогенезе, по своей сути является онкосупрессором [165]. В ходе исследования Ren J. и соавторов выявлено, что TSP-1 является прямой мишенью

для miR-449c, уровень экспрессии которой, в отличие от TSP-1 значительно повышен у пациентов с БИК. Далее при помощи иммунопреципитации РНК выявлено, что длинная некодирующая РНК lncTHBS1 является негативным регулятором для miR-449c и потенциально может использоваться в качестве агента, замедляющего развитие БИК [164].

В 2021 году опубликованы результаты исследования Луценко А.С. и Белой Ж.Е., выполненного в НМИЦ эндокринологии МЗ РФ, в ходе которого методом высокопроизводительного секвенирования исследована экспрессия микроРНК в плазме крови пациентов с акромегалией (n=12) и контрольной группы здоровых добровольцев (n=12) [166]. Наиболее отличающиеся в ходе анализа микроРНК далее валидизированы при помощи ПЦР в реальном времени. В ходе высокопроизводительного секвенирования выявлены 3 микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно ниже у пациентов с активной акромегалией по сравнению с группой контроля: miR-4446-3p -1.317 ($P = 0.001$), miR-215-5p -3.040 ($P = 0.005$) и miR-342-5p -1.875 ($P = 0.013$). В ходе ПЦР в реальном времени на расширенной выборке (47 пациентов с акромегалией, 28 здоровых добровольцев) подтверждены результаты для 2 микроРНК из 3-х: miR-4446-3p ($P < 0.001$, $P_{\text{adjusted}} < 0.001$), площадь под кривой операционных характеристик (AUC) 0.862 (95% ДИ 0.723-0.936; $P < 0.001$) и miR-215-5p ($P < 0.001$, $P_{\text{adjusted}} < 0.001$), AUC 0.829 (95% ДИ 0.698-0.907; $P < 0.001$). То есть эти две микроРНК позволяли с высокой долей вероятности дифференцировать пациентов с акромегалией и здоровых добровольцев.

Среди генетических механизмов развития кортикотропином доказано значение мутации гена *USP8*, кодирующего убиквитин карбокси-концевую гидролазу 8 [167,168]. Этот фермент участвует в процессе протеолиза белков. Мутации гена *USP8* обнаруживаются в 30-40% АКТГ-секретирующих аденомах гипофиза и молчащих кортикотропинах.

Выявлено, что наличие мутации в гене *USP8* ассоциировано с меньшим размером аденомы и большей вероятностью послеоперационной ремиссии

[169,170]. Тем не менее, мутация в этом гене также коррелировала с большей вероятностью рецидива [171].

В 2022 году опубликовано исследование, в котором проводилось сравнение уровня экспрессии микроРНК в тканях аденом у пациентов с активными (n=28) и, так называемыми, «немыми» кортикотропинами (n=20) [172]. Методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) выявлены 19 микроРНК, достоверно отличавшиеся между группами: в тканях активных кортикотропином отмечался более высокий уровень экспрессии miR-124-3p и miR-135-5p и более низкий уровень экспрессии их таргетных генов – *NR3C1* и *NR3C2*. Участие miR-124-3p в регуляции *NR3C1* подтверждено *in vitro* при помощи трансфекции этой микроРНК на клеточные линии AtT-20/D16v-F2 (выделена из передней доли гипофиза мышей). После трансфекции miR-124-3p выявлено снижение количества глюкокортикоидных рецепторов в культуре клеток. В заключении авторы делают выводы о том, что хотя разница в экспрессии микроРНК между тканью активных и «молчащих» аденом невелика, существует разница в экспрессии miR-124-3p, при этом её более высокий уровень экспрессии в тканях активных кортикотропином приводит к уменьшению количества глюкокортикоидных рецепторов клеток, с чем, вероятно, связана потеря отрицательной обратной связи тканью активных кортикотропиномы.

С каждым годом количество исследований профиля экспрессии микроРНК при патологии гипофиза растет, что приближает нас к пониманию патофизиологических процессов, приводящих к формированию аденом. Тем не менее, мы все еще далеки от понимания роли конкретных микроРНК и их таргетов в развитии той или иной патологии гипофиза. Болезнь Иценко-Кушинга относится к орфанным заболеваниям, в связи с чем опубликованные результаты исследований отличаются малыми размерами выборок и гетерогенностью самих данных, в том числе потому, что в ходе экспериментов используются различные методы определения микроРНК. Таким образом, сохраняется необходимость проведения масштабных исследований с включением как можно большего числа пациентов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Пациенты, включенные в исследование

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

АКТГ-зависимый гиперкортицизм подтвержден на основании как минимум 2х диагностических критериев: повышенного значения кортизола слюны в 23:00, повышенной экскреции свободного кортизола с мочой по данным исследования суточной мочи на кортизол, отсутствия подавления кортизола в ходе МПД [2,3,5]. Диагноз БИК устанавливался на основании значения АКТГ утром более 10 пг/мл в сочетании с лабораторным подтверждением ЭГ и при выявлении аденомы гипофиза более 6 мм по данным МРТ, или по данным результатов селективного забора крови из НКС. Диагноз АКТГ-эктопированный синдром устанавливался на основании результатов селективного забора крови из НКС. Окончательная верификация диагноза БИК проводилась на основании данных гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования послеоперационного материала у пациентов после нейрохирургического вмешательства и/или послеоперационной ремиссии. Окончательная верификация диагноза АКТГ-эктопированный синдром проводилась на основании гистологического, ИГХ исследования послеоперационного материала (при наличии) и/или данным послеоперационной ремиссии у пациентов с установленной локализацией НЭО. У нескольких пациентов точную локализацию АКТГ-продуцирующей опухоли в ходе комплексного онкопоиска (МСКТ грудной клетки, колоноскопии, гастроскопии, УЗИ щитовидной железы) установить не удалось (оккультная опухоль).

Послеоперационная ремиссия после нейрохирургического лечения БИК или удаления НЭО при АКТГ-ЭС оценивалась по клинико-лабораторной картине

развития надпочечниковой недостаточности или при нормализации кортизола крови или слюны в 23:00, а также свободного кортизола суточной мочи. Диагноз алиментарно-конституционального ожирения устанавливался на основании подсчета индекса массы тела (ИМТ более 30 кг/м²) при исключении гормональных причин ожирения.

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

2.2. Дизайн исследования

Дизайн исследований исходя из поставленных целей и задач, критерии включения и исключения представлены в таблице 2

Таблица 2. Характеристики выполненных исследований

Раздел исследования	Критерии включения	Критерии исключения	Тип исследования	Объем выборки
Исследовать диагностические возможности определения свободного кортизола в слюне в ходе МПД.	<p>1. пациенты, обратившиеся для амбулаторного или стационарного обследования в НМИЦ эндокринологии с направительным диагнозом ЭГ;</p> <p>2. пациенты с избыточной массой тела, у которых диагноз ЭГ исключался по решению врачей НМИЦ эндокринологии на основании комплекса лабораторных исследований;</p> <p>3. здоровые добровольцы, осмотренные врачами НМИЦ эндокринологии и не имевшие клинических признаков ЭГ;</p> <p>4. возраст старше 18 лет.</p>	<p>1. возраст младше 18 лет;</p> <p>2. состояние после двусторонней адреналэктомии;</p> <p>3. беременность;</p> <p>4. работа в ночное время, прием глюкокортикоидов;</p> <p>5. острые инфекционные заболевания;</p> <p>6. обострение хронических заболеваний;</p> <p>7. тяжелые соматические заболевания (почечная и печеночная недостаточность, терминальные состояния, острые периоды инсульта и инфаркта, ранее диагностированные злокачественные новообразования);</p>	Диагностическое проспективное исследование.	54 пациента с ЭГ, 54 пациента с алиментарно-конституциональным ожирением, 56 здоровых добровольцев.

		<p>8. тяжелые психические расстройства;</p> <p>9. злоупотребление алкоголем (установленный диагноз «хронический алкоголизм» или употребление крепких алкогольных напитков ежедневно);</p> <p>10. прием препаратов, влияющих на метаболизм кортизола;</p> <p>11. кровоточивость десен;</p>		
<p>2.1.2. Исследование экспрессии микроРНК в крови, оттекающей от гипофиза у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС методом</p>	<p>1. Возраст старше 18 лет;</p> <p>2. АКТГ-зависимый гиперкортицизм, подтвержденный на основании критериев, установленных действующими клиническими рекомендациями по</p>	<p>1. возраст моложе 18 лет;</p> <p>2. прием препаратов, снижающих уровень кортизола;</p> <p>3. тяжелые системные заболевания;</p> <p>4. беременность.</p>	<p>одноцентровое, одномоментное, выборочное исследование случай-контроль</p>	<p>24 пациента с БИК, 12 пациентов с АКТГ-ЭС</p>

высокопроизводительного секвенирования (NGS).	диагностике БИК [3] с последующей верификацией БИК или АКТГ-эктопии на основании результатов селективного забора крови из НКС и иммуногистохимического исследования.			
2.1.3. Исследование наиболее отличающихся по данным NGS микроРНК-кандидатов в плазме крови пациентов с БИК и АКТГ-ЭС методом ПЦР в реальном времени.				54 пациента с БИК, 13 пациентов с АКТГ-ЭС

2.3. Методика забора биологического материала и проведения фармакологических проб

Набор и обследование пациентов проводились на базе отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ НМИЦ эндокринологии МЗ РФ (зав. отделением д.м.н. Белая Ж.Е.).

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

Забор утренних образцов слюны в ходе малой пробы с дексаметазоном (МПД) выполнялся натощак в 08:00-09:00 по тому же принципу, что и забор слюны в 23:00 на том же анализаторе.

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

Двусторонний селективный забор крови из НКС выполнялся опытным сосудистым хирургом д.м.н. Ситкиным И.И. на базе ФГБУ НМИЦ эндокринологии МЗ РФ на васкулярной рентгеновской системе визуализации для инвазивных и диагностических процедур AlluraXper FD20 (Philips Medical Systems Nederland B.V., Нидерланды). Процедура проводилась в первой половине дня, после

стандартной подготовки пациента и премедикации (диазепам 5 мг/мл в/м). Доступ осуществлялся через бедренную вену, через которую под рентгенологическим контролем после установки интродьюсеров 4F и 5F проводились многоцелевые катетеры 4F, которые устанавливались в правом и левом нижних каменистых синусах.

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

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

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

Малая проба с дексаметазоном выполнялась согласно действующими клиническими рекомендациями: в 23:00 пациент принимал 1 мг дексаметазона, на

следующий день в 08:00-09:00 проводился забор крови с определением кортизола. Проба считалась положительной при снижении кортизола менее 50 нмоль/л [2,3].

Забор суточной мочи осуществлялся в стационарных условиях: пациент собирал мочи в единую тару в течение 24-х часов: первая утренняя порция пропускалась, далее вплоть до 07:00 следующих суток продолжался сбор мочи. Пациент был проинформирован, что при пропуске одной порции мочи, материал необходимо собирать заново. Сбор суточной мочи всегда предшествовал проведению МПД.

2.4. Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования выполнялись в лаборатории НМИЦ эндокринологии МЗ РФ (зав. лабораторией к.м.н. Л.В. Никанкина).

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

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

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

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

2.5. Инструментальные методы исследования

Исследования выполнялись на базе отделения лучевой диагностики ФГБУ НМИЦ эндокринологии МЗ РФ (зав. отделением д.м.н., проф. Воронцов А.В.)

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

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

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

2.6. Гистологические и иммуногистохимические исследования

Морфологический анализ образцов кортикотропином выполнен к.м.н. Лапшиной А.М. на базе отдела фундаментальной патоморфологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (зав. отделением – д.м.н., проф. А. Ю. Абросимов) и включал гистологический и иммуногистохимический (ИГХ) методы исследования.

В исследование были включены образцы ткани с наличием опухоли, объем которых был достаточен для гистологического и ИГХ исследований. Приготовление гистологических препаратов проводилось по стандартной методике с использованием гистопроцессора (Leica asp200) с проведением дегидратации полученных фрагментов ткани опухоли в абсолютном спирте в течение 12 часов, затем ткань заливалась в парафиновые блоки, после чего из парафиновых блоков производились срезы не более 5 мкм с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином и проведением ИГХ реакции с антителами к АКТГ (1:100, Dako) и использованием низкомолекулярного

цитокератина САМ 5.2 (1:100, Cell Marque) с демаскирующей обработкой щелочным буфером. ИГХ исследование выполнено с помощью автоматизированного аппарата (иммуностейнер Leica Bond Max) по стандартному протоколу.

Согласно морфологической классификации опухолей гипофиза ВОЗ от 2017 г. [173] кортикотропиномы были разделены на плотногранулированные кортикотропиномы (ПГК), состоящие из базофильных клеток с интенсивным окрашиванием цитоплазмы большинства опухолевых клеток-кортикотрофов (при ИГХ); редкогранулированные кортикотропиномы (РГК) – аденомы, состоящие из базофильных и хромофобных клеток с очаговой и слабо выраженной иммуноэкспрессией АКТГ цитоплазмой опухолевых клеток; аденомы из Кроковских клеток (Crooke's cell) характеризующиеся преимущественно хромофобными клетками со «стекловидной», гиалиновой цитоплазмой, с секреторными гранулами, окрашенными антителами к АКТГ, смещенными к периферии опухолевых клеток, с накоплением цитокератиновых филаментов, выявляемые при ИГХ с антителами к САМ 5.2 в виде кольца вокруг ядер.

2.7. Генетические методы исследования

Высокопроизводительное секвенирование проводилось на базе лаборатории генетики Центра биомедицинских технологий Федерального научно-клинического центра ФМБА России (зав. лабораторией – к.б.н. А.Г. Никитин) и медико-генетического центра «Геномед».

Выделение микроРНК из плазмы крови проводилось с помощью miRNeasy Serum/Plasma Kit («Qiagen», Германия) согласно инструкции компании-производителя на автоматической станции QIAcube («Qiagen», Германия). Для предотвращения деградации в выделенную РНК добавляли 1 ед. RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Fisher Scientific», США) на 1 мкл раствора нуклеиновых кислот. Концентрацию суммарной РНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare», Великобритания).

Высокопроизводительное секвенирование методом NGS.

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

Валидизация полученных микроРНК методом ПЦР в реальном времени.

Анализ экспрессии микроРНК производили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Исследование проводилось на оборудовании StepOnePlus (Applied Biosystems, США) с наборами TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, США) и TaqMan Advanced miRNA (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкциям производителей. Общий объем ПЦР реакции составлял 20 мкл. Условия амплификации фрагментов ДНК: 95C/20 сек – 1 цикл; 95C/1 сек, 95C/20 сек – 40 циклов. Данные экспрессии нормализованы с использованием геометрической средней референсной микроРНК (cel-miR-39-3p). Для получения значений пороговых циклов (cycle threshold, Ct) использовано программное обеспечение SDS (версия 2.3, Applied Biosystems, США). Значение Ct <35 выбрано в качестве порогового для определения экспрессии микроРНК. Для сравнительной

оценки циркулирующих микроРНК использован метод дельта-Сt, выполненный в пакете ddCT версии 1.30.0.

2.8. Статистическая обработка данных

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

Количественные параметры представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M+SD$) или медианы (Me) и интерквартильных размахов [Q_{25} ; Q_{75}], меры вариабельности - в виде абсолютных и относительных частот. 95% доверительные интервалы (95% ДИ) были рассчитаны методом Клоппера-Пирсона.

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

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

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

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

Для оценки диагностической возможности – ROC-анализ с расчетом чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного результата (ПЦПР) и прогностической ценности отрицательного результата (ПЦОР) и их 95% ДИ по методу Клоппера-Пирсона.

Отрезные значения отбирались согласно критерию Юдена. Эффективность использования полученных отрезных значений рассчитывалась по следующей схеме. Все полученные результаты в зависимости от их совпадения с результатами клиническо-лабораторных исследований подразделялись на четыре вида:

- Истинно положительный (ИП) результат: при использовании исследуемого показателя, правильность диагноза подтверждена стандартным методом диагностики;
- Истинно отрицательный (ИО) результат: отсутствие заболевания подтверждено как исследуемым методом, так и стандартным методом диагностики;

- Ложноположительный (ЛП) результат: при помощи исследуемого метода выявлено заболевание, но результат не подтвержден стандартным методом;
- Ложноотрицательный (ЛО) результат: заболевание не выявлено исследуемым методом, но выявлено при использовании стандартного метода;

Затем, по специальным формулам производилось вычисление основных показателей эффективности диагностического метода: диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), общей точности (ОТ), прогностической ценности положительного результата (ПЦПР) и прогностической ценности отрицательного результата (ПЦОР). ПЦПР – вероятность наличия заболевания при положительном (патологическом) результате теста. ПЦОР – вероятность отсутствия заболевания при отрицательном (нормальном) результате теста. Вычисление вышеуказанных показателей производилось с использованием ресурса statpages.info.

2.9. Этическая экспертиза

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

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Изучение диагностических возможностей исследования кортизола слюны в ходе МПД методом ЭХЛА

Образцы слюны были взяты у 164 участников исследования: 54 здоровых добровольцев, 45 из которых имели нормальный ИМТ и еще 9 человек имели ИМТ в пределах от 25,0 - 30,0 кг/м², соответствующий избыточной массе тела, и 110 пациентов с ожирением (ИМТ \geq 30 кг/м²), имевших также клинические признаки ЭГ. ЭГ был подтвержден у 54 пациентов (47 пациентов – БИК, 5 пациентов – СИК, 2 пациента с АКТГ-эктопированным синдромом), у 56 пациентов было подтверждено алиментарно-конституциональное ожирение. Основные характеристики групп пациентов и здоровых добровольцев представлены в таблице 3.

Таблица 3. Основные количественные и качественные характеристики и сравнение групп пациентов с эндогенным гиперкортицизмом, ожирением и здоровыми добровольцами.

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

Ж – женщины; М – мужчины; ИМТ – индекс массы тела. Меры вариабельности отражены в виде медианы и интерквартильного размаха. ¹ – точный критерий Фишера; ² – критерий Манна-Уитни.

Пороговый $P_0=0,017$ (после применения поправки Бонферрони)

Сравнение групп пациентов, включенных в исследование приведено в таблице 4.

Таблица 4. Сравнение групп пациентов, включенных в исследование.

	Эндогенный гиперкортицизм	Алиментарно- конституциональное ожирение	<i>P</i>*
Количество человек	54	56	
Пол Ж:М (%)	44 (81,5%): 10 (18,5%)	46 (82,1%): 10 (17,9%)	0,929 ¹
Возраст (лет)	40,00 [26,50; 53,0]	45 [34; 58]	0,042 ²
ИМТ (кг/м ²)	31,63 [27,40; 35,40]	37,2 [32,8; 40,0]	<0,001 ²

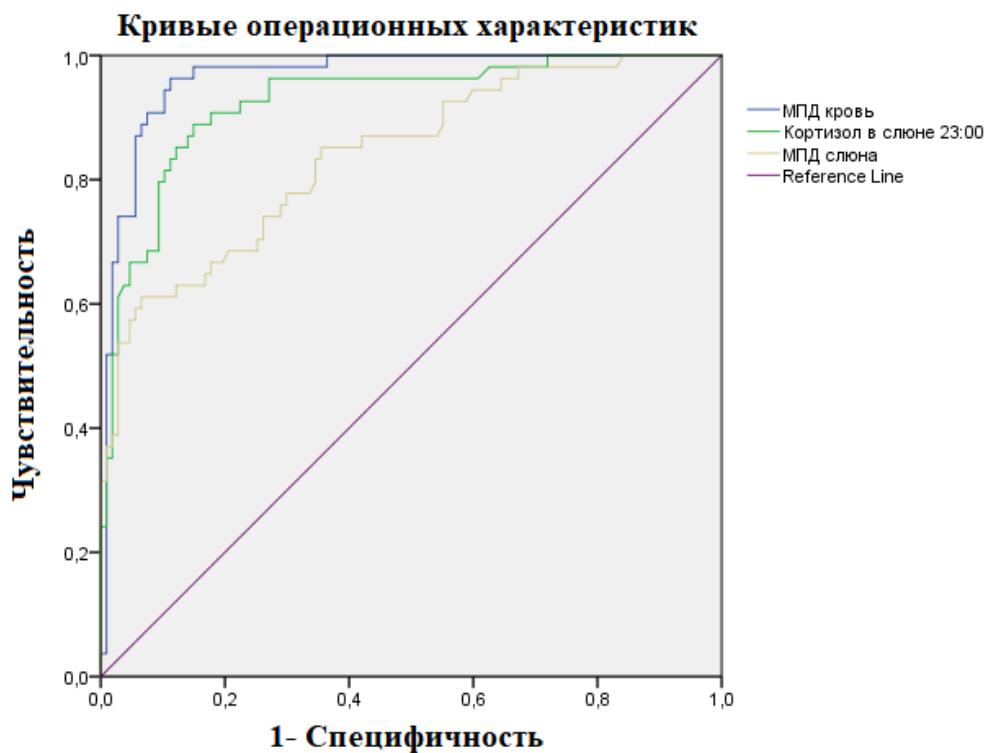
Ж – женщины; М – мужчины; ИМТ – индекс массы тела. Меры вариабельности отражены в виде медианы и интерквартильного размаха. ¹ – точный критерий Фишера; ² – критерий Манна-Уитни.

Пороговый $P_0=0,017$ (после применения поправки Бонферрони)

Можно сделать вывод о том, что группа пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением закономерно отличалась от группы пациентов с ЭГ по ИМТ. Тем не менее, не наблюдалось различий по поло-возрастным характеристикам.

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

Был выполнен ROC-анализ. При сравнении площадей под кривой операционных характеристик (AUC) с целью выявления ЭГ получены следующие результаты: для кортизола слюны в ходе МПД - 0,838 (95% ДИ 0,772-0,905), для кортизола в крови в ходе МПД - 0,965 (95% ДИ 0,939-0,992) и свободного кортизола слюны в 23:00 - 0,925 (95% ДИ 0,882-0,969). Были определены оптимальные точки разделения (cut-off) для исследования свободного кортизола в слюне в ходе МПД. При условии наибольшего значения суммы чувствительности и специфичности для разных когорт получены следующие результаты: для когорты «Контроль + ЭГ» значение составило 12,6 нмоль/л (чувствительность = 58,2%, специфичность = 96,2%), для когорты «ожирение + ЭГ» значение кортизола в слюне в ходе МПД составило 12,1 нмоль/л (чувствительность = 60%, специфичность = 92,9%), для всех когорт точка разделения составила 12,2 нмоль/л (чувствительность = 60,7%, специфичность = 93,4%). Учитывая незначительную вариабельность отрезных точек для разных когорт пациентов, cut-off значение было определено как 12,0 нмоль/л. На рисунке 3 представлены кривые операционных характеристик для исследованных методов диагностики.



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

Рисунок 3. Кривые операционных характеристик для анализа слюны на кортизол в ходе МПД, анализа крови на кортизол в ходе МПД и кортизола слюны в 23:00. Примечание: AUC – площадь под кривой операционных характеристик, МПД – малая проба с дексаметазоном.

Диагностические возможности анализа слюны на кортизол в ходе МПД при точке разделения 12,0 нмоль/л сведены в таблице 5.

Таблица 5. Диагностические возможности определения кортизола в слюне в ходе МПД методом ЭХЛА при cut-off значении равном 12,0 нмоль/л.

	Выявление ЭГ среди пациентов с:	
	нормальным ИМТ	Ожирением
Точка разделения (cut-off)	12,0 нмоль/л	
Чувствительность (95%ДИ)	61,1% (47,8-72,96%)	
Специфичность (95%ДИ)	92,5% (82,4-97,08%)	92,8% (83,02-97,19%)
ПЦПР (95%ДИ)	0,89 (0,76-0,96)	0,89 (0,76-0,96)
ПЦОР (95%ДИ)	0,70 (0,63-0,74)	0,71 (0,65-0,75)
Отношение правдоподобия для положительного результата теста	8,25 (3,23-26,24)	8,55 (3,33-27,22)

Учитывая, что при выбранной нами точке разделения кортизола слюны в ходе МПД чувствительность недостаточна высокая, были определены границы «серой зоны» для данного теста. При анализе наибольшей суммы чувствительность + специфичность, при которой чувствительность была максимальной, выявлено, что при значении кортизола слюны 5,2 нмоль/л, чувствительность увеличивается до 85,2% (95% ДИ 73,4-92,3) при специфичности 57,3% (95% ДИ 47,9-66,1). Таким образом, диапазон с 5,2 нмоль/л до 12 нмоль/л можно считать границами «серой зоной», при этом, при получении результатов анализа, находящегося в данном промежутке, рекомендуется провести уточняющее исследование, так как ЭГ не может быть полностью исключен. Диагностические возможности анализа слюны в ходе МПД при точке разделения 5,2 нмоль/л отражены в таблице 6.

Таблица 6. Диагностические возможности определения кортизола в слюне в ходе малой пробы с дексаметазоном методом электрохемилюминесцентного анализа при точке разделения кортизола слюны 5,2 нмоль/л.

	Выявление ЭГ среди пациентов с:	
	нормальным ИМТ	ожирением
Точка разделения (cut-off)	5,2 нмоль/л	
Чувствительность (95% ДИ)	85,2% (73,4-92,3%)	
Специфичность (95% ДИ)	59,3% (46,0-71,3%)	55,4% (42,41-67,61%)
ПЦПР (95% ДИ)	0,67 (0,60-0,72)	0,63 (0,56-0,68)
ПЦОР (95% ДИ)	0,82 (0,68-0,91)	0,78 (0,64-0,90)
Отношение правдоподобия для положительного результата теста	2,04 (1,49-2,61)	1,68 (1,27-2,08)

При анализе комбинации исследования свободного кортизола слюны в 23:00 и кортизола в ходе МПД при точке разделения 5,2 нмоль/л были получены результаты, свидетельствующие о более высоких показателях чувствительности. Таким образом, количество ложноотрицательных результатов у пациентов с ЭГ сократилось до 3 случаев, процент дискордантных результатов уменьшился до 14,8% (8 случаев). Тем не менее, что закономерно, за счет снижения специфичности увеличилось общее количество ложноположительных результатов у пациентов без ЭГ (таблица 7).

Таблица 7. Количество ложноотрицательных, ложноположительных результатов и процент дискордантных результатов при исследовании кортизола слюны в 23:00

и кортизола слюны в рамках МПД (ЭХЛА) для точки разделения кортизола слюны в ходе МПД 5,2 нмоль/л.

	Количество ложноположительных результатов (кортизол слюны в ходе МПД более 5,2 нмоль/л и кортизол слюны вечером более 9,4 у здоровых)	Количество ложноотрицательных результатов (кортизол слюны в ходе МПД менее 5,2 нмоль/л и кортизол слюны вечером менее 9,4 у пациентов с истинным ЭГ)	Абсолютное количество и процент дискордантных результатов
ЭГ		3	8 (14,8%)
Алиментарно-конституциональное ожирение	8		20 (35,7%)
Здоровые добровольцы	5		17 (31,5%)

Изучена диагностическая возможность комбинации исследования кортизола слюны в 23:00 и кортизола слюны в ходе МПД, так как данная комбинация была бы оптимальным выбором для пациента в виду полной неинвазивности и возможности удаленной диагностики. Выявлено, что в когорте пациентов с ЭГ (n=54), процент дискордантных результатов составил 33,3% (18 случаев), оба исследования были ложноотрицательными в 5 случаях. Вследствие более высокой специфичности, при анализе групп пациентов без ЭГ диагностические возможности такой комбинации были несколько выше. При анализе данных пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением (n=56) выявлено, что процент дискордантных результатов равен 12,5% (7 случаев), при этом оба теста были ложноположительны в 4 случаях. В контрольной группе (n=54) оба теста показали ложноположительные результаты лишь в двух случаях, при этом процент дискордантных результатов был минимальным и составил 5,6% (3 случая). Диагностические возможности комбинации исследований приведены в таблице 8.

Таблица 8. Количество ложноотрицательных, ложноположительных результатов и процент дискордантных результатов при исследовании кортизола слюны вечером и кортизола слюны в рамках МПД (ЭХЛА) для точки разделения кортизола слюны в ходе МПД 12,0 нмоль/л.

	Количество ложноположительных результатов (кортизол слюны в ходе МПД более 12,0 нмоль/л и кортизол слюны вечером более 9,4 у здоровых)	Количество ложноотрицательных результатов (кортизол слюны в ходе МПД менее 12,0 нмоль/л и кортизол слюны вечером менее 9,4 у пациентов с истинным ЭГ)	Абсолютное количество и процент дискордантных результатов
ЭГ		5	18 (33,3%)
Алиментарно-конституциональное ожирение	4		7 (12,5%)
Здоровые добровольцы	2		3 (5,6%)

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

подробное сравнение диагностических возможностей комбинации тестов представлено в таблице 9.

Таблица 9. Сравнение диагностических возможностей двух различных комбинаций исследований при точке разделения кортизола слюны в ходе МПД 5,2 нмоль/л.

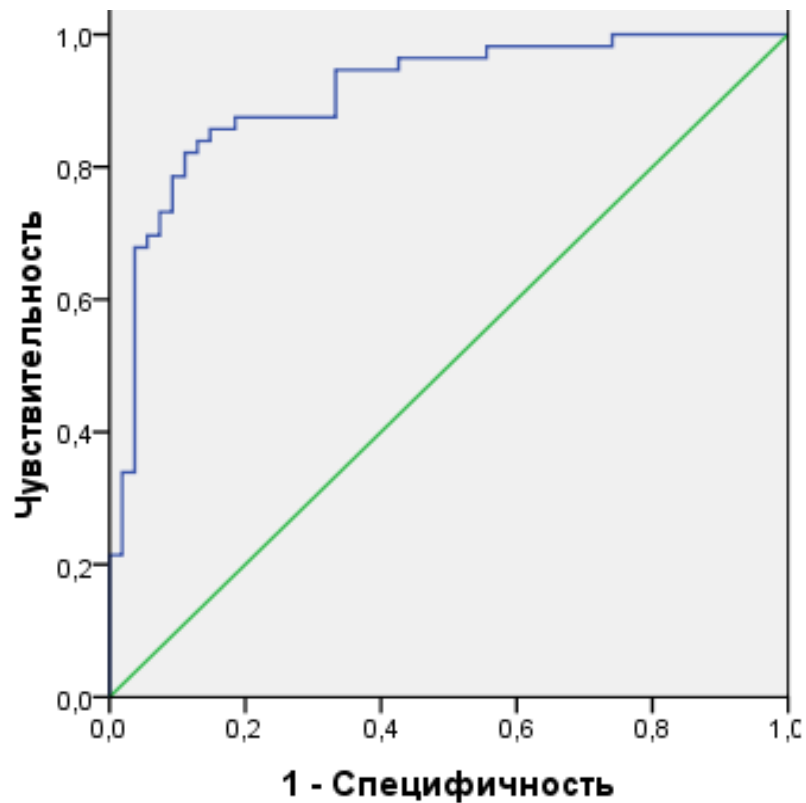
	Комбинации тестов	
	Кортизол слюны в 23:00 + кортизол слюны в ходе МПД (точка разделения 5,2 нмоль/л)	Кортизол слюны в 23:00 + Кортизол крови в ходе МПД (точка разделения 50 нмоль/л)
Чувствительность (95% ДИ)	77,8% (66,4% - 86,9%)	85,2% (74,5-92,6)
Специфичность (95% ДИ)	45,5% (39,9-49,9)	70,9% (65,7-74,5)
ПЦПР (95% ДИ)	0,41 (0,35-0,46)	0,59 (0,51-0,64)
ПЦОР (95% ДИ)	0,81 (0,71-0,89)	0,91 (0,84-0,95)
Отношение правдоподобия для положительного результата теста	1,43 (1,11-1,73)	2,93 (2,17-3,63)

При комбинации исследований кортизола слюны в 23:00 и в ходе МПД при отрезной точке 5,2 нмоль/л чувствительность составила 77,8%. Сравнение диагностических возможностей классической комбинации исследований исследований кортизола в слюне в двух точках представлено в таблице 10.

Таблица 10. Сравнение диагностических возможностей двух комбинаций исследований при точке разделения кортизола слюны в ходе МПД при различных точках разделения.

	Комбинации тестов	
	Кортизол слюны в 23:00 + кортизол слюны в ходе МПД (точка разделения 5,2 нмоль/л)	Кортизол слюны в 23:00 + Кортизол крови в ходе МПД (точка разделения 12,0 нмоль/л)
Чувствительность (95% ДИ)	77,8% (66,4% - 86,9%)	61,1% (50,0-70,7)
Специфичность (95% ДИ)	45,5% (39,9-49,9)	83,6% (78,2-88,3)
ПЦПР (95% ДИ)	0,41 (0,35-0,46)	0,65 (0,53-0,75)
ПЦОР (95% ДИ)	0,81 (0,71-0,89)	0,81 (0,76-0,86)
Отношение правдоподобия для положительного результата теста	1,43 (1,11-1,73)	3,74 (2,29-6,05)

На рисунке 4 представлены кривые операционных характеристик для комбинации исследований кортизола слюны в двух точках.



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

Рисунок 4. Кривые операционных характеристик для комбинации исследований слюны на кортизол в 23:00 и кортизола слюны в ходе МПД. Примечание: AUC – площадь под кривой операционных характеристик.

Таким образом, нами разработан алгоритм неинвазивной диагностики ЭГ на основании исследования кортизола слюны в 23:00 в комбинации с исследованием

кортизола слюны в ходе МПД. При этом однонаправленные результаты обоих исследований могут с большой долей вероятности подтвердить или опровергнуть диагноз ЭГ, при дискордантных результатах диагностику следует дополнить исследованием суточной экскреции кортизола с мочой (см. рисунок 5).



Рисунок 5. Схематическое отображение алгоритма неинвазивной диагностики ЭГ.

Ниже приведены клинические примеры, которые наглядно демонстрируют диагностические возможности предложенного нами алгоритма неинвазивной диагностики ЭГ.

Клинический пример № 1

У пациентки Э. 34 лет, с морбидным ожирением (ИМТ 44 кг/м²) в рамках диагностики причины набора веса проводилось исключение ЭГ. Было выполнено исследование кортизола слюны в 23:00 – 2,23 нмоль/л (менее 9,4 нмоль/л), исследование кортизола слюны в ходе МПД – 2,1 нмоль/л (менее 12,0 нмоль/л, проба положительна). Результаты данной комбинации исследований полностью исключают ЭГ. Тем не менее, при исследовании кортизола крови в ходе МПД у данной пациентки отсутствовало подавление кортизола ниже 50 нмоль/л (155 нмоль/л). В качестве дополнительного исследования суточной экскреции кортизола с мочой (264,5 нмоль/сут), что позволяет исключить ЭГ. Таким образом, при классической комбинации методов первичной диагностики ЭГ у пациентки Э. полученные разнонаправленные данные не позволяют исключить ЭГ и приводят к необходимости проводить дополнительный диагностический поиск (исследование суточной мочи на кортизол, исследование кортизола крови в 23:00). Тогда как при использовании алгоритма неинвазивной диагностики ЭГ, диагноз исключается сразу и не приводит к дополнительным расходам на уточняющие методы исследования, ускоряет диагностику ЭГ и минимизируется дискомфорт пациента за счет полностью неинвазивных диагностических исследований.

Клинический пример № 2

У пациентки К., 56 лет проводилось исключение ЭГ по поводу резкой прибавки веса. Данные проведенного обследования: кортизол слюны, собранной в 23:00 – 8,6 нмоль/л (менее 9,4 нмоль/л), кортизол слюны в ходе МПД – 5,1 нмоль/л (менее 5,2 нмоль/л), кортизол крови в ходе МПД – 110,7 нмоль/л (при норме менее 50 нмоль/л), кортизол суточной мочи – 101,0 нмоль/сут (60-413 нмоль/сут). В данном случае в очередной раз наблюдается преимущество комбинации исследований кортизола слюны в 23:00 и кортизола слюны в ходе МПД перед классической комбинацией с исследованием крови в рамках МПД, так как в первом случае нет разнонаправленности результатов исследований и диагноз ЭГ исключается сразу.

Клинический пример №3

У пациентки М., 70 лет, с ожирением II степени (ИМТ 37 кг/м²), проводилось исключение ЭГ. Результаты проведенных исследований: кортизол слюны, собранной в 23:00 – 4,0 нмоль/л (менее 9,4 нмоль/л), кортизол слюны в ходе МПД – 11,3 нмоль/л (менее 12,0 нмоль/л), кортизол крови в ходе МПД – 314 нмоль/л (при норме менее 50 нмоль/л), кортизол суточной мочи – 130,5 нмоль/сут (60-413 нмоль/сут). Таким образом, наблюдается дискордантность результатов при классической комбинации исследований кортизола слюны в 23:00 и кортизола крови в ходе МПД, что привело к необходимости в проведении дополнительных исследований (сбор суточной мочи на кортизол). Тогда как при комбинации исследований кортизола слюны в 23:00 и кортизола слюны в ходе МПД диагноз ЭГ исключается сразу.

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

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

В исследование были включены 24 пациента с БИК и 12 пациентов с АКТГ-ЭС. Общая характеристика участников представлена в таблице 11.

Таблица 11. Основные характеристики пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом, у которых проводился забор крови из НКС для оценки микроРНК методом NGS.

	БИК	АКТГ-ЭС	<i>P</i> *
<i>N</i>	24	12	
Пол: М:Ж (%)	3 (12,5%):21 (87,5%)	4 (33,33%):8 (66,67%)	0,190 ¹
Возраст, лет	46,5 [33; 54,25]	54 [38,75; 60,75]	0,177 ²
ИМТ, кг/м ²	31 [29,18; 36,08]	33,35 [24,6; 41,39]	0,987 ²
АКТГ утром, пг/мл	58 [49,09; 84,2]	181,2 [84,87; 210,45]	0,003 ²
АКТГ вечером, пг/мл	49,12 [29,05; 74,02]	112,81 [66,26; 193,65]	0,009 ²
Кортизол суточной мочи, нмоль/сут	1120 [796,55; 2217,3]	3537,6 [922,4; 6982,6]	0,062 ²
Кортизол слюны в 23:00, нмоль/л	29,94 [15,74; 52,65]	80,74 [16,27; 104,2]	0,299 ²

АКТГ – адренокортикотропный гормон, БИК – болезнь Иценко-Кушинга, М-мужчины; Ж-женщины; ИМТ- индекс массы тела; Количественные данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов; ¹ – точный критерий Фишера; ² – критерий Манна-Уитни.

*Пороговый $P_0=0,007$ (после применения поправки Бонферрони)

Все пациенты разделены на группы согласно результатам селективного забора крови из НКС. Всем пациентам из группы БИК выполнена транссфеноидальная аденомэктомия (ТА): в 21 случае достигнута ремиссия, в 3 случаях сохранялся гиперкортицизм, по причине чего в одном случае из-за выраженности симптомов выполнена двусторонняя адреналэктомия (ДА). Из 12 пациентов с АКТГ-ЭС у 6-и диагностирован карциноид легкого, у 1 - феохромоцитомы с продукцией АКТГ, еще у 1 - НЭО поджелудочной железы. В 4 случаях источник гиперпродукции АКТГ не был обнаружен после применения всех возможных методов визуализации (КТ органов грудной клетки, малого таза и

забрюшинного пространства, гастроскопии, колоноскопии, позитронно-эмиссионной томографии с соматостатиновой меткой. Хирургическое удаление опухоли выполнено в 7 случаях: в 5 случаях удален карциноид легкого, в 1 случае - НЭО поджелудочной железы, еще в 1 случае - феохромоцитомы надпочечника с гиперпродукцией АКТГ. Во всех случаях наблюдалась послеоперационная ремиссия. Один пациент с подтвержденным карциноидом и циклическим гиперкортицизмом отказался от хирургического лечения. За период наблюдения умерло 2 пациента: пациент, отказавшийся от хирургического лечения, умер в результате тяжелой инфекции COVID-19 и пациент с оккультной опухолью (в результате полиорганной недостаточности).

В результате высокопроизводительного секвенирования методом NGS выявлены 187 дифференциально экспрессирующихся микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС с количеством прочтения более 100. Среди них отобраны 11 микроРНК со значением $p < 0,05$, которые также показали статистическую значимость после поправки на множественность сравнения ($p_{\text{adjusted}} < 0,1$) (см. табл. 12).

Таблица 12. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС, которые статистически значимо отличались в крови, оттекающей из НКС по данным NGS.

	микроРНК	Log 2 fold change	p	p*
1	miR-10b-5p	-11,379	0,001	0,001
2	miR-152-3p	-13,021	0,001	0,001
3	miR-345-5p	-13,309	0,001	0,001
4	miR-186-5p	-11,728	0,001	0,002
5	miR-375	-11,469	0,001	0,002
6	miR-27a-3p	-10,719	0,001	0,007
7	let-7e-5p	-2,209	0,003	0,032
8	let-7c-5p	-1,807	0,010	0,080

*Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга.

Рисунок 6. Циркулирующие микроРНК у пациентов с БИК (n=24) и АКТГ-ЭС (n=12) в крови, оттекающей из НКС. Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. Высокая экспрессия конкретной микроРНК показана оттенками красного, низкий уровень экспрессии – оттенками синего. Горизонтальная полоса

в верхней части рисунка указывает на групповую принадлежность пациента (зеленый цвет – АКТГ-ЭС, розовый – БИК).

Выявлено, что уровень экспрессии всех микроРНК-кандидатов был снижен у пациентов с БИК по сравнению с пациентами группы АКТГ-ЭС. Для дальнейшей валидации мы также включили miR-16-5p и let-7g-5p, которые наиболее значимо отличались у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС по данным пилотного исследования [157].

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

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

Таблица 13. Основные характеристики пациентов второго раздела исследования.

	БИК	АКТГ-ЭС	<i>p</i>
<i>N</i>	54	13	
Пол: М:Ж (%)	11(20,4):43(79,6)	4(30,8):9 (69,2)	0,466 ¹
Возраст, лет	44,5 [34,75; 51,25]	54,0 [34,5; 61,5]	0,263 ²
ИМТ, кг/м ²	31,5 [27,45; 35,13]	32 [22,5; 42,18]	0,818 ²
АКТГ утром, пг/мл	73,71 [52,2; 109,88]	149,6 [81,85; 210,45]	0,004 ²
АКТГ вечером, пг/мл	62,43 [37,27; 82,19]	109,4 [63,52; 194,3]	0,005 ²
Кортизол суточной мочи, нмоль/сут	988,9 [703,93; 1610,10]	2098 [822,35; 6988,4]	0,05 ²
Кортизол слюны в 23:00, нмоль/л	26,59 [14,39; 36,64]	80,79 [16,27; 104,20]	0,091 ²

АКТГ – адренотропный гормон, БИК – болезнь Иценко-Кушинга, М-мужчина; Ж-женщина; ИМТ- индекс массы тела; Меры вариабельности представлены в виде медианы и интерквартильных размахов; ¹ – точный критерий Фишера; ² – критерий Манна-Уитни.

*Пороговый $P_0=0,007$ (после применения поправки Бонферрони)

Среди 54 пациентов с БИК у 49 (90,7%) была диагностирована артериальная гипертензия; у 33 (61,1%) - различные стадии ожирения ($\text{ИМТ} \geq 30,0 \text{ кг/м}^2$); у 24 пациентов (44,4%) имелись нарушения углеводного обмена: у 21 пациента - сахарный диабет (СД) 2-го типа, у 2-х - СД 1-го типа, у одного пациента - нарушение толерантности к глюкозе; у 21 пациента - остеопороз (38,9%). Из 13 пациентов с АКТГ-ЭС у 12 (92,3%) диагностирована артериальная гипертензия; у 7 (53,85%) имелось ожирение; у 10 пациентов (76,9%) - СД 2 типа, у 1 пациента (7,7%) — нарушение толерантности к глюкозе, у 6 пациентов (33,3%) выявлен остеопороз.

Дифференциальная экспрессия 13 микроРНК представлена в таблице 14.

Таблица 14. Дифференциальная экспрессия микроРНК-кандидатов у пациентов с БИК (n=54) и АКТГ-ЭС (n=13), исследованная методом RT-qPCR.

микроРНК	БИК Среднее \pm СО [95% ДИ]	FC	log2FC	p	p*
let-7b-5p	0,107 \pm 0,160 (0,060 - 0,155)	0,162 \pm 0,215 (0,026 – 0,299)	0,660	-0,600	0,185
miR-375	0,072 \pm 0,122 (0,032 - 0,113)	0,168 \pm 0,211 (0,026 - 0,309)	0,431	-1,214	0,150
miR-27a-3p	17,921 \pm 31,046 (9,447 - 26,395)	16,189 \pm 7,572 (11,614 - 20,764)	1,107	0,147	0,077
let-7e-5p	0,001 \pm 0,001 (0,000 - 0,002)	0,001 \pm 0,001 (-0,004 - 0,007)	0,609	-0,716	0,145
miR-186-5p	0,829 \pm 0,880 (0,589 - 1,069)	0,793 \pm 0,353 (0,580 – 1,006)	1,045	0,064	0,292
miR-16-5p	161,998 \pm 120,422 (129,129 - 194,866)	145,283 \pm 159,644 (43,850 – 246,716)	1,115	0,157	0,365
miR-10b-5p	1,171 \pm 2,105 (0,597 - 1,746)	1,220 \pm 1,856 (0,099 - 2,341)	0,960	-0,059	0,868
miR-206	0,005 \pm 0,011 (0,001 - 0,009)	0,007 \pm 0,012 (-0,001 - 0,016)	0,721	-0,471	0,572

let-7g-5p	0,306 ± 0,449 (0,184 - 0,429)	0,329 ± 0,520 (0,015 – 0,643)	0,930	-0,104	0,818
miR-152-3p	0,194 ± 0,236 (0,129 - 0,258)	0,178 ± 0,147 (0,089 – 0,267)	1,088	0,121	0,818
miR-345-5p	0,004 ± 0,005 (0,002 - 0,006)	0,005 ± 0,006 (-0,003 – 0,013)	0,706	-0,502	0,687
let-7c-5p	0,079 ± 0,167 (0,033 - 0,125)	0,060 ± 0,071 (0,017 – 0,103)	1,311	0,391	0,709
let-7f-5p	0,023 ± 0,047 (0,008 - 0,037)	0,014 ± 0,019 (0,001 – 0,026)	1,670	0,740	0,689

Данные для каждой группы представлены в виде абсолютного значения (2-ΔCt). Парные сравнения проводились с использованием U-критерия Манна-Уитни, метод Бенджамини-Хохберга использовался для поправки на множественность сравнений. ДИ рассчитывался на основании t-распределения. Log2FC рассчитывался как двоичные логарифмы значений FC. Сокращения: микроРНК; FC-fold changes.

*Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга.

Сравнение экспрессии микроРНК между двумя группами представлено на рисунке 7.

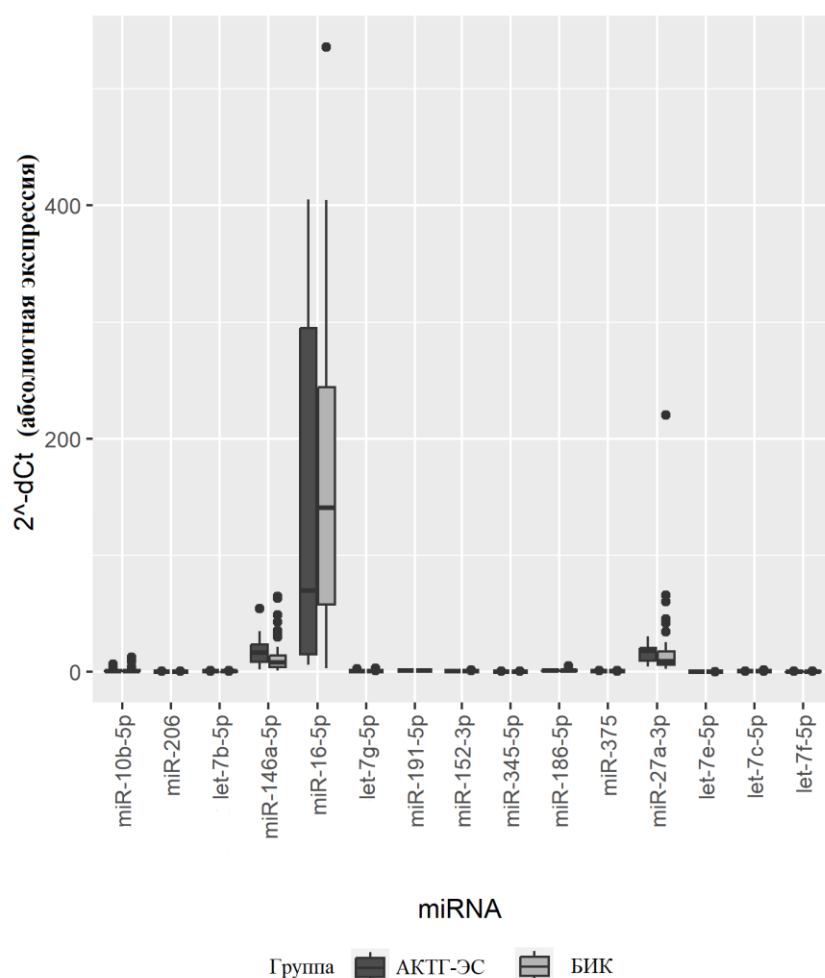


Рисунок 7. Сравнение циркулирующих микроРНК плазмы крови у пациентов с БИК (n=54) и АКТГ-ЭС (n=13), исследованных методом RT-qPCR.

Таким образом, в ходе валидации уровень микроРНК по периферической крови с использованием метода RT-qPCR статистически значимо не отличался.

Среди 54 пациентов с БИК всем выполнена ТА. Образцы с достаточным количеством ткани аденомы по данным послеоперационного гистологического исследования были также изучены методом ИГХ (n=40). Плотногранулированные кортикотропиномы (ПГК) были выявлены в 30 случаях, редкогранулированные кортикотропиномы (РГК) - в 5 случаях, кортикотропиномы из Круксовских клеток - у 4 пациентов. Из 13-и пациентов с АКТГ-ЭС у 6-и диагностированы НЭО легких, у 1 пациента - НЭО поджелудочной железы, в 1 случае была выявлена НЭО тимуса, в 1 случае - феохромоцитома с АКТГ-продукцией, у остальных 4 пациентов после

комплексных визуализирующих методов исследования опухоль не была выявлена (оккультная опухоль). Хирургическое лечение проведено 7 пациентам с клинико-лабораторными признаками послеоперационной ремиссии гиперкортицизма. Типичный карциноид выявлен в 4 случаях, атипичный карциноид - в 2 случаях, в 1 случае – феохромоцитома, продуцирующая АКТГ. У пациента с НЭО тимуса была выполнена биопсия, подтвердившая нейроэндокринную природу образования.

3.3 Обсуждение полученных результатов

В ходе исследования был проведен анализ диагностических возможностей определения кортизола в слюне в утренние часы после приема 1 мг дексаметазона методом ЭХЛА на автоматизированном анализаторе. Комбинация исследований проб слюны в 23:00 и в ходе МПД позволяет сделать диагностику ЭГ полностью неинвазивной и, при необходимости, дистанционной. Традиционное определение кортизола в крови после МПД характеризуется лучшей чувствительностью, но более низкими показателями специфичности по сравнению с исследованием свободного кортизола в слюне после МПД, для компенсации этой проблемы была предложена «серая зона» для определения кортизола в слюне после МПД. При получении результата исследования в интервал 5,2 - 12,0 нмоль/л рекомендуется проведение дополнительных тестов.

Ранее зарубежными коллективами были проведены и опубликованы результаты исследования слюны в ходе МПД. Тем не менее, в этих исследованиях использовались другие методы определения кортизола слюны. Как упоминалось ранее, чувствительность различных методов исследования кортизола слюны отличается и, соответственно, будут отличаться и cut-off значения. В одном из исследований, были определены уровни кортизола суточной мочи, кортизола слюны вечером, а также кортизола слюны и крови в утренние часы в ходе МПД. Кортизол слюны был измерен при помощи жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии. В исследовании участвовали 99 человек: 21 пациент с ЭГ, 78 участников с эукортицизмом. Была определена точка разделения

для кортизола слюны, которая составила 0,85 нмоль/л [174]. В отличие от проведенного нами исследования, здесь применен другой метода исследования (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией), а также отсутствовала когорта пациентов с ожирением, у которых мы наиболее часто наблюдаем ложноположительные результаты исследования на ЭГ по причине развития функционального гиперкортицизма. В другом исследовании, проведенном во Франции, также были исследованы кортизол суточной мочи, кортизол в образцах слюны и крови в ходе МПД. В исследование включено 27 пациентов с ЭГ и 64 здоровых добровольца. Исследование кортизола слюны проводилось при помощи радиоиммунологического анализа, была определена точка разделения для кортизола слюны 1,9 нмоль/л, при этом чувствительность составила 100%, специфичность 94% [175]. Тем не менее, в данном исследовании также не было когорты пациентов с ожирением. В исследовании Castro M. и соавторов изучен дозозависимый ответ кортизола в слюне и крови в ходе МПД, было включено 46 пациентов с ЭГ разного происхождения. В результате выявлено более выраженное подавление кортизола слюны при увеличении дозы дексаметазона у пациентов с ЭГ [176], при этом, для исследования кортизола крови и слюны был также выбран радиоиммунный метод. Существуют некоторые ограничения самих методов исследования, а именно радиоиммунный анализ сопряжен с лучевым воздействием, в настоящее время редко используется, тогда как метод tandemной масс-спектрометрии достаточно дорогостоящий. Оба метода предполагают предварительное накопление биологических образцов для максимального использования диагностического набора, тогда как ЭХЛА проводится на автоматическом анализаторе и позволяет быстро получить результат исследования кортизола крови или слюны у индивидуального пациента.

В нашей работе впервые было проведено сравнение профилей экспрессии микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС методом NGS с последующей валидизацией при помощи RT-qPCR. В первом разделе исследования мы оценили разницу экспрессии микроРНК в материале плазмы крови, оттекающей от

гипофиза, собранной при проведении процедуры селективного забора крови из НКС. Таким образом сравнивались образцы крови, оттекающей от гипофиза с кортикотропиномой с образцами крови, оттекающей от условно интактного гипофиза у пациентов с АКТГ-ЭС, у которых источник гиперпродукции АКТГ находится вне гипофиза. В результате мы значительно расширили список микроРНК-кандидатов и обнаружили 187 микроРНК с числом прочтений более 100, которые потенциально могут быть выбраны для валидации методом RT-qPCR. Мы выбрали 11 микроРНК с $p < 0,05$, которые также показали статистическую значимость после поправки на множественные сравнения ($p_{\text{adjusted}} < 0,1$). Несмотря на многообещающие результаты первой фазы исследования, в ходе валидации методом RT-qPCR на расширенных когортах пациентов ($n = 67$) не было выявлено статистически значимых различий в этих микроРНК в образцах периферической крови пациентов. Расхождение результатов первой и второй фазы исследования может быть связано с различными методами детекции микроРНК (NGS и RT-qPCR), а также с расширением объема выборок на втором этапе исследования. В пилотном исследовании [157] miR-16-5p наиболее значимо отличалась между группами пациентов с БИК и АКТГ-ЭС при анализе образцов периферической крови методом RT-qPCR [45,04 (95% ДИ 28,77–61,31) в группе БИК vs 5,26 (2,65–7,87) в группе АКТГ-ЭС, $p < 0,001$; $q = 0,001$], эта микроРНК также значимо отличалась при сравнении здоровых добровольцев с пациентами с БИК и АКТГ-ЭС. В первой фазе исследования miR-16-5p была обнаружена, но не показала значимого различия между группами согласно значениям p и p_{adjusted} (0,434 и 0,664 соответственно). Это также может быть связано с разными методами исследования (RT-qPCR и NGS). Ранее в исследовании Amoral F. и соавторов было выявлено снижение уровня экспрессии miR-16 в образцах ткани аденом у пациентов с БИК по сравнению с нормальным гипофизом [154], тогда как в пилотном исследовании [157] уровень ее экспрессии в периферической крови был повышен у пациентов с БИК по сравнению с пациентами с АКТГ-ЭС и группой контроля. В ходе второго раздела данного исследования не было выявлено существенных различий в экспрессии miR-16-5p между двумя когортами ($p = 0,365$,

$p_{\text{adjusted}}=0,730$). Согласно имеющимся данным, miR-16-5p выступает в роли онкосупрессора, ингибирующего пролиферацию клеток и клеточный цикл [177], воздействуя на онкоген *SOX5* [178]. В работе Zhijian Gu. и соавторов был исследован уровень экспрессии miR-16-5p в ткани остеосаркомы по сравнению с прилегающей тканью методами RT-qPCR, иммуноблоттинга и ИГХ. Было обнаружено, что в опухолевой ткани ее уровень значительно снижен [178]. Авторы обнаружили, что miR-16-5p подавляет экспрессию Smad3 – важного транспортера в сигнальном пути трансформирующего фактора роста β (TGF- β). Будучи подавленной, miR-16-5p не оказывает угнетающего влияния на Smad3, благодаря чему его экспрессия увеличивается, усиливая пролиферацию, миграцию и инвазию клеток остеосаркомы.

В одном из последних исследований было обнаружено увеличение экспрессии miR-375-3p и miR-7-5p в НКС по данным NGS на стороне поражения по сравнению с контралатеральной стороной у одного пациента с БИК [179]. На следующем этапе исследования эти две микроРНК были проанализированы методом RT-qPCR в периферической плазме крови у 5 пациентов с БИК до и после проведения ТА. В результате было выявлено снижение уровня miR-7-5p ($p=0,0002$) у пациентов после проведения ТА, тогда как miR-375-3p обнаружена только в одном случае. Эти микроРНК были также исследованы в опухолевой ткани, что подтвердило присутствие miR-375-3p и miR-7-5p в кортикотропинах. Далее исследователи оценили эти микроРНК в когортах пациентов с БИК ($n=12$) и гормонально-неактивными аденомами гипофиза (ГНАГ) ($n=9$). Результаты RT-qPCR показали, что уровень miR-7-5p в плазме был в 3,5 раза выше у пациентов с БИК по сравнению с пациентами с ГНАГ ($p=0,0013$). Так же как на предыдущем этапе исследования, miR-375-3p не обнаруживалась в большинстве образцов. В первой фазе нашего исследования уровень miR-375 значительно снижается в крови из НКС у пациентов с БИК по сравнению с пациентами с АКТГ-ЭС по данным NGS. Дискордантность результатов этих двух исследований можно объяснить разным дизайном, а также размерами выборок: в нашем исследовании мы

сравнивали экспрессию микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС. Первая фаза нашего исследования показала значительное снижение уровня miR-375 у пациентов с БИК по сравнению с пациентами с АКТГ-ЭС (\log_2FC -11,47, $p = 0,001$, $p_{adjusted} = 0,002$). Тем не менее, эта разница не была подтверждена по результатам RT-qPCR. Последние исследования свидетельствуют о том, что miR-375-3p играет регуляторную роль в различных сигнальных путях, влияя на онкогенез, дифференцировку клеток и тканей, а также на иммунную систему [180]. Согласно результатам экспериментальных исследований на образцах раковых клеток, miR-375-3p действует как онкосупрессор, и ее подавление играет значимую роль в развитии различных типов рака [180-183]. Было выявлено, что она участвует в сигнальном пути PI3K/AKT, объединяясь с тромбоспондином 2 (TNBS2) [184]. В исследовании Zhang N. и соавторов miR-375-3p таргетирует MAP3K8 (митоген-активируемую протеинкиназу 8) в кортикотрофах, ингибируя синтез РОМС (проопиомеланокортина) и производных гормонов у мышей путем подавления фосфорилирования ERK1/2 и транскрипционную активность индуцированного фактором роста нервов клон В (NGFI-B). Функциональные исследования показали, что ингибирование эндогенной miR-375 в опухолевых клетках гипофиза мышей (AtT-20) значительно увеличивает экспрессию РОМС и секрецию АКТГ, стимулируемую КРГ [185]. В нашем исследовании мы также выявили снижение уровня экспрессии miR-375 в образцах крови, взятых из гипофиза с АКТГ-продуцирующей опухолью, по сравнению с интактным гипофизом. В недавних исследованиях было показано, что все подтипы аденом гипофиза характеризуются гиперэкспрессией высокомолекулярных белков группы А (HMGA)1 и HMGA2 [186]. Было показано, что снижение экспрессии let-7 может наблюдаться примерно в 42% аденом гипофиза, что обратно коррелирует с изменением экспрессии HMGA2 [187]. Ранее было обнаружено снижение экспрессии таргетирующих гены HMGA miR-15, miR-16, miR-26, miR-196a-2 и let-7a в исследовании 41 образца аденом гипофиза с различными гистотипами, при этом была подтверждена обратная корреляция с уровнем экспрессии HMGA [188]. Результаты нашего исследования также показывают, что экспрессия let-7b-5p, let-7e-5p, let-7g-5p, let-7c-5p и let-7f-5p

подавляется в образцах крови из НКС у пациентов с БИК по сравнению с пациентами с АКТГ-ЭС.

Поскольку функциональные аденомы гипофиза относятся к орфанным заболеваниям, а микроРНК являются новыми генетическими биомаркерами со сложными и дорогостоящими методами обнаружения, количество исследований, особенно у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС, очень ограничено. В 2021 году при исследовании экспрессии микроРНК у пациентов с АКТГ-зависимыми и АКТГ-независимыми формами ЭГ, а также у здоровых добровольцев методом NGS было выявлено 6 дифференциально экспрессирующихся микроРНК (miR-96-5p, miR-146b-5p, miR-183-5p, miR-185-5p, miR-616-5p, and miR-629-5p) в образцах периферической крови пациентов с болезнью и синдромом Иценко-Кушинга, при этом только miR-182-5p отличалась по уровню экспрессии у пациентов с БИК по сравнению с группой контроля [189]. В нашем исследовании miR-182-5p была обнаружена в образцах крови из НКС в первой фазе исследования, ее уровень был снижен у пациентов с БИК по сравнению с пациентами с АКТГ-ЭС ($\log_2FC -2,079$), тем не менее данное различие не было подтверждено статистически ($p = 0,38$). Интересно, что miR-146b-5p, miR-183-5p, miR-185-5p и miR-629-5p также были обнаружены на первом этапе нашего исследования, но выявленные различия в экспрессии не были значимыми согласно показателю p . В недавнем двухфазном исследовании было обнаружено снижение экспрессии 3-х микроРНК в образцах периферической крови пациентов с акромегалией по сравнению с контролем при исследовании методом NGS: miR-4446-3p $-1,317$ ($p = 0,001$), miR-215-5p $-3,040$ ($p = 0,005$) и miR-342-5p $-1,875$ ($p = 0,013$). Несмотря на то, что эти различия не прошли поправку на множественные сравнения, различия были подтверждены с помощью RT-qPCR в случае miR-4446-3p ($p < 0,001$, $p_{adjusted} < 0,001$) и miR-215-5p ($p < 0,001$, $p_{adjusted} < 0,001$) [166].

Достоверно определить гены-мишени конкретной микроРНК сложно, так как каждая микроРНК может взаимодействовать с разными таргетами. Тем не менее существуют базы данных, такие как TargetScan [190], которые предоставляют

информацию о предполагаемых взаимодействиях микроРНК с мРНК-мишенями на основе их комплементарности. Результаты оцениваются на основании индекса *cumulative weighted contex++ score*, отражающему вклад 14 параметров вероятности связывания, при этом значения находятся в диапазоне от 1 до -3. Чем меньше значение данного показателя – тем больше вероятность взаимодействия [191]. В таблице 15 отражены результаты поиска в базе TargetScan.

Таблица 15. Потенциальные гены-мишени некоторых микроРНК.

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

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

Карта взаимодействий отражена на рисунке 8.

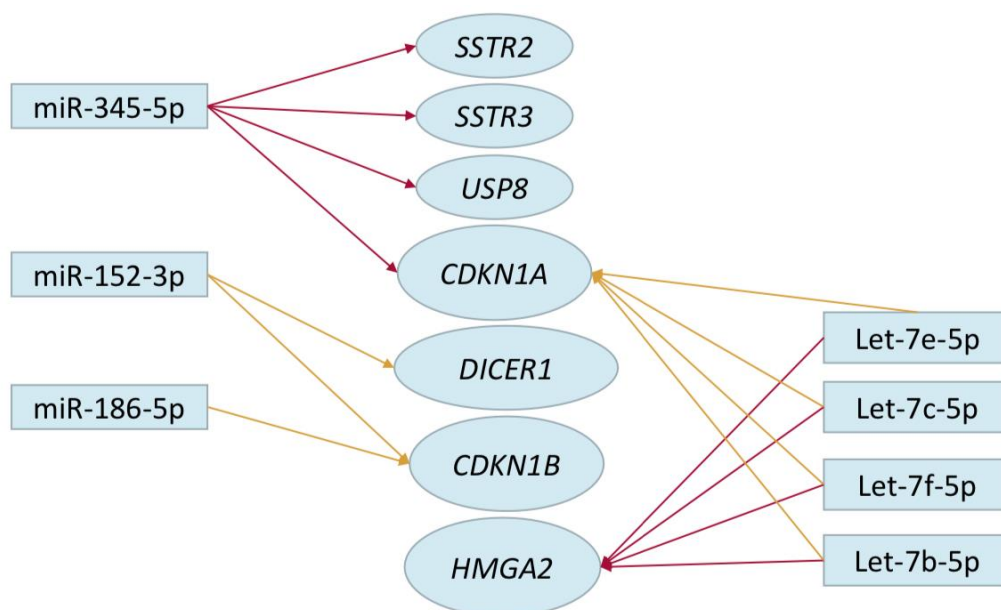


Рисунок 8. Карта взаимодействий микроРНК с потенциальными таргетными генами, которые по данным литературы могут участвовать в патофизиологии аденом гипофиза.

Как было указано ранее в обзоре литературы, есть научные доказательства влияния мутации гена *USP8* на развитие кортикотропином [172,173]. Фермент убиквитин карбокси-концевая гидролаза 8, кодируемая геном *USP8*, участвует в процессе протеолиза белков. Мутации гена *USP8* обнаруживаются в 30-40% АКТГ-секретирующих аденомах гипофиза и молчащих кортикотропиномах.

Выявлено, что наличие мутации в гене *USP8* ассоциировано с меньшим размером аденомы и большей вероятностью послеоперационной ремиссии [174,175]. Тем не менее, мутация в этом гене по некоторым данным коррелировала с большей вероятностью рецидива [176]. Мутации гена *CDKN1B* ингибитор циклин-зависимой киназы 1b были описаны при МЭН-1 синдроме и в редких случаях кортикотропином [192]. Ген *HMGA2* по данным исследований экспрессировался в тканях гормонально-неактивных аденом [193]. Герминальные и соматические мутации в гене *DICER1* были описаны при тяжелом течении болезни Иценко-Кушинга у детей [194]. Таким образом, измененные микроРНК могут влиять эпигенетически на экспрессию данных генов даже без наличия

мутации непосредственно в гене и таким образом могут вовлекаться в патогенез развития кортикотропином.

Подводя итог, цель данного исследования состояла в том, чтобы найти дифференциально экспрессируемые микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС. Мы провели двухфазное исследование с использованием метода высокопроизводительного секвенирования (NGS) и RT-qPCR на большой выборке редких пациентов. В результате первого этапа исследования мы обнаружили 187 дифференциально экспрессирующихся микроРНК с количеством прочтений более 100 в плазме крови, оттекающей от гипофиза, при этом 17 микроРНК показали значимость согласно показателю p , 11 из которых также подтвердили значимость после поправки на множественность сравнений. Это первое исследование, в котором сравниваются профили экспрессии микроРНК в образцах крови, взятых из пораженного (БИК) и интактного гипофиза (АКТГ-ЭС), что позволяет значительно расширить список микроРНК-кандидатов для дальнейшей валидации в образцах периферической крови методом RT-qPCR.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение массы тела является наиболее частым симптомом ЭГ, в связи с чем при скрининге эндокринных причин ожирения необходимо учитывать вероятность данной патологии. Диагностические инструменты, которые мы широко используем, все еще нуждаются в улучшении и упрощении как для пациентов, так и для врачей первичного звена. В ходе этой работы определена точка разделения (5,2 нмоль/л) и границы «серой» зоны (5,2 – 12,0 нмоль/л) для кортизола слюны в ходе МПД для диагностики ЭГ среди пациентов с ожирением, что позволяет сделать первый этап скрининга полностью неинвазивным. На основании данного исследования предложен алгоритм, включающий в себя исследование кортизол слюны в двух точках (в 23:00 и 08:00 следующего дня после принятого накануне 1 мг дексаметазона). При этом в случае разнонаправленных результатов исследований, диагностику рекомендуется дополнить изучением суточной экскреции кортизола с мочой. Применяя на практике предложенный алгоритм, мы упрощаем диагностику ЭГ, делая ее более доступной для отдаленных регионов, принимая во внимание длительную стабильность материала слюны.

В ходе второго раздела исследования впервые был проанализирован весь спектр микроРНК методом высокопроизводительного секвенирования в крови, оттекающей от пораженного гипофиза у пациентов с БИК и условно интактного гипофиза у пациентов с АКТГ-ЭС. В результате было получено 187 микроРНК с количеством прочтений более 100 и из них отобраны 11 наиболее различавшиеся, которые в дальнейшем прошли фазу валидации в крови из кубитальной вены с применением другого, более доступного метода (RT-qPCR). По выбранным микроРНК из кубитальной вены различий найти не удалось. Тем не менее, в литературе описано применение высокопроизводительного секвенирования как диагностического метода, что открывает возможность для использования NGS, а именно анализа изменений экспрессии большого набора микроРНК в крови из НКС, для определения генеза АКТГ-зависимого ЭГ.

Таким образом, мы выделили микроРНК (miR-10b-5p, miR-152-3p, miR-345-5p, miR-186-5p, miR-375, miR-27a-3p, let-7e-5p, let-7c-5p, let-7f-5p, miR-206, let-7b-5p), отличающиеся у пациентов с БИК и АКТГ-ЭС в крови, оттекающей от гипофиза, некоторые из которых являются известными регуляторами генов, ранее описанных в патогенезе развития аденом гипофиза, что дополняет наши знания об эпигенетических биомаркерах, влияющих на их формирование. Полученные различия в крови от гипофиза методом высокопроизводительного секвенирования не удалось валидизировать в периферической крови, используя метод RT-qPCR, что может быть обусловлено различной локализацией забора крови и разницей методов анализа.

ВЫВОДЫ

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренотропный гормон

АКТГ-ЭС – АКТГ-эктопированный синдром

БИК – болезнь Иценко-Кушинга

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ – иммуногистохимия

ИМТ – индекс массы тела

МПД – малая проба с дексаметазоном

МР – магнитно-резонансный

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

ПГК – плотногранулированная кортикотропинома

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РГК – редкогранулированная кортикотропинома

СД – сахарный диабет

ЭГ – эндогенный гиперкортицизм

ЭХЛА – электрохемилюминисцентный анализ

NGS – Next Generation Sequencing

RT-qPCR – real-time quantitative polymerase chain reaction

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plotz, C.M. et al. The natural history of Cushing's syndrome // American Journal of Medicine. – 1952. Vol. 13, № 5 – P. 597–614.
2. Nieman, L.K. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2008. – Vol. 93. – P. 1526–1540.
3. Мельниченко, Г.А. и соавт. Болезнь Иценко-Кушинга: клиника, диагностика, дифференциальная диагностика, методы лечения. Проблемы Эндокринологии. – 2015. – Т. 61, № 2. – С. 55–77.
4. Valassi, E. et al. Diagnostic tests for Cushing's syndrome differ from published guidelines: data from ERCUSYN // European Journal of Endocrinology. – 2017. – Vol. 176, № 5. – P. 613–624.
5. Barbot, M. et al. Cushing's syndrome: Overview of clinical presentation, diagnostic tools and complications // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2020. – Vol. 34, № 2. – P. 101380.
6. Lacroix, A. et al. Cushing's syndrome // The Lancet. – 2015. – Vol. 386, № 9996. – P. 913–927.
7. Seltzer, J. et al. Gene and protein expression in pituitary corticotroph adenomas: a systematic review of the literature // Neurosurg Focus. – 2015. – Vol. 38, № 2. – P. E17.
8. Zhang, C. et al. The Clinical Features and Molecular Mechanisms of ACTH-secreting Pancreatic Neuroendocrine Tumors // J Clin Endocrinol Metab. – 2020. – Vol. 105, № 11. – P. 3449–3458.
9. Li, Y. et al. Whole exome sequencing of thymic neuroendocrine tumor with ectopic ACTH syndrome // Eur J Endocrinol. – 2017. – Vol. 176, № 2. – P. 187–194.
10. Perez-Rivas, L.G. et al. Expression and mutational status of USP8 in tumors causing ectopic ACTH secretion syndrome // Endocr Relat Cancer. – 2017. – Vol. 24, № 9. – P. L73–L77.

11. Cho, H.J. et al. Exosomal microRNA-4661-5p-based serum panel as a potential diagnostic biomarker for early-stage hepatocellular carcinoma // *Cancer Med.* – 2020. – Vol. 9, № 15. – P. 5459–5472.
12. Fabris, L. et al. The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers // *Eur Urol.* – 2016. – Vol. 70, № 2. – P. 312–322.
13. Ghizoni, J.S. et al. The utilization of saliva as an early diagnostic tool for oral cancer: microRNA as a biomarker // *Clin Transl Oncol.* – 2020. – Vol. 22, № 6. – P. 804–812.
14. Matsuyama, H. et al. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 21, № 1. – P. 132.
15. Wierinckx, A. et al. MicroRNAs in pituitary tumors // *Mol Cell Endocrinol.* – 2017. – Vol. 456. – P. 51–61.
16. Mairinger, F.D. et al. Different micro-RNA expression profiles distinguish subtypes of neuroendocrine tumors of the lung: results of a profiling study // *Mod Pathol.* – 2014. – Vol. 27, № 12. – P. 1632–1640.
17. Feng, Y. et al. MicroRNAs and target genes in pituitary adenomas // *Horm Metab Res.* – 2018. – Vol. 50. – P. 179–92.
18. Yoshimoto, T. et al. Pulmonary carcinoids and low-grade gastrointestinal neuroendocrine tumors show common microRNA expression profiles, different from adenocarcinomas and small cell carcinomas // *Neuroendocrinology.* – 2017. – Vol. 106. – P. 47–57.
19. Di Fazio, P. et al. Expression of hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, and hsa-miR-222-3p and their putative targets HMGA2 and CDKN1B in typical and atypical carcinoid tumors of the lung // *Tumor Biol.* – 2017. – Vol. 39. – P. 1–8.
20. Лапшина, А.М. и соавт. Роль микроРНК в онкогенезе опухолей гипофиза и их практическая значимость // *Терапевтический архив.* – 2016. – Т. 88, № 8. – С. 115–120.
21. Sharma, S.T. et al. Cushing's syndrome: epidemiology and developments in disease management // *Clin Epidemiol.* – 2015. – Vol. 7. – P. 281–293.

22. Hakami, O.A. et al. Epidemiology and mortality of Cushing's syndrome // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2021. – Vol. 35, №1. – P. 101521.
23. Белая, Ж.Е. и соавт. Современный взгляд на скрининг и диагностику эндогенного гиперкортицизма // *Проблемы эндокринологии.* – 2012. – Т. 58, № 4. – С. 35–41.
24. Javanmard, P. et al. Mortality in Patients with Endogenous Cushing's Syndrome // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* – 2018. – Vol. 47, № 2. – P. 313–333.
25. Etxabe, J. et al. Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach // *Clin Endocrinol.* – 1994. – Vol. 40, № 4. – P. 479–484.
26. Pivonello, R. et al. Complications of Cushing's syndrome: state of the art // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2016. Vol. 7, № 4. – P. 611–629.
27. Bolland, M.J. et al. Mortality and morbidity in Cushing's syndrome in New Zealand // *Clin Endocrinol.* – 2011. – Vol. 75, № 4. – P. 436–42.
28. Feelders, R.A. et al. The burden of Cushing's disease: clinical and health-related quality of life aspects // *Eur J Endocrinol.* – 2012. – Vol. 167, № 3. – P. 311–326.
29. Cushing, H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations // *Bull Johns Hopkins Hosp.* – 1932. – Vol. 50. – P. 95–137.
30. Lonser, R.R. et al. Cushing's disease: pathobiology, diagnosis, and management // *J Neurosurg.* – 2017. – Vol. 126, № 2. – P. 404–417.
31. Белая, Ж.Е. и соавт. Метаболические осложнения эндогенного гиперкортицизма. Выбор пациентов для скрининга // *Ожирение и метаболизм.* – 2013. – Т. 10, № 1. – С. 26–31.
32. Nieman, L.K. Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening // *Eur J Endocrinol.* – 2015. – Vol. 173, № 4. – P. M33–M38.
33. Rubinstein, G. et al. Time to Diagnosis in Cushing's Syndrome: A Meta-Analysis Based on 5367 Patients // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2020. – Vol. 105, № 3. – P. E12–E22.
34. Bride, M.M. et al. Quality of life in Cushing's syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* // – 2021. – Vol. 35, № 1. – P. 101505.

35. Clayton, R.N. et al. Mortality in patients with Cushing's disease more than 10 years after remission: a multicentre, multinational, retrospective cohort study // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2016. – Vol. 4, № 7. – P. 569–576.
36. Ntali, G. et al. Mortality in Cushing's syndrome: systematic analysis of a large series with prolonged follow-up // *Eur J Endocrinol.* – 2013. – Vol. 169, № 5. – P. 715–723.
37. Nieman, L.K. Diagnosis of Cushing's Syndrome in the Modern Era // *Endocrinol Metab Clin North Am.* – 2018. – Vol. 47, № 2. – P. 259–273.
38. Newell-Price, J. et al. Cushing's syndrome // *Lancet.* – 2006. – Vol. 367, № 9522. – P. 1605–1617.
39. Putignano, P. et al. The effects of anti-convulsant drugs on adrenal function // *Horm Metab Res.* – 1998. – Vol. 30, № 6–7. – P. 389–397.
40. Isidori, A.M. et al. Discriminatory value of the low-dose dexamethasone suppression test in establishing the diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – Vol. 88, № 11. – P. 5299–5306.
41. Scaroni, C. et al. Approach to patients with pseudo-Cushing's states // *Endocr Connect.* – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. R1–R13.
42. Newell-Price, J. et al. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states // *Endocr Rev.* – 1998. – Vol. 19, № 5. – P. 647–672.
43. Белая, Ж.Е. Ранняя диагностика эндогенного гиперкортицизма. Канонический wnt-сигнальный путь и изменение костного метаболизма при глюкокортикоидном остеопорозе: автореф. дисс. ... докт. мед. наук: 14.01.02 / Ж.Е. Белая – М., 2013. – 49 с.
44. Белая, Ж.Е. и соавт. Автоматизированный электрохемилюминесцентный метод определения кортизола в слюне для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением // *Ожирение и метаболизм.* – 2011. – Т. 27, № 2. – С. 56–63.
45. Glass, A.R. et al. Circadian rhythm of serum cortisol in Cushing's disease // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1984. – Vol. 59, № 1. – P. 161–165.

46. Ceccato, F. et al. Performance of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal incidentaloma, and adrenal insufficiency // *Eur J Endocrinol.* – 2013. – Vol. 169, №1. – P. 31–36.
47. Raff, H. et al. Late-night salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – Vol. 83, № 8. – P. 2681–2686.
48. Evans, P.J. et al. Salivary cortisol levels in true and apparent hypercortisolism // *Clinical Endocrinology (Oxford).* – 1984. – Vol. 20. – P. 709–715.
49. Raff, H. Cushing's syndrome: diagnosis and surveillance using salivary cortisol // *Pituitary.* – 2012. – Vol. 15. – P. 64–70.
50. Гончаров, Н.П. и соавт. Использование ультрачувствительного метода определения биологически активного свободного кортизола в слюне для оценки глюкокортикоидной функции коры надпочечников // *Проблемы Эндокринологии.* – 2008. – Т. 58, № 3. – С. 27–35
51. van Baal, L. et al. Distinct Late-Night Salivary Cortisol Cut-Off Values for the Diagnosis of Hypercortisolism // *Horm Metab Res.* – 2021. – Vol. 53, № 10. – P. 662–671.
52. Kivlighan, K.T. et al. Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva // *Horm Behav.* – 2004. – Vol. 46, № 1. – P. 39–46.
53. Cohen, A. et al. The Relationship Between Tobacco Smoking, Cortisol Secretion, and Sleep Continuity // *Subst Use Misuse.* – 2019. – Vol. 54, № 10. – P. 1705–1714.
54. Rohleder, N. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers // *Int J Psychophysiol.* – 2006. – Vol. 59, № 3. – P. 236–243.
55. Mendelson, J.H. et al. Effects of low- and high-nicotine cigarette smoking on mood states and the HPA axis in men // *Neuropsychopharmacology.* – 2005. – Vol. 30, № 9. – P. 1751–1763.
56. del Arbol, J.L. et al. Plasma concentrations of beta-endorphin in smokers who consume different numbers of cigarettes per day // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2000. – Vol. 67, № 1. – P. 25–28.

57. Smith, R.E. et al. Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1996. – Vol. 81, № 9. – P. 3244–3248.
58. Lages, A.S. et al. Late-Night Salivary Cortisol: Cut-Off Definition and Diagnostic Accuracy for Cushing's Syndrome in a Portuguese Population // *Acta Med Port.* – 2019. – Vol. 32, № 5. – P. 381–387.
59. Carrasco, C.A. et al. Midnight salivary cortisol determination for assessing the outcome of transsphenoidal surgery in Cushing's disease // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – Vol. 93, № 12. – P. 4728–4734.
60. Putignano, P. et al. Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – Vol. 88, № 9. – P. 4153–4157.
61. Papanicolaou, D.A. et al. Nighttime salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – Vol. 87, № 10. – P. 4515–4521.
62. Sturmer, L.R. et al. Clinical utility of an ultrasensitive late night salivary cortisol assay by tandem mass spectrometry // *Steroids.* – 2018. – Vol. 129. – P. 35–40.
63. Zerikly, R.K. et al. Diagnostic characteristics of late-night salivary cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – Vol. 95, № 10. – P. 4555–4559.
64. Erickson, D. et al. Late-night salivary cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome by liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2012. – Vol. 76, № 4. – P. 467–472.
65. Antonelli, G. et al. Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome // *Clin Chim Acta.* – 2015. – Vol. 451. – P. 247–251.
66. Bäcklund, N. et al. Reference intervals of salivary cortisol and cortisone and their diagnostic accuracy in Cushing's syndrome // *Eur J Endocrinol.* – 2020. – Vol. 182, № 6. – P. 569–582.

67. Belaya, Z.E. et al. Diagnostic performance of late-night salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay in obese and overweight patients referred to exclude Cushing's syndrome // *Endocrine*. – 2012. – Vol. 41, № 3. – P. 494–500.
68. Aberle, J. et al. Specificity of late-night salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay for Cushing's disease in an obese population // *J Endocrinol Invest*. – 2018. – Vol. 41, № 11. – P. 1325–1331.
69. Ceccato, F., Boscaro, M. Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis // *High Blood Press Cardiovasc Prev*. – 2016. – Vol. 23, № 3. – P. 209–215.
70. Alexandraki, K.I., Grossman, A.B. Is urinary free cortisol of value in the diagnosis of Cushing's syndrome? // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 259–263.
71. Boscaro, M. et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: atypical presentations and laboratory shortcomings // *Arch Intern Med*. – 2000. – Vol. 160, № 20. – P. 3045–3053.
72. Ceccato, F. et al. Screening Tests for Cushing's Syndrome: Urinary Free Cortisol Role Measured by LC-MS/MS // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2015. – Vol. 100, № 10. – P. 3856–3861.
73. Carroll, T.B., Findling, J.W. The diagnosis of Cushing's syndrome // *Rev Endocr Metab Disord*. – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 147–153.
74. Arnaldi, G. et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2003. – Vol. 88, № 12. – P. 5593–5602.
75. Mericq, M.V., Cutler, G.B. Jr. High fluid intake increases urine free cortisol excretion in normal subjects // *J Clin Endocrinol Metab*. – 1998. – Vol. 83, № 2. – P. 682–684.
76. Белая, Ж.Е. и соавт. Болезнь Иценко – Кушинга (учебное пособие). – М. ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, 2021. – 40 с.
77. Bianchi, L. et al. Measurement of urinary free cortisol by LC-MS-MS: adoption of a literature reference range and comparison with our current immunometric method // *J Endocrinol Invest*. – 2019. – Vol. 42, № 11. – P. 1299–1305.

78. Luo, A. et al. Clinical utility of an ultrasensitive urinary free cortisol assay by tandem mass spectrometry // *Steroids*. – 2019. – Vol. 146. – P. 65–69.
79. Putignano, P. et al. Screening for Cushing's syndrome in obese women with and without polycystic ovary syndrome // *J Endocrinol Invest*. – 2003. – Vol. 26, № 6. – P. 539–544.
80. Elamin, M.B. et al. Accuracy of diagnostic tests for Cushing's syndrome: a systematic review and meta-analyses. // *J. Clin Endocrinol Metab*. – 2008. – Vol. 93. – P. 1553–1562.
81. Magiakou, M.A. et al. Cushing's syndrome in children and adolescents. Presentation, diagnosis, and therapy.// *N Engl J Med*. – 1994. – Vol. 331. – P. 629–636.
82. Yanovski, J.A. et al. Corticotropin-releasing hormone stimulation following low-dose dexamethasone administration. A new test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states // *JAMA*. – 1993. – Vol. 269. – P. 2232–2238.
83. Pecori Giraldi, F. et al. The dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test and the desmopressin test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 2007. – Vol. 66, № 2. – P. 251–257.
84. Erickson, D. et al. Dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test for diagnosis of mild hypercortisolism // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2007. – Vol. 92, № 8. – P. 2972–2976.
85. Martin, N.M. et al. Comparison of the dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone test and low-dose dexamethasone suppression test in the diagnosis of Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2006. – Vol. 91, № 7. – P. 2582–2586.
86. Yanovski, J.A. et al. The dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test differentiates mild Cushing's disease from normal physiology // *J Clin Endocrinol Metab*. – 1998. – Vol. 83, № 2. – P. 348–352.
87. Gatta, B. et al. Reevaluation of the combined dexamethasone suppression-corticotropin-releasing hormone test for differentiation of mild Cushing's disease from pseudo-Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2007. – Vol. 92, № 11. – P. 4290–4293.

88. Pecori Giraldi, F. et al. The dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test and the desmopressin test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 2007. – Vol. 66, № 2. – P. 251–257.
89. Tirabassi, G. et al. Use of the desmopressin test in the differential diagnosis of pseudo-Cushing state from Cushing's disease // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2010. – Vol. 95, № 3. – P. 1115–1122.
90. Raul, J.S. et al. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair // *Clin Biochem*. – 2004. – Vol. 37, № 12. – P. 1105–1111.
91. Greff, M.J.E. et al. Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications // *Clin Biochem*. – 2019. – Vol. 63. – P. 1–9.
92. Webb, E.C. et al. Integrating cortisol and isotopic analyses of archeological hair: reconstructing individual experiences of health and stress // *Am J Phys Anthropol*. – 2015. – Vol. 156, № 4. – P. 577–594.
93. Loussouarn, G. et al. Diversity in human hair growth, diameter, colour and shape. An in vivo study on young adults from 24 different ethnic groups observed in the five continents // *Eur J Dermatol*. – 2016. – Vol. 26, № 2. – P. 144–154.
94. Wester, V.L. et al. Hair cortisol and cortisone are decreased by natural sunlight // *Psychoneuroendocrinology*. – 2016. – Vol. 72. – P. 94–96.
95. Thomson, S. et al. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome // *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. – 2010. – Vol. 118, № 2. – P. 133–138.
96. Stolze, B.R. et al. An improved micro-method for the measurement of steroid profiles by APPI-LC-MS/MS and its use in assessing diurnal effects on steroid concentrations and optimizing the diagnosis and treatment of adrenal insufficiency and CAH // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2016. – Vol. 162. – P. 110–116.
97. Phillipou, G. Investigation of urinary steroid profiles as a diagnostic method in Cushing's syndrome // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 1982. – Vol. 16, № 5. – P. 433–439.

98. Eisenhofer, G. et al. Plasma Steroid Metabolome Profiling for Diagnosis and Subtyping Patients with Cushing Syndrome // *Clin Chem.* – 2018. – Vol. 64, № 3. – P. 586–596.
99. Barahona, M.J. et al. Deleterious Effects of Glucocorticoid replacement on bone in women after long-term remission of Cushing's syndrome // *Journal of Bone and Mineral Research.* – 2009. – Vol. 24. – P. 1841–1846.
100. Lukert, B.P. et al. Serum osteocalcin is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoids // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 1986. – Vol. 62. – P. 1056–1058.
101. Рожинская, Л.Я. Остеопенический синдром при заболеваниях эндокринной системы и постменопаузальный остеопороз: патогенетические аспекты, диагностика и лечение: автореф. дисс. ... докт. мед. наук: 14.01.02 / Л.Я. Рожинская – М., 2002. – 318 с.
102. Kristo, C. et al. Restoration of the coupling process and normalization of bone mass following successful treatment of endogenous Cushing's syndrome: a prospective, long-term study // *European J. Endocrinology.* – 2006. – Vol. 154. – P. 109–118.
103. Szappanos, A. et al. Bone turnover in patients with endogenous Cushing's syndrome before and after successful treatment // *Osteoporosis International.* – 2010. – Vol. 21. – P. 637–645.
104. Sereg, M. et al. Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical Cushing's syndrome // *Steroids.* – 2011. – Vol. 76, № 1–2. – P. 38–42.
105. Belaya, Z.E. et al. Diagnostic performance of osteocalcin measurements in patients with endogenous Cushing's syndrome // *Bonekey Rep.* – 2016. – Vol. 5. – P. 815.
106. Patel, L. et al. Machine Learning Methods in Drug Discovery // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25, № 22. – P. 5277.
107. Handelsman, G.S. et al. eDoctor: machine learning and the future of medicine // *J Intern Med.* – 2018. – Vol. 284, № 6. – P. 603–619.

108. Peiffer-Smadja, N. et al. Machine learning for clinical decision support in infectious diseases: a narrative review of current applications // *Clin Microbiol Infect.* – 2020. – Vol. 26, № 5. – P. 584–595.
109. Kosilek, R.P. et al. Diagnostic use of facial image analysis software in endocrine and genetic disorders: review, current results and future perspectives // *Eur J Endocrinol.* – 2015. – Vol. 173, № 4. – P. M39–M44.
110. Popp, K.H. et al. Computer Vision Technology in the Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome // *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* – 2019. – Vol. 127, № 10. – P. 685–690.
111. Scaroni, C. et al. Approach to patients with pseudo-Cushing's states // *Endocr Connect.* – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. R1–R13.
112. Lindsay, J.R., Nieman, L.K. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy: challenges in disease detection and treatment // *Endocr Rev.* – 2005. – Vol. 26, № 6. – P. 775–799.
113. Findling, J.W., Raff, H. Diagnosis of endocrine disease: Differentiation of pathologic/neoplastic hypercortisolism (Cushing's syndrome) from physiologic/non-neoplastic hypercortisolism (formerly known as pseudo-Cushing's syndrome) // *Eur J Endocrinol.* – 2017. – Vol. 176, № 5. – P. R205–R216.
114. Fan, J. et al. Ultrasound imaging in the diagnosis of benign and suspicious adrenal lesions // *Med Sci Monit.* – 2014. – Vol. 20. – P. 2132–2141.
115. Talbot, J.A. et al. Analytical and clinical aspects of adrenocorticotrophin determination // *Ann Clin Biochem.* – 2003. – Vol. 40, № 5. – P. 453–471.
116. Liddle, G.W. et al. Clinical and laboratory studies of ectopic humoral syndromes // *Recent Prog Horm Res.* – 1969. – Vol. 25. – P. 283–314.
117. Hayes, A.R., Grossman, A.B. The Ectopic Adrenocorticotrophic Hormone Syndrome: Rarely Easy, Always Challenging // *Endocrinol Metab Clin North Am.* – 2018. – Vol. 47, № 2. – P. 409–425.
118. Jagannathan, J. et al. Outcome of using the histological pseudocapsule as a surgical capsule in Cushing disease // *J Neurosurg.* – 2009. – Vol. 111, № 3. – P. 531–539.

119. Ciric, I. et al. Transsphenoidal surgery for Cushing disease: experience with 136 patients // *Neurosurgery*. – 2012. – Vol. 70, № 1. – P. 70–81.
120. Yogi-Morren, D. et al. Pituitary MRI findings in patients with pituitary pituitary and ectopic ACTH-dependent Cushing syndrome: does a 6-mm pituitary tumor size cut-off value exclude ectopic ACTH syndrome? // *Endocr Pract*. – 2015. – Vol. 21, № 10. – P. 1098–1103.
121. Zampetti, B. et al. Bilateral inferior petrosal sinus sampling // *Endocr Connect*. – 2016. – Vol. 5, № 4. – P. R12–R25.
122. Ситкин И.И. и соавт. Значение селективного забора крови из нижних каменистых синусов для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого гиперкортицизма // *Эндокринная хирургия*. – 2018. – Т. 12, №2. – С. 89–95.
123. Crapo, L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests // *Metabolism*. – 1979. – Vol. 28, № 9. – P. 955–977.
124. Findling, J.W. et al. Selective venous sampling for ACTH in Cushing's syndrome: differentiation between Cushing disease and the ectopic ACTH syndrome // *Ann Intern Med*. – 1981. – Vol. 94, № 5. – P. 647–652.
125. Oldfield, E.H. et al. Preoperative lateralization of ACTH-secreting pituitary microadenomas by bilateral and simultaneous inferior petrosal venous sinus sampling // *N Engl J Med*. – 1985. – Vol. 312, № 2. – P. 100–103.
126. Landolt, A.M. et al. Corticotrophin-releasing factor-test used with bilateral, simultaneous inferior petrosal sinus blood-sampling for the diagnosis of pituitary-dependent Cushing's disease // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 1986. – Vol. 25, № 6. – P. 687–696.
127. Дедов, И.И. и соавт. Первый опыт использования селективного забора крови из нижних каменистых синусов в России (клиническое наблюдение) // *Проблемы Эндокринологии*. – 2009. – Т. 55, № 6. – С. 11–16.
128. Pereira, C.A. et al. Diagnostic accuracy of Bilateral Inferior Petrosal Sinus Sampling: The Experience of a Tertiary Centre // *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. – 2021. – Vol. 129, № 2. – P. 126–130.

129. Swearingen, B. et al. Diagnostic errors after inferior petrosal sinus sampling // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2004. – Vol. 89, № 8. – P. 3752–3763.
130. Sturrock, N.D., Jeffcoate, W.J. A neurological complication of inferior petrosal sinus sampling during investigation for Cushing's disease: a case report // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 1997. – Vol. 62, № 5. – P. 527–528.
131. Bonelli, F.S. et al. Venous subarachnoid hemorrhage after inferior petrosal sinus sampling for adrenocorticotrophic hormone // *AJNR Am J Neuroradiol.* – 1999. – Vol. 20, № 2. – P. 306–307.
132. Gandhi, C.D. et al. Neurologic complications of inferior petrosal sinus sampling // *AJNR Am J Neuroradiol.* – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 760–765.
133. Diez, J.J, Iglesias P. Pulmonary thromboembolism after inferior petrosal sinus sampling in Cushing's syndrome // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 1997. – Vol. 46, № 6. – P. 777.
134. Lefournier, V. et al. One transient neurological complication (sixth nerve palsy) in 166 consecutive inferior petrosal sinus samplings for the etiological diagnosis of Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1999. – Vol. 84, № 9. – P. 3401–3402.
135. Pinelli, S. et al. Second-Line Tests in the Diagnosis of Adrenocorticotrophic Hormone-Dependent Hypercortisolism // *Ann Lab Med.* – 2021. – Vol. 41, № 6. – P. 521–531.
136. Nieman, L.K. et al. A simplified morning ovine corticotropin-releasing hormone stimulation test for the differential diagnosis of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1993. – Vol. 77, № 5. – P. 1308–1312.
137. Reimondo, G. et al. The corticotrophin-releasing hormone test is the most reliable noninvasive method to differentiate pituitary from ectopic ACTH secretion in Cushing's syndrome // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2003. – Vol. 58, № 6. – P. 718–724.
138. Araya, A.V. et al. Combined dexamethasone and desmopressin test in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome and pseudo-cushing's states // *Pituitary* – 2017. – Vol. 20, № 5. – P. 602–603.
139. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // *Cell.* – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 215–233.

140. Belaya, Z. et al. Effects of active acromegaly on bone mRNA and microRNA expression patterns // *Eur J Endocrinol.* – 2018. – Vol. 178, № 4. – P. 353–364.
141. Belaya, Z. et al. Effects of endogenous hypercortisolism on bone mRNA and microRNA expression in humans // *Osteoporos Int.* – 2018. – Vol. 29, № 1. – P. 211–221.
142. Луценко, А.С. и соавт. Экспрессия циркулирующих микроРНК в плазме у пациентов с акромегалией // *Проблемы эндокринологии.* – 2019. – Т. 65, № 5. – С. 311–318.
143. Луценко, А.С. и соавт. МикроРНК и их значение в патогенезе СТГ-продуцирующих аденом гипофиза // *Вестник Российской академии медицинских наук.* – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 290–298.
144. Аушев, В.Н. МикроРНК: малые молекулы с большим значением // *Клиническая онкогематология.* – 2015. – Т. 8, № 1. – С. 1–12.
145. Hanahan, D., Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation // *Cell.* – 2011. – Vol. 144, № 5. – P. 646–674.
146. Calin, G.A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 15524–155290.
147. Pashaei, E. et al. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. e0179543.
148. Adhami, M. et al. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review // *Breast Cancer.* – 2018. – Vol. 25. – P. 198–205.
149. Pardini, B. et al. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol. 18. – P. 696.
150. Shao, C. et al. The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: a systematic review with meta-analysis // *BMC Cancer.* – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 1103.
151. Saleem, M. et al. Sox6, A Potential Target for MicroRNAs in Cardiometabolic Disease // *Curr Hypertens Rep.* – 2022. – Vol. 24, № 5. – P. 145–156.

152. Bottoni, A. et al. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas // *J Cell Physiol.* – 2005. – Vol. 204, № 1. – P. 280–285.
153. Bottoni, A. et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas // *J Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 210, № 2. – P. 370–377.
154. Amaral, F. et al. MicroRNAs Differentially Expressed in ACTH-Secreting Pituitary Tumors // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2009. – Vol. 94, № 1. - P. 320–323.
155. Stilling, G. et al. MicroRNA expression in ACTH-producing pituitary tumors: up-regulation of microRNA-122 and -493 in pituitary carcinomas // *Endocrine.* – 2010. – Vol. 38, № 1. – P. 67–75.
156. Gentilin, E. et al. miR-26a plays an important role in cell cycle regulation in ACTH-secreting pituitary adenomas by modulating protein kinase C δ // *Endocrinology.* – 2013. – Vol. 154, № 5. – P. 1690–1700.
157. Belaya, Z. et al. Circulating Plasma microRNA to Differentiate Cushing's Disease From Ectopic ACTH Syndrome // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2020. – Vol. 11. – P. 331.
158. Garbicz, F. et al. Increased expression of the microRNA 106b~25 cluster and its host gene MCM7 in corticotroph pituitary adenomas is associated with tumor invasion and Crooke's cell morphology // *Pituitary.* – 2017. – Vol. 20, № 4. – P. 450–463.
159. Coli, A. et al. Minichromosome maintenance protein 7 as prognostic marker of tumor aggressiveness in pituitary adenoma patients // *Eur J Endocrinol.* – 2016. – Vol. 174, № 3. – P. 307–314.
160. Li, Y. et al. Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma // *Cancer Sci.* – 2009. – Vol. 100, № 7. – P. 1234–1242.
161. Poliseno, L. et al. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation // *Sci Signal.* – 2010. – Vol. 3, №117.
162. Grzywa, T.M. et al. Lineage-dependent role of miR-410-3p as oncomiR in gonadotroph and corticotroph pituitary adenomas or tumor suppressor miR in

somatotroph adenomas via MAPK, PTEN/AKT, and STAT3 signaling pathways // *Endocrine*. – 2019. – Vol. 65, № 3. – P. 646–655.

163. Vicchio, T.M. et al. MicroRNAs expression in pituitary tumors: differences related to functional status, pathological features, and clinical behavior // *J Endocrinol Invest*. – 2020. – Vol. 43, № 7. – P. 947–958.

164. Ren, J. et al. TSP-1 is downregulated and inversely correlates with miR-449c expression in Cushing's disease // *J Cell Mol Med*. – 2019. – Vol. 23, № 6. – P. 4097–4110.

165. Huang, T. et al. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 48. – P. 84546–84558.

166. Lutsenko, A. et al. Circulating Plasma MicroRNA in Patients With Active Acromegaly // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2022. – Vol. 107, № 2. – P. 500–511.

167. Perez-Rivas, L.G. et al. The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2015. – Vol. 100, № 7. – P. E997–E1004.

168. Reincke, M. et al. Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease // *Nat Genet*. – 2015. – Vol. 47, № 1. – P. 31–38.

169. Hayashi, K. et al. The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease // *Eur. J. Endocrinol*. – 2016. – Vol. 174. – P. 213–226.

170. Wanichi, I.Q. et al. Cushing's disease due to somatic USP8 mutations: A systematic review and meta-analysis // *Pituitary*. – 2019. – Vol. 22. – P. 435–442.

171. Albani, A. et al. The USP8 mutational status may predict long-term remission in patients with Cushing's disease // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. – 2018. – Vol. 89. – P. 454–458.

172. Mossakowska, B.J. et al. Difference in miRNA Expression in Functioning and Silent Corticotroph Pituitary Adenomas Indicates the Role of miRNA in the Regulation of Corticosteroid Receptors // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23, № 5. – P. 2867.

173. Nishioka, H., Inoshita, N. New WHO classification of pituitary adenomas (4th edition): assessment of pituitary transcription factors and the prognostic histological factors // *Brain Tumor Pathology*. – 2018. – Vol. 35, № 2. – P. 57–61.
174. CM, Ng. et al. Clinical utility of late-night and post-overnight dexamethasone suppression salivary cortisone for the investigation of Cushing's syndrome // *Hong Kong Med J*. – 2017. – Vol. 23. – P. 570–578.
175. Barrou, Z. et al. Overnight dexamethasone suppression test: comparison of plasma and salivary cortisol measurement for the screening of Cushing's syndrome // *Eur J Endocrinol*. – 1996. – Vol. 134, № 1. – P. 93–96.
176. Castro, M. et al. A dose-response study of salivary cortisol after dexamethasone suppression test in Cushing's disease and its potential use in the differential diagnosis of Cushing's syndrome // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 2003. – Vol. 59, № 6. – P. 800–805.
177. Bandi, N., Vassella, E. miR-34a and miR-15a/16 are co-regulated in non-small cell lung cancer and control cell cycle progression in a synergistic and Rb-dependent manner // *Mol Cancer*. – 2011. – Vol. 10, № 55.
178. Renjie, W., Haiqian, L. MiR-132, miR-15a and miR-16 synergistically inhibit pituitary tumor cell proliferation, invasion and migration by targeting Sox5 // *Cancer Lett*. – 2015. – Vol. 356. – P. 568–78.
179. Niedra, H. et al. Case Report: Micro-RNAs in Plasma From Bilateral Inferior Petrosal Sinus Sampling and Peripheral Blood From Corticotroph Pituitary Neuroendocrine Tumors // *Front. Endocrinol*. – 2022. – Vol.13. – P. 748152.
180. Liu, Y. et al. MiR-375: A novel multifunctional regulator // *Life Sci*. – 2021. – Vol. 275. – P. 119323.
181. Xu, X. et al. miR-375-3p Suppresses Tumorigenesis and Partially Reverses Chemoresistance by Targeting YAP1 and SP1 in Colorectal Cancer Cells // *Aging (Albany NY)*. – 2019. – Vol. 11. – P. 7357–7385.
182. Wei, J. et al. MicroRNA-375: potential cancer suppressor and therapeutic drug // *Biosci Rep*. – 2021. – Vol. 41, № 9. – P. BSR20211494.

183. Li, Q. et al. The Role of Exosomal miR-375-3p: A Potential Suppressor in Bladder Cancer via the Wnt/b-Catenin Pathway // *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* – 2020. – Vol. 34. – P. 12177–12196.
184. Slattery, M.L. et al. The PI3K/AKT signaling pathway: associations of miRNAs with dysregulated gene expression in colorectal cancer // *Mol. Carcinog.* – 2018. – Vol. 57, № 2. – P. 243–261.
185. Zhang, N. et al. MicroRN 375 mediates the signaling pathway of corticotropin-releasing factor (CRF regulating pro-opiomelanocortin (POMC) expression by targeting mitogenactivate protein kinase 8 // *Journal of Biological Chemistry.* – 2013. – Vol. 288, № 15. – P. 10361–10373.
186. D'Angelo, D. et al. Epigenetic Mechanisms Leading to Overexpression of HMGA Proteins in Human Pituitary Adenomas // *Front Med (Lausanne).* – 2015. – Vol. 39, № 2.
187. Qian, Z.R. et al. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas // *Mod Pathol.* – 2009. – Vol. 22. – P. 431–41.
188. Palmieri, D. et al. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis // *Oncogene.* – 2012. – Vol. 31. – P. 3857–65.
189. Vetrivel, S. et al. Circulating microRNA Expression in Cushing's Syndrome // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – P. 620012.
190. Nam, J.W. et al. Global Analyses of the Effect of Different Cellular Contexts on MicroRNA Targeting // *Molecular Cell.* – 2014. – Vol. 53, № 6. – P. 1031–1043.
191. Riffo-Campos, Á. et al. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2016. – Vol. 17, № 12. – P. 1987.
192. Karhu, A., Aaltonen, L.A. Susceptibility to pituitary neoplasia related to MEN-1, CDKN1B and AIP mutations: an update // *Hum Mol Genet.* – 2007. – Vol.16, № 1. – P. R73–79.
193. Fedele, M. et al. HMGA2: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? // *Mol Cell Endocrinol.* – 2010. – Vol. 326, № 1–2. – P. 19–24.

194. Martínez de LaPiscina, I. et al. Rare Germline DICER1 Variants in Pediatric Patients With Cushing's Disease: What Is Their Role? // Front Endocrinol (Lausanne). – 2020. – Vol.11. – P. 433.