

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

На правах рукописи

ТРУХИНА Диана Аршалуйсовна

**КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ
С ФЕНОКОПИЯМИ СИНДРОМА МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭНДОКРИННЫХ
НЕОПЛАЗИЙ 1 ТИПА**

3.1.19. ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Ж.Е. Белая

МОСКВА

2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Общие сведения о синдроме множественных эндокринных неоплазий 1 типа.....	8
1.2 Ген <i>MEN1</i> и менин.....	15
1.3 Фенокопии синдрома МЭН-1	20
1.4 Общие характеристики микроРНК.....	27
1.5 МикроРНК и менин.....	32
1.6 МикроРНК и синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1 Дизайн исследования	47
2.2 Условия проведения	48
2.3 Критерии соответствия	49
2.4 Клиническое обследование пациентов.....	51
2.5 Лабораторные методы исследования	51
2.6 Инструментальные методы исследования	52
2.7 Гистологические и иммуногистохимические исследования.....	52
2.8 Молекулярно-генетические исследования.....	54
2.9 Статистический анализ	56
2.10 Способ определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с его фенокопиями.....	57
2.11 Этическая экспертиза.....	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ ..	60
3.1. Клиническая характеристика пациентов с фенотипом МЭН-1. Создание диагностической модели по определению вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа среди пациентов с его фенокопиями	60
3.1.1 Клиническая характеристика пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 и сравнение их с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1	60
3.1.2 Создание диагностической модели по определению вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа среди пациентов с его фенокопиями	66
3.1.3 Обсуждение полученных результатов.....	71
3.2 Иммуногистохимическое исследование тканей аденом гипофиза у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, фенокопиями синдрома и спорадической акромегалией.....	79

3.2.1 Обсуждение полученных результатов.....	84
3.3 Оценка экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, спорадическими акромегалией, первичным гиперпаратиреозом, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами	86
3.3.1 Клиническая характеристика пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в исследование экспрессии микроРНК методом NGS	86
3.3.2 Анализ экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, спорадическими акромегалией, первичным гиперпаратиреозом, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами методом NGS	90
3.3.3 Клиническая характеристика пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в исследование экспрессии микроРНК методом RT-qPCR	100
3.3.4 Анализ экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, спорадическими акромегалией, первичным гиперпаратиреозом, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами методом RT-qPCR	104
3.3.5 Обсуждение полученных результатов.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ.....	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа (МЭН-1) (OMIM #131100) – редкое, аутосомно-доминантное заболевание, обусловленное мутациями в гене *MEN1*, кодирующем белок менин [1]. Синдром предрасполагает к развитию опухолей околощитовидных желез, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, аденом гипофиза, а также других эндокринных и неэндокринных новообразований, которые обычно манифестируют в молодом возрасте [2]. В случае выявления у пациента фенотипа МЭН-1 при отсутствии мутаций в гене *MEN1*, состояние расценивается как фенокопия данного синдрома [3, 4]. Одной из причин развития фенокопий МЭН-1 могут быть мутации в других генах, однако даже при полногеномном секвенировании остаётся группа пациентов с фенотипом синдрома МЭН-1, у которых мутации не выявляются [5]. Таким образом поиск клинических признаков, способных своевременно определять пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 является актуальной задачей. В последнее время для таких целей все чаще используются математические модели. Совершенствование существующих диагностических моделей или разработка новых упростит выявление пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, что поможет избежать неоправданного долгосрочного лабораторно-инструментального скрининга.

Другими возможными причинами сочетания нескольких эндокринных опухолей у таких пациентов могут быть эпигенетические изменения, влияющие на экспрессию менина. Изменение экспрессии микроРНК рассматривается как важный механизм в посттрансляционной регуляции генов, и уже существует множество данных, подтверждающих роль микроРНК в развитии опухолей различных органов, включая гипофиз, поджелудочную и околощитовидные железы [6]. Некоторые микроРНК могут непосредственно влиять на мРНК менина, снижая или повышая его экспрессию в тканях, а сам менин, выступая в роли транскрипционного фактора, участвовать в регуляции синтеза микроРНК [7, 8]. Исходя из этого, возможным триггером развития опухолевого процесса, схожего с синдромом МЭН-1, могут быть посттрансляционные изменения экспрессии менина или экспрессии других генов, ассоциированных с множественными опухолями эндокринной системы, в том числе вследствие изменений профиля микроРНК.

Особенностью микроРНК является их стабильность, тканеспецифичность, способность высвобождаться за пределы клетки и присутствовать в крови и других биологических жидкостях в составе внеклеточных везикул, липидов. МикроРНК таким способом участвуют в межклеточной коммуникации, выполняя в том числе паракринную функцию, а при воздействии на другие органы и ткани функцию подобную гормонам [9]. Опухолевые клетки и стромальные компоненты опухоли представляют собой источник содержания не кодирующих РНК в крови. По сравнению с нормальными клетками, опухолевые клетки выделяют по меньшей мере в десять раз

больше внеклеточных везикул, которые содержат микроРНК, действуя как опухолевые супрессоры или онкогены в органах мишенях [9]. Таким образом, измерение микроРНК в периферической крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 и сравнение их с генетически верифицированным синдромом МЭН-1, а также со спорадическими аналогами заболеваний может помочь в определении сходств и различий профилей экспрессии микроРНК у данных пациентов и в перспективе определить возможные причины возникновения сочетанных эндокринных опухолей у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1.

Степень разработанности темы исследования

Экспрессия микроРНК в тканях эндокринных желез активно исследуется в мире, в том числе в органах, патогномоничных для синдрома МЭН-1: околощитовидных железах, гипофизе, поджелудочной железе. Однако на сегодняшний день только в одном исследовании произведена оценка циркулирующих микроРНК у пациентов с синдромом МЭН-1. Оценка экспрессии микроРНК у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 не проводилась. Работы, посвященные созданию диагностической модели по выявлению пациентов, подозрительных в отношении истинного синдрома МЭН-1, носят единичный характер. В большинстве из них имеются критерии, доступные только после проведения хирургического вмешательства. Вместе с тем, наиболее оптимальным является получение информации до вмешательства, так как тактика ведения пациентов может меняться. Совершенствование существующих моделей или разработка новых смогут облегчить своевременное выявление пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 и оценить необходимость долгосрочного лабораторно-инструментального скрининга.

Цель исследования

Выявление отличительных особенностей фенокопий синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа от генетически подтвержденного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа и спорадических аналогов заболеваний на основе клинических характеристик, результатов иммуногистохимического исследования и экспрессии микроРНК.

Задачи исследования

1. Сравнить клинические признаки пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 и генетически подтвержденным синдромом МЭН-1.
2. Разработать диагностическую модель с использованием клинических характеристик для определения вероятности наличия генетически подтвержденного синдрома МЭН-1 среди пациентов с фенотипом МЭН-1.
3. Исследовать экспрессию менина иммуногистохимическим методом в образцах аденом гипофиза у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и спорадической акромегалией.

4. Провести сравнительный анализ экспрессии микроРНК, полученных методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) в периферической крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, спорадической акромегалией, спорадическим первичным гиперпаратиреозом и группой относительно здоровых добровольцев.

5. Валидизировать установленные отличия экспрессии микроРНК в периферической крови методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (RT-qPCR).

Научная новизна исследования

Впервые в мире определена экспрессия менина в тканях аденом гипофиза у фенокопий синдрома МЭН-1 методом иммуногистохимического исследования.

Впервые в мире проведено исследование экспрессии микроРНК в периферической крови в группе пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 методом NGS, сравнение их с группами пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, спорадической акромегалией, спорадическим первичным гиперпаратиреозом и относительно здоровыми добровольцами, а также проведена валидация полученных результатов методом RT-qPCR.

Теоретическая и практическая значимость

Предложен комплекс клинических характеристик, вошедших в диагностический алгоритм, который позволяет дифференцировать синдром МЭН-1 и его фенокопии на этапе скрининга.

Получены микроРНК в плазме крови, валидизированные двумя методами (NGS и RT-qPCR), которые отличаются у пациентов с синдромом МЭН-1 и фенокопиями.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор лично провел анализ состояния научной проблемы в мире на основании литературных данных, сформулировал цель, задачи и дизайн диссертационной работы, принимал непосредственное участие в работе с пациентами и организации проведения лабораторных исследований, а также участвовал в интерпретации данных иммуногистохимического исследования, результатов метода RT-qPCR. Основной объем работы по сбору клинико-анамнестических данных, подготовке базы пациентов, статистической обработке данных и интерпретации полученных результатов, отбору критериев для разработки диагностической модели, подготовке публикаций и докладов по теме работы выполнены лично автором.

Основные положения, выносимые на защиту

Пациенты с фенокопиями синдрома МЭН-1 могут быть выделены от генетически подтвержденного синдрома МЭН-1 по клиническим признакам, объединённым в диагностическую модель с использованием метода k-ближайших соседей с диагностической точностью 96,7%.

Аденомы гипофиза пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 по данным иммуногистохимического исследования экспрессии менина соответствуют спорадическим формам, и отличаются от аденом гипофиза пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1.

По данным профиля циркулирующих микроРНК методом NGS пациенты с фенокопиями синдрома МЭН-1 отличаются от пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1. Различия между группами подтверждаются методом RT-qPCR по микроРНК miR-576-5p.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 20.05.2025 на заседании межкафедрального собрания Института высшего и дополнительного профессионального образования ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России.

Основные результаты диссертационной работы представлены на ежегодных конгрессах Эндокринологического общества (ENDO, онлайн формат, 2021 г.; в качестве устного доклада, Атланта (штат Джорджия, США) 2022 г.; в качестве устного доклада, Чикаго (штат Иллинойс, США) 2023 г.; в качестве устного доклада, Бостон (штат Массачусетс, США) 2024 г.), на 22 Европейском эндокринологическом Конгрессе (ECE, онлайн-формат, 2020), на V (XXX) Национальном конгрессе эндокринологов с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» в 2024 г. в качестве устного доклада. Результаты работы удостоены награды Outstanding Abstract Award на конгрессе ENDO 2022 (Атланта, штат Джорджия, США, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе в журналах, которые входят в перечень отечественных рецензируемых журналов, рекомендуемых для публикации основных результатов диссертаций – 2; тезисы, опубликованные за рубежом – 5. На основании результатов проведенного исследования получен патент на изобретение RU 2838817 C1.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, описание материалов и методов проведения исследования, собственные результаты и их обсуждение, заключение), выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, условных обозначений и списка литературы. Библиография включает 244 источника (из них 13 отечественных и 231 зарубежный). Работа иллюстрирована 23 рисунками и 33 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о синдроме множественных эндокринных неоплазий 1 типа

Синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа (МЭН-1; OMIM #131100 [10]) представляет собой редкое аутосомно-доминантное заболевание, вызванное мутациями в гене-супрессоре опухолей *MEN1*, кодирующем белок менин [1]. Реальная заболеваемость и распространенность синдрома МЭН-1 неизвестны, однако по оценкам большинства исследований она составляет примерно 2–3/100 тыс. человек [2–4, 11]. Распределение синдрома МЭН-1, в целом, одинаково между полами, между тем в некоторых крупных работах наблюдается преобладание пациентов женского пола [12–15]. Заболевание поражает все возрастные группы пациентов и имеет высокую степень пенетрантности, таким образом к пятому десятилетию клинические и биохимические проявления заболевания развиваются у более чем 98% пациентов с МЭН-1 [3, 4, 15]. Синдром МЭН-1 характеризуется различными комбинациями более 20 эндокринных и неэндокринных опухолей, вместе с тем основными проявлениями синдрома, первоначально названного Вермером триадой-П, являются: первичный гиперпаратиреоз (ПГПТ), аденомы гипофиза (АГ) и нейроэндокринные опухоли (НЭО) поджелудочной железы – parathyroid, pituitary, pancreas [16]. Другими опухолями, ассоциированными с синдромом МЭН-1, являются НЭО тимуса и легких, НЭО желудка, опухоли надпочечников, ангиофибромы лица, коллагеномы, гиберномы, менингиомы, эпендимомы, лейомиомы и липомы, а также повышенный риск развития рака молочной железы у пациенток [2–4, 12, 17]. Возраст постановки диагноза синдрома МЭН-1 варьирует в зависимости от клинических проявлений и способов диагностики: так, например, функционально активные опухоли манифестируют гораздо раньше, чем гормонально-неактивные образования, которые могут клинически проявляться только лишь при опухолевой прогрессии [2, 18].

Первичный гиперпаратиреоз (ПГПТ) (гиперплазия и/или образования ОЩЖ) является наиболее частым, а также, в большинстве случаев, первым проявлением синдрома МЭН-1, и наблюдается у более чем 93% пациентов (почти у 100% к 50 годам) [3, 4, 19]. ПГПТ в рамках синдрома МЭН-1 во многих аспектах отличается от спорадического ПГПТ. Возраст постановки диагноза значительно ниже, чем при спорадическом ПГПТ, хотя и варьируется в зависимости от серии случаев (20–25, 38–40 лет по сравнению с 55 годами) [12, 20–22]. Также при сравнении ПГПТ в рамках синдрома МЭН-1 и спорадической формы отсутствует преобладание женского пола над мужским (1:1 по сравнению с 3:1) [23]. Уровни кальция и паратиреоидного гормона (ПТГ) в сыворотке крови, как правило, ниже у пациентов с МЭН-1, и почти во всех случаях наблюдается диффузная гиперплазия ОЩЖ, в отличие от пациентов со спорадическим ПГПТ, а тяжелая гиперкальциемия, приводящая к кризу или рак ОЩЖ, встречаются реже [20, 24, 25]. Тем не менее во всероссийском регистре ПГПТ не выявлено различий по данным минерального

обмена, и даже отмечена более выраженная гиперкальциемия у пациентов с МЭН-1, по сравнению со спорадическим ПГПТ [26]. Снижение минеральной плотности костной ткани (МПК) более выражено у пациентов с ПГПТ в рамках синдрома МЭН-1, что может быть связано с ранним возрастом манифестации заболевания и влиянием других эндокринных нарушений [11, 27]. Это также подтверждается в исследовании Пылиной С.В. и соавт., где при сравнении групп ПГПТ с синдромом МЭН-1 и спорадическим ПГПТ, не отличавшихся по возрасту, частота костных осложнений в группе с синдромом МЭН-1 была выше, а МПК в бедренной кости – ниже, чем при спорадической форме [28]. Обычно не наблюдается различий в распространенности поражения почек у пациентов с ПГПТ при синдроме МЭН-1 [20, 29], однако отмечены случаи более частого возникновения симптоматических нефролитиазов среди пациентов с этим синдромом [30]. Хирургическое вмешательство показано пациентам с МЭН-1 с «симптомным» ПГПТ [31]. По данным клинических рекомендаций таким пациентам рекомендуется хирургическое лечение в объеме субтотальной или тотальной паратиреоидэктомии (ПТЭ) с целью профилактики рецидива заболевания [19]. Субтотальная ПТЭ (резекция 3,5 ОЩЖ с сохранением 50 мг нормальной ткани ОЩЖ) в отличие от тотальной ПТЭ с аутотрансплантацией фрагментов ОЩЖ в недоминантную мышцу предплечья имеет чуть выше риск рецидива или персистенции заболевания, однако частота хронического гипопаратиреоза, в том числе, тяжелого течения значительно ниже [32, 33]. Некоторые авторы также предлагают менее чем субтотальную паратиреоидэктомию (одностороннее удаление, иссечение одной железы), которая может быть связана с большим риском отсутствия ремиссии (0–53%) и рецидива (0–100%) ПГПТ по сравнению с тотальной и/или субтотальной паратиреоидэктомией, но меньшим риском гипопаратиреоза. Данный объем операции может быть предложен отдельным группам пациентов (молодого возраста) с четкой локализацией образований [4, 34–36].

Аденомы гипофиза (АГ) чаще встречаются у 35–50% (описаны от 18% до 65,6%) пациентов с синдромом МЭН-1, и являются первым проявлением синдрома в 13–29% случаях [4]. Средний возраст диагностики образований гипофиза у пациентов составляет 33–38 лет [11, 37]. Ранее данные указывали на большую распространенность макроаденом среди пациентов с синдромом МЭН-1, однако в настоящее время у таких пациентов АГ в основном представлены микроаденомами (две трети случаев) [38–40]. По некоторым данным АГ в рамках синдрома МЭН-1, как правило, более агрессивны с точки зрения супраселлярного распространения и инвазивности [40, 41], тем не менее карциномы гипофиза встречаются редко [38]. Пролактиномы остаются самым распространенным типом АГ среди пациентов с синдромом МЭН-1 (27,8–67,4%), за которыми следуют гормонально-неактивные АГ (28,2–48,1%) [39, 29]. Рост числа диагностируемых за последние годы неактивных аденом гипофиза (НАГ) объясняется улучшением качества визуализирующих методов исследования и тщательным скринингом

пациентов с синдромом МЭН-1 [11, 37, 38]. Соматотропиномы при синдроме МЭН-1 встречаются в 4,3–12,9% случаев, АКТГ-секретирующие АГ – в 2,9–5,6% случаев, тогда как гиперсекреция других гормонов передней доли гипофиза встречается в менее чем 2% случаев [29, 38, 39]. В то же время плюригормональные АГ наблюдаются у 10% пациентов [37]. Мультифокальные АГ редко встречаются у пациентов с синдромом МЭН-1 (~4%), однако все-таки более распространены по сравнению со спорадическими АГ [29, 41]. В целом прогноз пациентов с образованиями гипофиза при МЭН-1 благоприятный. Ранее высказывались предположения о том, что АГ при синдроме МЭН-1 плохо поддаются терапии, однако по последним данным лечение АГ у пациентов аналогично лечению их спорадических аналогов и включает в себя соответствующую медикаментозную терапию, трансназальную транссфеноидальную аденомэктомию, или проведение лучевой терапии [11, 29, 38].

Нейроэндокринные образования поджелудочной железы (НЭО ПЖ) в рамках синдрома МЭН-1 обнаруживаются у 30–80% пациентов (по данным патоморфологического исследования у ~95% пациентов [42]), и являются первым проявлением синдрома в 20% случаев [3, 4, 43, 44]. В настоящее время эти образования представляют собой основную причину преждевременной смертности у пациентов с синдромом МЭН-1 [3, 4, 45–47]. НЭО ПЖ обычно возникают в более раннем возрасте у пациентов с синдромом МЭН-1 по сравнению с пациентами без синдрома [21, 22]. Они в основном представляют собой небольшие (менее 2 см) образования часто с мультифокальным ростом. Образования могут быть гормонально-активными, (например, секретировать гастрин, инсулин, глюкагон и т.д.), что потенциально облегчает их диагностику в связи с яркой клинической картиной, так и с отсутствием каких-либо клинических проявлений (например, образования секретирующие панкреатический полипептид или гормонально-неактивные), которые могут проявляться в виде симптомов масс-эффекта или обнаруживаться только при визуализирующих исследованиях [11]. У пациентов с синдромом МЭН-1 часто может присутствовать несколько разных по типу НЭО ПЖ одновременно, что усложняет интерпретацию биохимических и визуализирующих исследований. Так, например, у пациентов с синдромом МЭН-1 могут быть невизуализируемые гастриномы в двенадцатиперстной кишке и сопутствующие гормонально-неактивные НЭО ПЖ. В этом случае хирургическая резекция только НЭО ПЖ не устранит гипергастринемию [48]. Основными целями лечения НЭО ПЖ при синдроме МЭН-1 являются снижение заболеваемости и смертности, при сохранении качества жизни пациента [11].

На данный момент, гормонально-неактивные НЭО ПЖ являются самыми распространенными НЭО при синдроме МЭН-1 [44, 49]. По данным эндоскопического ультразвукового исследования на пациентах без явных признаков поражения ПЖ у ~55% пациентов с синдромом МЭН-1 были выявлены одна или несколько гормонально-неактивных

НЭО ПЖ [50]. В настоящее время не выявлено каких-либо специфических маркеров, как при спорадических формах, с достаточной диагностической ценностью для выявления на ранних этапах гормонально-неактивных НЭО ПЖ при синдроме МЭН-1 [48, 51, 52], и в большинстве своем диагностика таких образований зависит от визуализирующих методов исследований. По данным систематического обзора van Treijen M.J.C. и соавт., для выявления гормонально-неактивных НЭО ПЖ наибольшей чувствительностью обладает эндоскопическое ультразвуковое исследование, в том числе в комбинации с МРТ забрюшинного пространства. Также может быть использована позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией с ^{68}Ga -DOTATATE в случае диагностики метастазов [53]. Для гормонально-неактивных НЭО ПЖ размером менее 2 см, без признаков агрессивного роста, всё чаще выбирается тактика активного наблюдения, поскольку в 60–70% случаев таких новообразований не наблюдается прогрессирования, тогда как для образований более 2 см и НЭО с признаками быстрого прогрессирования рекомендуется хирургическое вмешательство [48, 54, 55]. Медикаментозное лечение гормонально-неактивных НЭО ПЖ (менее 2 см) при синдроме МЭН-1 не было подтверждено в рандомизированных контролируемых исследованиях, однако в некоторых представленных работах по использованию аналогов соматостатина (АС) в большинстве случаев отмечена стабилизация заболевания [56]. По частоте встречаемости у пациентов с синдромом МЭН-1 среди НЭО ПЖ после гормонально-неактивных образований следуют гастриномы и инсулиномы [11]. Инсулиномы встречаются у ~10–20% пациентов с синдромом МЭН-1 и являются первым клиническим проявлением у 10% таких пациентов. В основном они выявляются как небольшие множественные образования в области тела и хвоста поджелудочной железы, диагностируемые до 20–30 лет [29]. По сравнению со спорадическими формами у пациентов с синдромом МЭН-1 инсулиномы крупных размеров чаще всего являются доброкачественными образованиями, а злокачественные инсулиномы встречаются в 8% случаев [57, 58]. Золотым стандартом в лечении инсулином является хирургическое вмешательство. Объем операции зависит от расположения и наличия иных новообразований в ПЖ [48]. Гастриномы, приводящие к синдрому Золлингера-Эллисона, редко (в 8% случаев) являются первым клиническим проявлением синдрома МЭН-1, а средний возраст постановки диагноза составляет 34–39 лет, что заметно моложе по сравнению со спорадическими формами заболевания [44]. Большинство (60–80%) гастрином у пациентов с синдромом МЭН-1 локализуется в двенадцатиперстной кишке и примерно у 15% имеется сочетание с гастриномами в ПЖ [59]. Также, довольно часто можно встретить сочетание с гормонально-неактивными НЭО ПЖ, которые могут осложнять точную локализацию гастрином. При синдроме МЭН-1 гастрин-продуцирующие НЭО обычно небольшие, с мультифокальным ростом и довольно часто имеют метастазы в регионарные лимфатические узлы на момент постановки диагноза [44]. С учетом

особенностей расположения гастрином их размеров, мультифокального роста при синдроме МЭН-1, а значит соответствующий объем оперативного вмешательства (от тотальной дуоденопанкреатэктомии, до дуоденэктомии с возможной энуклеацией образований в ПЖ) многие сообщества рекомендуют проведение хирургического вмешательства при размерах образований >2 см (что является редкостью) [60, 61]. Чаще всего пациентам с гастриномами при синдроме МЭН-1 рекомендуют активное наблюдение с назначением ингибиторов протонной помпы в связи с хорошей общей выживаемостью (10-летняя выживаемость 65–96%) и особенностями течения заболевания при наследственном синдроме [62]. Также, на выбор терапевтической тактики могут влиять прогностические факторы (молодой возраст на момент постановки диагноза (≤ 33 лет), высокий уровень гастрина ($\geq 10\,000$ пг/мл натощак), наличие НЭО ПЖ >3 см, наличие печеночных или костных метастазов, наличие НЭО желудка), ответственные за неблагоприятный исход заболевания [11, 62]. В совокупности другие НЭО ПЖ довольно редко диагностируются у пациентов с синдромом МЭН-1 (<1 –2%), могут достигать 3 см на момент постановки диагноза с уже имеющимися метастазами в локорегионарные лимфатические узлы и/или в печень [3, 4, 11]. В эту группу НЭО ПЖ входят глюкагономы, соматостатиномы, образования, секретирующие вазоактивный интестинальный пептид, соматолиберин, АКТГ. Для лечения симптомов заболевания пациентам показано хирургическое лечение в сочетании с аналогами соматостатина [3, 4, 11].

Говоря о гастриномах при синдроме МЭН-1 следует также упомянуть о НЭО желудка. Энтерохромаффиноподобная клеточная гиперплазия встречается почти у всех пациентов с синдромом МЭН-1 и синдромом Золлингера-Эллисона, тогда как сами образования ($>0,5$ мм) обнаруживаются только у 10–23% пациентов [4, 11, 63]. В исследовании Manoharan J. и соавт., в которое вошли 38 пациентов с синдромом МЭН-1, у $\sim 60\%$ (10/16) пациентов с сопутствующей гипергастринемией были выявлены признаки гиперплазии энтерохромаффиноподобных клеток, и только у $\sim 15\%$ (2/16) – небольшие образования. У пациентов с синдромом МЭН-1 без повышенного уровня гастрина подобных изменений выявлено не было [63]. По сравнению с НЭО желудка 1 типа, которые обычно возникают на фоне хронического аутоиммунного атрофического гастрита, НЭО ассоциированные с синдромом МЭН-1 и сопутствующей гипергастринемией, как правило, встречаются намного реже от общего количества НЭО желудка, ведут себя агрессивнее, с большим метастатическим потенциалом (10–20%) [64]. Лечение таких НЭО желудка предполагает хирургическое удаление образования, а в некоторых случаях лечение с помощью АС [65].

Бронхолегочные НЭО встречаются у 5–30% пациентов с синдромом МЭН-1, с медианой возраста постановки диагноза – 40–45 лет [4, 11]. Обычно они протекают бессимптомно, так как в большинстве своем представляют собой хорошо дифференцированные НЭО (10-летняя

выживаемость ~71%) и обычно выявляются при рутинном скрининге компонентов синдрома. В исследовании van den Broek M.F.M. и соавт. было показано, что медиана выживаемости у пациентов со спорадическими формами НЭО легких была ниже, чем у пациентов с синдромом МЭН-1 [66]. Оперативное вмешательство, является методом выбора при таких НЭО [3, 4].

Одними из самых агрессивных НЭО у пациентов с синдромом МЭН-1 являются также НЭО тимуса. Частота их выявления среди пациентов с синдромом МЭН-1 невысокая и составляет примерно 3,7% (<10%), а средний возраст постановки диагноза находится в пределах 40-45 лет [4, 67]. В большинстве исследований НЭО тимуса у пациентов с синдромом МЭН-1 представлены преимущественно у мужчин, хотя и имеются работы, где заболевание одинаково распределено между полами [67, 68]. НЭО тимуса обычно протекают бессимптомно и часто обнаруживаются случайно при визуализирующих методах исследований или в результате масс-эффекта, и крайне редко являются гормонально-активными. Несмотря на низкую распространенность НЭО тимуса среди пациентов с синдромом МЭН-1, они ответственны за 19% смертей среди таких пациентов [45]. Общая 10-летняя выживаемость составляет ~35%, а более 50% пациентов имеют отдаленные метастазы на момент постановки диагноза [11, 67, 69].

Образования надпочечников редко являются первым проявлением синдрома МЭН-1 (~6% случаев) и обычно диагностируются при скрининге других компонентов синдрома чаще всего на пятом десятилетии жизни [70]. Частота поражения надпочечников составляет примерно 40%, однако по данным некоторых исследований может достигать 73% [4, 70, 71]. Большинство образований надпочечников у пациентов с синдромом МЭН-1 являются гормонально-неактивными и, как правило, остаются стабильными на протяжении всего периода наблюдения. В исследовании Gatta-Cherifi V. и соавт., у 146 из 715 пациентов (20,4%) с синдромом МЭН-1 были выявлены поражения надпочечников, и из них только 15,3% образований являлись гормонально-активными [72]. Лечение образований надпочечников при синдроме МЭН-1, в целом, не отличается от спорадических аналогов заболевания [11].

Диагностика синдрома МЭН-1

По данным клинических рекомендаций зарубежных [3, 4] и отечественных [19] молекулярно-генетическое тестирование для исключения/подтверждения синдрома МЭН-1 должно быть рекомендовано пациенту с клиническим диагнозом синдрома МЭН-1: наличие двух или более МЭН-1-ассоциированных эндокринных опухолей (т.е., образования ОЩЖ, НЭО ПЖ, АГ); родственнику первой степени родства члена семьи с известной мутацией в гене *MEN1* без клинических проявлений (предпочтительно в возрасте до 5 лет [2]), клиническим диагнозом МЭН-1 или семейным анамнезом, указывающим на эндокринные опухоли; пациенту с множественным поражением околощитовидных желез в любом возрасте; с поражением околощитовидных желез до 30 лет; с рецидивом или персистенцией ПГПТ; с гастриномой или

множественными НЭО ПЖ в любом возрасте; с наличием НЭО тимуса в любом возрасте. В том числе важно рассматривать диагноз МЭН-1 у пациентов с подозрительным в отношении синдрома анамнезом: с «спорадической» НЭО ПЖ до 40 лет; с наличием гормонально-активной АГ (кроме микропролактином у женщин) или гормонально-неактивной АГ более 1 см до 30 лет; с сочетанием одного основного компонента с второстепенным или двух второстепенных признаков (таких как, образования надпочечников, НЭО легких, НЭО желудка) [4, 73, 74]. В исследовании de Laat J.M. и соавт. подчеркивается необходимость исключения синдрома МЭН-1 не только при наличии множественных НЭО ПЖ, но также при обнаружении инсулином или гормонально-неактивных НЭО ПЖ у пациентов моложе 20 лет [75].

Генетическое тестирование для исключения/подтверждения синдрома МЭН-1 в настоящее время состоит из анализа последовательности ДНК кодирующих экзонов и соединений сплайсинга на наличие мутаций в гене *MEN1* при помощи метода высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) или секвенирования по Сэнгеру [3, 4]. Также необходимо проведение мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA) [3, 4] или исследование вариации числа копий генов (CNV) для обнаружения более крупных изменений (делеций/дупликаций) [73].

После подтверждения диагноза пациентам необходимо оставаться под пожизненным наблюдением мультидисциплинарной команды и проходить ежегодно физикальное и лабораторного-инструментальное обследование для выявления различных компонентов синдрома [3, 4]. Пациенты с синдромом МЭН-1 имеют сниженную продолжительность жизни по сравнению с общей популяцией, что связано с МЭН-1 ассоциированными образованиями со злокачественным потенциалом (например, НЭО тимуса, энтеропанкреатические НЭО), которые являются основной причиной смерти таких пациентов. Учитывая отсутствие профилактических методов лечения, корреляции генотипа с фенотипом целью скрининга и длительного наблюдения является улучшение выживаемости и качества жизни таких пациентов [29]. Однако по данным Newey P.J. и соавт. агрессивный скрининг не всегда может приводить к положительным результатам для пациентов. Отсутствие надежных доказательств по ряду аспектов лечения синдрома МЭН-1, а также риск ятрогенного вреда от скрининга или вмешательств с недоказанной эффективностью, делают такие предположения потенциально необоснованными. Кроме того, остается не до конца изученным психологическое и экономическое воздействие интенсивного скрининга [76]. Так, исследование van Leeuwen R.S. и соавт. показало, что у пациентов с синдромом МЭН-1, считающих себя группой высокого риска по развитию новообразований, качество жизни было ниже [77]. Ввиду чего, Newey P.J. и соавт. предлагается индивидуализировать текущие рекомендации для пациента и адаптировать их к местным ресурсам и пожеланиям пациента, который должен быть вовлечен в процесс принятия

решений [76]. Также важна своевременная диагностика членов семьи (при их согласии) на наличие мутаций в гене *MEN1* [78]. Пациентам с подтверждённой мутацией, а также родственникам с отсутствием мутаций, но клиническими проявлениями МЭН-1, в настоящее время, рекомендуется активный скрининг компонентов синдрома с длительным наблюдением. Родственники пациентов с синдромом МЭН-1 без мутаций и МЭН-1 ассоциированных образований могут быть освобождены от пожизненного мониторинга новообразований [29].

На сегодняшний день у небольшого количества пациентов с клиническими признаками синдрома МЭН-1 не обнаруживают мутации в кодирующих областях или соседних сайтах сплайсинга гена *MEN1*. В таких случаях мутация может находиться в областях гена, которые не исследуются в рамках рутинной практики, например, в нетранслируемых, интронных или регуляторных регионах [79–81]. Также к фенотипу МЭН-1 могут приводить генетический мозаицизм [82, 81] и альтернативные механизмы сайленсинга гена *MEN1* (например, модификация и деацетилирование гистонов, метилирование ДНК [83–86], изменение некодирующих РНК [7, 87, 88]), или мутации в других генах, ответственных за фенотип МЭН-1 (например, *CDKN1B*, *AIP*, *CDC73* [2–2]). Более подробно фенокопии синдрома МЭН-1 рассмотрены в разделе 1.3.

1.2 Ген *MEN1* и менин

Впервые ген *MEN1* на длинном плече хромосомы 11q13 (рис. 1) картировали исследователи из Каролинского института в Стокгольме и университетской больницы Уппсалы в 1988 г. [90], а в 1997 г. был идентифицирован сам ген *MEN1* [91].

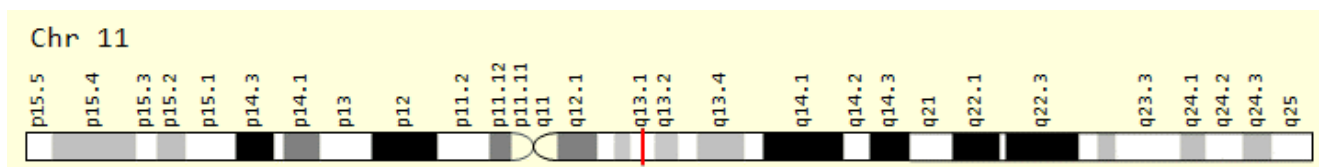


Рисунок 1 – 11-я хромосома. Красным выделена локация гена *MEN1* [92].

Ген состоит из 10 экзонов, со стартовым кодоном трансляции в 2 экзоне и стоп-кодоном в 10 экзоне [93] и кодирует белок менин, у которого имеются несколько изоформ: 610 аминокислот (выбранная в качестве каноничной последовательности), 615 аминокислот, 574 аминокислоты [2, 93]. На сегодняшний день зарегистрировано более 1300 мутаций, и описано 24 полиморфизма гена *MEN1* [94]. Нонсенс-мутации в гене *MEN1* составляют 14–23%, миссенс – 20–25%, делеции и инсерции со сдвигом рамки считывания – 41%, делеции и инсерции без сдвига рамки считывания – 5,5–6%, сплайсинговые мутации – 9%, крупные делеции – 1–2,5% [2, 95]. Мутации чаще всего наследуются от одного из родителей (~85–90%), и примерно в 10% случаев возникают *de novo*. Большинство герминальных мутаций (~70%) в гене *MEN1* считаются патогенными и связаны либо с преждевременным укорочением менина в результате мутаций со сдвигом рамки считывания и нонсенс-мутаций, либо с делециями экзонов [93]. Миссенс-

мутации, делеции и инсерции без сдвига рамки считывания не предсказывают очевидной инактивации менина, и вопрос о том, являются ли они патогенными, требует дальнейшего изучения [2]. По данным литературы не отмечено каких-либо «горячих точек» мутаций в гене *MEN1* и четкой корреляции между генотипом и фенотипом. Однако в некоторых исследованиях были выявлены определенные генотипы, которые ассоциируются с более агрессивным течением заболевания (например, мутации, затрагивающие домены, взаимодействующий с JunD, CHES1) [93].

Гипотеза «двойного удара» Кнудсона может объяснять роль гена *MEN1* как супрессора опухолевого роста. В 1971 году А. Кнудсон предложил гипотезу, объясняющую механизм возникновения наследственных и спорадических форм ретинобластомы. Он предположил, что для развития опухоли необходимо две последовательные мутации: первая – в клетках зародышевой линии, а вторая – соматическая. В случае ненаследственной формы требуются две мутации в одной и той же соматической клетке, что снижает вероятность их совпадения, поэтому спорадическая ретинобластома, как результат двух соматических мутаций, проявляется в более зрелом возрасте [96]. У пациентов с герминальными мутациями в гене *MEN1* потеря гетерозиготности (LOH) на хромосоме 11q13 обнаруживается в более чем 90% опухолей, тогда как в спорадических аналогах этих эндокринных опухолей LOH *MEN1* наблюдается в 5–50% случаев [97]. Как и в случае с герминальными мутациями, соматические мутации также распределены по всей кодирующей области гена *MEN1* без «горячих точек». Кроме того, не выявлено очевидных корреляций между генотипом и фенотипом для конкретных соматических мутаций и связанных с ними типов опухолей [2]. В целом, соматические мутации в гене *MEN1* в спорадических аденомах ОЩЖ выявляются в 12–35% случаев [97], в НЭО ПЖ – примерно в 25–44% [98], в НЭО бронхов – 35%, тогда как в АГ процент соматических мутаций гена *MEN1* низок и составляет примерно 2–5% [99], а в опухолях надпочечника – менее 5% [100]. Однако каким образом мутации в гене *MEN1*, приводящие, соответственно, к синтезу дефектного белка менина, приводят к образованию специфических опухолей, остается неясным [101].

Белок менин и его функции

Менин, массой 67 кДа, широко экспрессируется во всех органах и тканях, однако его экспрессия варьирует в зависимости от типа ткани [102]. На С-конце менина содержатся 2 сигнала ядерной локализации (nuclear localization signals, NLS) – NLS1: 479-497 и NLS2: 588-608, а также 1 вспомогательный NLS (aNLS: 546-572) [100]. Таким образом, как показали эксперименты с использованием менина, меченного флуоресцентным белком, иммунофлуоресценции и вестерн-блоттинга субклеточных фракций, данный белок, в основном, находится в ядре, и в небольшом количестве также может быть обнаружен в цитоплазме и клеточной мембране [2]. Менин подвергается посттрансляционным изменениям, таким как

фосфорилирование (по аминокислотным остаткам Ser394, Thr397, Thr399, Ser487, Ser543, Ser583), сумоилирование, пальмитирование, которые могут усиливать или подавлять функцию менина как супрессора опухолевого роста в ядре [100]. Функциональный вклад этих посттрансляционных модификаций не был изучен в МЭН-1 ассоциированных эндокринных клетках, или в клиническом контексте. При герминальных и соматических мутациях в гене *MEN1*, приводящих к укорочению белка и потере одного или обоих основных NLS, происходит инактивация белка. При миссенс-мутациях синтезируемый белок подвергается деградации протеасомами, что предотвращает его функциональную активность [100].

Несмотря на то, что при воспроизведении белка менина не удалось обнаружить каких-либо функциональных свойств, прямые или косвенные взаимодействия с более чем 50 различными белками с известными функциями помогли получить представление о его роли в различных процессах и путях. Менин выполняет интегральные ядерные функции, поскольку он напрямую взаимодействует с ДНК (независимым от последовательности образом) и с белками, ответственными за транскрипцию (активацию или супрессию), передачу сигналов клетки, регуляцию репарации ДНК и структурную целостность клетки [102]. Белки, взаимодействующие с менином, перечислены в таблице 1.

Таблица 1 – Белки, взаимодействующие с менином [100–102].

Активаторы и ингибиторы транскрипции	c-MYB, MLL1, MLL2, PEM, RUNX2, DAXX, HDACs mSIN3A, LEDGF, PRMT5, SuV39H1, DNMT1, FBP1, FOXA2, HLXB9/MNX1, JUND, c-MYC; NFkB – p50, p52, p65; ядерные рецепторы (AR, ER α , LXR α , PPAR α , PPAR γ , RXR, VDR); SMADs (SMAD1, SMAD3, SMAD5), SIRT1, SON, TCF3, TCF4, β -катенин; изоформы RNA-Pol-II (pSer5, pSer2); SKIP
Белки сигнальных путей	AKT1, FOXO1, NM23 β , GRB2, RAS, SOS1
Другие белки	RPA2, ASK, CHES1, FANCD2, GFAP, Виментин, NMMHC-IIA, IQGAP1, ARS2, CHIP, HSP70

В качестве опухолевого супрессора менин, как было выявлено, связывает транскрипционный фактор AP-1 JunD, взаимодействует со SMAD3, DAXX (репрессор транскрипции и компонент комплекса ремоделирования хроматина), каноническим эффектором пути TGF- β , ингибируя рост клеток [102–104]. Важная роль менина в ядре подчеркивается в исследованиях на мышах *in vivo*, которые показали, что менин регулирует рост клеток, уменьшая экспрессию ингибиторов циклин-зависимой киназы p18^{Ink4c} и p27^{Kip1}, чтобы снизить активность циклин-зависимой киназы 2 и ограничить пролиферацию клеток [105, 106]. Также стоит отметить

взаимодействие менина с модификацией гистонов H3K4me3, которая в основном располагается в промоторной области вблизи сайта начала транскрипции и активирует транскрипцию генов. Среди членов семейства MLL, ответственных за депонирование этой гистоновой модификации, менин взаимодействует с двумя гистоновыми метилтрансферазами MLL1 и MLL2. Потеря менина в этом белковом комплексе приводит к репрессии транскрипции определенных генов из-за потери H3K4me3 [107]. Открытие этой интеракции выявило новые функции менина, как онкогенного кофактора при взаимодействии с гибридными белками MLL, которые вызывают агрессивные формы лейкозов [85].

Несмотря на значительный прогресс в изучении функции менина, его роль в развитии опухолей эндокринных органов до конца не изучена. Исследование менина, учитывая его ключевое значение в физиологических и патологических процессах в организме, может предоставить важные данные об онкогенезе в эндокринных железах. А также, как в исследовании Verschuur A.V.D. и соавт., может выступать в качестве дополнительного критерия в диагностике синдрома МЭН-1 [108]. В этой работе авторы проанализировали 29 образований ОЩЖ от 16 пациентов с синдромом МЭН-1 и 61 образование ОЩЖ от 32 пациентов без синдрома. Отсутствие экспрессии менина в ядре по данным ИГХ исследования в одной или нескольких опухолях было обнаружено у 100% пациентов с синдромом МЭН-1 и только у 9% пациентов без него. А при использовании нескольких образований от одного пациента потеря экспрессии менина хотя бы в одной опухоли наблюдалась у 100% из 8 пациентов с синдромом МЭН-1 и у 21% из 14 пациентов без синдрома. При использовании такого критерия, когда на одного пациента приходится не менее 2 опухолей с потерей экспрессии менина в ядре, положительная и отрицательная прогностическая ценность диагноза МЭН-1 составили 100%. Таким образом, авторы предлагают использовать отсутствие экспрессии менина в ядре в образованиях ОЩЖ как критерий патогенной мутации гена *MEN1* (при вариантах с неопределенной клинической значимостью). А при сохранной экспрессии менина в ядре в образованиях ОЩЖ при их множественном поражении у одного пациента считать мутацию в гене *MEN1* маловероятной [108].

Lines K. и соавт. в своем исследовании оценили потенциальную роль генетических модификаторов на развитие опухолей у взрослых мышей *Men1*^{+/-}, так как определение таких модификаторов может обеспечить лучшее понимание функции менина и его молекулярных взаимодействий в эндокринных опухолях, а также предоставить инструмент для прогнозирования появления опухолей у пациентов с мутациями в гене *MEN1* и новые мишени как для моно-, так и для комбинированной терапии. В общей сложности были изучены 275 мышей *Men1*^{+/-} в возрасте 5–26 мес. конгенных штаммов C57BL/6 и 129S6/SvEv. Исследователи выявили, что опухоли гипофиза и надпочечников развивались раньше у самцов C57BL/6 и самок

129S6/SvEv соответственно, а опухоли поджелудочной железы и яичек развивались раньше у самцов 129S6/SvEv. По данным ИГХ-исследования во всех опухолях отсутствовала экспрессия менина. При анализе последовательности всего генома мышей 129S6/SvEv и C57BL 6 *Men1*^{+/-} выявили >54 000 различных вариантов модификаторов в >300 генах. Выявленные гены (*Kras*, *Wnt2b*, *Il3ra* и *Tnfrsf10a*), связаны с сигнальными путями, участвующими в опухолеобразовании и потенциально могут быть модификаторами *MEN1*, поскольку менин подавляет MAPK-управляемую пролиферацию KRAS, контролирует передачу сигналов wnt посредством взаимодействия с β -катенином, регулирует экспрессию интерлейкинов и способствует ФНО- α апоптозу за счет активации каспазы 8 [109].

Проведены также работы, в которых оценивалась экспрессия менина в АГ у человека. В 2002 г. Wrocklage С. и соавт. исследовали экспрессию менина в 11 спорадических опухолях гипофиза и 4 нормальных гипофизах с помощью антител к менину и выявили большую экспрессию менина в опухолевых тканях, чем в нормальных тканях [110]. Theodoropoulou М. и соавт. проанализировали экспрессию менина в 7 нормальных гипофизах и 68 спорадических АГ. В гипофизах без опухоли была обнаружена выраженная ядерная экспрессия менина. В спорадических АГ экспрессия менина была различной, при этом высокий процент случаев демонстрировал значительное снижение экспрессии менина по сравнению с нормальным гипофизом. Уровень экспрессии менина не коррелировал с гистологическими и клиническими особенностями опухоли, а также со степенью инвазии. В 1 случае пролактин-продуцирующей карциномы экспрессия менина отсутствовала [111].

Изменение экспрессии менина изучалось и при других образованиях. В основном во всех исследованиях отсутствие экспрессии менина в ядре указывало на более злокачественный характер образований [112, 113]. Так, в исследовании Lairmore Т.С. и соавт. было показано, что по данным ИГХ исследования 97 образцов холангиокарцином экспрессия менина в образованиях Grade I проявлялась в ядре интенсивным, диффузным, мелкозернистым, с выраженным линейным перинуклеарным рисунком (средний балл по ИГХ = 2), тогда как в образованиях Grade III такая экспрессия менина отсутствовала (средний балл по ИГХ = 0,35) [112]. В тоже время в работе Wang Z.F. и соавт. при изучении образцов тканей глиом ядерная экспрессия менина наоборот присутствовала почти в половине образцов (44,4%), и такая аномально высокая экспрессия менина в ядре коррелировала с более короткой медианной выживаемостью (20 месяцев) пациентов, большим объемом опухоли и более высоким процентом окрашивания Ki67 [114].

Учитывая отсутствие исследований в группах фенокопий синдрома МЭН-1, важно выяснить, имеются ли различия в экспрессии менина у пациентов с фенокопиями, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 по сравнению со спорадическими формами. Понимание

того, схожа ли или отличается экспрессия менина между этими группами, может дать ценное представление о роли менина в онкогенезе таких образований.

1.3 Фенокопии синдрома МЭН-1

У 5–10% пациентов с фенотипом МЭН-1 мутации в гене *MEN1* не определяются, и такое состояние расценивается как фенокопия данного синдрома [115]. За последние годы был проведен ряд исследований для поиска других генов, ответственных за клинические проявления синдрома МЭН-1. Так, в литературе описаны гены группы ингибиторов циклин-зависимых киназ (cyclin-dependent kinases inhibitors, CDKI), которые могут быть ответственны за фенотип МЭН-1 [89]. Один из них это – *CDKN1B* (p27) – ингибитор циклин-зависимой киназы 1В, который кодируется геном *CDKN1B*, расположенным на хромосоме 12p13.1. Он регулирует течение клеточного цикла посредством ингибирования перехода G1-фазы в S [116]. Интересно, что менин может регулировать экспрессию p27, образуя комплекс с метилтрансферазами (MLL1 или MLL2) и РНК-полимеразой II. Инактивация белка менина вследствие мутации в гене *MEN1*, также, как и мутации в гене *CDKN1B*, приводят к снижению экспрессии p27, что в свою очередь запускает неконтролируемую прогрессию клеточного цикла. При обнаружении мутаций в гене *CDKN1B* у пациента диагностируется синдром МЭН-4. Этот синдром выявляется у 3–5% пациентов с клиническим диагнозом МЭН-1, у которых отсутствуют мутации в гене *MEN1* [117–119]. При этом синдроме манифестация заболевания обычно происходит на 20 лет позже, чем при синдроме МЭН-1, и при нем в большинстве своем встречаются образования ОЩЖ и АГ, реже – сочетание с гастроэнтеропанкреатическими НЭО, НЭО бронхов, образованиями надпочечников, раком молочной железы и липомами. ПППТ встречается у 80% пациентов с синдромом МЭН-4, и обычно является первым проявлением синдрома. В большинстве случаев ПППТ представлен множественным поражением ОЩЖ, однако он возникает в более позднем возрасте, в отличие от синдрома МЭН-1 [120, 121]. Поражение гипофиза обычно является вторым по частоте проявлением синдрома и встречается в 30–40 % случаев, а энтеропанкреатические НЭО – в 5–35% [121]. Мутации в других генах семейства CDKI встречаются крайне редко у пациентов с синдромом МЭН-1 без мутаций [89]. Так, в исследовании Agarwal S.K. и соавт. мутации в гене *CDKN2B* были зарегистрированы только в 1% случаев (у двух человек), в гене *CDKN2C* – в 0,5% (у 1 человека), в гене *CDKN1A* – в 0,5% (у 1 человека) [89]. У всех пациентов имелся ПППТ с множественным поражением ОЩЖ, и только у 2/4 пациентов имелись поражения других эндокринных органов: у одного образование надпочечника, у другого АГ [89]. По данным ряда других исследований, мутации в генах *CDKN1A*, *CDKN2B*, и *CDKN2C* в основном выявляются в образованиях ОЩЖ и при семейных формах ПППТ, а также в НЭО ПЖ [122, 123]; а мутации в гене *CDKN2A* в основном обнаружены только в спорадических опухолях, в частности в НЭО ПЖ [124, 125].

В зависимости от клинической картины и семейного анамнеза, другие гены, ассоциированные с наследственными АГ или ПППТ, также могут быть рассмотрены у пациентов с клинической картиной МЭН-1 без мутации [2, 119, 126, 127]. Если у пациента без мутаций в гене *MEN1* в качестве основного компонента синдрома МЭН-1 присутствует АГ, то следует также исключить мутации в гене *AIP*, который кодирует белок, взаимодействующий с рецепторами ароматических углеводов [2]. Мутации в этом гене могут приводить к семейным изолированным аденомам гипофиза (Familial Isolated Pituitary Adenomas, FIPA), при которых обычно выявляются АГ, секретирующие СТГ или ПРЛ. Как правило данные АГ манифестируют в молодом возрасте, чаще всего представлены макроаденомами с агрессивным ростом и плохо поддаются терапии [128]. Однако мутации в гене *AIP* могут быть ответственны и за фенотип МЭН-1 [129]. Так, в исследовании Belar О. и соавт. среди 79 пациентов с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1 при проведении секвенирования генов *MEN1*, *CDKN1B* и *AIP* у 34 пациентов были выявлены мутации в гене *MEN1*, а у двух пациентов – мутации в генах *CDKN1B* и *AIP* [129]. А в работе Pardi E. и соавт. среди 54 пациентов с фенотипом МЭН-1 (31 пациент, имеющих родственника с мутацией в гене *MEN1*, 1 удочеренная пациентка и 22 спорадических случая) у 34/54 пациентов были выявлены мутации в гене *MEN1* (в большинстве случаев в группе с уже имеющимися родственниками с подтвержденным синдромом МЭН-1), у одного пациента была выявлена мутация в гене *CDKN1B*, и у двух пациентов из спорадической группы – мутации в гене *AIP* [118].

Другим геном, способным вызывать МЭН-1 подобные проявления является ген *CDC73*, мутации в котором обычно приводят к синдрому гиперпаратиреоза с опухолью челюсти (hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome, HPT-JT) [130]. *CDC73* кодирует белок парафибромин, который является частью комплекса РНК-полимеразы II/Pafl, важного для транскрипции генов, и функционирует как ген-супрессор опухолевого роста через регуляцию генов, включая регулятор клеточного цикла циклин D1 [126]. Как следует из названия, при этом синдроме развиваются образования ОЩЖ в ассоциации с оссифицирующими фибромами верхней и/или нижней челюстей, кроме того, у некоторых пациентов могут развиваться опухоли матки и почек, реже – образования ПЖ, яичек, щитовидной железы и гипофиза. У 30% носителей мутации *CDC73* наблюдается отсутствие фенотипических проявлений характерных для данного синдрома [126, 130]. В литературе, однако, описаны случаи, при которых мутации в гене *CDC73* приводили к фенотипу МЭН-1 [5, 115, 126]. В работе Backman S. и соавт. 14 пациентам с клиническим диагнозом МЭН-1 и отсутствием мутаций в гене *MEN1* было проведено полногеномное секвенирование для поиска генов, ответственных за подобный фенотип. Интересно, что у трех пациентов были найдены патогенные варианты в гене *MEN1*, которые не были обнаружены при рутинном генетическом исследовании; у одного пациента была выявлена

мутация в гене *CASR*, а у другого – крупная делеция на хромосоме 1q, включающая ген *CDC73* [5]. В исследовании Lines K.E. и соавт. описан пациент с гетерозиготной мутацией с.1138C>T (p.Leu380Phe) *CDC73* и клиническими проявлениями синдрома МЭН-1: акромегалией в раннем возрасте, нормокальциемическим ПГПТ, и НЭО ПЖ [126]. Авторы предполагают, что такое сочетание может быть связано с тем, что парафибромин и менин могут иметь общие сигнальные пути. Парафибромин входит в состав комплекса Raf1, который необходим для создания модификаций гистонов во время транскрипционной элонгации, а менин, как указано выше, связан с комплексом гистон-метилтрансфераз, который метилирует гистоны. Таким образом, возможно, что, парафибромин и менин могут регулировать активность Raf-комплексов, либо напрямую, либо через эпигенетические механизмы и служить основой в развитии опухолей [126]. Также авторы подчеркивают важность выявления других генов, ответственных за похожие фенотипы, ввиду разных рисков развития различных опухолей. Так, риск развития карциномы ОЩЖ намного ниже (<1%) у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, но значительно выше (~15%) у пациентов с НРТ-ЖТ [126].

Инактивирующие мутации в гене *CASR* обычно приводят к семейной гиперкальциемической гипокальциурии 1 типа (при которой у большинства пациентов симптомы минимальны или отсутствуют вовсе), а также могут стать причиной изолированного семейного гиперпаратиреоза [131]. Ген *CASR* кодирует кальций чувствительный рецептор (Calcium-sensing receptor, CaSR) – это G-белок-связанный рецептор, который в основном экспрессируется в ОЩЖ и почках, и влияет на гомеостаз кальция посредством снижения секреции ПТГ и уменьшения реабсорбции кальция в почечных канальцах при повышении концентрации кальция в крови [132]. Тем не менее, мутации в гене *CASR* также могут являться причиной развития клинического синдрома МЭН-1. В исследовании Turner J.J. и соавт., у 2/261 пациентов из 74 семей с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1 (сочетание АГ и ПГПТ) не было выявлено мутаций в гене *MEN1*. Тем не менее мутации были обнаружены в других генах: у 1 пациентки с гиперкальциемией и «незадавленным» уровнем ПТГ (проведена субтотальная тиреоидэктомия и выявлена гиперплазия всех удаленных ОЩЖ) и акромегалией была выявлена мутация в гене *CASR*, такую же мутацию выявили в дальнейшем у трех ее сестер. У другой пациентки с пролактиномой и ПГПТ с поражением 1 ОЩЖ была выявлена мутация в гене *CDC73*, как и у членов ее семьи [115].

В обзоре Brandi M.L. и соавт., отмечено, что фенотип МЭН-1 может встречаться и при мутациях в гене *RET*, которые обычно ассоциируются с синдромами МЭН-2А и МЭН-2В [2]. Для МЭН-2А характерно развитие медуллярного рака ЩЖ, феохромоцитомы и образований ОЩЖ, а для МЭН2В – медуллярный рак ЩЖ и феохромоцитомы, ассоциированные с марфаноподобной внешностью, невромами слизистой оболочки, дисфункцией вегетативных ганглиев кишечника.

В литературе описан пациент с болезнью Иценко-Кушинга и образованием ОЩЖ, которому был выставлен диагноз клинического МЭН-1, однако мутаций в гене *MEN1* выявлено не было. Спустя 10 лет, у пациента диагностировали медуллярный рак ЩЖ и двустороннюю феохромоцитому и, учитывая клиническую картину, выявили мутацию в гене *RET* [133].

Фенотип, схожий с МЭН-1, может наблюдаться и при мутациях в гене *MAX* (также известный как Мус-ассоциированный фактор X). Этот ген кодирует фактор транскрипции, который является частью оси MYC/MAX/MXD1 и играет роль в пролиферации и дифференцировке клеток, ангиогенезе и апоптозе. Обычно при данном синдроме выявляется двусторонняя феохромоцитома в сочетании с АГ, как часть синдрома «3PAs» (pituitary adenoma, pheochromocytoma, paraganglioma) [81, 134]. Однако, в последнее время, мутации в гене *MAX* выделяют в отдельный синдром МЭН-5, при котором также выявляются и другие виды опухолей, такие как, образования ОЩЖ и НЭО ПЖ, ганглионевромы, ганглионевробластомы, онкоцитомы и карциномы почек [135]. Описан пациент с мутацией в гене *MAX* с наличием пролактин-секретирующей АГ в сочетании с множественным поражением ОЩЖ и двусторонней метастатической феохромоцитомой [135]. Небольшое количество пациентов с данными мутациями затрудняет составление рекомендаций по ведению таких пациентов, и в настоящее время представляется целесообразным придерживаться протокола наблюдения, аналогичного протоколу наблюдения при синдроме МЭН-1 [3, 4, 136].

Если мутации в перечисленных выше генах не обнаружены, у пациентов с предполагаемой генетической природой заболевания (отягощенная наследственность, наличие 3-х МЭН-1 ассоциированных опухолей, НЭО ПЖ и др.) рекомендуется провести скрининг некодирующих участков гена *MEN1* [79, 80]. Так, в исследовании Kooblall K.G. и соавт., несмотря на отсутствие мутаций в гене *MEN1* при стандартных генетических тестах, была выявлена гетерозиготная мутация в 5' нетранслируемой области гена *MEN1*, охватывающая основной промотор и многочисленные цис-регуляторные области, что подчеркивает важность исследования нетранслируемых областей гена у пациентов с фенотипом МЭН-1, не имеющих мутаций кодирующей области [79]. Остаются пациенты без выявленных мутаций, которым может понадобиться проведение полноэкзомного [137] или полногеномного секвенирования [5] для поиска других, пока не описанных генов, ответственных за развитие фенотипа МЭН-1. Также возможно рассмотрение исследования транскриптома крови [2, 138].

Для постановки диагноза МЭН-1 должны быть соблюдены следующие критерии: «генетический, семейный и клинический» [3, 4, 75]. В поддержку этих рекомендаций, в исследовании Ellard S. и соавт., вероятность обнаружения мутации в гене *MEN1*, в целом, коррелировала с клиническими проявлениями заболевания: у пациентов с тремя основными

МЭН-1 ассоциированными образованиями мутация в гене *MEN1* выявлялась в 79% случаев, а при наличии отягощенной наследственности, процент достигал 91 [139]. У пациентов с двумя основными опухолями мутации выявлялись в 37% случаев, а при наличии отягощенной наследственности – в 69%. При этом стоит отметить, что в основном мутации имелись у пациентов с сочетанием образований ОЩЖ и ПЖ, и лишь в небольшом проценте – у пациентов с сочетанием АГ и образованиями ОЩЖ. Также в работе оценили процент выявления мутаций при наличии одной основной МЭН-1 ассоциированной опухоли, который составил 15 при наличии родственников с известным заболеванием, и 0% при отсутствии семейного анамнеза заболевания [139]. В другом исследовании, Tham E. и соавт. среди 200 пациентов с эндокринными опухолями, ассоциированными с синдромом МЭН-1, мутация в гене *MEN1* также встречалась намного чаще у пациентов с наличием трех основных МЭН-1 ассоциированных образований и семейным анамнезом (93%), без семейного анамнеза – в 31% случаев [140]. При наличии только 2/3 МЭН-1 ассоциированных образований мутация обнаруживалась в 56% и 2% случаев с отягощенной наследственностью и без, соответственно. Среди пациентов с двумя основными образованиями без семейного анамнеза, мутация в гене *MEN1* была обнаружена у 1/19 пациента с сочетанием ПГПТ и НЭО ПЖ, и ни у одного пациента с сочетанием образований ОЩЖ и гипофиза (0/27) [140].

При всем при этом, клинический критерий по мнению ряда авторов стал предметом дискуссий [75, 115], ведь остаются пациенты с фенотипом МЭН-1 без мутаций в гене *MEN1*. У большинства пациентов с отсутствием мутаций имеется сочетание двух образований, ассоциированных с синдромом МЭН-1, а третий характерный компонент либо не проявляется вовсе, либо – значительно реже [117, 118, 141–144]. У таких пациентов обычно отсутствует отягощенный семейный анамнез, и заболевание развивается в более старшем возрасте [141, 142, 144]. По результатам работы Pieterman C.R.C. и соавт. было выявлено, что пациенты с фенотипом МЭН-1 и отсутствием мутаций в гене *MEN1* были значительно старше пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 на момент диагностики первого (52 года [95% ДИ 49–55] и 35 лет [95% ДИ 29–41], $P < 0,001$, соответственно) и второго (58 лет [95% ДИ 55–61] и 40 лет [95% ДИ 33–46], $P < 0,001$, соответственно) проявлений синдрома [142]. Как было отмечено выше [139, 140], отсутствие мутаций в гене *MEN1* чаще всего наблюдается у пациентов с 2/3 основных новообразований, в частности при сочетании АГ и поражений ОЩЖ. У таких пациентов, как правило, выявляется только одно образование ОЩЖ, а множественное поражение встречается редко. Стоит также подчеркнуть, что АГ у таких пациентов в большинстве случаев секретирует СТГ [118, 142–146]. Так, в исследовании Hai N. и соавт. из 20 пациентов с фенотипом МЭН-1 без семейного анамнеза заболевания только у 1/9 пациентов с сочетанием АГ и образований ОЩЖ была выявлена мутация в гене *MEN1*, тогда как у пациентов

с комбинацией других образований – у 7/11 [143]. В том числе стоит отметить, что у 7/12 пациентов без мутаций АГ секретировала гормон роста [143]. В работе Pardi E. и соавт. также частота сочетания АГ и ПППТ была значительно ниже в группе генетически подтвержденного синдрома МЭН-1, чем у пациентов без мутаций ($P < 0,0001$), а большинство АГ в группе без мутаций секретировали СТГ ($P = 0,02$). И наоборот, сочетание ПППТ и НЭО ПЖ значительно чаще встречалось у пациентов с мутациями ($P < 0,01$) [118]. Некоторыми авторами отмечено более благоприятном течении заболевания у пациентов без мутаций, что позволяет предположить отсутствие истинного синдрома МЭН-1 у таких пациентов и может служить основанием для подбора индивидуальной схемы наблюдения за такими пациентами. По данным de Laat J.M. и соавт. у пациентов без мутаций с фенотипом МЭН-1 ожидаемая продолжительность жизни, в целом, была сопоставима с общей популяцией: медиана выживаемости у пациентов без мутаций составила 87 лет (95 % ДИ недоступен) по сравнению с 73 годами (95 % ДИ, 69,5–76,5) у пациентов с мутациями ($P = 0,001$) [141]. В исследовании Pieterman C.R.C. и соавт. также выживаемость пациентов без мутаций была значительно выше, чем у пациентов с мутациями [142]. Учитывая характеристику пациентов с фенотипом МЭН-1 и отсутствием мутаций, авторами был предложен возможный алгоритм наблюдения за такими пациентами. Важным этапом остается генетическое консультирование и комплексное генетическое тестирование на основе анамнеза заболевания и наследственности (исключение крупных делеций и дупликаций, иных участков гена *MEN1*, мутации в других ответственных за фенотип МЭН-1 генах). Основываясь на клинической картине, исследователи предлагают не проводить скрининг для исключения компонентов синдрома МЭН-1 пациентам без мутаций старше 58 лет с поражением одной ОЦЖ и без НЭО ПЖ, учитывая отсутствие развития НЭО ПЖ у таких пациентов за период наблюдения в их когорте пациентов. Напротив, пациентов без мутаций с наличием 3-х типичных проявлений синдрома авторами рекомендовано обследовать также, как и пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1. Для других пациентов с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1 и отсутствием мутаций можно рассмотреть менее частое проведение скрининга компонентов синдрома МЭН-1 [142].

Как уже отмечалось ранее, большинство пациентов с клиническими признаками МЭН-1 и отсутствием мутаций имеют комбинацию АГ и ПППТ [119, 141, 143]. Еще одна теория объясняет такое сочетание широкой распространенностью обоих заболеваний [75]. Так, за последние два десятилетия частота выявления ПППТ увеличилась в 3 раза: с 76 до 233 на 100 000 женщин и с 30 до 85 на 100 000 мужчин [131, 147]. Распространенность АГ составляет по данным исследований 89,1 на 100 тыс. [148] или около 1 на 1000 человек [149], а заболеваемость приближается к 20% от общей популяции. Известно также, что опухоли гипофиза выявляются в более чем в 25% аутопсий и у 20% населения, подвергающихся визуализирующим

исследованиям [150]. Таким образом, вероятность развития у пациентов случайного сочетания опухолей ОЩЖ и гипофиза, которые соответствуют клиническим критериям синдрома МЭН-1, также может возрастать.

Обобщая вышесказанное, сомнительно, что пациенты с фенотипом МЭН-1 включающем в себя сочетание АГ с поражением одной ОЩЖ, без отягощенного наследственного анамнеза и отсутствием мутаций подвержены риску развития других опухолей, ассоциированных с МЭН-1, и что их тактика ведения должна включать долгосрочный регулярный инструментальный и лабораторный скрининг, который рекомендуется пациентам с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1. Учитывая потенциальную распространенность случайного сочетания фенотипа МЭН-1, ограниченную доступность специализированного генетического анализа, первостепенное значение имеет раннее выявление пациентов, которым необходимо проведение генетического тестирования, в том числе не только рутинными методами. В последнее время для таких целей все чаще используют методы машинного обучения. В целом, программные алгоритмы могут быть обучены различать и классифицировать сложные закономерности, и все чаще используются в диагностических и прогностических исследованиях. Так, de Laat J.M. и соавт. разработали номограмму, позволяющую врачу рассчитать риск наличия синдрома МЭН-1 у пациентов со спорадически возникающими эндокринными образованиями и подозрением на синдром МЭН-1 с хорошей прогностической ценностью: показатель c-statistic равнялся 0,86 (95% ДИ 0,81–0,90) и 0,77 (95% ДИ 0,66–0,88) на тестовой и валидационной выборках, соответственно [151]. В работе Ростомян Л.Г. в модель для определения выявления синдрома МЭН-1 среди пациентов с ПГПТ при построении модели логистической регрессии в качестве независимых факторов были включены такие показатели как возраст на момент дебюта ПГПТ, исходный уровень ПТГ, пол, мягкое течение ПГПТ. Наибольшее значение имели показатели такие как повышение уровня ПТГ до 2,5 раз выше верхней границы нормы ($p < 0,001$) и возраст дебюта ПГПТ до 40 лет ($p < 0,001$). При проведении многофакторного анализа комбинация умеренно повышенного ПТГ и возраста на момент дебюта ПТГ повышала более чем в 12 раз риск наличия МЭН-1 среди пациентов с ПГПТ вне зависимости от пола и течения ПГПТ 40 лет [152]. Наряду с вышеуказанной моделью, Мокрышевой Н.Г. и соавт. был предложен способ прогнозирования наличия мутации в гене *MEN1* на основании клинического фенотипа пациентов с ПГПТ при помощи логистической регрессионной модели, с высокой предсказательной способностью: диагностическая чувствительность модели составила 96%, специфичность – 98% [153].

Еще одной причиной сочетания двух МЭН-1 ассоциированных опухолей могут быть эпигенетические изменения: модификация и деацетилирование гистонов, метилирование ДНК в МЭН-1 ассоциированных тканях опухолей (таких как НЭО ПЖ, образования ОЩЖ) [83–85].

Механизм сайленсинга генов, осуществляемый некодирующими РНК (нкРНК), представляет собой еще один потенциальный эпигенетический способ формирования опухолей, включая те, которые ассоциированы с синдромом МЭН-1.

1.4 Общие характеристики микроРНК

Семейство нкРНК очень разнообразно и имеет несколько способов классификации, в том числе по локализации в геноме, механизму действия или по размеру. По последнему признаку нкРНК подразделяются на малые (<200 нуклеотидов) и длинные (>200 нуклеотидов). К малым нкРНК относятся микроРНК (около 22 нуклеотидов), малые интерферирующие РНК (около 20–25 нуклеотидов), малые ядерные РНК (около 150 нуклеотидов), малые нуклеоларные РНК (около 70 нуклеотидов), трансферные РНК (около 30–33 нуклеотидов), piwi-ассоциированные РНК (26–31 нуклеотидов). В отличие от них, длинные нкРНК имеют более гетерогенный размер (от 200 до десятков тысяч нуклеотидов). Другой, недавно открытый класс нкРНК – это циркулярные РНК (около 50–150 нуклеотидов), которые имеют ковалентно замкнутую кольцевую структуру [9, 154].

МикроРНК являются наиболее подробно изученным классом нкРНК. Впервые микроРНК были описаны в 1993 г. группами Эмброса В. и Равкона Г. в нематодах *Caenorhabditis elegans*, что произвело революцию в области молекулярной биологии, за что им в октябре 2024 г. была вручена Нобелевская премия [155]. МикроРНК (рис. 2) представляют собой короткие нкРНК и регулируют экспрессию генов, обычно связываясь с определенными участками в 3'-нетранслируемых областях (3'-НТО) матричной РНК (мРНК), а также в 5'-НТО, кодирующей области или промоторе, с различным уровнем комплементарности и либо вызывают деградацию, либо блокируют трансляцию мРНК [9, 155].

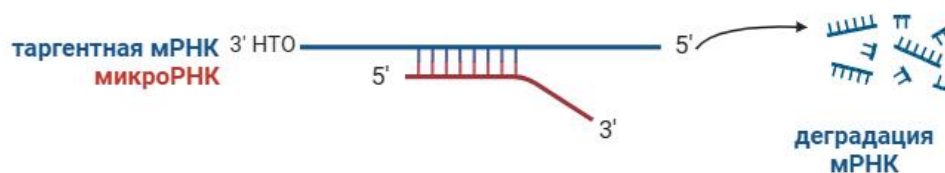


Рисунок 2 – МикроРНК, связанная с таргетной мРНК. Создано при помощи <https://BioRender.com>.

Биосинтез микроРНК начинается с пост- или котранскрипционного процессинга РНК-полимеразой II/III. Примерно половина всех недавно идентифицированных микроРНК процессируются, как правило, из интронов и относительно небольшого количества экзонов белок-кодирующих генов, в то время как остальные являются межгенными, транскрибируются независимо от гена-хозяина и регулируются собственными промоторами. Иногда микроРНК транскрибируются в виде одной длинной копии, известной как кластеры (семейства), которые

могут иметь схожие начальные участки. Различают канонический и неканонический пути биосинтеза микроРНК [155, 156].

В рамках канонического пути (рис. 3) первичные микроРНК (pri-микроРНК), которые имеют большую длину (обычно более 1 кб) и содержат локальную структуру «стебель-петля», транскрибируются со своих генов [157]. Затем они процессируются в микроРНК-предшественницы (pre-микроРНК), которые представляют собой небольшие шпильчатые РНК длиной ~65 нуклеотидов, микропроцессорным комплексом, состоящим из двух мультибелковых единиц – большой (различные классы РНК-ассоциированных белков, двухцепочечные РНК-связывающие белки, рибонуклеопротеины и семейство белков саркомы Юинга) и малой (ядерный фермент рибонуклеаза III Drosha и РНК-связывающий белок DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8)) [158]. В дальнейшем pre-микроРНК экспортируется в цитоплазму, где завершается созревание микроРНК. Экспорт из ядра в цитоплазму происходит посредством белка экспортина 5, который образует транспортный комплекс с ГТФ-связывающим ядерным белком Ran-ГТФ и pre-микроРНК [157]. После экспорта в цитоплазму pre-микроРНК расщепляется рибонуклеазой III Dicer вблизи терминальной петли, что приводит к образованию зрелого дуплекса – микроРНК-микроРНК[^], состоящего из двух цепей микроРНК по 22 нуклеотида каждая. Дуплекс, генерируемый Dicer, впоследствии связывается с семейством белков Argonaute (AGO; AGO1–4 у человека), образуя эффекторный комплекс, называемый РНК-индуцированный комплекс выключения гена (RNA-induced silencing complex, RISC). Направляющая нить (микроРНК) определяется на этапе связывания с AGO, в основном на основе относительной термодинамической стабильности двух концов дуплекса микроРНК. В качестве направляющей обычно выбирается нить с относительно нестабильным концом на стороне 5'. Дополнительным фактором, определяющим выбор нити, является первая нуклеотидная последовательность: белки AGO выбирают направляющие нити с U в нуклеотидном положении 1. Незагруженная нить называется «пассажирской» (микроРНК[^]), которая затем будет разматываться с направляющей нити с помощью различных механизмов. Пассажирские нити микроРНК, не содержащие несоответствий, расщепляются AGO2 и деградируют под действием клеточных механизмов, а дуплексы с центральными несоответствиями или микроРНК, не связанные с AGO2, пассивно разматываются и только затем деградируют [155, 158].

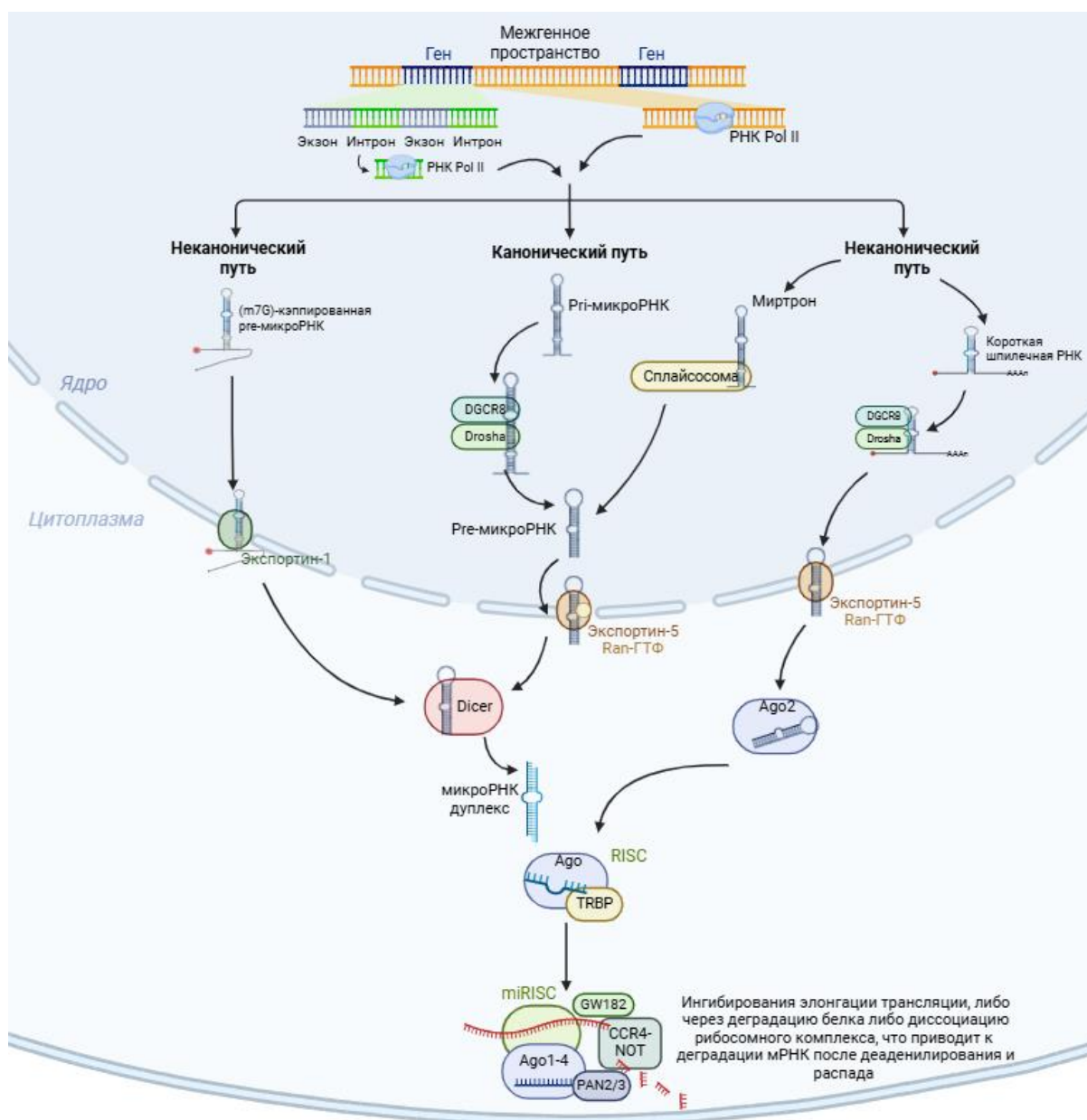


Рисунок 3 – Процессинг микроРНК разными путями. Создано при помощи <https://BioRender.com>.

При неканоническом пути микроРНК образуются в результате иной комбинации тех же белков, что и при каноническом пути. Выделяют два основных неканонических пути: Drosha/DGCR8-независимый и Dicer-независимый. Примером первого является биогенез миртронов. Миртронные ргi-микроРНК соответствуют всей интронной последовательности мРНК, кодирующей гены, в которых они расположены, и образуются во время сплайсинга, а не микропроцессорным комплексом. После сплайсинга миртронные рге-микроРНК экспортируются в цитоплазму экспортином 5 и обрабатываются Dicer с образованием зрелой микроРНК [158]. Другой пример – 7-метилгуанозиновая (m7G)-кэппированная рге-микроРНК. Эти зарождающиеся РНК напрямую экспортируются в цитоплазму через экспортин 1 без необходимости расщепления Drosha [155]. При Dicer-независимом пути Drosha обрабатывает микроРНК из эндогенных транскриптов коротких шпилечных РНК. Поскольку они слишком

коротки, чтобы быть субстратами Dicer, этим pre-микроРНК требуется только AGO2 для завершения их созревания в цитоплазме. Это способствует загрузке всей pre-микроРНК в AGO2, а также AGO2-зависимой нарезке нити 3p. Созревание нити 5p завершается ее обрезкой 3'–5' [155, 156].

Все пути в конечном итоге приводят к функциональному комплексу RISC с микроРНК (miRISC). Формирование сайленсингового комплекса miRISC начинается с рекрутирования семейства белков GW182 с помощью miRISC. Белок GW182 обеспечивает основу для рекрутирования других эффекторных белков, таких как поли(А)-деаденилазные комплексы PAN2-PAN3 и CCR4-NOT, после взаимодействия микроРНК с целевой мРНК [155]. МикроРНК в составе комплекса RISC доставляет его к мРНК-мишени комплементарным нуклеотидам способом. Обычно сайт-мишень мРНК находится в 3' или 5' НТО, а комплементарная последовательность на микроРНК, называемая seed-последовательностью, расположена на расстоянии 2–7 нуклеотидов [158]. После распознавания целевой мРНК miRISC предотвращает ее трансляцию путем ингибирования элонгации трансляции, либо через деградацию белка, либо диссоциацию рибосомного комплекса, что приводит к деградации мРНК после деаденилирования и распада [158].

По данным исследований, 30–50% всех белок-кодирующих генов могут регулироваться микроРНК. И хотя микроРНК в основном снижают экспрессию генов, некоторые работы показали, что микроРНК могут также повышать экспрессию своих генов-мишеней [159, 160]. В том числе, по результатам биоинформатического анализа выявлено, что конкретная микроРНК может регулировать экспрессию до тысячи мРНК, а одна мРНК может контролироваться несколькими микроРНК [161]. Полная информация о микроРНК доступна в базе данных miRBase и включает около 1917 предшественников человеческих микроРНК и 2654 зрелых последовательностей микроРНК [162].

Многие микроРНК присутствуют в жидкостях организма (включая сыворотку, плазму, мочу и др.) и играют роль в межклеточной коммуникации, функционируя как гормоноподобные молекулы, влияя на поведение различных клеток [154, 163]. МикроРНК достаточно устойчивы к экстремальным изменениям pH, температуры, повторяющимся циклам замораживания-оттаивания [9, 164], к деградации, несмотря на наличие большого количества РНКаз во внеклеточном пространстве, благодаря инкапсуляции в везикулах, связыванию с РНК-связывающими белками или ассоциации с липопротеиновыми комплексами [9, 155]. Внеклеточные везикулы представляют собой форму межклеточной коммуникации, и в целом обладают гораздо большим потенциалом, чем предполагалось изначально. Например, известно, что они могут модулировать иммунный ответ, а также участвовать в канцерогенезе или развитии нейродегенеративных заболеваний [165]. Внеклеточные везикулы, содержащие микроРНК,

могут выделять опухолевые клетки в большем, чем нормальные клетки, количестве. Тем самым опухолевые клетки могут представлять собой важный источник циркулирующих нкРНК. Также известно, что клетки крови и эндотелиальные клетки являются одними из основных участников пула циркулирующих микроРНК, поэтому интерпретация циркулирующих уровней нкРНК требует осторожности. Однако физиология эндокринных желез предполагает, что кровь, в целом, может служить репрезентативной тканью для выявления специфичных нкРНК из образований эндокринного генеза, учитывая хорошее кровоснабжение эндокринных желез [166].

Неотъемлемым шагом в исследовании микроРНК является метод их выявления. В настоящее время существуют множество различных способов определения экспрессии микроРНК: для одномоментного выявления большого количества микроРНК используют высокопроизводительное секвенирование или микрочипы, в то время как для определения уровня отдельных микроРНК могут быть использованы нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ* и количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (RT-qPCR), которая и используется в большинстве случаев [161, 167].

На сегодняшний день наиболее часто используемым методом обнаружения специфических микроРНК является RT-qPCR. Ее принцип заключается в обратной транскрипции микроРНК в кДНК с последующей количественной ПЦР в реальном времени стандартными способами с использованием праймеров [167]. Преимуществом использования RT-qPCR являются небольшое количество используемого исходного материала, быстрота получения результатов, простота их интерпретации, невысокая стоимость. Однако данный метод имеет ряд специфических проблем: небольшая пропускная способность, анализ ограниченного количества микроРНК, высокая схожесть некоторых микроРНК, что может приводить к ошибкам анализа [9, 161]. Вместе с тем, учитывая простоту метода и высокие специфичность и чувствительность, его часто используют в качестве метода валидации данных, полученных другими способами [161].

Микрочипы, в целом, преодолевают некоторые из ограничений RT-qPCR, позволяя проводить высокопроизводительные исследования тысяч известных микроРНК одновременно, более экономичным по сравнению с NGS способом. Принцип этого метода основан на обратной гибридизации в твердой фазе. После выделения микроРНК обогащаются и помечаются красителем, а затем непосредственно гибридизуются с соответствующими зондами, специфичными для зрелых микроРНК. Однако он не подходит для измерения абсолютных значений экспрессии микроРНК и требует валидации результатов вторым методом [167, 168].

Несмотря на широкое использование RT-qPCR и микрочипов, эти методы ограничены изучением заранее определенных мишеней, и единственным по настоящему поисковым методом, позволяющим выявлять новые микроРНК, является проведение NGS. Данный способ обладает такими преимуществами, как высокая пропускная способность, высокая чувствительность и

высокая скорость проведения анализа. Кроме того, анализ микроРНК на основе NGS позволяет выявлять изомикроРНК (изоформы микроРНК, последовательности которых отличаются от соответствующих референсных последовательностей в miRBase). Однако этот метод является дорогостоящим, а интерпретация данных требует сложного биоинформатического анализа [9, 167]. Невзирая на все преимущества NGS метода, для минимизации ошибочных суждений необходимо подтверждение полученных результатов иным способом, например, RT-qPCR, который остается в настоящее время золотым стандартом для проверки данных экспрессии микроРНК, полученных другими методами, в том числе, при помощи NGS [168, 169].

Следующим важным этапом является определение функции микроРНК и поиск ее мишеней. Подтверждение биологической функции микроРНК в лабораторных условиях может быть достаточно трудоемкой и дорогостоящей задачей, в связи с чем разработаны биоинформатические инструменты для идентификации мРНК-мишеней, основанных на комплементарности между 3' НТО и «затравочной» последовательностью, т.е. 6–8 нуклеотидами на 5' зрелой микроРНК [170]. К таким алгоритмам относятся TargetScan [171], miRNet [172] и многие другие. Также разработаны предикторы на основе машинного обучения с использованием доказанных взаимодействующих пар микроРНК–мРНК. Эти алгоритмы часто используются в качестве предварительного скрининга для выявления генов, регулируемых конкретной микроРНК [170]. В целом, при комбинации вышеуказанных методов возможно увеличить число истинных предсказаний мишеней микроРНК и ограничить количество ложноположительных результатов. Однако после биоинформатического анализа и выявления потенциальных целевых мРНК, в дальнейшем, следует подтвердить экспериментальным путем все гипотезы: показать совместную экспрессию микроРНК и целевой мРНК *in vivo*; доказать взаимодействие между микроРНК и определенным сайтом мРНК; продемонстрировать эффекты микроРНК на экспрессию целевого белка и на его биологическую функцию [161].

1.5 МикроРНК и менин

В последние два десятилетия тканеспецифические изменения активности и/или экспрессии микроРНК были предложены в качестве возможных модуляторов опухолевого генеза, в том числе при МЭН-1-ассоциированных образованиях, включая гипофиз, ОЩЖ и НЭО ЖКТ [6, 173, 174]. Одной из таких микроРНК является miR-24-3p (и его pre-микроРНК miR-24-1; *далее идет сохранение написания названия вышеуказанной микроРНК как miR-24-1/miR-24, как и было указано в статьях авторов, однако в настоящее время эта нуклеотидная последовательность микроРНК называется miR-24-3p*). Так, в исследовании Luzi E. и соавт. было продемонстрировано, что экспрессия miR-24-1 была усилена в ЛОН-отрицательных аденомах ОЩЖ пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, где она непосредственно связывалась с 3' НТО мРНК менина и подавляла его экспрессию. Напротив, в ЛОН-

положительных аденомах ОЩЖ, экспрессия miR-24-1 была резко снижена. Исходя из этого авторы предположили, что экспрессия miR-24-1 только в ЛОН-отрицательных аденомах ОЩЖ пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и ее отсутствие в ЛОН-положительных аденомах, говорит о необходимости остаточной секреции менина для экспрессии самой микроРНК. Также интересно, что несмотря на наличие экспрессии мРНК гена *MEN1* в ЛОН-отрицательных аденомах ОЩЖ (за счет оставшегося аллеля дикого типа) по сравнению с ЛОН-положительными аденомами, экспрессия самого менина отсутствовала в обоих подтипах, что свидетельствовало о том, что гиперэкспрессия miR-24-1 может негативно влиять на мРНК менина. Таким образом, авторы предположили наличие отрицательной обратной связи, по которой менин необходим для экспрессии miR-24-1, при этом последняя подавляет экспрессию менина в отсутствие ЛОН второго аллеля гена *MEN1*, то есть может «выключать» этот аллель, имитируя второй «соматический удар» инактивации опухолевых супрессоров в тканях согласно теории «двойного удара» Кнудсона [7]. В другой своей работе Luzi E. и соавт. показали на клеточной линии BON1 (клеточная линия нейроэндокринных опухолевых клеток ПЖ человека), полученной из лимфатических узлов метастаза карциноидной опухоли ПЖ, что менин также может специфически связываться с pri-miR-24-1, способствуя биогенезу уже зрелой miR-24-1. Vijayaraghavan J. и соавт. в своей работе установили, что miR-24 непосредственно снижает экспрессию менина в клеточных линиях MIN6 (клетки инсулиномы мыши) и β lox5 (иммортиализированные β -клетки человека), а также подтвердили наличие петли отрицательной обратной связи между менином и miR-24 уже в клетках поджелудочной железы. Кроме того, в этой работе было показано, что снижение экспрессии менина под воздействием miR-24 приводит к снижению экспрессии ингибиторов клеточного цикла p27^{kip1} и p18i^{nk4c} [88].

Также взаимодействие miR-24 и менина исследованы на неэндокринных тканях. Так, в работе Ehrlich L. и соавт. было продемонстрировано, что экспрессия miR-24 повышена в клеточных линиях внутрипеченочных и внепеченочных холангиокарцином человека и, что данная микроРНК подавляет экспрессию менина. А ингибирование miR-24 увеличивает экспрессию белка менина, снижая при этом пролиферацию, ангиогенез, миграцию и инвазию [175]. А в исследовании Hall C. и соавт. ингибирование miR-24 увеличивало экспрессию менина и трансформирующего фактора роста- β 1, что впоследствии приводило к усилению фиброза печени у мышей FVB/NJ WT (дикого типа) и Mdr2^{-/-} (in vivo модель первичного склерозирующего холангита) [176]. Взаимодействие miR-24-менина было в том числе изучено на 70 образцах тканей рака легкого и прилегающих к опухоли тканях (≥ 2 см от опухоли) [177]. Pan Y. и соавт. выявили, что экспрессия miR-24 в опухолевых тканях была значительно выше, чем в прилежащих тканях, тогда как экспрессия менина в опухолевых тканях была ниже. Кроме того, авторы отметили, что пациенты с более высокой экспрессией miR-24 имели низкую 5-летнюю

выживаемость, в отличие от пациентов с повышенной экспрессией менина. Таким образом, авторы продемонстрировали, что стимулирование роста и метастазирования клеток рака легкого с помощью miR-24, по крайней мере, частично опосредовано регуляцией менина [177].

Кроме miR-24-3p, были найдены иные микроРНК, которые взаимодействуют с менином в различных тканях. Luzi E. и соавт. в своей работе продемонстрировали влияние менина на микроРНК miR-26a в человеческих стволовых клетках, выделенных из жировой ткани, индуцированных по пути дифференцировки в остеобласты (hADSC) [8]. В этом исследовании авторы выявили, что менин, связываясь с промоторной областью miR-26a, является модулятором экспрессии miR-26a (напрямую) и белка SMAD1 (опосредованно через miR-26a), играющего важную роль в клеточном цикле и росте, что по-видимому, играет ключевую роль в процессе остеогенеза hADSCs [8]. В исследовании Gurung B. и соавт. выявлено, что менин взаимодействует с арсенит-резистентным белком 2 (ARS2), компонентом ядерного CAP-связывающего комплекса, имеющего решающее значение для синтеза некоторых микроРНК, и повышает процессинг pri-let-7a и pri-miR-155 в их зрелые формы [178, 179]. Мишенью микроРНК let-7a является белок IRS2, который играет важную роль в передаче сигналов инсулина и индуцированной инсулином пролиферации клеток. Эти результаты раскрывают механизм, посредством которого менин подавляет пролиферацию клеток, по крайней мере частично, путем стимулирования процессинга микроРНК let-7a через взаимодействие с ARS2 и экспрессии ключевого компонента инсулинового сигнального пути – IRS2 [178, 179]. В работе Li Y. и соавт. было выявлено, что по сравнению со здоровой тканью в тканях нейробластом повышена экспрессия miR-421, которая существенно усиливает клеточную пролиферацию, прогрессию клеточного цикла, миграцию и инвазию клеток [180]. На клеточных линиях нейробластомы SHSY5Y, SHEP и IMR-32 было показано, что менин является мишенью miR-421, которая, связываясь с 3' НТО его мРНК подавляет его экспрессию. Более того, снижение уровня менина имело сходный эффект со сверхэкспрессией miR-421. С другой стороны, сверхэкспрессия менина лишь частично отменяла эффекты miR-421 в клетках нейробластомы [180]. Также было изучено влияние miR-802 на менин в образцах тканей рака легкого человека и клеточных линиях рака легкого (A549, NCI-H358 и NCI-H1299) [181]. Исследователи выявили повышенную экспрессию miR-802 в образцах тканей рака легкого, и затем продемонстрировали *in vitro*, что miR-802 способствует пролиферации клеток рака легкого путем воздействия на менин, снижая его экспрессию [181]. В работе Lu Y. и соавт. на клеточной линии MIN6 было выявлено, что miR-17, экспрессия которой повышается под воздействием высоких уровней глюкозы в β -клетках ПЖ, напрямую подавляет экспрессию менина посредством связывания с 3' НТО его мРНК, тем самым способствуя пролиферации β -клеток ПЖ [182]. А в работе Ouyang M. и соавт. продемонстрировано, что miR-29 подавляет экспрессию менина в клеточной линии эпителия

кишечника крысы [183]. Отрицательная корреляция между miR-762 и менином была обнаружена в исследовании Ноу R. и соавт. в тканях рака яичника. Выявлено, что miR-762 может непосредственно подавлять экспрессию менина, связываясь с 3' НТО его мРНК, активируя сигнальный путь Wnt/ β -катенин, и способствовать тем самым пролиферации и метастазированию раковых клеток яичников [184]. А в работе Hussain S. и соавт. по выявлению дисфункции миокарда посредством эпигенетической регуляции JunD в условиях гипергликемии показано, что гиперэкспрессия miR-673 предотвращала гиперэкспрессию менина, восстанавливая экспрессию JunD в кардиомиоцитах, обработанных глюкозой [185].

Данные о взаимном влиянии различных микроРНК и менина представлены в таблице 2.

Таблица 2 – МикроРНК, взаимодействующие с менином.

Клетки/ткань (n)	МикроРНК	Экспрессия	Метод измерения	Источник
BON1 нормальная ОЩЖ (1), образования ОЩЖ неМЭН-1 (3), образования ОЩЖ МЭН-1 (8)	miR-24-1	↑ в -LOH MEN1 ↓ в +LOH MEN1	Нозерн-блот RT-qPCR	[7]
BON1 нормальная ОЩЖ (2), образования ОЩЖ неМЭН-1 (2), образования ОЩЖ МЭН-1 (7)	miR-4258	↑ в -LOH MEN1 ↓ в +LOH MEN1	Микрочип RT-qPCR	[87]
	miR-664	↑ в -LOH MEN1 ↓ в +LOH MEN1		
	miR-1301	↑ в +LOH MEN1		
MIN6, β lox5	miR-24	↑	RT-qPCR	[88]
Mz-ChA-1, TFK-1, SG231, CCLP-1, HuCC-T1, HuH-28 Образцы холангиокарцином (9)	miR-24	↑	RT-qPCR	[175]
Холангиоциты и ткань печени мышей	miR-24	↑	qPCR	[176]
A549, NCI-H446 Образцы рака легкого и прилегающей нормальной ткани (70)	miR-24	↑	RT-qPCR	[177]
hADSC	miR-26a	↓	Нозерн-блот RT-qPCR	[8]
MEFs	let-7a miR-155	↑	RT-qPCR	[178, 179]
SHSY5Y, SHEP, IMR-32	miR-421	↑	RT-qPCR	[180]

Образцы нейробластомы и прилегающей нормальной ткани (28)				
A549, NCI-H358, NCI-H1299 Образцы рака легкого и прилегающей нормальной ткани (40)	miR-802	↑	RT-qPCR	[181]
MIN6	miR-17	↑	RT-qPCR	[182]
IECs	miR-29	↑	RT-qPCR	[183]
SKOV3, CAO V Образцы опухоли и прилегающей нормальной ткани (n=60)	miR-762	↑	RT-qPCR	[184]
Сердечная ткань мышей с индуцированным стрептозоцином сахарным диабетом	miR-673	↓	RT-qPCR	[185]

Примечание: BON1 – клеточная линия нейроэндокринных опухолевых клеток ПЖ человека; MIN6 – клеточная линия инсулиномы мыши; Blox5 – immortalized β-клетки ПЖ человека; Mz-ChA-1, TFK-1, SG231, CCLP-1, HuCC-T1, HuH-28 – клеточные линии холангиокарциномы человека; A549, NCI-H358, NCI-H1299 – клеточные линии рака легкого; hADSCs – человеческие стволовые клетки, выделенные из жировой ткани, индуцированные по пути дифференцировки в остеобласты; MEFs – мышечные эмбриональные фибробласты; SHSY5Y, SHEP и IMR-32 – клеточные линии нейробластомы; IECs – клеточная линия эпителия кишечника крысы; SKOV3, CAO V – клеточные линии аденокарциномы яичника человека; RT-qPCR – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. ↓ – снижает, ↑ – повышает.

1.6 МикроРНК и синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа

Наряду с miR-24-3p в **образованиях ОЩЖ** также были исследованы и другие микроРНК. В работе Luzi E. и соавт. проводилось сравнение экспрессии микроРНК с помощью микрочипов в семи аденомах ОЩЖ пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 (из них в четырех аденомах была выявлена LOH в локусе 11q13, тогда как в трех аденомах аллель дикого типа был сохранен) с двумя спорадическими аденомами ОЩЖ (без соматических мутаций в гене *MEN1*) и двумя образцами тканей здоровых ОЩЖ (использовался свежемороженый материал) [87]. Было выявлено, что экспрессия восьми микроРНК (hsa-miR-4258, hsa-miR-664, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-625, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-3614-5p, hsa-miR-23c, hsa-miR-3938) отличалась между LOH-отрицательными ОЩЖ и контролем, экспрессия двух микроРНК (hsa-miR-1301, hsa-miR-664) отличалась между LOH-положительными аденомами ОЩЖ и контролем. Экспрессия шести микроРНК (hsa-miR-4258, hsa-miR-1301, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-3944, hsa-miR-135b, hsa-miR-1261) отличалась между LOH-положительными и LOH-отрицательными аденомами ОЩЖ. При этом примечательна различная экспрессия трех

микроРНК (miR-4258, miR-664 и miR-1301) в LOH-положительных и LOH-отрицательных аденомах ОЦЖ пациентов с МЭН-1. Так, экспрессия miR-4258 была подавлена в LOH-положительных аденомах ОЦЖ по сравнению с LOH-отрицательными аденомами ОЦЖ, что демонстрирует необходимость наличия хотя бы одного аллеля дикого типа для экспрессии этой микроРНК. Экспрессия miR-4258 была выше в LOH-отрицательных аденомах ОЦЖ по сравнению с контролем. Экспрессия miR-664 была выше в LOH-отрицательных аденомах и ниже в LOH-положительных аденомах по сравнению с контролем. Экспрессия miR-1301 была выше в LOH-положительных аденомах ОЦЖ по сравнению с LOH-отрицательными ОЦЖ и контролем. Таким образом, авторы делают вывод, что для экспрессии некоторых микроРНК необходимо наличие хотя бы одного аллеля дикого типа, кодирующего белок менин, а также что miR-4258, miR-1301 и miR-664 являются наилучшими прогностическими и диагностическими маркерами в разграничении МЭН-1-ассоциированных аденом ОЦЖ, спорадических аденом ОЦЖ и здоровых ОЦЖ, а также в разграничении между МЭН-1-ассоциированными аденомами ОЦЖ с или без LOH в локусе 11q13 [87].

В исследовании Grolmusz V.K. и соавт. проводилось сравнение 16 образований ОЦЖ от пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и 40 спорадических образований ОЦЖ [173]. Анализ экспрессии микроРНК проводился из материала, выделенного из парафиновых блоков, методом RT-qPCR для 6 микроРНК: hsa-miR-24, hsa-miR-28, hsa-miR-326, hsa-miR-484, hsa-miR-637, hsa-miR-744, при этом экспрессию hsa-miR-637 не удалось обнаружить во всех образцах. По остальным микроРНК не было выявлено значимых различий в менин-положительных и менин-отрицательных тканях образований ОЦЖ, независимо от наличия или отсутствия герминальной мутации в гене *MEN1*. Однако экспрессия hsa-miR-24 и hsa-miR-28 была выше в спорадических образованиях ОЦЖ по сравнению с МЭН-1-ассоциированными образованиями. Кроме того, при дальнейшем делении группы спорадических образований ОЦЖ на менин-положительные и менин-отрицательные, в обеих группах экспрессия этих микроРНК была выше, чем в МЭН-1-ассоциированных образованиях [173].

Для определения дифференциально экспрессируемых микроРНК между спорадическими и наследственными опухолями ОЦЖ и анализа их корреляции с клинико-патологическими особенностями Hwang S. и соавт. был проведен анализ 887 микроРНК при помощи микрочипов и далее валидация дифференциально экспрессируемых микроРНК при помощи RT-qPCR на 25 спорадических и 12 наследственных опухолей ОЦЖ и 24 образцов нормальной ткани ОЦЖ [186]. Четыре микроРНК, включая miR-365, miR-125a-3p, miR-574-5p и miR-1246, были значительно снижены в спорадических опухолях ОЦЖ, тогда как miR-142-3p, let-7i, miR-125a-5p, miR-199b-5p и miR-1274b_v16.0 были значительно повышены; miR-193b был снижен в образованиях ОЦЖ с мутацией в гене *MEN1*. Семь из этих микроРНК (let-7i, miR-365, miR-125a-

3p, miR-125a-5p, miR-142-3p, miR-193b и miR-199b-5p) были выбраны для дальнейшей валидации методом RT-qPCR. Среди этих микроРНК только miR-199b-5p существенно различалась по экспрессии между двумя типами опухолей ОЩЖ; а по сравнению с экспрессией в нормальной ткани ОЩЖ экспрессия miR-199b-5p была снижена при sporadic форме и повышена при наследственной форме [186]. При проведении ROC-анализа было выявлено, что с 67% чувствительностью и 100 % специфичностью изменение экспрессии miR-199b-5p позволяют различать sporadic и наследственные образования ОЩЖ [186].

Не только в тканях ОЩЖ, но и экспрессия микроРНК в крови была оценена Yavgoroulou М.Р. и соавт. у пациентов с ППТ до паратиреоидэктомии (ПТЭ) и спустя 2 месяца после ПТЭ [187]. Десять микроРНК были отобраны на основании их взаимодействия с генами, связанными с образованием опухолей в ОЩЖ: miR-17-5p, miR-24-3p, miR-29b-3p, miR-31-5p, miR-135b-5p, miR-186-5p, miR-195-5p, miR-330-3p, miR-483-3p, miR-877-5p. В образованиях ОЩЖ по сравнению с нормальной тканью экспрессия miR-17-5p, miR-31-5p, miR-135b-5p, miR-186-5p и miR-330-3p была значительно снижена, а miR-24-3p и miR-29b-3p – повышена. Экспрессия miR-135b-5p также была значительно снижена в образцах сыворотки крови пациентов по сравнению с контролем, однако различий в экспрессии микроРНК до и после проведения ПТЭ обнаружено не было [187].

В исследовании Lines E. и соавт. изучалась экспрессия miR-15a, miR-16-1 и let-7a в **образованиях гипофиза** у мышей с гетерозиготным нокаутом гена *Men1* [188]. Экспрессия всех трех микроРНК была значимо подавлена по сравнению с контрольной группой (здоровые мышечные гипофизы). Также в исследовании было показано, что экспрессия мРНК гена *Ccnd1* и белка циклина D1 была значимо повышена в аденомах гипофиза *Men1*^{+/-} мышей по сравнению со здоровыми мышечными гипофизами. Была выявлена обратная корреляция между уровнями miR-15a и miR-16-1 и мРНК *Ccnd1*, что может свидетельствовать о регуляции циклина D1 этими микроРНК. Это предположение было подтверждено на клеточных культурах, когда введение антагонистов к miR-15a и miR-16-1 приводило к значимому повышению экспрессии циклина D1 [188]. Анализ экспрессии мРНК мишени микроРНК let-7a – *Kras* – выявил значимое повышение экспрессии *Kras* в аденомах гипофиза *Men1*^{+/-} мышей, однако значимой обратной корреляции между экспрессией *Kras* и let-7a не наблюдалось. В данной работе авторы также выявили, что отсутствие экспрессии менина в клеточной культуре приводит к снижению экспрессии miR-15a, но не miR-16-1. Кроме того, miR-15a и miR-16-1 непосредственно не влияют на экспрессию менина, что говорит об отсутствии петель обратной связи в данном случае [188]. Экспрессия miR-15a и miR-16-1 также исследовалась в 10 СТГ-АГ и 10 ПРЛ-АГ методом Нозерн-блот в работе Bottoni A. и соавт. [189]. Авторы выявили, что экспрессия miR-15a и miR-16-1

снижена в АГ по сравнению с нормальным гипофизом, а также обратно коррелирует с диаметром опухоли [189].

Влияние микроРНК на *AIP* в АГ изучалось в работе Trivellin G. и соавт. [190]. Авторы выявили повышенную экспрессию *miR-107* в СТГ/ПРЛ-секретирующих и гормонально-неактивных АГ по сравнению с контролем, и подтвердили, что мишенью этой микроРНК является 3' НТО *AIP*. Однако в свою очередь *AIP* не влияет на экспрессию *miR-107*, что свидетельствует об отсутствии обратной отрицательной связи [190]. В исследовании Dénes J. и соавт. изучалась экспрессия микроРНК, которые потенциально связываются с 3' НТО *AIP*, в спорадических соматотропиномах с низкой ($n=13$) и высокой ($n=18$) экспрессией *AIP* [191]. В АГ с низкой или высокой экспрессией белка *AIP* не наблюдалось значительной разницы в экспрессии мРНК *AIP*, что свидетельствует о ее посттранскрипционной регуляции. Экспрессия *miR-34a* была повышена в образцах АГ с низким содержанием белка *AIP* по сравнению с АГ с высоким содержанием *AIP*. МикроРНК *miR-34a* ингибировала конструкцию люциферазы-3' НТО *AIP*, что свидетельствует о том, что *miR-34a* связывается с 3' НТО *AIP*, а уровни *miR-34a* были обратно пропорциональны ответу на терапию аналогами соматостатина. Таким образом, низкая экспрессия белка *AIP* ассоциируется с высокой экспрессией *miR-34a*, а сама *miR-34a* может снижать экспрессию белка *AIP* [191]. В 2020 г. работе Bogner E. M. была также обнаружена повышенная экспрессия *miR-34a* в АГ с мутацией в гене *AIP*, где она коррелировала с усиленной пролиферацией, миграцией и подавленным апоптозом, высоким уровнем цАМФ и ухудшением ответа на введение октреотида [192]. *In vitro* *miR-34a* непосредственно связывалась с геном, альфа-субъединицы 2 гуанин нуклеотид-связывающего протеина (G-протеин), *GNAI2*, кодирующем белок *Gai2* – ингибитором синтеза цАМФ. Уровень *Gai2* был значительно ниже в АГ с мутацией в гене *AIP* по сравнению с АГ без мутаций. В совокупности, в соматотропиномах с мутациями в гене *AIP* выявляется гиперэкспрессия *miR-34a*, которая, в свою очередь, снижает экспрессию *Gai2*, и, тем самым, увеличивает концентрацию цАМФ, что в конечном итоге способствует росту клеток [192].

D'Angelo D. и соавт. изучали изменение экспрессии микроРНК в 12 СТГ-АГ по сравнению с нормальными гипофизами при помощи микрочипа [193]. Было найдено девятнадцать микроРНК различно экспрессирующихся между АГ и нормальным гипофизом. Для дальнейшего анализа авторы выбрали восемь микроРНК (*miR-326*, *miR-432*, *miR-570*, *miR-34b*, *miR-548c-3p*, *miR-326*, *miR-603*, *miR-633*) мишенью которых являлись гены *HMGA1*, *HMGA2* и/или *E2F1*. Эти микроРНК также были проанализированы методом RT-qPCR в 6 образцах ПРЛ-АГ и 10 образцах гонадотропином, где показали одинаковый характер экспрессии во всех АГ, за исключением нескольких случаев. Авторы в том числе показали, что гиперэкспрессия этих микроРНК

подавляла рост клеток АГ, и обратно коррелировала с уровнями белков HMGA1 и HMGA2 в АГ [193].

Различия в профиле экспрессии микроРНК анализировали в исследовании He Z. и соавт. в СТГ-АГ, ПРЛ-АГ и НАГ, а также нормальной ткани гипофиза. По данным NGS они обнаружили 122, 70 и 30 микроРНК, дифференциально экспрессирующихся между СТГ-АГ, ПРЛ-АГ, НАГ, соответственно, по сравнению с нормальным гипофизом. Наиболее различающиеся микроРНК были в дальнейшем подтверждены методом RT-qPCR. Уровни экспрессий miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-338-5p и miR-375 оказались значительно ниже в группе ПРЛ-АГ по сравнению с контролем. В группе НАГ miR-493-5p и miR-124-3p были значительно подавлены, в то время как экспрессия miR-181b-5p была усилена по сравнению с контролем. В образцах СТГ-АГ экспрессия miR-184 была значительно усилена, тогда как экспрессия miR-124-3p была значительно снижена по сравнению с контролем [194]. Эти данные позволяют предположить, что эти микроРНК являются потенциальными биомаркерами различных типов АГ [194].

В другой работе Müssnich P. и соавт. проанализировали различия в характере экспрессии микроРНК между 12 гонадотропинами и нормальным гипофизом, выявив 44 повышенных и 57 подавленных микроРНК. Валидационный анализ этих дифференциально экспрессируемых микроРНК методом RT-qPCR, проведенной на более крупной серии из 21 гонадотропином (включая те, которые использовались для предыдущего анализа), выявил две микроРНК с пониженной экспрессией (miR-432 и miR-410) и две с повышенной экспрессией (miR-374b и miR-17). В дальнейшем при сравнении гонадотропином, 12 ПРЛ-АГ и 12 СТГ-АГ было выявлено повышение экспрессии miR-410 в большинстве ПРЛ-АГ и в половине СТГ-АГ, в отличие от гонадотропином [195]. МикроРНК miR-410 взаимодействовала с несколькими мРНК-мишенями, в частности с транскриптом гена G2/митоз-специфического циклина-B1 (*CCNB1*), который играет критическую роль в развитии опухолей гипофиза [195].

Было показано, что miR-410-3p может выступать в качестве микроРНК-супрессора опухолей, поэтому Grzywa T.M. и соавт. изучили ее участие в образовании опухолей гипофиза, проверив ее экспрессию у 75 пациентов с АГ (34 с гонадотропинами, 30 СТГ-АГ, 5 с АКТГ-АГ, 3 плюригормональных АГ и 3 НАГ) [196]. Экспрессия miR-410-3p оказалась различной для каждого типа АГ: повышена в СТГ-АГ, и снижена в гонадотропинах и НАГ. В экспериментах *in vitro* на клеточных линиях гонадотропином и АКТГ-АГ, микроРНК значительно увеличивала пролиферацию и инвазивность клеток, а также экспрессию *CCNB1* и способствовала активации сигнальных путей MAPK, PTEN/AKT и STAT3 ведя себя как онкогенная микроРНК, а на клеточных линиях СТГ-АГ был продемонстрирован противоположный эффект miR-410-3p, выступая как онкосупрессор [196].

В исследовании Mossakowska B.J. и соавт. различная экспрессия микроРНК изучалась в АГ у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга (n=28), а также молчащих АКТГ-АГ (n=20) [197]. Было выявлено 19 микроРНК различно экспрессирующихся между образцами АГ с манифестным синдромом Иценко-Кушинга (n=28) и молчащими АГ (n=20), мишенями которых являлись гены, регулирующие экспрессию кортикостероидных рецепторов. В клинически активных АКТГ-АГ было выявлено повышение экспрессии hsa-miR-124-3p и hsa-miR-135-5p и снижение экспрессии их генов-мишеней *NR3C1* и *NR3C2*. Роль hsa-miR-124-3p в регуляции *NR3C1* была дополнительно подтверждена *in vitro* с использованием клеток AtT-20/D16v-F2. В целом, полученные результаты указывают на относительно небольшую разницу в экспрессии микроРНК между клинически функционирующими и молчащими кортикотропинами [197].

Также различия в экспрессии микроРНК исследовались между инвазивными и неинвазивными аденомами гипофиза. Например, Zhou K. и соавт. проанализировали экспрессию miR-106b и гомолога фосфатазы и тензина (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN) в АГ, чтобы выяснить, способствует ли эта микроРНК пролиферации и инвазии опухолевых клеток гипофиза через сигнальный путь PI3K/АКТ при помощи регуляции экспрессии *PTEN* [198]. Экспрессию miR-106b и мРНК *PTEN* сравнивали в 29 образцах инвазивных АГ, 26 образцах неинвазивных АГ и 8 нормальных гипофизах. Экспрессия miR-106b оказалась значительно выше в тканях инвазивных АГ по сравнению с образцами неинвазивных АГ и нормального гипофиза. Значительных различий в экспрессии между двумя последними группами не наблюдалось. Уровень экспрессии белка PTEN в тканях инвазивных АГ был значительно ниже, чем в нормальных и неинвазивных АГ ($P < 0,01$). Метод qPCR и Вестерн-блот анализ показали, что снижение уровня miR-106b в клетках EC-1 или EC9706 приводило к повышению экспрессии *PTEN* как на уровне мРНК, так и на уровне белка, что указывает на то, что *PTEN* является прямой мишенью miR-106b. Анализ *in vitro* в клетках AtT-20, клеточной линии, полученной из АКТГ АГ мыши, показал, что miR-106b способствовал пролиферации и инвазии клеток AtT-20 через путь PI3K/АКТ путем снижения экспрессии PTEN. Результаты данного исследования показали, что miR-106b как онкоген регулирует пролиферацию и инвазию клеток опухоли гипофиза *in vitro* путем прямого воздействия на PTEN через сигнальный путь PI3K/АКТ [198].

На сегодняшний день одним из наиболее полных анализов циркулирующих микроРНК у пациентов с образованиями гипофиза является исследование Németh K. и соавт. [199]. Авторы включили в работу 45 пациентов с АГ, из которых 36 пациентам были исследованы микроРНК в крови до и после оперативного вмешательства. При сравнении со здоровыми добровольцами экспрессия микроРНК пациентов с АГ в плазме крови, в целом, была снижена. При сравнении до- и послеоперационных образцов плазмы крови в группах СТГ-АГ (n=8), ФСГ/ЛГ-АГ (n=20) и

НАГ (n=8) методом NGS отличия были выявлены по 3, 7 и 66 микроРНК соответственно. При валидации полученных результатов методом RT-qPCR было выявлено снижение экспрессии miR-143-3p в поздних послеоперационных образцах (3 месяца после хирургического вмешательства) плазмы по сравнению с предоперационными исключительно в ФСГ/ЛГ-АГ. Хотя изменение экспрессии микроРНК miR-26b-5p, miR-126-5p, miR-148b-3p и miR-150-5p с помощью RT-qPCR было сходно с результатами NGS, эти изменения не были статистически значимыми [199]. Авторы провели ROC-анализ, по результатам которого снижение уровня экспрессии miR-143-3p в плазме крови у пациентов с ФСГ/ЛГ-АГ позволяло дифференцировать до- и послеоперационные образцы пациентов с чувствительностью 81,8 % и специфичностью 72,3 % (площадь под кривой = 0,79; P = 0,02), что однако требует дальнейшего изучения [199].

Оценка циркулирующих микроРНК в периферической крови и в крови, оттекающей от гипофиза, проводилась также у пациентов с кортикотропиномой по сравнению с карциноидной опухолью другой локализации. В исследовании Belaya Zh.E. и соавт. приняли участие 12 пациентов с АКТГ-эктопированным синдромом, 28 пациентов с болезнью Иценко-Кушинга и 11 относительно здоровых добровольцев [200]. По результатам RT-qPCR были обнаружены статистически значимые различия в экспрессии miR-16-5p ($P < 0,001$; q = 0,001), miR-145-5p ($P = 0,008$; q = 0,087), miR-7g-5p ($P = 0,02$; q = 0,14) в периферической крови между группами БИК и АКТГ-эктопированным синдромом. Экспрессия miR-16-5p также отличалась между образцами здорового контроля и пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом. В работе Малыгиной А.А. и соавт. экспрессия микроРНК у пациентов с БИК и АКТГ-эктопированным синдромом была исследована при помощи метода NGS [201]. Выявлено 108 дифференциально экспрессирующихся микроРНК ($p < 0,05$). Более высокая экспрессия miR-383-3p, miR-4290 и miR-6717-5p и сниженная экспрессия miR-1203, miR-1229-3p, miR-639 были выявлены в крови оттекающей от гипофиза, по сравнению с АКТГ-эктопированным синдромом [201].

Vetrivel S. и соавт. в своей работе исследовали различия в экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с БИК, кортикостеромой и пациентами с подозрением на синдром Иценко-Кушинга, не подтвердившимся по диагностическим тестам [202]. По результатам NGS с дальнейшим подтверждением методом RT-qPCR была выявлена микроРНК miR-182-5p, экспрессия которой значимо отличалась между образцами БИК и контроля в независимой валидационной выборке, которую можно предложить в качестве возможного биомаркера БИК [202].

В исследовании Lutsenko A. и соавт. при сравнении профиля экспрессии циркулирующих микроРНК пациентов со спорадической акромегалией (n=47) и относительно здоровыми добровольцами (n=28) методом NGS с дальнейшим подтверждением RT-qPCR было выявлено снижение уровней miR-4446-3p и miR-215-5p в группе акромегалии по сравнению с контрольной

группой [203]. Различия в экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с акромегалией (n=20) по сравнению с контролем (n=30) исследовались также в работе Korkmaz H. и соавт. [204]. При помощи метода RT-qPCR были изучены уровни экспрессии miR-29c-3p, miR-31-5p, miR-18a-5p: miR-29c-3p была значительно ниже у пациентов с акромегалией по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). По уровням экспрессии miR-31-5p и miR-18a-5p значимых различий между группами не выявлено ($p = 0,375$ и $p = 0,649$, соответственно). Также авторы выявили, что у пациентов с отсутствием ремиссии акромегалии экспрессия miR-29c-3p было значительно снижена, по сравнению с пациентами с ремиссией при использовании аналогов соматостатина ($p = 0,016$) [204].

Исследование микроРНК у пациентов с синдромом МЭН-1 в АГ не проводилось.

В работе Luzi E. и соавт., проведенной на тканях нормальной **поджелудочной железы**, гастриноме и НЭО поджелудочной железы от пациента с генетически подтверждённым синдромом МЭН-1, были выявлены не только микроРНК, которые отличались между опухолями и контролем, но и микроРНК, отличающиеся между гастриномой и НЭО поджелудочной железы [205]. Сначала при помощи метода NGS авторы проанализировали специфический паттерн экспрессии микроРНК в нормальной поджелудочной железе, гастриноме и НЭО ПЖ, выявив различия в экспрессии микроРНК между всеми группами. В дальнейшем полученные результаты были подтверждены методом qRT-PCR. Тенденция изменения экспрессии панели микроРНК в целом совпала между данными NGS и RT-qPCR (в 6/7 случаев: miRNA-378-3p; miRNA-1468-5p; miR-625-5p; miR-215-5p; miR-1301-3p; miR-212-5p), а также соответствовала по уровню экспрессии микроРНК с клеточной линией BON1 (НЭО ПЖ), которая обычно используется в качестве референсной модели для НЭО [205].

В работе Bösch F. и соавт. исследовали профиль экспрессии микроРНК до и после лечения аналогами соматостатина у пациентов с НЭО ПЖ [206]. На первом этапе оценили профиль экспрессии 758 микроРНК в тканях НЭО ПЖ при помощи микрочипа у 8 пациентов с НЭО ПЖ до и после терапии и выявили 36 дифференциально экспрессируемых микроРНК. На втором этапе была проведена валидация полученных результатов методом qPCR на тех же 8 образцах до и после терапии аналогами соматостатина и выявлено, что данная терапия приводит к повышению экспрессии 3-х микроРНК (let-7c-5p, miR-24-3p, и miR-215-5p) и снижению экспрессии 12 микроРНК (miR-10a-3p, miR-185-3p, miR-339-5p, miR-371a-5p, miR-4436b-5p, miR-4653-3p, miR-4793-3p, miR-619-5p, miR-1226-3p, miR-3137, miR-4455 и miR-4656). Кроме того, авторы выявили 2 микроРНК let-7c-5p и miR-3137, которые оказались повышенными и пониженными соответственно при сравнении образцов каждого пациента друг с другом до и после терапии аналогами соматостатина [206]. Таким образом, авторы сделали вывод, что

аналоги соматостатина могут частично оказывать свое положительное действие посредством изменения профиля экспрессии микроРНК [206].

Также в работе Nyirő G. и соавт. с помощью различной экспрессии микроРНК исследовали возможность их использования в качестве биомаркеров для стратификации степеней НЭО ПЖ [207]. В общей сложности было использовано 33 образца НЭО ПЖ, 17 из которых являлись G1, 16 – G2. Вначале методом RT-qPCR были валидированы микроРНК, которые чаще всего упоминались в мировой литературе: экспрессия miR-130b-3p и miR-106b была значительно ниже в образцах G2 по сравнению с опухолями G1, в то время как miR-194-5p и miR-96-5p не показали значительных различий в экспрессии между двумя группами [207]. В дальнейшем в пяти образцах G1 и пяти образцах G2 была определена экспрессия микроРНК методом NGS с дальнейшим подтверждением результатов методом RT-qPCR. Из 6 микроРНК (miR-127-3p, miR-129-5p, miR-769-5p, miR-671-5p, miR-375-3p, и miR-30d-5p) демонстрирующих наибольшие различия между образцами G1 и G2, полученных методом NGS, было выявлено значительное снижение экспрессии только miR-30d-5p ($p = 0,0454$) в образцах G2 по сравнению с образцами G1. Остальные микроРНК не показали различий в экспрессии. При сравнении образцов с инсулиномой и НЭО ПЖ статистически значимых различий в уровнях экспрессии обнаружено не было. В дальнейшем авторы провели ROC-анализ и выявили панель микроРНК, при помощи которой возможно было разделить образцы на G1 и G2: комбинация miR-106b + miR-130b-3p + miR-127-3p + miR-129-5p + miR-30d-5p с чувствительностью 83,33 % и специфичностью 87,5% [207].

В настоящее время проводятся работы по поиску специфических для НЭО ПЖ циркулирующих микроРНК. Так, в исследовании Kövesdi A. и соавт. у пациентов с НЭО ПЖ определялась диагностическая ценность циркулирующих микроРНК в сочетании с хромогранином А [208]. В этом исследовании не было выявлено ни одной микроРНК, которая могла бы рассматриваться в качестве единственного биомаркера НЭО ПЖ, однако набор из пяти микроРНК (let-7b-5p, let-7i-5p, miR-143-3p, miR-30d-5p, miR-486-5p) в сочетании с повышенным уровнем хромогранина А по данным ROC-анализа обеспечил AUC 0,904 с чувствительностью 66,6% и специфичностью 96,5%. Тот же набор микроРНК был дифференциально экспрессирован у пациентов с феохромоцитомой/параганглиомой по сравнению со здоровыми людьми, что позволило авторам предположить, что в профилях микроРНК крови при опухолях нейроэндокринного происхождения происходят аналогичные изменения [208].

Оценка экспрессии микроРНК в сыворотке крови у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 ($n=9$) по сравнению с их здоровыми родственниками ($n=6$) проводилась в работе Kooblall K.G. и соавт. [209]. Анализ экспрессии циркулирующих

микроРНК производился методом NGS с последующей валидацией RT-qPCR, по результатам которого было выявлено, что у пациентов с синдромом МЭН-1 экспрессия miR-3156-5p значительно снижена по сравнению с их родственниками. Причем данная микроРНК была снижена только в образцах с наличием хотя бы 1 МЭН-1-ассоциированной опухоли, тогда как у 1 включенного пациента с хирургическим лечением ПППТ, НЭО ЖКТ экспрессия данной микроРНК не отличалась от относительно здоровых родственников. В ходе эксперимента на BON-1 клетках НЭО поджелудочной железы с нокаутом гена *MEN1* было отмечено, что подавление miR-3156-5p может быть следствием снижения экспрессии менина [209].

Таким образом, в обзоре акцентируется внимание на разграничении пациентов с фенотипами синдрома множественных эндокринных неоплазий от генетически подтвержденного синдрома МЭН-1, что является ключевым фактором в оценке риска развития опухолей и выборе оптимальных протоколов наблюдения, поскольку пациенты с истинным синдромом МЭН-1 имеют сниженную продолжительность жизни по сравнению с общей популяцией, и более агрессивное течение, чем пациенты с клиническими проявлениями МЭН-1 без мутаций. Сомнительно, что пациенты с определенным фенотипом МЭН-1 (сочетание АГ и поражения одной ОЩЖ), безотягощенного наследственного анамнеза и отсутствия мутаций подвержены риску развития других опухолей, ассоциированных с МЭН-1, и что тактика их ведения должна быть схожей с истинным синдромом МЭН-1. Использование математических моделей представляет собой перспективный инструмент для выявления генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с фенотипом МЭН-1. Дальнейшее усовершенствование существующих моделей или разработка новых позволит облегчить своевременное выявление пациентов с фенотипами синдрома МЭН-1, что поможет избежать неоправданного долгосрочного лабораторно-инструментального скрининга.

Кроме как случайного и генетических причин одновременного образования опухолей у пациентов с фенотипами синдрома МЭН-1, существуют и эпигенетические механизмы онкогенеза. В частности, микроРНК могут играть ключевую роль в одномоментном развитии образований в эндокринных железах, схожих с синдромом МЭН-1. Опухолевые клетки и стромальные компоненты опухоли представляют собой важный источник содержания некодирующих РНК в крови. По сравнению с нормальными клетками, опухолевые клетки выделяют по меньшей мере в десять раз больше внеклеточных везикул, которые содержат микроРНК, действуя как опухолевые супрессоры или онкогены в органах мишенях. Однако было также доказано, что клетки крови и эндотелиальные клетки также являются основными участниками пула циркулирующих микроРНК. Несмотря на это физиология эндокринных желез предполагает, что кровь, в целом, может служить репрезентативной средой, анализ которой

позволяет выявить наличие эндокринных образований. Кроме того, высокопроизводительные исследования РНК (секвенирование РНК методом NGS) у людей, продемонстрировали наличие тканеспецифичных некодирующих РНК в циркуляции, среди которых также были выявлены специфичные для эндокринных желез микроРНК. Эти данные обосновывают гипотезу о том, что циркулирующие в крови микроРНК могут использоваться для индикации физиологического состояния эндокринных желез, в том числе наличия эндокринных опухолей. Изучение экспрессии микроРНК в группе фенокопий синдрома МЭН-1 и сравнение их с истинным синдромом МЭН-1 поможет выявить как общие, так и различающиеся микроРНК, что в свою очередь в перспективе поспособствует определению возможной причины развития опухолей у пациентов с фенотипом МЭН-1.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

В соответствии с поставленными целями и задачами, в разделе 1 проведено одноцентровое одномоментное сравнительное исследование с ретроспективным сбором данных, включившее пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и его фенокопиями (всего 155 пациентов). В рамках данного исследования создана диагностическая модель на основе клинико-диагностических характеристик вышеуказанных пациентов. Для раздела 2 проведено ИГХ исследование экспрессии менина в тканях аденом гипофиза (всего 47 образцов) от пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, его фенокопиями и спорадической акромегалией. Для раздела 3 проведено одноцентровое исследование «случай-контроль» экспрессии микроРНК в плазме крови методом NGS (поисковый этап, всего 68 пациентов) и валидизация наиболее отличающихся микроРНК методом RT-qPCR (этап валидации, всего 80 пациентов, после проведения контроля качества и отбраковки невалидных образцов – 75 пациентов). Дизайн исследования представлен на рисунке 4.



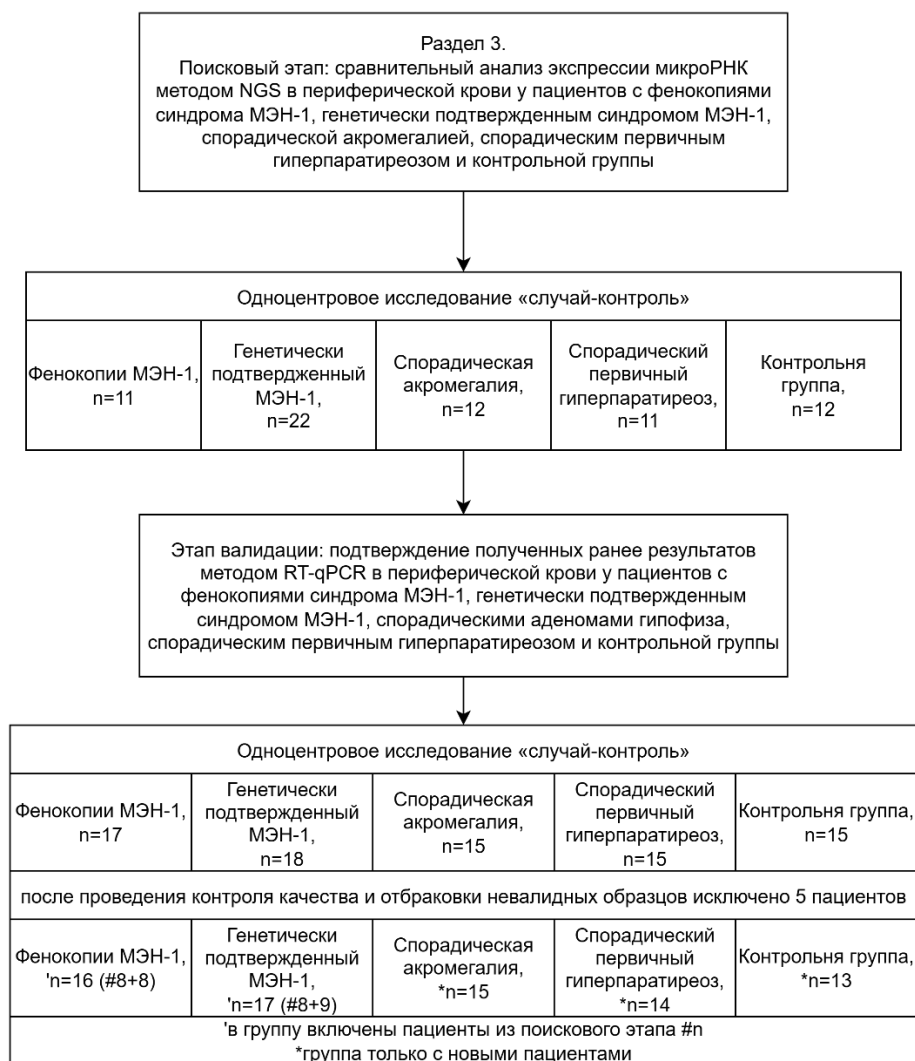


Рисунок 4 – Дизайн исследования.

2.2 Условия проведения

Набор пациентов проводился на базе ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России в отделении нейроэндокринологии и остеопатий с апреля 2019 г. по декабрь 2021 гг. (зав. отделением – д.м.н. Ж.Е. Белая) и отделениях нейроэндокринологии (зав. отделением – к.м.н. Е.Г. Пржиялковская) и остеопороза и остеопатий (зав. отделением – д.м.н. Ж.Е. Белая) с января 2022 г. по май 2023 г.

Молекулярно-генетическое тестирование пациентов проводилось в лаборатории генетики моногенных эндокринных заболеваний ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. отделением д.м.н. А.Н. Тюльпаков до 2020 г., далее – зав. отделением к.б.н. С.В. Попов).

Выделение, высокопроизводительное секвенирование и RT-qPCR микроРНК, MLPA произведены в лаборатории медико-генетического центра «Геномед».

Биоинформационный анализ проводился в лаборатории генетики Центра биомедицинских технологий Федерального научно-клинического центра ФМБА России (зав. лабораторией – к.б.н. А.Г. Никитин).

МРТ проводилась в отделении лучевой диагностики ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. отделением – д.м.н., проф. А.В. Воронцов до 2021 г.; далее – к.м.н Тарбаева Н.В.).

Гормональные и биохимические исследования проводились в клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. лабораторией – к.м.н. Л.В. Никанкина).

Оперативное лечение проводилось в нейрохирургическом отделении ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. отделением – д.м.н. А.Ю. Григорьев).

Морфологическое исследование проведено в отделе фундаментальной патоморфологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. отделением – д.м.н., проф. А. Ю. Абросимов до 2021 г.; далее – д.м.н. Л.С. Урусова).

2.3 Критерии соответствия

Критерии включения

Для исследования клинических характеристик пациентов и создания диагностической модели

В группу фенокопий синдрома МЭН-1: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше, с наличием двух и более опухолевых поражений эндокринных желез с отсутствием мутаций по данным NGS в панели генов-кандидатов; отсутствием крупных делеций/дупликаций кодирующей области *MEN1* по данным MLPA. В группу генетически подтвержденного МЭН-1: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше, с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 методом секвенирования по Сэнгеру или методом NGS. Формирование выборки пациентов – сплошное. Период набора: апрель 2019 – май 2023 гг.

Для исследования микроРНК в периферической крови методом NGS

В группу фенокопий синдрома МЭН-1: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше, в активной стадии (без лечения, либо с отсутствием ремиссии на фоне лечения) акромегалии и ПГПТ, с отсутствием мутаций по данным NGS в панели генов-кандидатов; отсутствием крупных делеций/дупликаций кодирующей области *MEN1* по данным MLPA. В группу генетически подтвержденного МЭН-1: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше, с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 методом секвенирования по Сэнгеру или методом NGS. Обязательное условие – наличие АГ как компонента синдрома МЭН-1. В группу спорадической акромегалии: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше; активная фаза акромегалии,

подтвержденная в соответствии с действующими клиническими рекомендациями [210]: характерные клинические проявления, повышение ИФР-1 (согласно возрастному референсному интервалу (РИ)) и отсутствие подавления секреции СТГ менее 1,0 нг/мл в ходе перорального глюкозотолератного теста (ПГТТ). Способ формирования выборки пациентов – сплошной. В группу спорадического ПППТ: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше; активная фаза ПППТ, подтвержденная в соответствии с действующими клиническими рекомендациями [19]: характерные клинические проявления, повышение общего кальция крови, скорректированного по альбумину кальция крови в сочетании с повышенным уровнем ПТГ, повышенной экскрецией кальция с мочой. Формирование выборки пациентов – сплошное. В группу здоровых добровольцев: субъекты обоих полов, в возрасте 18 лет и старше, отсутствие клинических проявлений эндокринных заболеваний. Формирование выборки здоровых добровольцев – произвольное. Период набора образцов пациентов и здоровых добровольцев: апрель 2019 – декабрь 2022 гг.

Для исследования микроРНК в периферической крови методом RT-qPCR

В группу фенокопий синдрома МЭН-1: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше, в активной стадии (без лечения, либо с отсутствием ремиссии на фоне лечения) акромегалии и ПППТ, болезни Иценко-Кушинга и ПППТ; с отсутствием мутаций по данным NGS в панели генов-кандидатов; отсутствием крупных делеций/дупликаций кодирующей области *MEN1* по данным MLPA. В группу генетически подтвержденного МЭН-1: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше, с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 методом секвенирования по Сэнгеру или методом NGS. Обязательное условие – наличие АГ как компонента синдрома МЭН-1. В группу спорадической акромегалии: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше; активная фаза акромегалии, подтвержденная в соответствии с клиническими рекомендациями [210]: характерные клинические проявления, повышение ИФР-1 (согласно возрастному референсному интервалу (РИ)) и отсутствие подавления секреции СТГ менее 1,0 нг/мл (менее 0,4 нг/мл) в ходе перорального глюкозотолератного теста. В группу спорадического ПППТ: пациенты обоих полов, от 18 лет и старше; активная фаза ПППТ, подтвержденная в соответствии с действующими клиническими рекомендациями [19]: характерные клинические проявления, повышение общего кальция крови, скорректированного по альбумину кальция крови в сочетании с повышенным уровнем ПТГ, повышенной экскрецией кальция с мочой. Формирование выборки пациентов – сплошное. В группу здоровых добровольцев: субъекты обоих полов, в возрасте 18 лет и старше, отсутствие клинических проявлений эндокринных заболеваний. Формирование выборки здоровых добровольцев – произвольное. Период набора образцов пациентов и здоровых добровольцев: декабрь 2022 – сентябрь 2023 гг.

Для ИГХ исследования тканей аденом гипофиза

Образцы тканей АГ, полученных в ходе трансназальной трансфеноидальной аденомэктомии пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, фенокопиями синдрома МЭН-1, спорадической акромегалией с апреля 2008 по декабрь 2020 гг. Формирование выборки пациентов – сплошное. Исследование проведено в 2021 г.

Критерии исключения

Для исследования клинических характеристик пациентов и создания диагностической модели

Отсутствие проведенного молекулярно-генетического тестирования для обеих групп пациентов.

Для исследования микроРНК в периферической крови

Группа фенокопий синдрома МЭН-1, спорадической акромегалии и ПППТ: возраст моложе 18 лет, ремиссия заболевания, период беременности и лактации, острые состояния. Группа генетически подтвержденного синдрома МЭН-1: возраст моложе 18 лет, период беременности и лактации, острые состояния. Группа здоровых добровольцев: возраст моложе 18 лет, период беременности и лактации, психические заболевания, онкологические заболевания, наличие острых заболеваний и декомпенсации хронических заболеваний на момент включения.

Для ИГХ исследования аденом гипофиза

Злокачественные новообразования, лучевая терапия, отсутствие генетического тестирования у пациентов с фенотипом МЭН-1.

2.4 Клиническое обследование пациентов

Осмотр включал сбор жалоб, анамнеза, в том числе сопутствующего и лекарственного, измерение массы тела и роста. Измерение массы тела проводилось с помощью медицинских весов с точностью до 100 г, пациенты были одеты в легкую комнатную одежду. Рост измерялся с помощью стадиометра с точностью до сантиметра, пациенты были без обуви и головного убора. ИМТ рассчитывался как масса тела (в килограммах), деленная на квадрат роста (метры). Информация о пациентах, включенных в исследование ретроспективно, собиралась на основании записей в электронной медицинской системе.

2.5 Лабораторные методы исследования

Забор крови из периферической вены выполнялся утром натощак в промежуток 8:00–10:00. Образцы центрифугировались при температуре 5°C и скорости вращения 3000 оборотов/мин в течение 20 минут (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов (A-4-81, F-4-81-MTP/Flex, 33 FA-45-30-11 и F-45-48-PCR)). Образцы сыворотки и плазмы немедленно замораживались и хранились при температуре -80°C.

ИФР-1 (возраст-специфические референсные диапазоны: 18-20 лет: 127- 584 нг/мл; 21-25 лет: 116-358 нг/мл; 26-30 лет: 117-329 нг/мл; 31-35 лет: 115-307 нг/мл; 36-40 лет: 109-284 нг/мл;

41-45 лет: 101-267 нг/мл; 46-50 лет: 94-252 нг/мл; 51-55 лет: 87-238 нг/мл; 56-60 лет: 81-225 нг/мл и 61-65 лет: 75-212 нг/мл) и СТГ (референсный диапазон: 0,6-6,9 нг/мл) измеряли иммунохемилюминесцентным методом на аппарате Liaison. Измерение уровня пролактина проводилось иммунохемилюминесцентным методом на автоматизированной системе Vitros 3600 (референсный диапазон: 69-340 мЕд/л). ПТГ (РИ 15–65 пг/мл), утренний АКТГ (РИ 7–66 пг/мл), кортизол после НПТ с 1 мг дексаметазона (отрезная точка для подавления 50 нмоль/л), кортизол в слюне в 23:00 (РИ 0,5–9,4 нмоль/л), а также свободный кортизол в суточной моче с предварительной экстракцией хлористым метиленом (РИ 60–413 нмоль/24 часа) оценивались электрохемилюминесцентным методом на анализаторе Cobas 6000 Module e601 (Roche, Швейцария). Биохимические показатели оценены на аппарате ARCHITECT c8000 (Abbott, США) с использованием реактивов того же производителя согласно стандартной методике: сывороточные концентрации общего кальция (РИ 2,15–2,55 ммоль/л), фосфора (РИ 0,74–1,52 ммоль/л), креатинина (РИ 63–110 мкмоль/л для мужчин, 50–98 мкмоль/л для женщин), альбумина (РИ 35–50 г/л). Поправка концентрации кальция в сыворотке на альбумин выполнялась по формуле: общий кальций сыворотки (ммоль/л) = измеренный общий кальций сыворотки (ммоль/л) + $0,02 \times (40 - \text{измеренный альбумин сыворотки (г/л)})$.

2.6 Инструментальные методы исследования

MPT головного мозга и MPT органов брюшной полости проводились на магнитно-резонансном томографе GE Optima MR450w 1,5T (США), а также на магнитно-резонансном томографе фирмы Siemens (Erlange, Германия) мощностью поля 1,5 Тесла с толщиной среза 3 мм для сагитальных и фронтальных изображений и 4 мм для аксиальных изображений с введением гадолиниевого контрастного препарата по показаниям.

УЗИ околощитовидных желез, щитовидной железы проводились на аппаратах Voluson E8 датчиками RAB 6-D, C1-5 (GE Healthcare, США) или Aplio 500 датчиком 6C1 (Toshiba, Япония).

КТ органов брюшной полости и забрюшинного пространства проводилась на мультidetекторном компьютерном томографе Optima CT660 фирмы General Electric. Толщина срезов при исследовании составляла 0,625 мм. Область сканирования – от диафрагмы до седалищных бугров. При необходимости выполнялось внутривенное болюсное контрастирование не ионным контрастным веществом (Йомепрол 400 мг/мл).

2.7 Гистологические и иммуногистохимические исследования

Морфологический анализ образцов аденом гипофиза выполнен в сотрудничестве с к.м.н. А.М. Лапшиной и включал гистологический и иммуногистохимический (ИГХ) методы исследования. В исследование были включены парафиновые блоки образцов тканей опухолей гипофиза, полученных в ходе трансназальной трансфеноидальной аденомэктомии, объем которых был достаточен для гистологического и иммуногистохимического исследований. Срезы

толщиной 3–4 мкм, которые наносили на адгезивные стекла (Menzel GmbH&Co KG, Германия), депарафинизировали, проводили демаскировку антигенов при помощи высоко- и низко pH-буферов (Leica). Далее окрашивали гематоксилином и эозином и проводили иммуногистохимические реакции с антителами (АТ), используемыми для определения типа секреции АГ и экспрессии менина: АТ к менину (Abcam ab2605), которые связывались с частью С-конца менина человека; АТ к пролактину (разведение, 1:600, Dako, поликлональные кроличьи), соматотропному (разведение 1:400, Dako, поликлональные кроличьи), адренотропному, фолликулостимулирующему, тиреотропному гормонам (Dako), Pit-1, T-box (Novus Bio), ERA (Abcam), низкомолекулярному цитокератину (разведение 1:100, моноклональные мышинные, клон CAM 5.2 Cell Marque).

ИГХ исследование выполнено с помощью автоматизированного аппарата (иммуностейнер Leica Bond Max) по стандартному протоколу. В соответствии с морфологической классификацией ВОЗ от 2017 года (исследование проведено в 2021 г. до появления новой классификации ВОЗ от 2022 г.), в исследованных образцах ткани опухоли гипофиза были разделены на плотногранулированные соматотропиномы (ПГС), редкогранулированные соматотропиномы (РГС), смешанные сомато- и лактотрофные аденомы (ССЛ). ПГС представлены оксифильными клетками (при окраске гематоксилином и эозином), с интенсивным окрашиванием цитоплазмы большинства опухолевых клеток с антителами к СТГ и САМ 5.2 (при ИГХ), РГС – опухоли гипофиза из оксифильных и хромофобных клеток (при окраске гематоксилином и эозином), с очаговой или слабо выраженной иммуноэкспрессией СТГ цитоплазмы опухолевых клеток и наличием фиброзных телец в более 75% клеток опухоли. ССЛ состоят из двух популяций клеток, каждая из которых имеет позитивное окрашивание на СТГ или пролактин. Кортикотропиномы были разделены на плотногранулированные (ПГ) – из базофильных клеток с интенсивным окрашиванием цитоплазмы большинства опухолевых клеток-кортикотрофов (при ИГХ), редкогранулированные (РГ) – из базофильных и хромофобных клеток с очаговой и слабо выраженной иммуноэкспрессией АКТГ цитоплазмой опухолевых клеток. Пролактиномы были разделены также на РГ – из относительно крупных хромофобных или слегка ацидофильных клеток с хорошо развитой, обильной эндоплазматической сетью и множеством незрелых секреторных гранул; ПГ – из ацидофильных клеток с множеством крупных секреторных гранул, эндоплазматическая сеть не так обильна, как при РГ подтипе.

При оценке экспрессии менина использовалась 4-балльная система оценки: отсутствие окраски обозначалось как 0; цитоплазматическая и ядерные окраски окраска в зависимости от степени выраженности окрашивания обозначались как с (слабая), ср (средняя), сл (сильная).

В качестве положительного контроля для АТ к менину в работу были взяты образцы ткани нормального гипофиза, полученные на аутопсии и после оперативного вмешательства без

признаков патологии. Также использовалась ткань нормальной поджелудочной железы после оперативного вмешательства по поводу НЭО поджелудочной железы.

2.8 Молекулярно-генетические исследования

Высокопроизводительное параллельное секвенирование, полноэкзомное секвенирование

Массовое параллельное секвенирование (next-generation sequencing, NGS) проводилось на платформе Illumina методом парно-концевого чтения (2x150 п.о.) с использованием таргетной панели, включавшей в том числе гены *MEN1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2C*, *CDKN2D*, *AIP*, *CASR*, *CDC73*, которые, по научным литературным данным и базы данных из OMIM, были описаны при фенотипе синдрома МЭН-1, и полноэкзомного секвенирования.

Подготовку полногеномной библиотеки (KAPA HyperPlus, Roche, Швейцария) и обогащение матрицы ДНК (KAPA HyperCapture, Roche, Швейцария) производили в соответствии с протоколами производителя (Roche (La Roche Ltd)). Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (HG38), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением компьютерных алгоритмов предсказания патогенности вариантов (SIFT, PolyPhen-2 HDIV, Polyphen-2 HVAR, PROVEAN, CADD). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы данные международного проекта gnomAD Exomes для экзонных вариантов и базы gnomAD Genomes для интронных вариантов. Для предсказания эффекта изменений в сайтах сплайсинга и прилежащих к сайту сплайсинга интронных участках использованы программы SpliceAI и AdaBoost. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM, HGMD и литературные данные. Заключение о клинической значимости найденных вариантов дано с учетом рекомендаций American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) и российского руководства по интерпретации данных NGS. В заключение включены только варианты, имеющие возможное отношение к клиническим проявлениям у пациента. Полиморфизмы, классифицированные по различным критериям как нейтральные, не включены в заключение. Анализовались панели, средняя глубина покрытия которых была не менее 70x, процент целевых нуклеотидов с эффективным покрытием >10x – не менее 97%.

Мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб

Пациентам с фенотипом МЭН-1 и отсутствием мутаций была проведена MLPA с использованием набора зондов SALSA MLPA Probemix P017 MEN1 (MRC-Holland, Нидерланды) и набора реагентов SALSA MLPA EK1-FAM (MRC-Holland, Нидерланды). Капиллярный электрофорез проводился на анализаторе ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США)

с использованием капилляра длиной 50 см и полимера POP-7 согласно рекомендациям производителя (протокол проведения MLPA доступен на сайте производителя <https://mlpa.com> или по запросу). В качестве маркера был использован размерный стандарт GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems, США). Первичную обработку полученных данных, а также фрагментный анализ проводили с использованием программного обеспечения Coffalyser.Net (MRC-Holland, Нидерланды).

Выделение микроРНК из плазмы

Выделение микроРНК проводилось из 200 мкл плазмы с использованием наборов miRNeasy Serum/Plasma Kit («Qiagen», Германия), согласно инструкции производителя, на автоматической станции QIAcube («Qiagen», Германия). Для предотвращения деградации РНК добавляли по 1 мкл RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Fisher Scientific», США). Концентрацию суммарной РНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare», Великобритания).

Количественная оценка транскриптов микроРНК с помощью NGS

Для проведения высокопроизводительного секвенирования отбирали образцы с концентрацией суммарной РНК в водном растворе не ниже 5 нг/мкл. Анализ экспрессии микроРНК был выполнен на высокопроизводительном секвенаторе NextSeq 500 с помощью TruSeq Small RNA Library Prep Kit («Illumina», США). Библиотеки были подготовлены с помощью QIAseq miRNA Library Kit в соответствии со стандартными протоколами производителя. Биоинформатический анализ полученных данных проводился с помощью программного обеспечения Cutadapt (удаление адаптеров), Bowtie2 (выравнивание прочтений), FastQC (контроль качества), Seqbuster (аннотация последовательностей микроРНК, анализ изомеров микроРНК). FastQC использовался в качестве инструмента для визуализации различных измерений контроля качества. Для каждого образца последовательности аннотировались с использованием баз данных человеческих pre-микроРНК и зрелых микроРНК, предоставленных в miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) с помощью SeqBuster.

Количественная оценка транскриптов микроРНК с помощью RT-qPCR

Исследование проведено 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. В качестве контролей выделения детектировали РНК UniSp2, UniSp4, UniSp5. Контроль обратной транскрипции проводили при помощи cel-miR-39-3p. Для получения значений пороговых циклов (cycle threshold, Ct) использовано программное обеспечение SDS (версия 2.3, Applied Biosystems, США). Значение Ct <40 выбрано в качестве

порогового для определения экспрессии микроРНК. Для сравнительной оценки циркулирующих микроРНК использован метод $\Delta\Delta C_t$, выполненный в пакете GraphPad Prism 8.

2.9 Статистический анализ

Были использованы пакеты прикладных программ IBM SPSS Statistics v23 (IBM, США) для Microsoft® Windows10, язык программирования R версии 4.3.3 с пакетом Bioconductor версии 3.18 (статистический анализ и графический вывод результатов по микроРНК, полученных в ходе NGS), GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США; статистический анализ и графический вывод результатов по микроРНК, полученных в ходе RT-qPCR). Размер выборки предварительно не рассчитывался ввиду редкости заболевания. Систематизация исходной информации осуществлялась в электронных таблицах Office Excel 2016 (Microsoft, США), имеющиеся пропуски в данных не заполнялись. Основные количественные характеристики пациентов представлены в виде медианы (Me) и интерквартильных интервалов [Q1; Q3]. Соотношения качественных признаков представлены в виде долей (%). Сравнение между количественными параметрами пациентов и группой относительно здоровых добровольцев проводили с использованием критериев Краскела-Уоллиса (3 и более независимые группы) и Манна-Уитни (2 независимые группы). Для сравнения качественных параметров использованы критерий хи-квадрат (когда число ожидаемых наблюдений в ячейках было 5 или более), точный критерий Фишера (когда число ожидаемых наблюдений в любой из ячеек четырех- или многопольной таблицы было менее 5) и критерий Фримена-Холтона (для таблиц 2x3, 3x3, с помощью онлайн-калькулятора <http://vassarstats.net/fisher2x3.html> и <http://vassarstats.net/fisher3x3.html>). Доверительные интервалы рассчитывались методом Клоппера-Пирсона с помощью онлайн-калькулятора (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/confintervals/>). Возрастную пенетрантность основных проявлений синдрома МЭН-1 у пациентов с мутациями и без оценивали по методу Каплана-Мейера. Сравнение кривых Каплана-Мейера у пациентов с мутациями и без проводилось с помощью логрангового критерия. Статистически значимым признавался уровень ошибки первого рода менее 5% ($p < 0,05$). Для коррекции проблемы множественных сравнений применялась поправка Бонферрони (кроме сравнений в уровнях экспрессии микроРНК, для которых применялся метод Бенджамини-Хохберга, встроенный в соответствующие вычислительные алгоритмы).

Статистический анализ и графических вывод результатов по микроРНК, полученных в ходе NGS, выполнялся в сотрудничестве с к.м.н. Солодовниковым Александром Геннадьевичем (Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург) с использованием программного обеспечения R версии 4.3.3 с пакетом Bioconductor версии 3.18. Итоговый анализ для получения данных по различиям в экспрессии микроРНК методом NGS проводился при помощи DESeq2 версии 1.42. Поправка на множественность сравнений осуществлялась методом

Бенджамини-Хохберга. Прочтения для каждого образца из экспериментальной фазы исследования высчитаны согласно присвоенным идентификаторам микроРНК. Для подсчета молекул использовалась кластеризация уникальных молекулярных идентификаторов (UMI). Для расчета различий в экспрессии использовались прочтения UMI. Прочтения нормализованы на общее количество прочтений в каждом образце и представлены как количество прочтений на 10000 (нормализованное количество прочтений). Для кластерного анализа использована иерархическая кластеризация с применением метода Евклидова расстояния.

Количественные данные, полученные из исходного анализа RT-qPCR, были преобразованы методом $\Delta\Delta C_t$ и рассчитана относительная экспрессия (Fold Change, FC, $(2^{-\Delta\Delta C_t})$) с базовой группой (относительно здоровые добровольцы). Затем значения FC сравнивались между группами при помощи критерия Краскела-Уоллиса с вычислением нескорректированного p -значения. Группы попарно сравнивались методом Манна-Уитни с вычислением скорректированного значения p для исключения ложного обнаружения различий при множественных сравнениях с использованием метода Бенджамини-Хохберга.

2.10 Способ определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с его фенотипами

Для разработки модели было проведено одномоментное сравнительное исследование пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1, находившихся на стационарном обследовании и лечении в отделениях нейроэндокринологии и остеопороза и остеопатии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России в период с мая 2015 по май 2023 гг. Программа разрабатывалась совместно с Вороновым К.А. (ООО «Статэндокс», Екатеринбург).

Признаки и прогнозируемые показатели

С помощью алгоритма Boruta [211] отбирались предикторы для обучения моделей. Данный алгоритм является оберточным методом отбора признаков и настроен на поиск минимального оптимального набора признаков, вместо всех возможных релевантных признаков, что приводит к несмещенному и устойчивому отбору важных предикторов. Дополнительно проводился поиск параметров, рекомендуемых программой на основании математических расчетов, для оптимального управления процессом обучения модели.

Подготовка данных и реализация диагностической модели

Предварительная обработка данных включала в себя удаление всех случаев, содержащих неполные данные, удаление признаков с околонулевой дисперсией (near-zero variance), отсеивание коллинеарных предикторов, проводилась нормализация и центрирование предикторов. Во избежание утечки данных (data leakage) вся предварительная обработка и трансформация выполнялись после разделения набора данных.

Разделение на обучающую/тренировочную (training set) и тестовую (test set) выборки проводилась по схеме 80/20 случайным стратифицированным отбором. С целью подтверждения соответствия распределения данных в обучающей и тестовой выборках выполнялся анализ с оценкой модифицированного многомерного расстояния Махаланобиса и тестированием нулевой гипотезы о соответствии распределений (методом Монте-Карло). Исходно общая группа пациентов с фенотипом МЭН-1 (n=155) случайным образом была разделена на две выборки в соотношении 80%:20% – для обучения (n=125) и для тестирования моделей (n=30).

Для идентификации наилучшей модели прогнозирования наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 (фенокопиями) применялась вложенная кросс-валидация с 5 внешними и 3 внутренними циклами (3x5 Nested Cross-Validation). Данный подход обеспечил более точную оценку ошибки обобщения (Generalization error) при одновременной оптимизации гиперпараметров и показал свою применимость в предметной области.

Обучение и оценка качества работы алгоритмов машинного обучения проводилось на тренировочном наборе данных. Для разработки модели определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 (фенокопиями) проводилось сравнение 8 алгоритмов машинного обучения: логистическая регрессия (Logistic Regression), метод k-ближайших соседей (k-nearest neighbors, kNN; k=11, пороговое значение 50%), наивный байесовский классификатор (Naive Bayes), бинарное дерево решений (CART), алгоритмы дерева решений C5.0, бутстрэп-агрегирование CART (Bagged CART), случайный лес (Random Forest), градиентный бустинг (Stochastic Gradient Boosting, GBM). Результаты эффективности полученных моделей сравнивались между собой путем анализа стандартных метрик, полученных из матрицы ошибок классификации (confusion matrix): 1. Диагностическая точность модели; 2. Площадь под кривой операционных характеристик – ROC (Receiver Operating Characteristic curve) AUC (Area Under Curve); 3. Чувствительность (Sensitivity); 4. Специфичность (Specificity); 5. Точность; 6 F₁-мера. Основными метриками для выбора финальной модели были ROC-AUC, чувствительность и специфичность. На финальном этапе выбранная модель проверялась на тестовом наборе данных.

2.11 Этическая экспертиза

Локальным Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России, согласно протоколу, постановлено, что планируемая научная работа соответствует этическим стандартам добросовестной клинической практики и может быть проведена на базе Института Клинической эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (протоколы заседания № 20 от 14 декабря 2016 г. и

№ 4 от 10 марта 2021 г.). Добровольное информированное согласие было подписано всеми пациентами и относительно здоровыми добровольцами, включенными в исследование.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Клиническая характеристика пациентов с фенотипом МЭН-1. Создание диагностической модели по определению вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа среди пациентов с его фенотипами

3.1.1 Клиническая характеристика пациентов с фенотипами синдрома МЭН-1 и сравнение их с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1

В ходе одномоментного сравнительного исследования проанализированы клиничко-анамнестические данные 155 пациентов с фенотипом МЭН-1 (пациенты распределены на две группы по окончательному клиническому диагнозу): 95 пациентов с мутациями и 60 пациентов без выявленных мутаций по данным генетического тестирования. Основные характеристики пациентов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Общая характеристика и основные лабораторно-инструментальные показатели включенных в исследование пациентов с фенотипом МЭН-1

Параметр	Пациенты с мутацией, n=95	Пациенты без мутации, n=60	P-value
Пол, жен, n (%)	63 (66,3)	54 (90,0)	0,001
Возраст на момент диагностики клинического МЭН-1, лет Me [Q1; Q3]	37 [30; 48]	61 [57; 67]	<0,001
Отягощенная наследственность, n (%)	59 (62,1)	3 (5,0)	<0,001
Сочетание АГ+ПППТ, n (%)	21 (22,1)	53 (88,3)	<0,001
Аденомы гипофиза			
▼Наличие аденомы гипофиза, n (%)	73 (76,8)	57 (95)	0,003
Манифестация с АГ, n (%)	37 (50,7)	47 (82,5)	<0,001
Возраст на момент диагностики АГ, лет, Me [Q1; Q3]	30 [22; 40]	55 [46; 61]	<0,001
Микроаденома, n (%)	45 (61,6)	22 (38,6)	0,009
Тип секреции			
СТГ-АГ, n (%)	9 (12,3)	39 (68,4)	<0,001
ПРЛ-АГ, n (%)	30 (41,1)	6 (10,5)	
Другие, n (%)	34 (46,6)	12 (21,1)	
Первичный гиперпаратиреоз			
▼Наличие ПГПТ, n (%)	91 (95,8)	58 (96,7)	1,000*
Манифестация с ПГПТ, n (%)	35 (38,5)	12 (20,7)	0,023

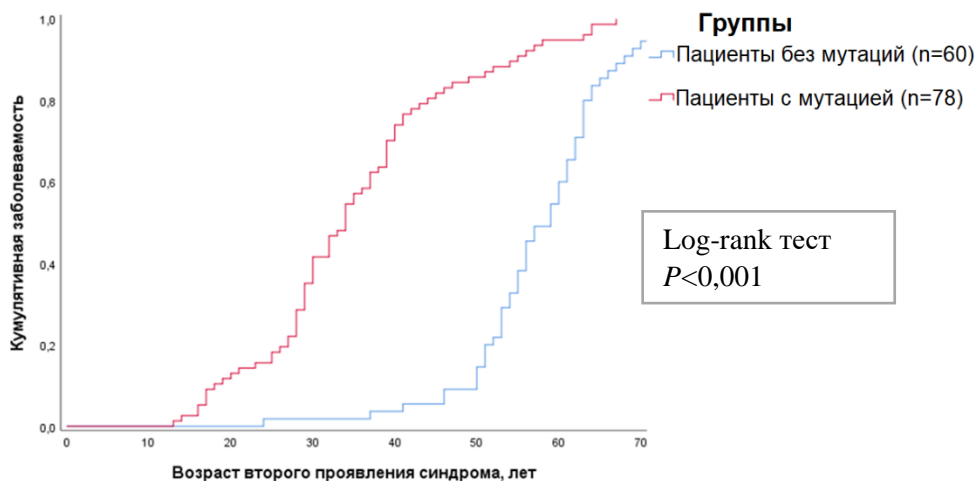
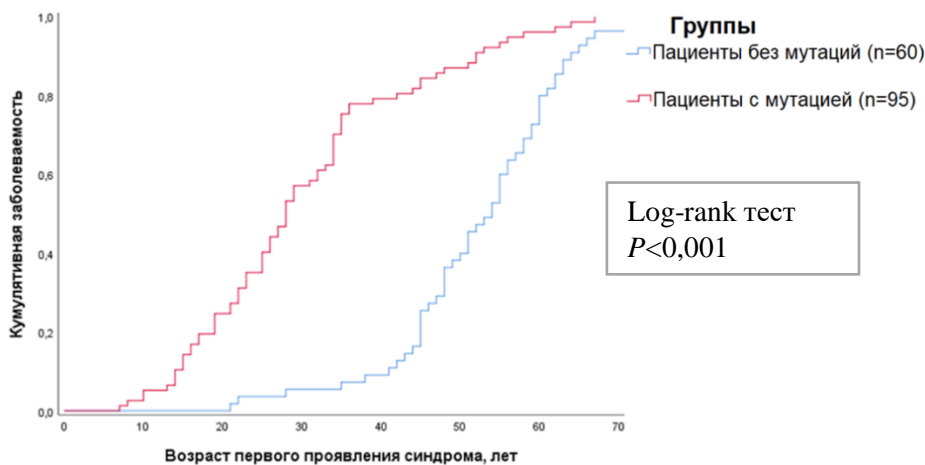
Возраст на момент диагностики ПГПТ, лет, Ме [Q1; Q3]	33 [26; 41]	57 [53; 62]	<0,001
Количество ОЩЖ, Ме [Q1; Q3]	3 [2; 4]	1 [1; 1]	<0,001
ПТГ до операции, пг/мл, Ме [Q1; Q3]	127,0 [92,3; 170,0]	124,7 [89,7; 153,6]	0,298
Кальций общий, до операции, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	2,74 [2,60; 2,86]	2,66 [2,57; 2,75]	0,023
Кальций скорр. по альбумину, до операции ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	2,58 [2,45; 2,66]	2,61 [2,51; 2,70]	0,247
Фосфор, до операции ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	0,9 [0,82; 1,02]	1,03 [0,89; 1,18]	0,008
Креатинин, мкмоль/л, до операции, Ме [Q1; Q3]	68,2 [63,8; 76,7]	66,55 [59,60; 72,60]	0,175
Рецидив ПГПТ, n (%)	32 (52,5)	2 (8,7)	<0,001
Наличие мочекаменной болезни, n (%)	43 (45,3)	33 (55,9)	0,251
Наличие язвенной болезни желудка, n (%)	14 (14,7)	6 (10,2)	0,380
Остеопороз, n (%)	32 (35,2)	31 (53,4)	0,028
Нейроэндокринные новообразования			
▼Наличие НЭО ПЖ, n (%)	68 (71,6)	5 (8,3)	<0,001
Манифестация с НЭО ПЖ, n (%)	23 (33,8)	1 (20)	0,661*
Возраст на момент диагностики НЭО ПЖ, лет, Ме [Q1; Q3]	32 [26; 40]	59 [58; 59]	0,004
▼Другие НЭО, n (%)	14 (14,8)	4 (6,8)	0,127
Другие образования			
▼Образование надпочечника, n (%)	39 (41,1)	19 (31,7)	0,240
▼Наличие узловых образований в щитовидной железе, n (%)	30 (32,3)	42 (71,2)	<0,001
Папиллярный рак щитовидной железы, n (%)	4 (13,3)	2 (4,2)	0,390*
▼Наличие других опухолей, n (%)	40 (42,1)	19 (31,7)	0,192

Примечание: Сравнение качественных параметров проводилось при помощи критерия хи-квадрата Пирсона (кроме параметров, отмеченных «*»), для которых применялся двусторонний точный критерий Фишера). Сравнение количественных параметров – при помощи критерия Манна-Уитни. Поправка на множественность сравнений проводилась методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считался $p < 0,002$ ($0,05/33$; полужирным

выделены статистически значимые уровни p). Доли признаков, отмеченных знаком «▼», посчитаны от общего числа пациентов; доли характеристик этих признаков посчитаны по количеству пациентов с наличием этого признака. НЭО – нейроэндокринная опухоль; АГ – аденома гипофиза; ПЖ – поджелудочная железа; ПГПТ – первичный гиперпаратиреоз; ОЩЖ – околощитовидная железа; СТГ – соматотропный гормон; ПРЛ – пролактин.

В группе без мутаций отмечено выраженное преобладание женского пола над мужским (9:1), тогда как в группе с мутациями соотношение мужчин и женщин составило 1:2. Семейный анамнез намного чаще был отягощен у пациентов с мутациями, чем у пациентов без мутаций (62,1% (95% ДИ 51,57–71,86%) и 5% (95% ДИ 1,04–13,92%), соответственно).

Как и предполагалось, возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1 был выше у пациентов без мутаций, чем с мутациями в 1,5 раза. Так, манифестация первого компонента синдрома у пациентов без мутаций наступила на 26 лет позже (54 года [45; 60] и 28 лет [21; 35], соответственно, $P < 0,001$, рис. 5). Пациенты из группы фенокопий синдрома МЭН-1 также были значительно старше при диагностике второй эндокринной опухоли синдрома МЭН-1 (59 лет [53; 63] и 34 года [28; 41], $P < 0,001$, рис. 5). Все три основных проявления синдрома МЭН-1 в группе без мутаций выявлены только у 4/60 пациентов, а в группе с мутациями – в 50/95 случаях ($P < 0,001$). Возраст манифестации третьего основного компонента также был выше в группе без мутаций – 63,5 года [58,5; 70] и 34 лет [29; 41] соответственно ($P < 0,001$, рис. 5).



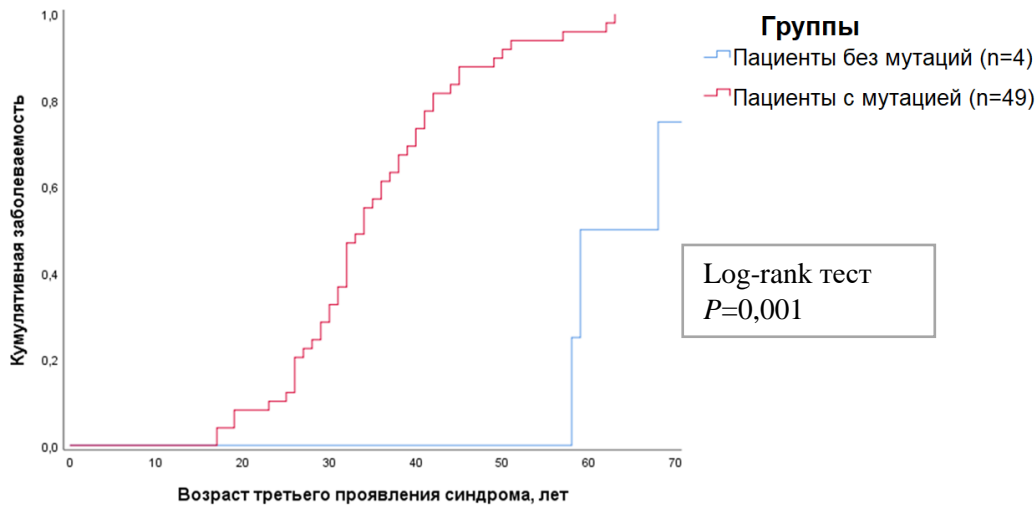
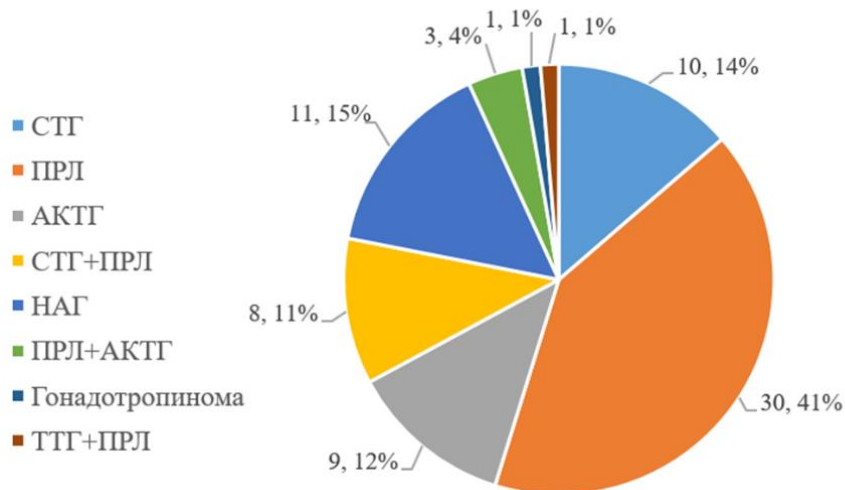


Рисунок 5 – Возраст манифестации основных эндокринных образований у пациентов с фенотипом МЭН-1.

Медиана возраста на момент диагностики АГ была меньше на 25 лет в группе с мутациями (30 лет [22; 40]), чем без (55 лет [46; 61], $P<0,001$). Частота возникновения АГ существенно не отличалась между группами пациентов с мутацией (76,8%) и без (95%). Однако заболевание намного чаще манифестировало с АГ в группе без мутаций ($P<0,001$), при этом большинство АГ были макроаденомами и секретировали СТГ. Тогда как в группе с мутациями чаще у пациентов выявлялись микроаденомы, секретирующие пролактин (рис. 6).

Тип секреции аденом гипофиза у пациентов с мутациями



Тип секреции аденом гипофиза у пациентов без мутаций

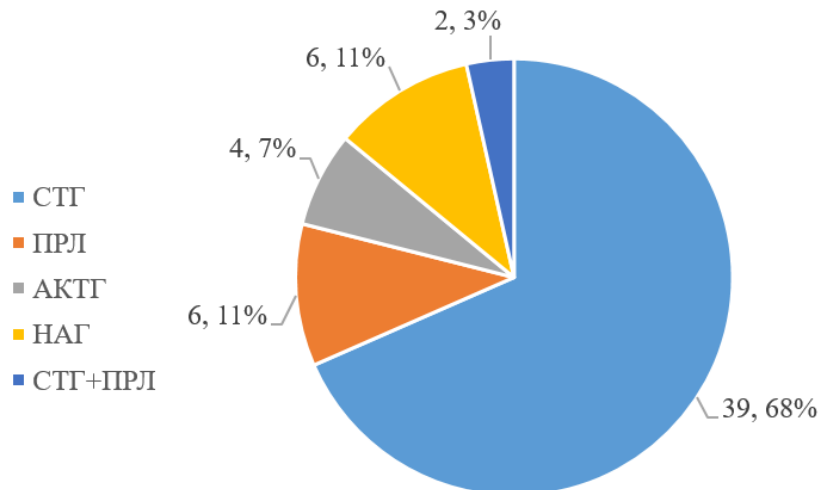


Рисунок 6 – Распределение аденом гипофиза по типу секреции в обеих группах. Данные представлены в виде абсолютных значений и относительных частот (n, %). СТГ – соматотропный гормон; ПРЛ – пролактин; АКТГ – адренокортикотропный гормон; НАГ – неактивная аденома гипофиза; ТТГ – тиреотропный гормон.

В группе без мутаций хирургическое лечение АГ было проведено 33/57 пациентам, в основном с акромегалией (27/33, 82%), а только медикаментозная терапия – у 17/57. Медикаментозная терапия была назначена 9 пациентам с СТГ-АГ (отказ от оперативного вмешательства) и 8 пациентам с ПРЛ-АГ. Из оставшихся 7 пациентов у 6 пациентов АГ являлись гормонально-неактивными, и не требовали какого-либо лечения, а пациентке с АКТГ-секретирующей АГ в анамнезе была проведена лучевая терапия с последующей ремиссией заболевания. У пациентов с мутациями, учитывая характер секреции АГ, хирургическое лечение было проведено только у 22/73 (30%) пациентов, с примерно равным распределением по типам АГ. Медикаментозная терапия назначалась 34/73 пациентам, причем у большинства из них (67%) АГ секретировали пролактин. Из оставшихся 17 пациентов 15 имели НАГ, а двум пациентам с АКТГ-АГ в анамнезе была проведена лучевая терапия, которая привела к ремиссии в одном случае, и к дальнейшей двусторонней адреналэктомии из-за отсутствия ремиссии в другом.

У пациентов без мутаций диагноз ПГПТ был поставлен на 2 десятилетия позже, чем у пациентов с мутациями (57 лет [53; 62] и 33 года [26; 41], $P < 0,001$). В группе с генетически верифицированным синдромом МЭН-1 наблюдалось значительно большее количество случаев множественного поражения ОЩЖ ($P < 0,001$) и рецидива ПГПТ ($P < 0,001$) по сравнению с фенокопиями синдрома МЭН-1. В группе без мутаций поражение одной ОЩЖ было в 42 случаях, двух – в 6 случаях, трех – в 1 случае, по сравнению с группой пациентов с мутациями: 9, 18, 30 случаях, соответственно, а также поражение четырех ОЩЖ в 28 случаях и пяти – в 4.

По данным минерального обмена, наличию ПГПТ, равно как и по осложнениям ПГПТ различий между группами выявлено не было.

Из основных компонентов синдрома МЭН-1 сочетание АГ и ПГПТ намного реже встречалось в группе с мутациями (22,1%), тогда как в группе без мутаций почти во всех случаях имелось только это сочетание (88,3%). Как и предполагалось, НЭО ПЖ преимущественно присутствовали в группе с мутациями, чем без (71,6% и 8,3%, $P<0,001$), и, в основном, представляли собой гормонально-неактивные НЭО (рис. 7). У всех пациентов с НЭО ПЖ в группе без мутаций образования были гормонально-неактивными. Возраст манифестации НЭО ПЖ также был моложе в группе с мутациями, чем в группе с фенокопиями синдрома МЭН-1.

Тип секреции нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы у пациентов с мутациями

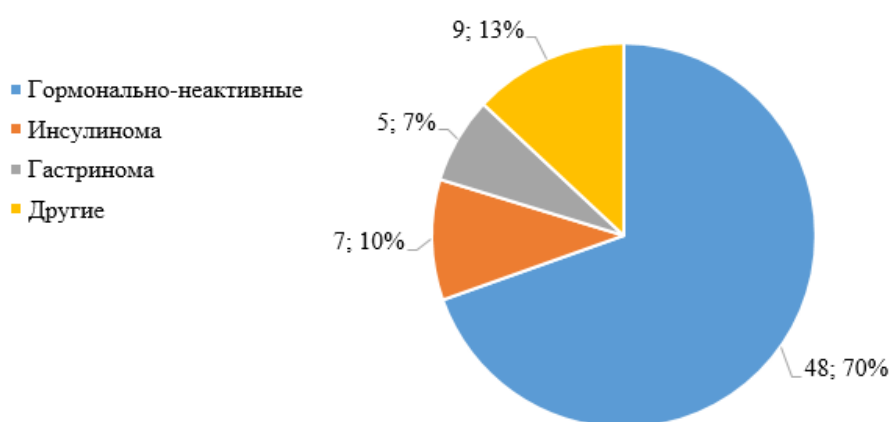


Рисунок 7 – Распределение нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы по типу секреции. Данные представлены в виде абсолютных значений и относительных частот (n; %).

В 23/68 случаев в группе с мутациями заболевание манифестировало с НЭО ПЖ, в группе фенокопий синдрома МЭН-1 – только в одном случае. Между группами не было отмечено различий по наличию иных опухолей, образований надпочечников и НЭО других локализаций. Однако в группе фенокопий НЭО в основном были в ЖКТ, тогда как в группе с мутациями – в легких и тимусе (таблица 4).

Таблица 4 – Другие нейроэндокринные образования у пациентов с фенотипом МЭН-1

Параметр	Пациенты с мутацией, n	Пациенты без мутации, n
НЭО легких	12	1
НЭО тимуса	2	–
НЭО желудка	–	2
НЭО подвздошной кишки	–	1

Примечания: НЭО – нейроэндокринные образования, МЭН-1 – синдром множественных эндокринных неоплазий.

В группе без мутаций чаще выявлялись узловые образования щитовидной железы, по сравнению с группой с мутациями, возможно из-за более старшего возраста пациентов с

фенокопиями. Тем не менее, статистически значимой разницы в частоте папиллярного рака щитовидной железы между двумя группами выявлено не было.

3.1.2 Создание диагностической модели по определению вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа среди пациентов с его фенокопиями

Исходно общая группа пациентов с фенотипом МЭН-1 ($n=155$; исследование 3.1) случайным образом была разделена на две выборки в соотношении 80%:20% – для обучения ($n=125$) и для тестирования моделей ($n=30$).

Далее был выполнен отбор наиболее информативных переменных с помощью метода случайного леса и алгоритма Boruta [211]. В качестве потенциальных параметров рассматривались исходные клинические показатели пациентов, представленные в таблице 3. По окончании процедуры отбора каждый признак получил значение, которое выражает степень его информативности. Чем выше значение, тем ценнее этот признак для прогнозирования и классификации. В результате был получен перечень признаков, которые можно ранжировать в соответствии с их значимостью для решения задачи классификации (рис. 8).

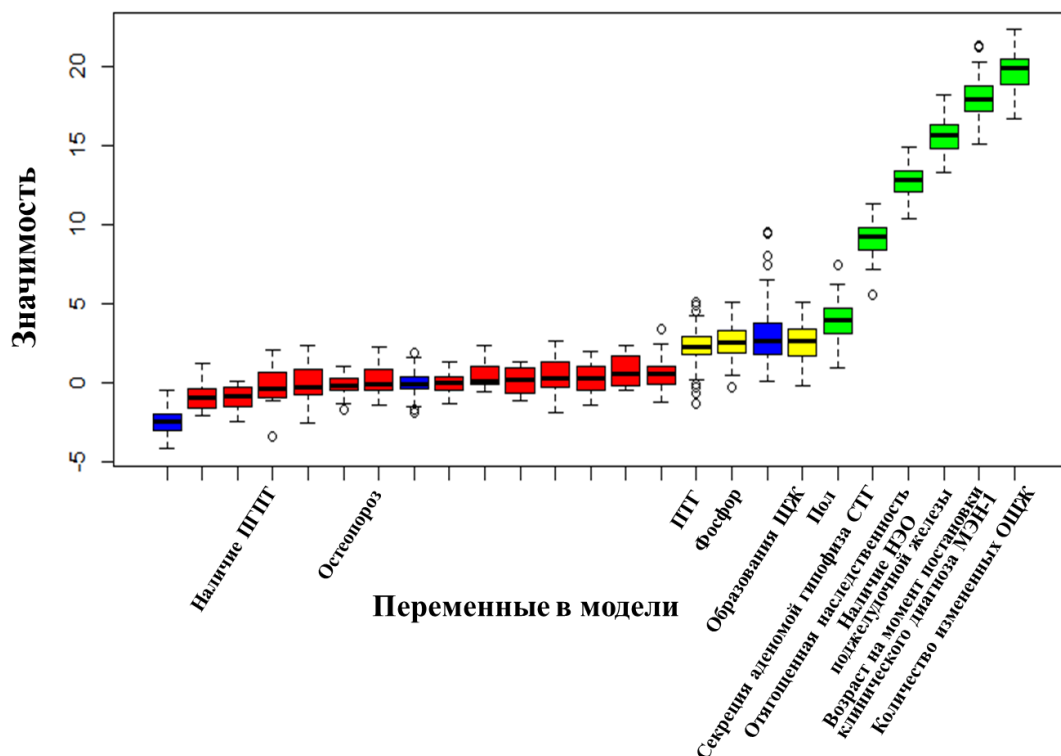


Рисунок 8 – Ранжирование отдельных признаков по степени влияния на потенциал модели. На графиках зеленым цветом обозначены признаки, вошедшие в модель и являющиеся значимыми; красным цветом – признаки вне модели; желтым – признаки, почти достигшие значимого результата; синим цветом показана важность для значений теневых признаков. ПТГ –

паратгормон, ЩЖ – щитовидная железа, СТГ – соматотропный гормон, НЭО – нейроэндокринное образование, ОЩЖ – околощитовидная железа.

Финальными переменными для классификации и прогнозирования наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 (фенокопиями) стали:

1. Количество измененных ОЩЖ;
2. Возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1;
3. Наличие НЭО поджелудочной железы;
4. Отягощенная наследственность;
5. Секреция аденомой гипофиза СТГ;
6. Пол.

Переменные, оказавшиеся менее релевантными, были удалены из анализа (рис. 8).

Для обучения моделей использовался тренировочный набор данных (n=125, обучающая выборка). Сравнение параметров эффективности диагностических моделей, полученных после применения алгоритмов машинного обучения к обучающей выборке, представлено в таблице 5. Основными метриками для выбора финальной модели были ROC-AUC, чувствительность и специфичность.

Таблица 5 – Сравнение эффективности моделей в прогнозировании наличия мутации у пациентов с фенотипом МЭН-1

Модель	Площадь под ROC-кривой (AUC)	Чувствительность, %	Специфичность, %
Logistic Regression	0,945 [0,924; 0,947]	92 [86,3; 92,0]	83,3 [75; 87,5]
kNN	0,958 [0,925; 0,976]	84 [80,5; 88,0]	97,9 [96,9; 100,0]
Naive Bayes	0,951 [0,930; 0,964]	88 [82,5; 92,0]	89,6 [84,4; 93,8]
CART	0,815 [0,801; 0,831]	76 [72,6; 82,0]	85,4 [78,1; 90,6]
C5.0	0,950 [0,926; 0,968]	92 [88,3; 92,0]	77,1 [65,6; 87,5]
Bagged CART	0,921 [0,901; 0,936]	92 [86,3; 92,0]	70,8 [59,4; 78,1]
Random Forest	0,970 [0,933; 0,974]	92 [86,3; 94,0]	83,3 [75; 90,6]
Generalized Boosted Modeling	0,938 [0,915; 0,958]	92 [86,3; 92,0]	79,2 [68,8; 90,6]

При оценке вышеуказанных параметров наилучшие значения AUC показали модели случайного леса (Random Forest) и k-ближайших соседей (k-nearest neighbors, kNN), однако в рамках приведенных дисперсий значений AUC можно говорить об эквивалентности моделей, за исключением модели CART, которая показала наихудшие значения. Значения чувствительности также не различаются в рамках доверительных интервалов, за исключением модели CART. Наилучшее значение специфичности показала модель k-ближайших соседей (k-nearest neighbors, kNN) среди всех проверенных моделей.

Таким образом оптимальный алгоритм для определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа среди пациентов с его фенокопиями можно реализовать на модели kNN.

Результаты проверки точности классификации, сделанной методом kNN, на тестовой выборке (n=30) представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6 – Таблица сопряженности для анализа диагностической эффективности метода k-ближайших соседей на тестовой выборке

Метод k-ближайших соседей	Диагноз подтверждён при молекулярно-генетическом исследовании		Сумма
	Наличие мутации	Отсутствие мутации	
Выявлено	17	–	17
Не выявлено	1	12	13
Сумма	18	12	30

Таблица 7 – Метрики качества диагностической модели при помощи метода k-ближайших соседей (k-nearest neighbors, kNN), полученные после применения к тестовой выборке

Модель	Диагностическая точность	Чувствительность	Специфичность	Точность	F1-мера	ROC-AUC
kNN	96,7%	94,4%	100,0%	100,0%	0,971	1,0

Диагностическая точность разработанной модели для определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 (фенокопиями) составила 96,7%: выявление пациентов с фенотипом МЭН-1 и мутацией с вероятностью верного заключения (прогностическая ценность положительного результата) составляет 100%; исключение пациентов с фенотипом МЭН-1 с мутациями с вероятностью верного заключения (прогностическая ценность отрицательного результата) – 92,3%. Данный способ позволяет с чувствительностью 94,4% и специфичностью 100% определить вероятность наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1.

Заявляемый способ может представлять собой инструмент для поддержки принятия врачебных решений. На выходе врач получает вероятность наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 (фенокопиями), выраженную в процентах. Диагностическая модель реализована в виде калькулятора (рис. 9) и доступна по ссылке: <https://r-datascience.shinyapps.io/mencalc/>.

Пол (муж/жен)	Женщина
Возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1	50
Отягощенная наследственность (родственники с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1) (да/нет)	Нет
Количество пораженных околощитовидных желез	1
Наличие нейроэндокринного новообразования поджелудочной железы (да/нет)	Нет
Секреция аденомой гипофиза соматотропного гормона (да/нет)	Да
Вероятность синдрома, %	8.33

Рисунок 9 – Калькулятор для определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа среди пациентов с его фенотипами.

Клинический пример 1

Пациентка И., 58 лет, поступила в отделение остеопороза и остеопатии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России. Результаты опроса и обследования пациентки И. в стационаре представлены на рисунке 10.

Пол (муж/жен)	Женщина
Возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1	54
Отягощенная наследственность (родственники с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1) (да/нет)	Нет
Количество пораженных околощитовидных желез	1
Наличие нейроэндокринного новообразования поджелудочной железы (да/нет)	Нет
Секреция аденомой гипофиза соматотропного гормона (да/нет)	Да
Вероятность синдрома, %	9.09

Рисунок 10 – Результаты обследований пациентки И., введенные в калькулятор.

Согласно расчету модели, у данной пациентки вероятность наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1 составляет 9,09%, то есть в данном случае модель позволяет сделать вывод в пользу наличия у пациентки И. фенотипа синдрома МЭН-1 с

отсутствием мутаций и исключить проведение углубленного генетического тестирования и необходимость проведения долгосрочного регулярного обследования.

Для подтверждения, полученного с помощью разработанного способа вывода, оценены данные генетического тестирования с использованием полноэкзомного секвенирования и МЛРА. Мутации в генах-кандидатах *MEN1*, *CDKN1B*, *AIP*, *CASR*, *CDC73*, а также других вошедших в исследование генов, способных приводить к фенотипу МЭН-1 выявлено не было. Таким образом, заключения, сделанные на основании разработанного способа и результатов молекулярно-генетического исследования, совпали.

Клинический пример 2

Пациент Р., 30 лет, поступил в отделение нейроэндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России. Результаты опроса и обследования пациента Р. в стационаре представлены на рисунке 11.

The image shows a web-based clinical calculator interface. It contains several input fields with dropdown menus and text boxes. The data entered is as follows:

Пол (муж/жен)	Возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1	Отягощенная наследственность (родственники с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1) (да/нет)	Количество пораженных околощитовидных желез	Наличие нейроэндокринного новообразования поджелудочной железы (да/нет)	Секреция аденомой гипофиза соматотропного гормона (да/нет)	Вероятность синдрома, %
Мужчина	30	Да	2	Да	Нет	100

Рисунок 11 – Результаты обследований пациента Р., введенные в калькулятор.

Согласно расчету модели, у данного пациента вероятность наличия мутации составляет 100%, то есть в данном случае модель позволяет сделать вывод в пользу наличия у пациента Р. мутации, приводящей к клинической картине МЭН-1, что позволяет рекомендовать проведение генетического тестирования, в том числе и родственников, и регулярного скрининга.

Для подтверждения, полученного с помощью разработанного способа вывода, оценены данные генетического тестирования с использованием полноэкзомного секвенирования. Выявлена мутация в гене *MEN1*, NM_001370259.2(*MEN1*): c.1673_1675del (p.Met558del). Таким образом, заключения, сделанные на основании разработанного способа и результатов молекулярно-генетического исследования, совпали.

Клинический пример 3

Пациент К., 53 лет, поступил в отделение остеопороза и остеопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России. Результаты опроса и обследования пациента К. в стационаре представлены на рисунке 12.

Пол (муж/жен)
Мужчина

Возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1
53

Отягощенная наследственность (родственники с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1) (да/нет)
Нет

Количество пораженных околощитовидных желез
4

Наличие нейроэндокринного новообразования поджелудочной железы (да/нет)
Да

Секреция аденомой гипофиза соматотропного гормона (да/нет)
Да

Вероятность синдрома, % ↑↓
90.91

Рисунок 12 – Результаты обследований пациента К., введенные в калькулятор.

Согласно расчету модели, у данного пациента вероятность наличия мутации составляет 90,91%, то есть в данном случае модель позволяет сделать вывод больше в пользу наличия у пациента К. мутации, приводящей к клинической картине МЭН-1, что позволяет рекомендовать проведение генетического тестирования, в том числе и родственников, и регулярного скрининга.

Для подтверждения, полученного с помощью разработанного способа вывода, оценены данные генетического тестирования с использованием полноэкзомного секвенирования. Выявлена мутация в гене *MEN1* NM_001370259.2(*MEN1*):c.658T>C (p.Trp220Arg). Таким образом, заключения, сделанные на основании разработанного способа и результатов молекулярно-генетического исследования, совпали.

3.1.3 Обсуждение полученных результатов

В этой части исследования изучены клинические характеристики пациентов с генетически верифицированным синдромом МЭН-1 (n=95) и пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 (n=60) у которых не было обнаружено мутаций по данным таргетной панели, включавшей, в том числе, гены *MEN1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2C*, *CDKN2D*, *AIP*, *CASR*, *CDC73*, полноэкзомного секвенирования, MLPA (*MEN1*).

В нашей работе отмечено выраженное преобладание женского пола над мужским (9:1) в группе фенокопий синдрома МЭН-1, по сравнению с пациентами в группе с мутациями (2:1), что сопоставимо с данными литературы [2, 144]. Небольшое преобладание женщин над мужчинами

в группе пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 сравнимо с результатами ряда крупных исследований, несмотря на, как правило, одинаковую частоту встречаемости данного заболевания у обоих полов ввиду типа наследования [12–15, 141].

Отягощенная наследственность присутствовала у 3/60 (5%) пациентов в группе фенокопий синдрома МЭН-1, в то время как у пациентов с мутациями – больше, чем в половине случаев (59/95). В других работах пациенты с отсутствием мутаций и фенотипом МЭН-1 также, в большинстве своем, не имели родственников с подобными проявлениями [144], либо процент выявления семейного характера заболевания варьировался от 4% (1/77) до 31% (12/39) [141–142]. Высокий процент семейного характера заболевания в исследовании Pieterman C.R.C. и соавт. [142] был скорее всего обусловлен тем, что только 69% пациентам с крайне подозрительными характеристиками в отношении мутаций в гене *MEN1* (отягощенная наследственность/молодой возраст установки диагноза клинического МЭН-1/наличие 3-х компонентов синдрома) выполнялся анализ для исключения крупных делеций и дупликаций.

Возраст постановки диагноза генетически верифицированного синдрома МЭН-1 зависит от клинических симптомов заболевания и методов диагностики, но обычно соответствует молодому, тогда как у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, чаще всего приходится на шестое-седьмое десятилетие [2, 3, 18, 75, 212]. В нашем исследовании пациенты без мутаций имели возраст, на момент постановки клинического диагноза МЭН-1 в 1,5 раз больше (37 лет [30; 48] vs 61 год [57; 67]), чем у пациентов с мутациями. И, соответственно, возраст манифестации первого, второго и третьего проявлений синдрома также был моложе у пациентов с мутациями, чем у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1: на 26, 25 и 14 лет соответственно.

В нашей работе у 53/60 (88,3%) пациентов в группе фенокопий синдрома МЭН-1 выявлено сочетание АГ+ПГПТ, тогда как в группе с мутациями такое сочетание отмечено лишь в 21/95 (22,1%) случаев, что в целом сопоставимо с данными литературы [117, 119, 143, 213]. Как в исследовании de Laat J.M. и соавт. [141], так и в работе Pieterman CRC и соавт. [142] также отмечено преобладание сочетания АГ+ПГПТ среди пациентов без мутаций (76,7% и 69,2%, соответственно), в то время как у пациентов с мутациями такое сочетание встречалось примерно в 39% случаев. Только у 4/60 пациентов нашего исследования из группы фенокопий диагностированы все 3 основных проявления синдрома МЭН-1, по сравнению с 50/95 пациентами с мутациями. В исследовании Kövesdi A. и соавт. все три основных проявления синдрома МЭН-1 встречались лишь у 3,9% пациентов без мутаций [144], а в работе Pieterman C.R.C. и соавт. – только у 1/39 в группе без мутаций [142].

Поражение гипофиза у пациентов с генетически верифицированным синдромом МЭН-1 выявляется примерно в 40 % случаев [29, 40, 214]. Чаще АГ представлены микроаденомами,

которые в основном секретируют пролактин или являются гормонально-неактивными образованиями [3, 4, 11, 37, 29]. У пациентов с отсутствием мутаций и сочетанием поражения гипофиза и ОЦЖ, АГ чаще всего являются соматотропинами [117, 118, 142], которые в большинстве своем, представлены макроаденомами [119, 144]. В нашем исследовании АГ присутствовали у 95% пациентов в группе без мутаций и у 76,8% в группе с мутациями. Эти показатели немного выше, чем в других исследованиях, что может быть связано с направлением работы отделений, в которые госпитализировались пациенты. Обе группы не различались по частоте гормонально-активных АГ, однако в группе с мутациями намного чаще встречались АГ, секретирующие несколько гормонов, чем в группе без мутаций, что схоже с другими работами [41, 144]. В группе без мутаций АГ, в основном, секретировали СТГ (68,4%) и были преимущественно макроаденомами (61,4%), тогда как в группе с мутациями большинство АГ являлись микроаденомами (61,6%) и секретировали ПРЛ (41%), что соответствует результатам других работ.

ПГПТ является наиболее частым проявлением синдрома МЭН-1, и наблюдается почти у всех пациентов с генетически верифицированным синдромом МЭН-1 (у ~100% пациентов к 50-ти годам) [3, 4]. Как правило, заболевание у таких пациентов характеризуется множественным поражением ОЦЖ, эктопическими ОЦЖ, и, следовательно, нередко рецидивы/отсутствие ремиссии после оперативного вмешательства [131]. Уровни кальция и ПТГ в сыворотке крови, как правило, ниже у пациентов с синдромом МЭН-1 [20, 24, 25, 30], однако в некоторых работах отмечено отсутствие каких-либо отличий в показателях минерального обмена [28], или даже более выраженная гиперкальциемия у пациентов с синдромом МЭН-1 [26]. У пациентов этой группы, как правило, выявляется более значительное снижение МПК по сравнению со спорадическими формами [20, 27, 215]. У пациентов с фенотипом МЭН-1 без мутаций ПГПТ чаще обнаруживается в старшем возрасте, с поражением, обычно, не более одной ОЦЖ, что, в свою очередь, приводит к более редкому возникновению рецидивов ПГПТ [142, 144]. В нашей работе ПГПТ присутствовал у 95,8% в группе пациентов с мутациями и у 96,7% в группе без мутаций. Пациенты без мутаций были старше на момент диагностики заболевания, чаще имели только одно поражение ОЦЖ и реже сталкивались с рецидивом ПГПТ по сравнению с пациентами с мутациями, что схоже с данными мировой практики. Пациенты обеих групп статистически не различались по показателям минерального обмена, однако в группе с мутациями была тенденция к более низкому уровню фосфора в крови, чем в группе без мутаций, что совпадает с данными других работ [20, 216]. По частоте осложнений ПГПТ между группами также не было выявлено различий, что согласуется с данными российского регистра ПГПТ [26], и в том числе других исследований [216].

НЭО ПЖ выявляются у 40–70% (до 80–95%) пациентов с синдромом МЭН-1, занимая второе место по частоте встречаемости среди компонентов этого синдрома. Кроме того, они представляют собой основную причину смертности среди пациентов этой группы [3, 4, 45, 47, 217]. У пациентов с фенотипом МЭН-1 без мутаций НЭО ПЖ обычно встречаются реже среди компонентов синдрома, чаще всего диагностируются в более старшем возрасте и являются, в основном, гормонально-неактивными НЭО [118]. В нашей работе только у 5/60 пациентов из группы без мутаций были диагностированы НЭО ПЖ, в то время как в группе с мутациями этот диагноз был поставлен у 68 из 95 пациентов. Пациенты с НЭО ПЖ из группы фенотипов синдрома МЭН-1 были старше на момент выявления образования (59 лет [58; 59] vs. 32 годами [26; 40]) пациентов из группы с мутациями, что соответствует данным других исследований [141, 142]. В группе генетически верифицированного синдрома МЭН-1 подавляющее большинство НЭО ПЖ являлись гормонально-неактивными образованиями, а в группе без мутаций все выявленные образования были гормонально-неактивными. И, действительно, в настоящее время в связи с усовершенствованием визуализирующих методов исследований у пациентов с синдромом МЭН-1 НЭО ПЖ в основном представлены гормонально-неактивными образованиями, за которыми следуют инсулиномы и гастриномы [11, 29, 48]. Мультифокальный рост является одной из особенностей НЭО ПЖ у пациентов с генетически верифицированным синдромом МЭН-1 [3, 4, 11, 48], и намного реже встречается у пациентов без мутаций [142]. В нашей работе мультифокальный рост не был обнаружен ни в одном из случаев пациентов без мутаций, и в 46/68 случаев пациентов с мутациями.

В нашей работе пациенты обеих групп не различались по наличию иных опухолей и НЭО других локализаций. В группе с мутациями большинство НЭО были локализованы в легких (12/14) и у двух пациентов были выявлены НЭО тимуса. В группе без мутаций всего диагностировано 4 НЭО иной локализации: 1 в легких, 2 в желудке и 1 в подвздошной кишке. Двум пациентам из этой группы (НЭО желудка и НЭО легкого) было выполнено полноэкзомное секвенирование, однако каких-либо мутаций выявлено не было. У пациентов с синдромом МЭН-1 НЭО тимуса диагностируется только у 3,7% (2,0–8,2%) пациентов [69, 218], тогда как у пациентов без мутаций НЭО тимуса обычно не встречается как компонент синдрома [118, 142, 144]. Данные согласуются с нашими результатами, поскольку в группе без мутаций не было выявлено ни одного НЭО тимуса, а в группе с мутациями процент выявления (2,1%) был таким же низким, как и в других группах пациентов с синдромом МЭН-1. Также как и в других работах пациенты с НЭО тимуса были мужского пола [67]. НЭО легких у пациентов с синдромом МЭН-1 встречаются в 5–13% случаев (до 22%–29%), протекают бессимптомно и выявляются при рутинной визуализации [66, 219, 220]. У пациентов без мутации НЭО легких либо вовсе не описаны среди пациентов этой группы [141, 144], либо встречаются намного реже [118, 142], чем

у пациентов с мутациями, что в целом сопоставимо с данными нашего исследования. НЭО желудка у пациентов с генетически верифицированным синдромом МЭН-1 выявляется редко и, в основном, у пациентов с синдромом Золлингера-Эллисона [63, 221]. В нашем исследовании ни у одного пациента с мутацией не было выявлена НЭО желудка, что возможно связано с малым количеством НЭО, секретирующих гастрин в нашем исследовании. Так в исследовании Manoharan J. и соавт. среди 16 пациентов с синдромом Золлингера-Эллисона у 10 были выявлены диффузные участки гиперплазии энтерохромаффиноподобных клеток и у двух только были диагностированы непосредственно НЭО [63]. У пациентов из группы без мутаций НЭО желудка (G1) были диагностированы раньше, чем основные компоненты синдрома и скорее всего не были ассоциированы с типом, характерным для синдрома МЭН-1, учитывая характеристику образований [222, 223].

При синдроме МЭН-1 образования надпочечников обычно наблюдаются примерно у 40% пациентов, и редко являются первым проявлением синдрома МЭН-1 [71]. У пациентов с отсутствием мутаций с фенотипом МЭН-1 также встречаются образования надпочечников, однако процент их выявления значительно ниже, чем у пациентов с мутацией [141, 142, 144]. Частота выявления образований надпочечников в обеих группах нашего исследования не различалась, что может быть связано с их возрастающей распространенностью с возрастом (пик после седьмого десятилетия) [224, 225], учитывая медиану возраста постановки клинического диагноза МЭН-1 у пациентов нашей группы без мутаций – 61 год [57; 67].

Как доброкачественные, так и злокачественные образования щитовидной железы могут выявляться более чем у 1/4 пациентов с синдромом МЭН-1, однако учитывая высокую распространенность патологий щитовидной железы в общей популяции, связь между этими состояниями скорее всего случайна или незначительна [3, 226]. Между тем в исследовании Nachtigall L.B. и соавт. при сравнении спорадической акромегалии и пациентов с клиническим диагнозом МЭН-1 (сочетание акромегалии и ПППТ), отмечена большая распространенность рака щитовидной железы (13,6%), чем у пациентов с изолированной акромегалией (2,3%) [119]. В нашем исследовании не обнаружено различий в частоте папиллярного рака щитовидной железы между группами, однако узловые образования щитовидной железы встречались значительно чаще в группе без мутаций, чем в группе с мутациями. Это может быть связано, по всей видимости, с большим количеством СТГ-продуцирующих АГ в группе без мутаций, учитывая, что поражение щитовидной железы достаточно распространено у пациентов с акромегалией, и, в том числе, более старшим возрастом пациентов в группе фенотипов синдрома МЭН-1 [227, 228].

По данным литературы, существует несколько теорий, объясняющих сочетание нескольких МЭН-1 подобных опухолей у пациентов без мутаций в гене *MEN1* (секвенирование гена,

исключение крупных делеций/дупликаций) с фенотипом МЭН-1 [2–4, 29]. Как уже было сказано, одна из них предполагает участие других генов, мутации в которых могут приводить к появлению клинических проявлений, ассоциированных с МЭН-1 (например, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *AIP*, *CDC73*, *CASR*, *RET*), эпигенетические изменения (метилование ДНК, изменение экспрессии микроРНК), а также вероятность развития у пациентов случайного сочетания опухолей ОЩЖ и гипофиза, которые соответствуют клиническим критериям синдрома МЭН-1. В том числе стоит отметить то, что у большинства описанных пациентов без мутаций с клиническими проявлениями МЭН-1 продукция СТГ образованием гипофиза была наиболее распространенной [117, 118, 142]. Поскольку при акромегалии зафиксировано увеличение частоты новообразований [229], одним из возможных объяснений сочетания акромегалии и ПГПТ может быть влияние избытка гормона роста на развитие образований ОЩЖ. Между тем в исследовании Nachtigall L.B. и соавт. приводятся аргументы против такой гипотезы [119]. Так, на животных моделях СТГ нарушал секреторную способность клеток ОЩЖ. А у пациентов с СТГ-дефицитом экзогенное поступление гормона роста повышало в органах-мишенях чувствительность к ПТГ, увеличивая уровень кальция и снижая уровень ПТГ [119]. Также эта теория не объясняет возникновение ПГПТ у пациентов фенотипа МЭН-1 в сочетании с другими АГ.

Согласно литературным данным, диагноз клинического МЭН-1 ставится у 4,8%–7,7% пациентов с АГ [119, 230]. Однако мутации среди этой когорты выявляются в основном у тех пациентов, которые имеют все три основных компонента синдрома или сочетание с НЭО ПЖ [119, 139]. По данным исследования de Laat J.M. и соавт. пациенты с фенотипом МЭН-1 без мутаций (77% АГ+ПГПТ) имели продолжительность жизни, сопоставимую с таковой в общей популяции, и за 8 лет наблюдения ни у одного из пациентов не развился третий компонент синдрома МЭН-1 [141]. Учитывая в большинстве случаев отсутствие семейного характера заболевания, поздний возраст манифестации, нечастое наличие НЭО ПЖ среди группы пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 без мутаций [141–142], можно предположить, что заболевание у этой группы пациентов протекает в более мягкой форме.

Исходя из вышесказанного, нельзя исключить наличие других генов (в том числе еще не идентифицированных) или эпигенетических факторов, способных вызвать сочетание АГ+ПГПТ и/или НЭО ПЖ у одного пациента без выявленных мутаций. Однако в ряде случаев обоснованным представляется предположение о случайном сочетании двух образований у пациентов с фенотипом МЭН-1. Таким образом, ключевым вопросом остается отбор пациентов, которых можно исключить из ежегодного обследования в рамках синдрома МЭН-1. Так как известно, что у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 частые скрининги

могут снижать качество жизни из-за высокого страха обнаружения новых опухолевых образований [77].

В последние годы машинное обучение, создание диагностических моделей в медицине становятся все более популярными. Их использование способствует улучшению диагностики и терапии различных заболеваний и состояний, повышая общую эффективность медицинских процессов. В рамках выполнения задачи исследования нами был разработан метод определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа у пациентов с его фенокопиями, используя алгоритмы машинного обучения. В качестве признаков в модель вошли 6 клиничко-диагностических показателей, доступных при рутинном обследовании пациентов с фенотипом МЭН-1: количество пораженных ОЩЖ; возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1; наличие НЭО поджелудочной железы; отягощенная наследственность; секреция аденомой гипофиза СТГ; пол. Из 8 алгоритмов машинного обучения: наилучшие показатели на обучающей и тестовой выборке продемонстрировал метод kNN. Данный метод показал, что разработанная диагностическая модель обладает достаточной диагностической точностью 96,7% для прогнозирования вероятности наличия генетического верифицированного синдрома МЭН-1, с чувствительностью 94,4% и специфичностью 100%. В иных работах также большой значимостью в прогнозировании наличия мутации у пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 обладали такие параметры, как семейный характер заболевания, наличие НЭО ПЖ и множественный характер поражения при ПГПТ [75, 151, 153]. В модели de Laat J.M. и соавт. использовали полиномиальную логистическую регрессию, основанную на 365 пациентах из обучающей выборки (n=58, с мутациями в гене *MEN1*), и 144 пациентов из тестовой выборки (n=27, с мутациями в гене *MEN1*) и включившую 7 переменных-предикторов (отягощенная наследственность в отношении НЭО; наличие НЭО поджелудочной железы; наличие аденомы гипофиза; наличие НЭО тимуса, легких или желудка; возраст на момент диагностики; рецидив ПГПТ или множественное поражение ОЩЖ; отсутствие рецидива ПГПТ). Показатель c-statistic прогностической модели составил 0,86 (95% ДИ 0,81–0,90) в тестовой выборке и 0,77 (95% ДИ 0,66–0,88) в валидационной когорте [151]. В работе Мокрышевой Н.Г. и соавт. при помощи логистической регрессионной модели, основанной на данных 111 пациентов (n=22, с ПГПТ и наличием мутации в гене *MEN1*; n=89, со спорадическим ПГПТ и фенокопиями синдрома МЭН-1 без мутации в гене *MEN1*) разработан способ прогнозирования наличия мутации в гене *MEN1* на основании клинического фенотипа пациентов с ПГПТ и включивший 8 переменных-предикторов (возраст манифестации ПГПТ; наличие в анамнезе АГ; наличие в анамнезе НЭО ЖКТ; отягощенная наследственность; количество образований, выявленных с помощью методов дооперационной топической диагностики ≥ 2 ; количество образований, выявленных интраоперационно ≥ 2 ; гистологическая

характеристика образований; отсутствие ремиссии ПГПТ) [153]. Однако следует отметить, что в этих моделях имеются некоторые ограничения: не учитывается ряд параметров, а именно тип секреции АГ, как один из признаков, отличающихся у пациентов с клиническими проявлениями МЭН-1 без и с мутацией [117, 142, 144]. В том числе в финальных версиях модели не отмечен такой предиктор как пол, учитывая различия по полу у пациентов с фенотипом МЭН-1 и отсутствием или наличием мутации. Кроме того, в указанных работах используются параметры, которые могут быть применимы только после проведения оперативного вмешательства, что может ограничивать применение данного метода у пациентов без хирургического лечения.

Сильной стороной использования в работе рутинных клиничко-лабораторных критериев, является то, что они обычно доступны для всех пациентов с фенотипом МЭН-1. Однако добавление дополнительных характеристик в модель может повысить ее диагностическую точность. Некоторые важные клинические признаки, которые указывают на генетически подтвержденный синдром МЭН-1 не были включены в модель ввиду их отбраковки на этапе выбора параметров модели. Так, не учтено наличие НЭО иных локализаций, в частности НЭО тимуса, который по данным исследований выявляется, хоть и не часто, но только у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 [142, 144, 151]. Но даже без дополнительных клинических характеристик разработанная модель продемонстрировала превосходное качество распознавания генетически верифицированного синдрома МЭН-1 среди пациентов с фенотипом МЭН-1. Однако несмотря на проведенную валидацию и проверку модели, необходимо ее дальнейшее тестирование и обучение. Модель должна быть проверена в различных условиях и на большем количестве пациентов, например, с использованием регистра пациентов с синдромом МЭН-1.

Таким образом, данная модель может являться перспективной для внедрения в клиническую практику, позволяя дополнить дифференциальную диагностику генетически подтвержденного синдрома МЭН-1 и его фенокopies, а также избежать неоправданного долгосрочного лабораторно-инструментального скрининга в случае отрицательного прогноза модели. Несомненно, золотым стандартом подтверждения диагноза синдрома МЭН-1 остается проведение генетического тестирования для определения мутаций в гене *MEN1*. У пациентов без мутации с фенотипом МЭН-1 (АГ+ПГПТ) также необходимо исключать мутации в других, наиболее частых генах (например, *CDKN1B*, гены других циклин-зависимых киназ, *AIP*, *CDC73*, *CASR*). Однако если мутации в этих генах не обнаружены, отсутствует отягощенная наследственность и по данным модели, в целом, мы видим низкий риск выявления синдрома, можно, по всей видимости, ограничить наблюдение за такими пациентами в рамках их основных заболеваний.

Полученные в данном разделе результаты были частично опубликованы автором диссертационной работы в 2025 г. [231].

Ограничения исследования

К ограничениям нашего исследования следует отнести небольшую выборку пациентов, связанную в первую очередь с орфанностью заболеваний. Учитывая ретроспективный характер исследования значения некоторых параметров у части пациентов отсутствовали. Одним из ограничений также является одноцентровой дизайн исследования и специфика отделений, в которых набирались пациенты, что может способствовать как снижению, так и повышению эффективности диагностической модели при внешней валидации.

3.2 Иммуногистохимическое исследование тканей аденом гипофиза у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1, фенокопиями синдрома и спорадической акромегалией

В иммуногистохимическое исследование было включено 47 образцов опухолей гипофиза. В группу гМЭН-1 вошли 11 образцов, в группу фМЭН-1 – 13; в группу СА – 23 образца. Пациенты трех групп были сопоставимы по полу, размерам АГ. Группа гМЭН-1 отличалась от фМЭН-1 и СА по возрасту ($p < 0,001$): пациенты в этой группе были моложе на момент проведения трансназальной трансфеноидальной аденомэктомии (табл. 8).

Таблица 8 – Клинические характеристики исследуемых групп

Показатель	гМЭН-1 n=11	фМЭН-1 n=13	СА n=23	P-value
Пол, жен., n (%)	8 (72,7)	10 (76,9)	18 (78,3)	0,909
Возраст на момент проведения операции, лет, Me [Q1; Q3]	33 [16; 47]	59 [56; 64]	57 [52; 62]	<0,001 p₁₋₂ <0,001 p₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ = 0,415
Размер аденомы, микро, n (%)	6 (54,5)	3 (23,1)	7 (30,4)	0,291

Примечание: Сравнение качественных параметров проводилось при помощи критерия Фримана-Холтона. Сравнение количественных параметров – при помощи критерия Краскела-Уоллиса/Манна-Уитни. Поправка на множественность сравнений проводилась методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считался $p < 0,017$ ($0,05/3$; полужирным выделены статистически значимые результаты). гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа; СА – спорадическая акромегалия.

АГ в группе гМЭН-1 представлены 5 плотногранулированными (ПГ) кортикотропинами, 2 – ПГ соматотропинами, 1 – ПГ пролактиномой, 1 – молчащей гонадотропиномой, 1 – полигормональной Pit1 позитивной опухолью (секреция ТТГ+ПРЛ), 1 – двойной кортико и пролактиномой. ППТ диагностирован у 9/11 пациентов. Более подробно компоненты синдрома МЭН-1 в группе гМЭН-1 представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика пациентов в группе генетически подтвержденного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа

№	Возраст на момент проведения операции; пол	Образования	Гистологическая характеристика аденом гипофиза
1	36; ж	Соматотропинома; гиперплазия левого надпочечника; ГН НЭО ПЖ; ПГПТ; образование правой молочной железы	Плотногогранулированная соматотропинома
2	27; ж	Кортикотропинома; ПГПТ; ГН НЭО ПЖ	Плотногогранулированная кортикотропинома
3	47; ж	АКТГ+ПРЛ-секретирующая аденома гипофиза; ПГПТ; гастринома; ГН НЭО ПЖ; объемное образование правого яичника	Двойная кортико- и пролактинома
4	20; м	Кортикотропинома	Плотногогранулированная кортикотропинома
5	57; м	Соматотропинома; ПГПТ	Плотногогранулированная соматотропинома
6	37; ж	Кортикотропинома; ПГПТ; двухсторонняя гиперплазия надпочечников	Плотногогранулированная кортикотропинома
7	33; ж	Пролактинома; ПГПТ	Плотногогранулированная пролактинома
8	13; м	ТТГ+ПРЛ-секретирующая аденома гипофиза; ПГПТ	Полигормональная Pit1 позитивная опухоль гипофиза (ТТГ+ПРЛ)
9	49; ж	Гонадотропинома (клинически неактивная); ПГПТ; менингиомы правой лобно-теменной области	Молчащая гонадотропинома
10	16; м	Кортикотропинома; ПГПТ; ГН НЭО ПЖ; образование S6 правого легкого	Плотногогранулированная кортикотропинома
11	13; ж	Кортикотропинома	Плотногогранулированная кортикотропинома

Примечания: ГН НЭО ПЖ – гормонально-неактивная нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы, ТТГ – тиреотропный гормон, ПРЛ – пролактинома, ПГПТ – первичный гиперпаратиреоз.

В группе фМЭН-1: 4 АГ являлись редкогранулированными соматотропиномами (РГС), 7 – плотногранулированными соматотропиномами (ПГС), и 2 АГ были смешанные сомато- и лакотрофные (ССЛ). У всех пациентов группы фМЭН-1 был установлен диагноз ПГПТ (паратгормон 104,85 пг/мл [91,63; 165,85]; кальций, скорректированный по альбумину 2,71 г/л

[2,61; 2,78]). У 3 пациентов, кроме поражения гипофиза и околощитовидных желез, были выявлены другие образования:

– у пациентки 59 лет, кроме соматотропиномы и ПППТ были выявлены также гормонально-неактивное образование надпочечника и поджелудочной железы, нейрофиброма правого забрюшинного пространства, гемангиомы лобной кости и 11 грудного позвонка.

– у пациентки 68 лет, кроме соматотропиномы и ПППТ были выявлены гормонально-неактивные аденомы обоих надпочечников и аденокарцинома правой почки.

– у пациентки 72 лет, кроме соматотропиномы и ПППТ были выявлены кистозное образование головки ПЖ, кисты обеих почек, печени и гиперплазия обоих надпочечников.

В группе СА по данным гистологической характеристики АГ были разделены на 6 РГС и 17 ПГС. Уровень кальция, скорректированного по альбумину, равнялся 2,41 ммоль/л [2,36; 2,46].

Результаты окрашивания на менин и сравнение результатов оценки экспрессии менина между тремя группами представлены в таблице 10. В качестве положительного контроля в работу были взяты образцы ткани нормального гипофиза, полученные на аутопсии и после оперативного вмешательства без признаков патологии. Также использовалась ткань нормальной поджелудочной железы (ПЖ) после оперативного вмешательства по поводу нейроэндокринной опухоли ПЖ. В ткани гипофиза обнаружена цитоплазматическая экспрессия менина; в эндокринной части ткани ПЖ (островки Лангерганса) – ядерная экспрессия.

Таблица 10 – Результаты окрашивания на менин в группах генетически подтвержденного синдрома МЭН-1, фенокопий синдрома МЭН-1 и спорадической акромегалии

Группы Окраска	гМЭН-1 n=11	фМЭН-1 n=13	СА n=23	<i>P</i> -value
Ядерная	0	1 (с)	7 (с-4; ср-3)	0,005 p₁₋₂=0,011 p₁₋₃=0,011 p₂₋₃=0,141
Цитоплазматическая	6 (с-5; ср-1)	12 (с-1; ср-8; сл-3)	14 (с -5; ср-9)	
Отсутствие	5	0	2	

Примечания: с – слабая; ср – средняя; сл – сильная. Сравнение качественных параметров проводилось при помощи критерия Фримана-Холтона. Поправка на множественность сравнений проводилась методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считался $p < 0,017$ ($0,05/3$; полужирным выделены статистически значимые результаты). гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа; СА – спорадическая акромегалия.

Группа фМЭН-1 отличалась от группы гМЭН-1 по результатам окрашивания на менин ($p=0,011$): экспрессия менина присутствовала во всех образцах группы фМЭН-1 (рис. 13), в большинстве своем в цитоплазме, тогда как в группе гМЭН-1 в 5 образцах экспрессия менина отсутствовала полностью (рис. 14). Примечательно, что в 6 образцах группы гМЭН-1 была

выявлена цитоплазматическая экспрессия менина – слабой ($n=5$) и средней ($n=1$) степеней выраженности (рис. 15). Ядерная экспрессия менина присутствовала в одном образце группы фМЭН-1, между тем в группе гМЭН-1 ядерной экспрессии менина не было обнаружено ни в одном из образцов.

Статистически значимых различий между группами фМЭН-1 и СА выявлено не было ($p=0,141$). Несмотря на это в группе фМЭН-1 только в одном случае была выявлена слабая ядерная экспрессия менина, тогда как в группе СА ядерная экспрессия была выявлена в 7 случаях (4 только в ядре, 3 и в ядре, и в цитоплазме) (рис. 16), к тому же в группе СА отсутствовала экспрессия менина в двух случаях.

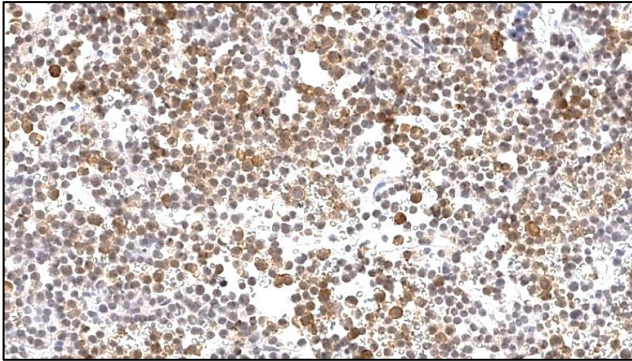


Рисунок 13 – Цитоплазматическая экспрессия менина в образце ткани аденомы гипофиза у пациента с фенокопией синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа x200.

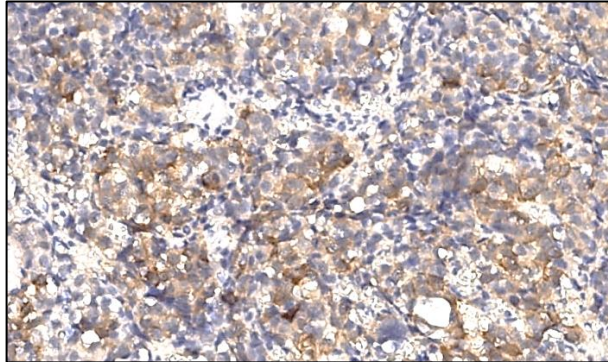


Рисунок 15 – Слабая цитоплазматическая экспрессия менина в образце ткани аденомы гипофиза у пациента с генетически подтвержденным синдромом множественных эндокринных неоплазий 1 типа, x200.

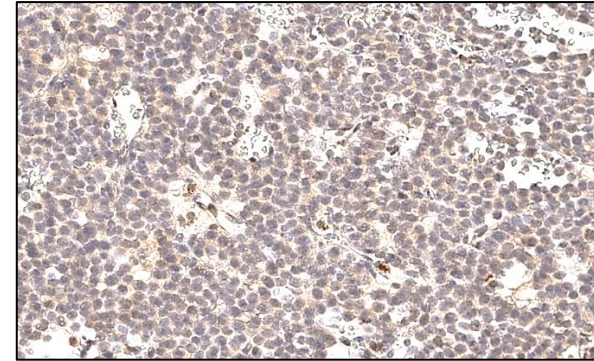


Рисунок 14 – Отсутствие экспрессии менина и в ядре, и в цитоплазме в образце ткани аденомы гипофиза у пациента с генетически подтвержденным синдромом множественных эндокринных неоплазий 1 типа, x200.

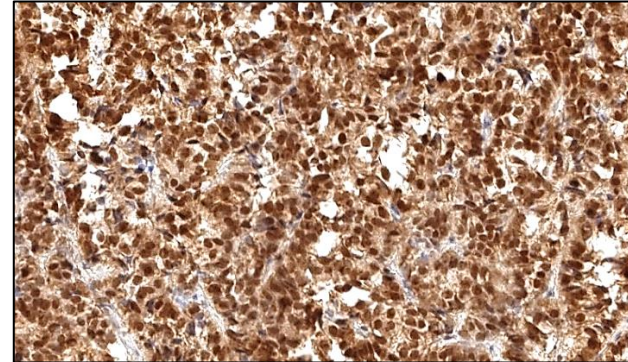


Рисунок 16 – Ядерная и цитоплазматическая экспрессия менина в образце ткани аденомы гипофиза у пациента со спорадической акромегалией, x200.

3.2.1 Обсуждение полученных результатов

В данной части исследования оценена экспрессия менина в тканях АГ в группах с генетических верифицированным синдромом МЭН-1, его фенотипами и СА. В половине случаев экспрессия менина отсутствовала в группе с гМЭН-1 (5/11). В группе с фМЭН-1 не обнаружено образцов АГ, с отсутствием экспрессии менина, тогда как в группе СА экспрессия менина отсутствовала в 2 из 23 случаев. Цитоплазматическая экспрессия менина, преимущественно слабой степени, выявлена в 6/11 образцах в группе гМЭН-1 и в 12/13 (преимущественно средней окраски) в образцах группы фМЭН-1. Ядерная экспрессия менина обнаружена в 7 образцах группы СА и в одном образце группы фМЭН-1. Интересно, что по данным некоторых исследований, экспрессия менина (в основном цитоплазматическая) может наблюдаться и при наличии мутаций в гене *MEN1* [98, 232]. Так, в исследовании Sonoda A. и соавт. в НЭО ПЖ цитоплазматическая экспрессия менина была выявлена в 2/7 образцов, ассоциированных с мутацией в гене *MEN1*, а в 21 спорадических НЭО ПЖ отсутствовала ядерная экспрессия, что по мнению авторов, может быть связано с включением образцов с мутациями в гене *MEN1* [232]. Вполне вероятно, что отсутствие экспрессии менина в двух случаях в группе СА в нашем исследовании может быть связано с возможными соматическими мутациями в гене *MEN1* или эпигенетическими изменениями, влияющими либо на менин и его пути, либо на другие гены, взаимодействующие с менином. Кроме того, имеются посттрансляционные модификации менина, включая сумоилирование по лизину 591, фосфорилированию по серину 394 и быструю деградацию с помощью убиквитин-протеасомного пути [102]. В работе Corbo V. и соавт. изучались генетические характеристики и экспрессия менина в 169 НЭО ПЖ. Авторы отметили, что в половине случаев с отсутствием ядерной экспрессии менина и в 1/3 случаев со слабой ядерной экспрессией, либо умеренной или интенсивной цитоплазматической экспрессией в тканях НЭО ПЖ имелись мутации в гене *MEN1*. Они предположили, что некоторые мутации приводят к преждевременной блокировке транскрипции, образуя патологический белок, который накапливается в цитоплазме из-за отсутствия по крайней мере одного из сигналов NLS. Мутации, не приводящие к образованию патологического белка менина, также могут частично влиять на ядерный транспорт, возможно, вызывая неполный процессинг белка или препятствуя его взаимодействию с другими белками. Все это может объяснить обилие цитоплазматической экспрессии менина, наблюдаемого при мутациях в гене *MEN1*. Эта гипотеза была подтверждена методом вестерн-блоттинга, который показал наличие экспрессии менина в опухолях с мутациями в гене *MEN1*. А отсутствие экспрессии менина может быть связано с укорочением белка на уровне С-концевого эпитопа из-за мутаций [98]. Наличие в 6/11 образцах нашего исследования из группы гМЭН-1 цитоплазматической экспрессии менина может быть связано с тем, что имелся детектируемый именно этим антителом С-конец менина, несмотря на наличие

мутаций в гене *MEN1*. Хотя в группах фМЭН-1 и СА не было выявлено отличий по экспрессии менина, ядерная экспрессия менина была выявлена только в 1/13 случаев в группе фМЭН-1 и в 7/23 случаев в группе СА. Стоит отметить, что в работе Corbo V. и соавт. по данным многомерной логистической модели увеличение на одну единицу цитоплазматической экспрессии менина приводило к удвоению вероятности наличия мутации (ОШ 2,2; 95% ДИ 1,0-4,9; $P=0,033$), тогда как для ядерной экспрессии наблюдался обратный эффект (ОШ 0,5; 95% ДИ 0,5-0,9; $P=0,021$) [98]. Также примечательным является то, что в исследовании Cao Y. и соавторов было установлено *in vitro*, что менин может перемещаться между ядром и цитоплазмой с помощью ядерных экспортных сигналов. Они продемонстрировали, что мутации в доменах, ответственных за ядерные экспортные сигналы, могут нарушать экспортную функцию менина. Эти и результаты других исследований указывают на то, что патологические состояния, влияющие на функции менина, могут изменять клеточную локализацию его взаимодействующих белков. Это позволяет предположить то, что аномальная экспрессия менина может возникнуть в результате изменений в его интеракторах, например, из-за накопления опухолями дополнительных мутаций, способных изменять их экспрессию [188, 233, 234].

Обращает на себя внимание также то, что аутопсийный гипофиз и нормальная ткань гипофиза в поле зрения АГ, полученная после операции, имели только цитоплазматическую экспрессию, а не ядерную. Что в свою очередь по данным исследований может быть результатом посмертной деградации белка в ядре [111].

Таким образом экспрессия менина, в целом, отличается в группах фМЭН-1 и гМЭН-1. Однако стоит учитывать тот факт, что в группе гМЭН-1 в части образцов может определяться цитоплазматическая экспрессия менина, но не ядерная. По полученным данным можно также предположить, что патогенез АГ при фМЭН-1 и СА может иметь сходства, однако при фМЭН-1, по всей видимости, имеются другие факторы, которые способствуют возникновению нескольких опухолей эндокринных желез у одного человека. Для понимания процесса необходимо дальнейшее исследование ассоциированных с фенотипом МЭН-1 генов, эпигенетических факторов, сигнальных путей, в которых участвует менин.

Полученные в данном разделе результаты были частично опубликованы автором диссертационной работы в 2021 г. [235].

Ограничения исследования

Следует отметить, что содержание менина по данным иммуногистохимического исследования было, в целом, гетерогенно как внутри, так и между группами, таким образом существует небольшая вероятность того, что пациенты с мутациями в гене *MEN1* могли быть включены в спорадическую группу. В дальнейшем было бы интересно изучить соматические мутации и потерю гетерозиготности гена *MEN1* в исследуемых образцах.

3.3 Оценка экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, спорадическими акромегалией, первичным гиперпаратиреозом, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами

3.3.1 Клиническая характеристика пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в исследование экспрессии микроРНК методом NGS

Для исследования экспрессии микроРНК плазмы крови методом NGS включено 68 человек (табл. 11): в группу фенокопий синдрома МЭН-1 (фМЭН-1) – 11 пациентов, в группу спорадической акромегалии (СА) – 12 пациентов, в группу спорадического первичного гиперпаратиреоза (сППТ) – 11 пациентов, в группу генетически подтвержденного синдрома МЭН-1 (гМЭН-1) – 22 пациента, в группу относительно здоровых добровольцев (З) – 12. Все группы не отличались по полу и индексу массы тела (ИМТ). По показателю «возраст» группа гМЭН-1 отличалась от групп фМЭН-1 и относительно здоровых добровольцев. Учитывая наличие различий по возрасту между группами, в дальнейшем на полученных результатах применялась поправка на возраст для нивелирования этого фактора.

Таблица 11 – Характеристики пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в анализ экспрессии микроРНК плазмы крови методом NGS

Параметр	фМЭН-1 (n=11)	СА (n=12)	сППТ (n=11)	гМЭН-1 (n=22)	З (n=12)	P-value
Пол, жен, n (%)	10 (90,9)	11 (91,7)	10 (90,9)	18 (81,8)	11 (91,7)	0,924
Возраст, лет Ме [Q1; Q3]	59 [51; 60]	59 [52; 63]	60 [53; 62]	38 [34; 41]	59,5 [51,5; 62,5]	P<0,001 P ₁₋₂ =0,486 P ₁₋₃ =0,242 P ₁₋₄ <0,001 P ₁₋₅ =0,413 P ₂₋₅ =0,887 P ₃₋₅ =0,832 P ₄₋₅ <0,001
ИМТ, кг/м ² , Ме [Q1; Q3]	28,9 [26,7; 35,7]	31,5 [24,9; 35,6]	26,3 [24,9; 31,8]	25 [22,1; 30,4]	26,8 [23,5; 31,5]	0,171

Примечание: Сравнение качественных параметров проводилось при помощи двустороннего точного критерия Фишера. Сравнение количественных параметров – при помощи критерия Краскела-Уоллиса (попарно при помощи критерия Манна-Уитни). Поправка на множественность сравнений проводилась методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считался $P<0,007$ (0,05/7; группы гМЭН-1, СА и сППТ не сравнивались). фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, СА – спорадическая акромегалия, сППТ – спорадический первичный гиперпаратиреоз, гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, З – относительно здоровые добровольцы.

В группе фМЭН-1 у всех пациентов имелись акромегалия и ПГПТ в активной стадии заболеваний. У 3/11 пациентов, кроме поражения гипофиза и ОЩЖ, были выявлены другие эндокринные и неэндокринные образования (табл. 12). Во всех случаях акромегалия была диагностирована раньше, чем ПГПТ; медиана до диагностики второй эндокринной опухоли составила 1 год [0; 2].

Таблица 12 – Характеристика пациентов с множественными образованиями (3/11) в группе фенокопий синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа

№	Возраст, пол	Образования
1	60, ж	СТГ-АГ, аденома правой верхней ОЩЖ, диффузная гиперплазия обоих надпочечников, светлоклеточный рак правой почки 1 ст. (T _{1b} N ₀ M ₀ G2), кисты в левой почке (I, II, IIF, III, IV типы по Bosniak)
2	59, ж	СТГ-АГ, ПГПТ без визуализации, ГНО головки поджелудочной железы, образование правого надпочечника нейрогенный природы, узелковая гиперплазия левого надпочечника, нейрофиброма забрюшинного пространства справа
3	56, ж	СТГ-АГ, аденомы левой и правой нижних ОЩЖ, интратиреоидная аденома ОЩЖ, ГНО левого надпочечника, гемангиома правой теменной кости

Примечание: ГНО – гормонально-неактивное образование; ОЩЖ – околощитовидная железа; СТГ-АГ – соматотропинома, ПГПТ – первичный гиперпаратиреоз ж – женщины.

При анализе лабораторных показателей (табл. 13) различий по уровню ИФР-1 между группами фМЭН-1 и СА не выявлено ($p=0,413$), также, как и при сравнении групп фМЭН-1 и сПГПТ по уровню кальция общего ($p=0,898$), кальция, скорректированного по альбумину ($p=0,963$) и ПТГ ($p=0,132$). Группа фМЭН-1 в том числе не отличалась по уровню кальция общего ($p=0,519$) и скорр. по альбумину ($p=1,000$) и ПТГ ($p=0,132$) от группы гМЭН-1, а также от 3-х пациентов группы гМЭН-1 по уровню ИФР-1. Группа относительно здоровых добровольцев отличалась по уровню ИФР-1 от групп фМЭН-1 ($p<0,001$) и СА ($p<0,001$), а по уровню кальция общего и кальция скорректированного по альбумину от групп фМЭН-1 ($p=0,005$ и $p=0,009$, соответственно) и сПГПТ ($p=0,005$ и $p=0,01$, соответственно).

Таблица 13 – Лабораторные показатели пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в анализ экспрессии микроРНК плазмы крови методом NGS

Параметр	фМЭН-1 (n=11)	гМЭН-1 (n=22)	СА (n=12)	сППТ (n=11)	З (n=12)	P-value
ИФР-1, нг/мл, Me [Q1; Q3]	560 [414,3; 679,0]	565,4 [375,2; 796,0] (n=3)	619,1 [449,4; 848,4]	–	103,6 [82,9; 113,3]	P<0,001 P ₁₋₂ =1,000 P ₁₋₃ =0,413 P ₁₋₅ <0,001 P ₃₋₅ <0,001
ПТГ, пг/мл, Me [Q1; Q3]	85,9 [67,4; 140,1]	91,6 [70,6; 134,4]	–	134,5 [94,6; 461,0]	–	P=0,132
Кальций общ., ммоль/л Me [Q1; Q3],	2,71 [2,59; 2,77]	2,67 [2,58; 2,71]	2,39 [2,30; 2,40]	2,72 [2,59; 2,82]	2,32 [2,27; 2,34]	P<0,001 P ₁₋₂ =0,144 P ₁₋₃ <0,001 P ₁₋₄ =0,898 P ₁₋₅ =0,005 P ₂₋₅ =0,001 P ₃₋₅ =0,233 P ₄₋₅ =0,005
Кальций скорр., ммоль/л Me [Q1; Q3]	2,65 [2,54; 2,68]	2,57 [2,47; 2,64]	2,33 [2,24; 2,36]	2,63 [2,51; 2,68]	2,18 [2,17; 2,26]	P=0,002 P ₁₋₂ =0,519 P ₁₋₃ =0,003 P ₁₋₄ =0,963 P ₁₋₅ =0,007 P ₂₋₅ =0,002 P ₃₋₅ =0,400 P ₄₋₅ =0,007

Примечание: Сравнение количественных параметров проводилось при помощи критерия Краскела-Уоллиса (попарно при помощи критерия Манна-Уитни). Поправка на множественность сравнений проводилась методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считался $P<0,007$ (0,05/7; группы СА и сППТ не сравнивались). фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, СА – спорадическая акромегалия, сППТ – спорадический первичный гиперпаратиреоз, гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, З – относительно здоровые добровольцы.

В группе гМЭН-1 у всех пациентов имелись АГ и ППТ. По секреции АГ были разделены следующим образом: 11 – пролактином (ПРЛ), 4 – гормонально-неактивные АГ (НАГ), 3 – болезнь Иценко–Кушинга (БИК), 2 – смешанные соматотропиномы/пролактиномы (СТГ+ПРЛ), 1 – соматотропинома, 1 – смешанная секреция адренокортикотропного гормона (АКТГ)+ПРЛ. Только АГ и ППТ на момент включения в исследование были выявлены у 4/22 пациентов; АГ, ППТ, образования поджелудочной железы – у 6/22 пациентов; у остальных пациентов

компоненты синдрома МЭН-1 представлены большим количеством эндокринных и неэндокринных поражений и более подробно отображены в таблице 14.

Таблица 14 – Характеристика пациентов с множественными образованиями в группе генетически подтвержденного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа на момент проведения исследования

№	Возраст, пол	Образования
1	19, м	ПРЛ-АГ, гиперплазия 4 ОЩЖ, множественные ГН НЭО поджелудочной железы, НЭО левого легкого (S6)
2	39, ж	ПРЛ-АГ, гиперплазии аллотрансплантата ОЩЖ, ГН НЭО поджелудочной железы, узелковая гиперплазия обоих надпочечников, ГНО латеральной ножки левого надпочечника
3	43, ж	ПРЛ-АГ, гиперплазия 1 ОЩЖ, ГН НЭО хвоста, перешейка, крючковидного отростка поджелудочной железы, нисходящего отдела двенадцатиперстной кишки, ГНО левого надпочечника
4	36, ж	АКТГ/ПРЛ-АГ, образования 2 ОЩЖ, ГН НЭО поджелудочной железы, ГНО левого надпочечника, гигантоклеточная опухоль альвеолярного отростка нижней челюсти, гигантское внеорганное объемное образование брюшной полости и малого таза неясного генеза
5	53, ж	НАГ, образования атипично расположенной ОЩЖ, ГН НЭО поджелудочной железы, НЭО правого легкого (S1), ГНО правого надпочечника, гемангиома печени (S7)
6	49, ж	АКТГ-АГ, образования 3 ОЩЖ в средостении, множественные ГН НЭО поджелудочной железы, НЭО правого легкого (S8/S9), множественные образования печени вторичного характера (mts)
7	39, ж	СТГ/ПРЛ-АГ, гиперплазия 1 ОЩЖ, ГН НЭО тела поджелудочной железы, гиперплазия левого надпочечника, образование молочной железы
8	40, м	НАГ, образование 1 ОЩЖ, множественные ГН НЭО головки и тела поджелудочной железы, ГНО левого надпочечника, множественные аденомы левой околоушной железы
9	36, ж	НАГ, образования 2 ОЩЖ, ГН НЭО поджелудочной железы, ГНО обоих надпочечников
10	37, ж	ПРЛ-АГ, образования 2 ОЩЖ, ГН НЭО культи поджелудочной железы, ГНО обоих надпочечников
11	41, ж	СТГ/ПРЛ-АГ, образования 2 ОЩЖ, инсулиномы поджелудочной железы, ГН НЭО крючковидного отростка поджелудочной железы, ГНО левого надпочечника, папиллярный рак щитовидной железы
12	63, ж	ПРЛ-АГ, образования 2 ОЩЖ, очаговое образование по ходу скрепок в S3 правого легкого и образования в корне правого легкого, увеличение паратрахеальных лимфатических узлов (mts), образование S4 печени, ГН

		НЭО головки и хвоста поджелудочной железы, ГНО обоих надпочечников, киста левой почки (Bosniak Pf)
--	--	--

Примечание: ПРЛ-АГ – пролактинома; АКТГ-АГ – кортикотропинома; НАГ – гормонально-неактивная аденома гипофиза; СТГ-АГ – соматотропинома; ППГТ – первичный гиперпаратиреоз; НЭО – нейроэндокринное образование; ГНО – гормонально-неактивное образование; ОЦЖ – околощитовидная железа; mts – метастазы; ж – женщины; м – мужчины.

3.3.2 Анализ экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, спорадическими акромегалией, первичным гиперпаратиреозом, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами методом NGS

По результатам биоинформатического и статистического анализов данных секвенирования получены результаты по экспрессии 122 микроРНК при сравнении групп фМЭН-1 и СА, из которых 10 микроРНК различались между группами ($p < 0,05$, таблица 15). Однако после применения поправки на множественность сравнений не выявлено различий в уровнях экспрессии микроРНК между образцами плазмы.

Таблица 15 – Изменения в экспрессии микроРНК плазмы крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 ($n=11$) по сравнению со спорадической акромегалией ($n=12$)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	<i>P</i> -value	<i>P</i> _{adj}
hsa-let-7f-5p	0,704154297	0,006	0,312
hsa-miR-122-5p	-0,899588229	0,006	0,312
hsa-miR-320a	-1,069860866	0,008	0,312
hsa-miR-34a-5p	-5,517090737	0,019	0,393
hsa-miR-375	2,434623355	0,017	0,393
hsa-miR-432-5p	1,750873282	0,018	0,393
hsa-miR-423-5p	-0,512995769	0,025	0,441
hsa-miR-151a-3p	0,872759348	0,035	0,512
hsa-miR-185-5p	-1,346399656	0,038	0,512
hsa-miR-103a-3p	0,783651031	0,044	0,537

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; p_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg.

По данным экспрессии 172 микроРНК при сравнении групп фМЭН-1 и сППГТ 16 микроРНК различались между группами ($p < 0,05$, табл. 16). При применении поправки на множественность сравнений выявлены различия только в 1/16 микроРНК между группами фМЭН-1 и сППГТ (miR-6124).

Таблица 16 – Изменения в экспрессии микроРНК плазмы крови у пациентов с фенокопией синдрома МЭН-1 (n=11) по сравнению со спорадическим первичным гиперпаратиреозом (n=11)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	P-value	P _{adj}
hsa-miR-6124	-4,999325213	<0,001	0,047
hsa-miR-142-5p	-1,015632257	0,001	0,069
hsa-miR-197-3p	-3,652816909	0,002	0,091
hsa-miR-375	1,957092116	0,003	0,091
hsa-miR-144-3p	-4,402542671	0,004	0,097
hsa-miR-320a	-0,853604588	0,005	0,097
hsa-miR-484	-1,858354892	0,003	0,097
hsa-miR-186-5p	-3,200373065	0,005	0,101
hsa-miR-150-5p	-1,434309523	0,012	0,210
hsa-miR-451a	-0,741870285	0,018	0,282
hsa-let-7d-5p	0,506875155	0,028	0,363
hsa-miR-944	1,955679367	0,027	0,363
hsa-miR-181b-5p	-3,141776608	0,035	0,431
hsa-miR-423-3p	-1,344183858	0,042	0,480
hsa-miR-148b-3p	-1,256372183	0,048	0,498
hsa-miR-30e-5p	-0,634386447	0,049	0,498

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; p_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg (полужирным выделены статистически значимые результаты).

При сравнении групп гМЭН-1 и фМЭН-1 были обнаружены 24/234 различно экспрессирующихся микроРНК с уровнем значимости $p < 0,05$ после поправки на множественность сравнений: экспрессия 4 микроРНК была ниже в группе гМЭН-1 по сравнению с фМЭН-1, а экспрессия 20 микроРНК – выше. МикроРНК были разделены на группы с более и менее чем 10 прочтений в одной из групп (табл. 17, 18). Тепловая карта экспрессии 24 микроРНК в группах пациентов фМЭН-1 по сравнению с гМЭН-1 представлена на рисунке 17, где видно достаточно четкое распределение по группам большинства пациентов.

Таблица 17 – МикроРНК, различно экспрессирующиеся в плазме крови пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 (n=22) по сравнению с его фенокопиями (n=11) (более 10 прочтений)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	P-value	P _{adj}
hsa-miR-3613-5p	6,009964	<0,001	<0,001
hsa-miR-335-5p	5,643685	<0,001	<0,001
hsa-miR-32-5p	5,405104	<0,001	<0,001

hsa-miR-760	5,277836	<0,001	<0,001
hsa-miR-2276-3p	-28,44718	<0,001	<0,001
hsa-miR-454-3p	-2,926644	<0,001	0,046

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; p_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg.

Таблица 18 – МикроРНК, различно экспрессирующиеся в плазме крови пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 (n=22) по сравнению с его фенокопиями (n=11) (менее 10 прочтений в одной из групп)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	<i>P</i> -value	<i>P</i> _{adj}
hsa-miR-425-3p	4,729436	<0,001	<0,001
hsa-miR-25-5p	4,748414	<0,001	<0,001
hsa-miR-501-3p	4,215495	<0,001	<0,001
hsa-miR-576-5p	4,472254	<0,001	<0,001
hsa-miR-1224-5p	4,988417	<0,001	<0,001
hsa-miR-141-3p	3,582906	<0,001	<0,001
hsa-miR-129-5p	15,62514	<0,001	0,001
hsa-miR-532-3p	3,864718	<0,001	0,001
hsa-miR-3187-3p	4,403906	<0,001	0,001
hsa-miR-503-5p	3,991885	<0,001	0,001
hsa-miR-30a-3p	3,735631	<0,001	0,002
hsa-miR-4306	3,610371	<0,001	0,002
hsa-miR-1908-5p	4,373386	<0,001	0,004
hsa-miR-664a-5p	-3,937607	<0,001	0,004
hsa-miR-130b-3p	4,091780173	0,001	0,010
hsa-let-7d-3p	-3,543134153	0,003	0,030
hsa-miR-19a-3p	3,813056169	0,005	0,045
hsa-miR-345-5p	3,677793403	0,006	0,046

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; p_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg.

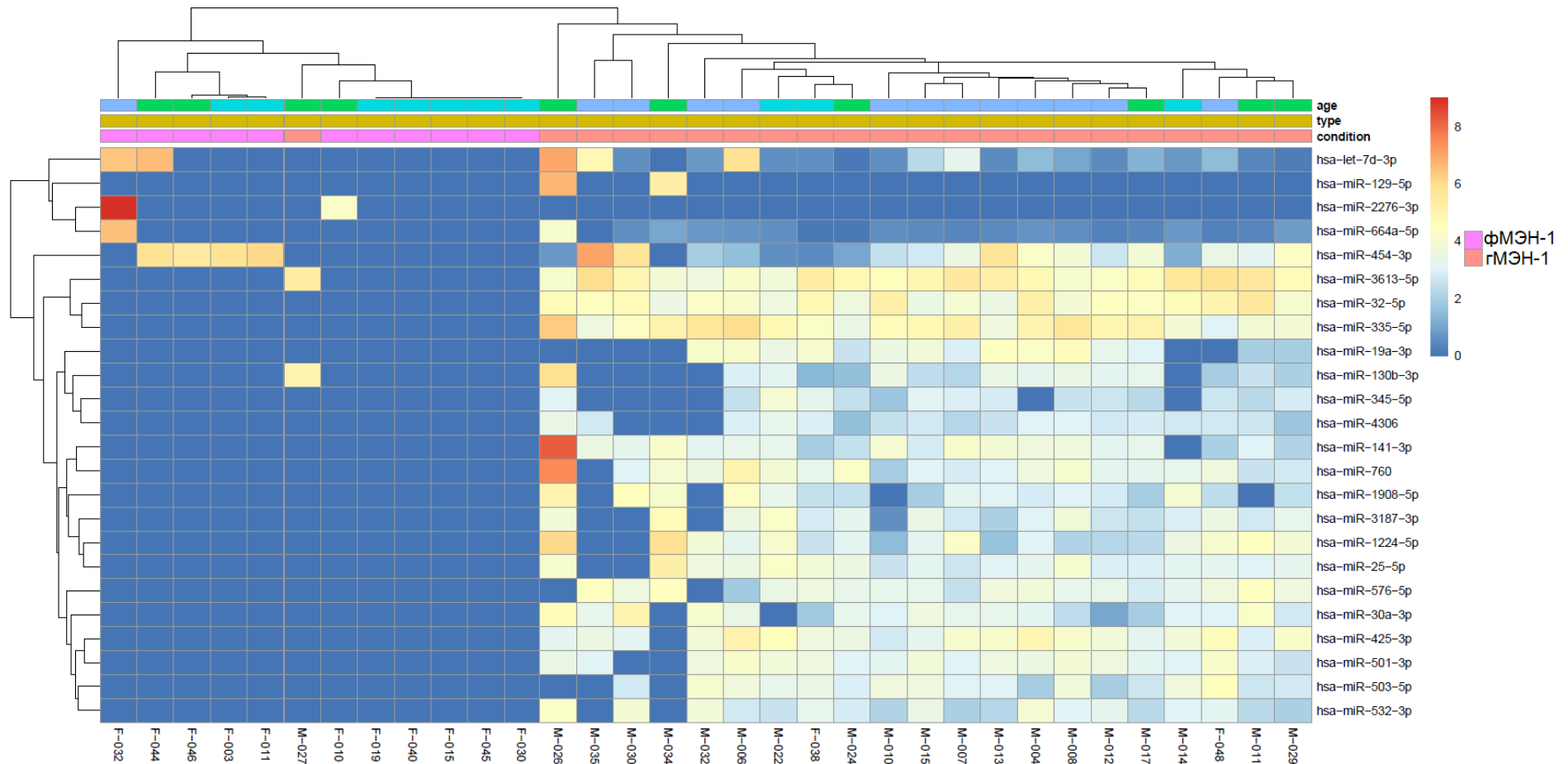


Рисунок 17 – Кластерный анализ экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 (фМЭН-1, n=11) и генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 (гМЭН-1, n=22). Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. На тепловой карте представлены 24 различно экспрессирующихся микроРНК между группами. Синий цвет соответствует низкому уровню экспрессии, красный – высокому.

При сравнении образцов групп фМЭН-1 и относительно здоровых добровольцев выявлено 10/136 различно экспрессирующихся микроРНК после поправки на множественность сравнений: экспрессия 5 микроРНК была выше в группе фМЭН-1 по сравнению с относительно здоровыми добровольцами, 5 микроРНК – ниже (табл. 19). По данным кластерного анализа, представленного в виде тепловой карты, выявлено относительное распределение почти всех пациентов по группам (рис. 18).

Таблица 19 – МикроРНК, различно экспрессирующиеся в плазме крови пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 (n=11) по сравнению с относительно здоровыми добровольцами (n=12)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	<i>P</i> -value	<i>P</i> _{adj}
hsa-miR-191-5p	-1,443400907	<0,001	<0,001
hsa-miR-151a-3p	-1,12317685	<0,001	0,011
hsa-miR-122-5p	1,446066119	0,001	0,021
hsa-let-7c-5p	0,818596195	0,005	0,036
hsa-let-7d-5p	0,774800159	0,005	0,036
hsa-miR-103a-3p	-0,900004745	0,005	0,036
hsa-miR-944	-4,561758016	0,005	0,036
hsa-miR-98-5p	1,077574285	0,003	0,036
hsa-miR-142-5p	0,653900023	0,007	0,043
hsa-miR-486-5p	-0,638949347	0,009	0,046

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; *p*_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg.

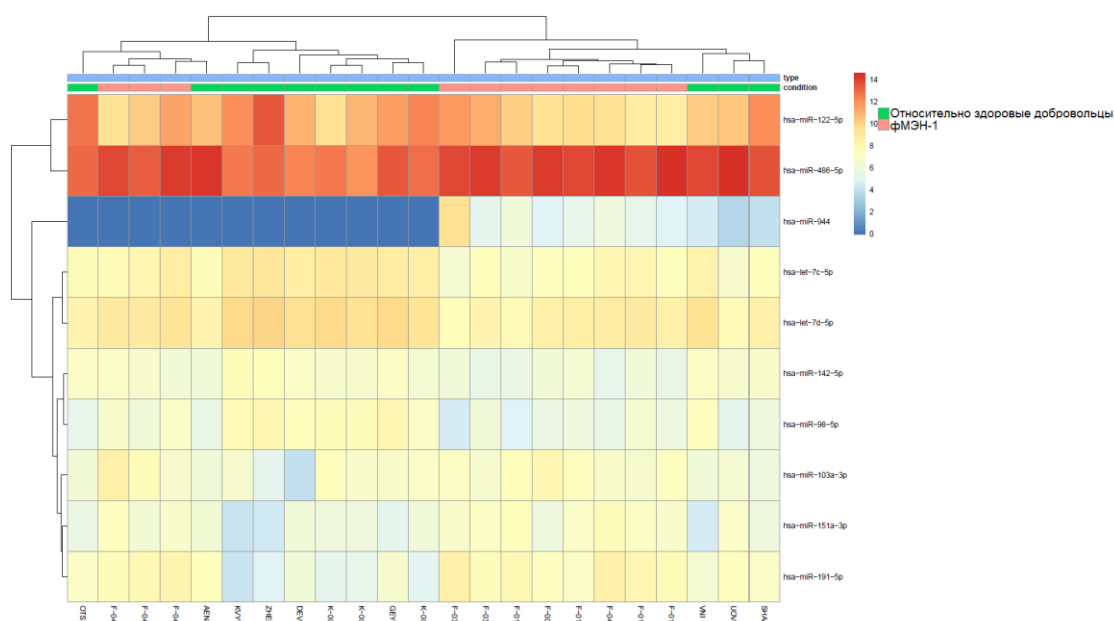


Рисунок 18 – Кластерный анализ экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с

фенокопиями синдрома МЭН-1 (фМЭН-1, n=11) и относительно здоровыми добровольцами (n=12). Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. На тепловой карте представлены 10 различно экспрессирующихся микроРНК между группами. Синий цвет соответствует низкому уровню экспрессии, красный – высокому.

Показатели экспрессии микроРНК плазмы крови у пациентов с СА в сравнении с относительно здоровыми добровольцами представлены в таблице 20. Получены статистически значимые различия в экспрессии 2/10 микроРНК. По данным кластерного анализа, представленного в виде тепловой карты, выявлено относительно четкое распределение почти всех пациентов по группам (рис. 19).

Таблица 20 – МикроРНК, различно экспрессирующиеся в плазме крови пациентов со sporadic акромегалией (n=12) по сравнению с относительно здоровыми добровольцами (n=12)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	P-value	P _{adj}
hsa-miR-944	4,328350984	<0,001	<0,001
hsa-miR-191-5p	1,301247349	<0,001	0,016
hsa-miR-21-5p	-1,055264171	0,002	0,072
hsa-let-7c-5p	-0,679733967	0,016	0,337
hsa-let-7d-5p	-0,633361291	0,019	0,337
hsa-miR-144-3p	-4,255981877	0,030	0,337
hsa-miR-148a-3p	-0,51349594	0,026	0,337
hsa-miR-320a	0,861034826	0,018	0,337
hsa-miR-342-3p	1,056898312	0,031	0,337
hsa-miR-4324	6,778903641	0,022	0,337

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; p_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg (полужирным выделены статистически значимые результаты).

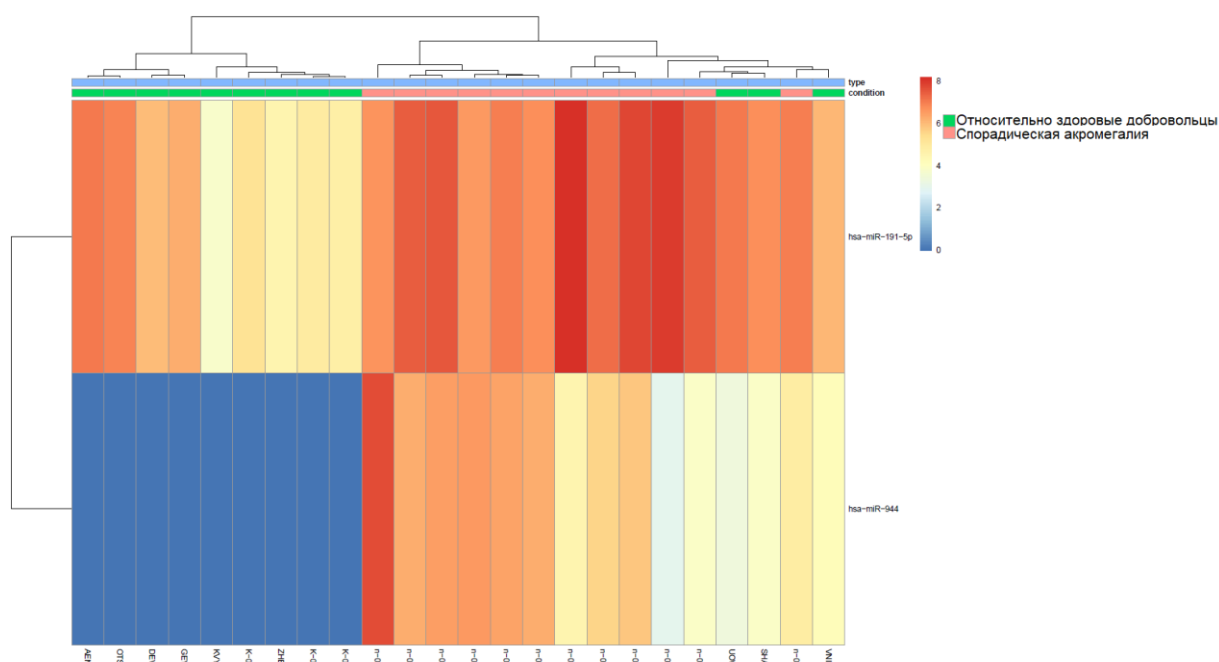


Рисунок 19 – Кластерный анализ экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с спорадической акромегалией (n=12) и относительно здоровыми добровольцами (n=12). Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. На тепловой карте представлена 1 различно экспрессирующаяся микроРНК между группами. Синий цвет соответствует низкому уровню экспрессии, красный – высокому.

Изменение экспрессии микроРНК плазмы крови у пациентов с сПГПТ по сравнению с относительно здоровыми добровольцами приведены в таблице 21. Выявлены статистически значимые различия в экспрессии 4/171 микроРНК после поправки на множественность сравнений: hsa-let-7d-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-let-7c-5p с экспрессией выше и hsa-miR-191-5p с экспрессией ниже в группе относительно здоровых добровольцев по сравнению с группой сПГПТ. По данным кластерного анализа, представленного в виде тепловой карты, выявлено относительно четкое распределение почти всех пациентов по группам (рис. 20).

Таблица 21 – МикроРНК, различно экспрессирующиеся в плазме крови пациентов со спорадическим первичным гиперпаратиреозом (n=11) по сравнению с относительно здоровыми добровольцами (n=12)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	P-value	P _{adj}
hsa-let-7d-5p	-1,3593	<0,001	<0,001
hsa-miR-98-5p	-1,61983	<0,001	<0,001
hsa-let-7c-5p	-1,22921	<0,001	<0,001
hsa-miR-191-5p	1,281938	<0,001	0,007
hsa-miR-223-5p	4,428969	0,003	0,081
hsa-miR-30d-5p	0,745842	0,003	0,081
hsa-miR-342-3p	1,136583	0,003	0,081

hsa-miR-423-3p	1,780539	0,004	0,093
hsa-miR-150-5p	1,549711	0,006	0,122
hsa-miR-328-3p	1,809583	0,009	0,161

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; P_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg (полужирным выделены статистически значимые результаты).

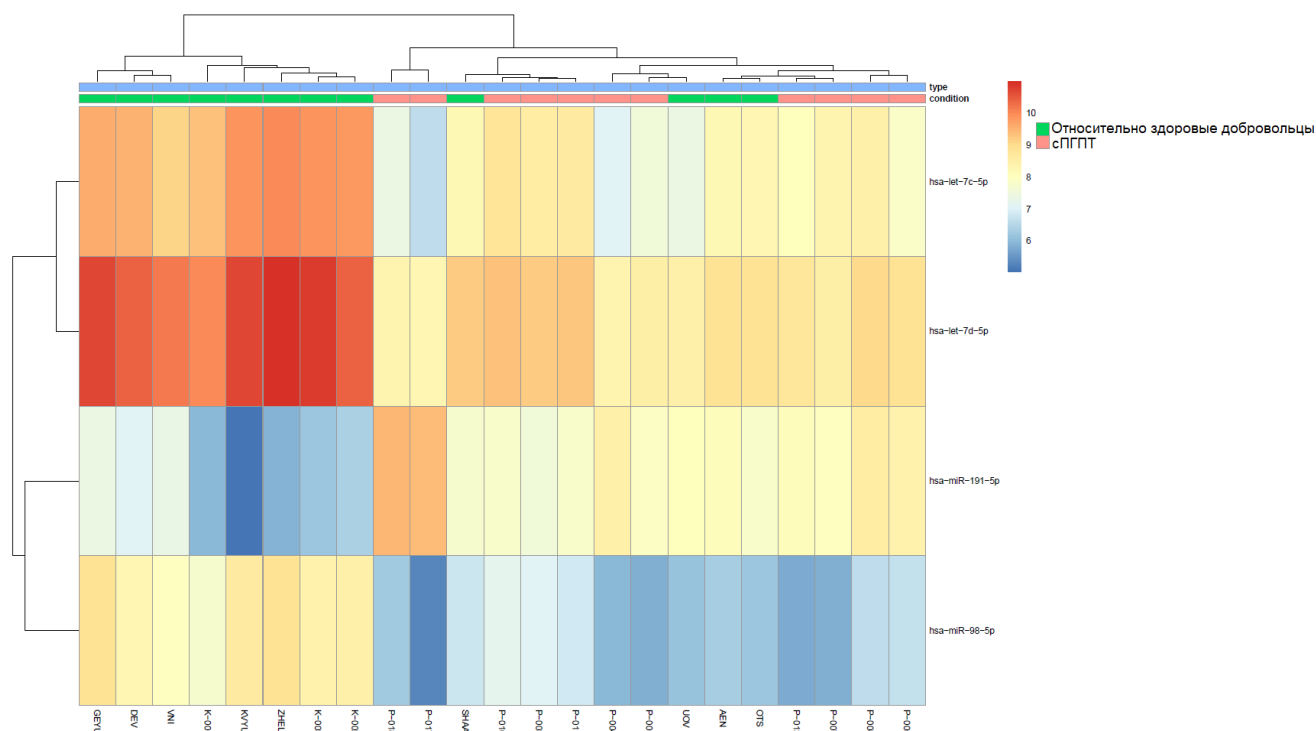


Рисунок 20 – Кластерный анализ экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с спорадическим первичным гиперпаратиреозом (n=11) и относительно здоровыми добровольцами (n=12). Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. На тепловой карте представлены 4 различно экспрессирующихся микроРНК между группами. Синий цвет соответствует низкому уровню экспрессии, красный – высокому.

В группах гМЭН-1 и здоровых добровольцев обнаружено 26/229 различно экспрессирующихся микроРНК после поправки на множественность сравнений: экспрессия 24 микроРНК была выше в группе гМЭН-1 по сравнению с относительно здоровыми добровольцами, а двух микроРНК – ниже (табл. 22). По данным кластерного анализа, представленного в виде тепловой карты, выявлено относительно четкое распределение большинства пациентов по группам (рис. 21).

Таблица 22 – МикроРНК, различно экспрессирующиеся в плазме крови пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 (n=22) по сравнению с относительно здоровыми добровольцами (n=12)

МикроРНК	Изменение экспрессии (Log2FC)	<i>P</i> -value	<i>P</i> _{adj}
hsa-miR-144-5p	6,08582868	<0,001	<0,001
hsa-miR-576-5p	5,16822953	<0,001	<0,001
hsa-miR-25-5p	5,20025574	<0,001	<0,001
hsa-miR-1976	5,19189151	<0,001	<0,001
hsa-miR-30a-3p	5,03902427	<0,001	<0,001
hsa-miR-532-3p	4,66548457	<0,001	<0,001
hsa-miR-3187-3p	4,83344	<0,001	<0,001
hsa-miR-574-3p	4,72875095	<0,001	<0,001
hsa-miR-4306	4,16210513	<0,001	<0,001
hsa-miR-130b-3p	4,96545191	<0,001	<0,001
hsa-miR-4433a-3p	4,78070233	<0,001	<0,001
hsa-miR-215-5p	4,29485814	<0,001	0,002
hsa-miR-598-3p	4,16363308	<0,001	0,002
hsa-miR-375	-2,3863249	<0,001	0,003
hsa-miR-1301-3p	4,2801957	<0,001	0,004
hsa-miR-625-5p	4,07414886	<0,001	0,005
hsa-miR-345-5p	4,04561494	<0,001	0,005
hsa-miR-99b-5p	4,00624917	<0,001	0,006
hsa-miR-99a-5p	4,08451382	0,001	0,015
hsa-miR-205-5p	4,91427045	0,001	0,016
hsa-miR-500a-3p	4,11486108	0,002	0,020
hsa-miR-326	4,15283791	0,002	0,025
hsa-miR-190b	3,88135069	0,003	0,033
hsa-miR-485-5p	4,05336094	0,003	0,033
hsa-miR-210-3p	3,78702475	0,004	0,034
hsa-miR-10a-5p	-2,2996825	0,005	0,045

Примечание: значения «изменения экспрессии» со знаком «-» означают пониженную экспрессию; анализ изменения экспрессии проводился с использованием DESeq2, который оценивает изменение кратности Log2FC, используя в качестве входных данных необработанные, ненормализованные количества прочтений; *P*_{adj} – поправка на множественность сравнений методом Benjamini–Hochberg.

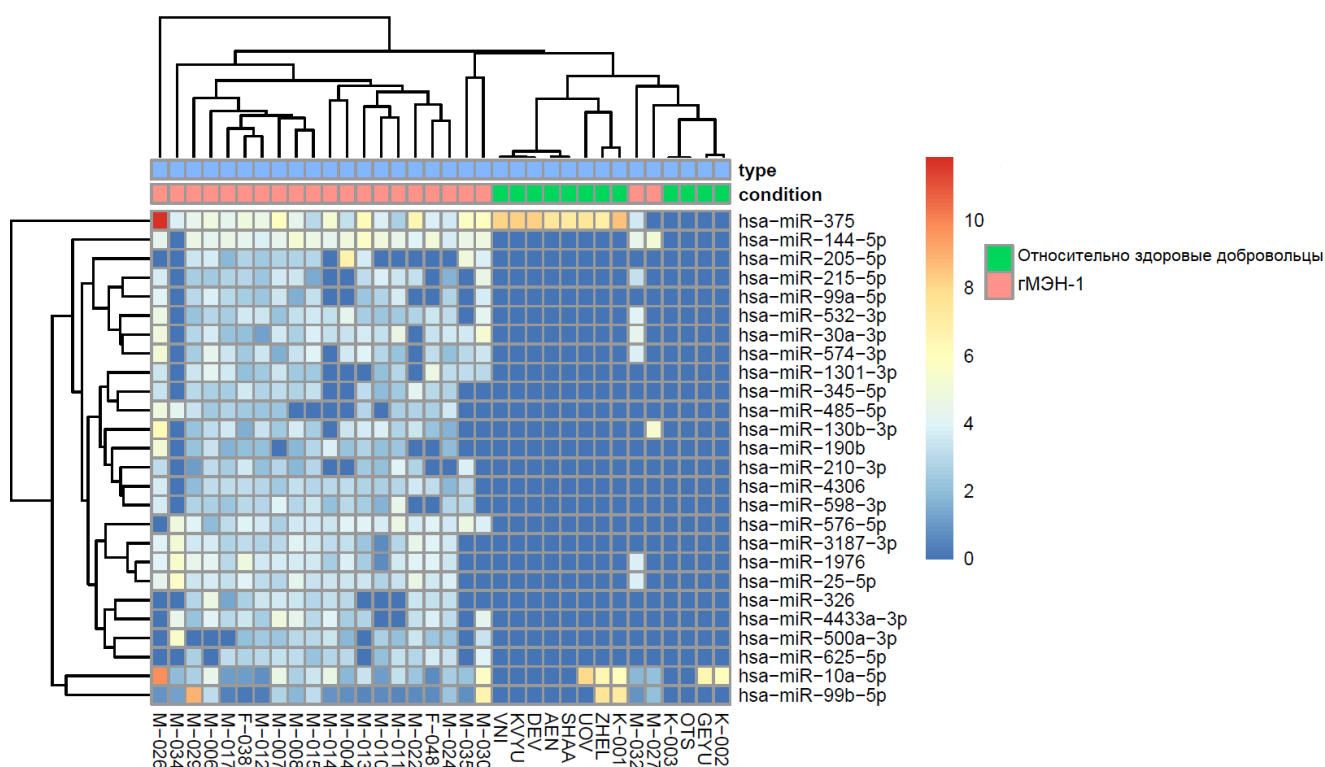
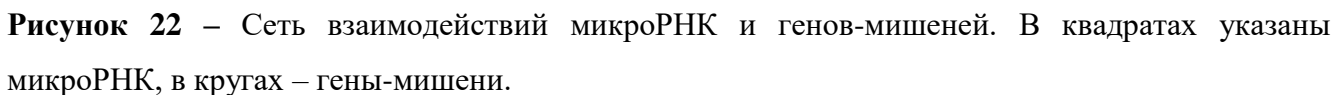


Рисунок 21 – Кластерный анализ экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с генетически верифицированного синдрома МЭН-1 (n=22) и относительно здоровыми добровольцами (n=12). Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. На тепловой карте представлены 26 различно экспрессирующихся микроРНК между группами. Синий цвет соответствует низкому уровню экспрессии, красный – высокому.

Проведенный с помощью miRNet 2.0 [172] анализ показал, что обнаруженные микроРНК, влияя на их гены-мишени, регулируют транскрипционные факторы, молекулы сигнальных путей, клеточные циклы, дифференцировку клеток, канцерогенез и гены-онкосупрессоры (рис. 22). Также стоит отметить, что такие гены как *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDC73*, *CDKN2A*, с которыми могут потенциально взаимодействовать указанные микроРНК, ассоциированы с МЭН-1 подобными проявлениями.

Для дальнейшей верификации полученных результатов методом RT-qPCR выбраны одни из наиболее отличающихся по профилю экспрессии микроРНК: hsa-miR-98-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-944, hsa-miR-760, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-3613-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-1976, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-501-3p. Также в этот список была включена микроРНК hsa-miR-24-3p, которая связывается с 3'НТО мРНК гена *MEN1* и имеет петлю обратной отрицательной связи с менином [7, 88].



3.3.3 Клиническая характеристика пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в исследование экспрессии микроРНК методом RT-qPCR

В валидизирующую часть исследования было включено 80 пациентов, однако после проведения контроля качества и отбраковки невалидных образцов 5 пациентов в итоге были исключены из анализа. По количеству пациентов группы были распределены следующим образом: в группу фМЭН-1 вошли 16 пациентов (8/16 пациентов включены из анализа экспрессии микроРНК методом NGS), в группу СА – 15 пациентов, в группу сППТ – 14 пациентов, в группу гМЭН-1 – 17 пациентов (8/17 пациентов включены из анализа экспрессии микроРНК методом NGS), в группу относительно здоровых добровольцев – 13 человек. Основные характеристики групп представлены в таблице 23. Все группы не отличались по полу и ИМТ; группа гМЭН-1 отличалась от группы фМЭН-1 по возрасту.

Таблица 23 – Характеристики пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в анализ экспрессии микроРНК плазмы крови методом RT-qPCR

Показатель	фМЭН-1 n=16	СА n=15	сППТ n=14	гМЭН-1 n=17	З n=13	P-value
Пол, жен, n (%)	15 (93,8)	12 (80,0)	13 (92,9)	15 (88,2)	11 (84,6)	0,777
Возраст, лет Me [Q1; Q3]	59 [53; 67]	55 [53; 59]	60 [57; 66]	41 [38; 52]	58 [50; 61]	<0,001 p ₁₋₂ = 0,281 p ₁₋₃ = 0,411 p₁₋₄ = 0,001 p ₁₋₅ = 0,475 p ₂₋₅ = 0,751 p ₃₋₅ = 0,141 p ₄₋₅ = 0,035
ИМТ, кг/м ² , Me [Q1; Q3]	28,95 [26,8; 30,6]	27,8 [24,3; 32,0]	32,1 [24,7; 34,2]	26,1 [22,1; 30,0]	24,9 [22,9; 32,8]	0,087

Примечание: Сравнение качественных параметров проводилось при помощи двустороннего точного критерия Фишера. Сравнение количественных параметров – при помощи критерия Краскела-Уоллиса (попарно при помощи критерия Манна-Уитни). Поправка на множественность сравнений проводилась методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считался $p < 0,007$ ($0,05/7$; группы СА, сППТ, гМЭН-1 между собой не сравнивались; полужирным выделены статистически значимые результаты). фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, СА – спорадическая акромегалия, сППТ – спорадический первичный гиперпаратиреоз, гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, З – относительно здоровые добровольцы.

В группу фМЭН-1 вошли 14 пациентов с сочетанием акромегалии и ППТ в активной стадии заболеваний и 2 пациента с сочетанием БИК и ППТ, также в активной стадии. У 6/16 пациентов, кроме поражения гипофиза и ОЩЖ, были выявлены другие эндокринные и неэндокринные образования (табл. 24). Во всех случаях аденома гипофиза была диагностирована раньше, чем ППТ; медиана до диагностики второй эндокринной опухоли составила 2 года [1; 7,5].

Таблица 24 – Характеристика пациентов с множественными образованиями (6/16) в группе фенокопий синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа на момент исследования

№	Возраст, пол	Образования
1	60, ж	СТГ-АГ, аденома правой верхней ОЩЖ, диффузная гиперплазия обоих надпочечников, кисты в левой почке (I, II, IIF, III, IV типы по Bosniak)
2	59, ж	СТГ-АГ, ППТ без визуализации, ГНО головки поджелудочной железы, образование правого надпочечника нейрогенный природы, узелковая гиперплазия левого надпочечника без гормональной активности, нейрофиброма забрюшинного пространства справа

3	56, ж	СТГ-АГ, аденомы левой и правой нижних ОЩЖ, интратиреоидная аденома ОЩЖ, ГНО левого надпочечника, гемангиома правой теменной кости
4	76, ж	СТГ-АГ, аденома левой верхней ОЩЖ, простые кисты печени, кистозное образование головки поджелудочной железы, диффузная гиперплазия надпочечников без гормональной активности
5	67, ж	СТГ-АГ, ПППТ без визуализации, макронодулярная гиперплазия надпочечников без гормональной активности, менингиома правой височной области
6	74, ж	СТГ-АГ, аденома правой верхней ОЩЖ, ГНО правого надпочечника

Примечание: ГНО – гормонально-неактивное образование; ОЩЖ – околощитовидная железа; ПППТ – первичный гиперпаратиреоз, СТГ-АГ – соматотропинома, ж – женщины.

При анализе лабораторных показателей (табл. 25) группы фМЭН-1 (14/16 пациентов) и СА не отличались по уровню ИФР-1 ($p=1,000$), но отличались по уровню кальция общего ($p<0,001$) и кальция, скорректированного по альбумину ($p<0,001$). Группа фМЭН-1 (16/16 пациентов) не отличалась от группы сПППТ по уровню кальция общего ($p=0,697$), кальция, скорректированного по альбумину ($p=0,821$), и ПТГ ($p=0,183$). Группа фМЭН-1 (16/16) не отличалась от группы гМЭН-1 по уровню кальция общего ($p=0,374$) и скорр. по альбумину (0,367) и ПТГ ($p=0,183$), а также не отличалась от 4-пациентов из группы гМЭН-1 по уровню ИФР-1 ($p=0,232$). Группа относительно здоровых добровольцев отличалась по уровню кальция общего ($p<0,001$) и кальция, скорректированного по альбумину ($p<0,001$), от групп сПППТ и фМЭН-1 (16/16 пациентов).

Таблица 25 – Лабораторные показатели пациентов и относительно здоровых добровольцев, включенных в анализ экспрессии микроРНК плазмы крови методом RT-qPCR

Параметр	фМЭН-1 (n=11)	гМЭН-1 (n=22)	СА (n=12)	сПППТ (n=11)	З (n=12)	P-value
ИФР-1, нг/мл, Me [Q1; Q3]	567,4 [453,5; 783,0] (n=14)	399,1 [345,5; 591,0] (n=4)	633,6 [433,3; 750,4]	–	111,3 [91,9; 152,8]	$P=0,003$ $P_{1-2}=0,232$ $P_{1-3}=1,000$ $P_{1-5}<0,001$ $P_{3-5}<0,001$
ПТГ, пг/мл, Me [Q1; Q3]	115,9 [83,4; 141,1]	135,2 [95,3; 159,3]	–	165,0 [88,6; 283,5]	–	$P=0,183$
Кальций общ, ммоль/л Me [Q1; Q3],	2,73 [2,67; 2,78]	2,69 [2,50; 2,83]	2,51 [2,43; 2,56]	2,66 [2,60; 2,89]	2,38 [2,27; 2,38]	$P<0,001$ $P_{1-2}=0,374$ $P_{1-3}<0,001$ $P_{1-4}=0,473$

						$P_{1-5} < 0,001$ $P_{2-5} = 0,001$ $P_{3-5} = 0,233$ $P_{4-5} = 0,005$
Кальций скорр., ммоль/л Ме [Q1; Q3]	2,64 [2,54; 2,72]	2,62 [2,46; 2,75]	2,42 [2,34; 2,46]	2,60 [2,52; 2,80]	2,27 [2,18; 2,33]	$P < 0,001$ $P_{1-2} = 0,367$ $P_{1-3} = 0,003$ $P_{1-4} = 0,759$ $P_{1-5} < 0,001$ $P_{2-5} = 0,002$ $P_{3-5} = 0,400$ $P_{4-5} = 0,007$

Примечание: Сравнение количественных параметров – при помощи критерия Краскела-Уоллиса (поправку при помощи критерия Манна-Уитни). Поправка на множественность сравнений проводилась методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считался $P < 0,007$ ($0,05/7$; группы СА и сППТ не сравнивались). фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, СА – спорадическая акромегалия, сППТ – спорадический первичный гиперпаратиреоз, гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, 3 – относительно здоровые добровольцы.

В группе гМЭН-1 у всех пациентов имелись АГ и ПГПТ. По секреции АГ были разделены следующим образом: 9 – ПРЛ, 3 – НАГ, 3 – смешанные СТГ+ПРЛ, 1 – соматотропинома, 1 – кортикотропинома. Только АГ и ПГПТ на момент включения в исследование были выявлены у 2/17 пациента; АГ, ПГПТ, образования поджелудочной железы – у 4/17 пациентов; у остальных пациентов компоненты синдрома МЭН-1 представлены большим количеством эндокринных и неэндокринных поражений и более подробно отображены в таблице 26.

Таблица 26 – Характеристика пациентов с множественными образованиями в группе генетически подтвержденного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа на момент проведения исследования

№	Возраст, пол	Образования
1	39, ж	ПРЛ-АГ, гиперплазия 1 ОЩЖ, проинсулинома, ГНО поджелудочной железы, узелковая гиперплазия обоих надпочечников, ГНО латеральной ножки левого надпочечника
2	43, ж	ПРЛ-АГ, гиперплазия 1 ОЩЖ, ГНО хвоста, перешейка, крючковидного отростка поджелудочной железы, нисходящего отдела двенадцатиперстной кишки, ГНО левого надпочечника
3	53, ж	НАГ, образования атипично расположенной ОЩЖ, ГНО поджелудочной железы, НЭО правого легкого (S1), ГНО правого надпочечника, гемангиома печени (S7)

4	49, ж	АКТГ-АГ, образования 3 ОЩЖ в средостении, множественные ГНО поджелудочной железы, НЭО правого легкого (S8/S9), множественные образования печени вторичного характера (mts)
5	39, ж	СТГ/ПРЛ-АГ, гиперплазия 1 ОЩЖ, ГНО тела поджелудочной железы, гиперплазия левого надпочечника, образование молочной железы
6	37, ж	ПРЛ-АГ, образования 2 ОЩЖ, ГНО культи поджелудочной железы, ГНО обоих надпочечников
7	41, ж	СТГ/ПРЛ-АГ, образования 2 ОЩЖ, инсулиномы поджелудочной железы, ГНО крючковидного отростка поджелудочной железы, ГНО левого надпочечника, папиллярный рак щитовидной железы
8	52, ж	ПРЛ-АГ, образования 2 ОЩЖ, множественные НЭО головки поджелудочной железы гормонально-неактивные, узелковая гиперплазия обоих надпочечников, лимфаденопатия брюшной полости,
9	42, м	СТГ/ПРЛ-АГ, гиперплазия 3 ОЩЖ, узелковая гиперплазия обоих надпочечников
10	63, ж	НАГ, образование 1 ОЩЖ, НЭО поджелудочной железы, гормонально-неактивное
11	68, ж	ПРЛ-АГ, образование 1 ОЩЖ, НЭО поджелудочной железы, узелковая гиперплазия обоих надпочечников, образование в S8 нижней доли левого легкого (Lung-RADS 4A), гормонально-неактивное, гиперваскулярное образование правой почки, образование дна желудка, гормонально-неактивное

Примечание: ПРЛ-АГ – пролактинома; НАГ – гормонально-неактивная аденома гипофиза; СТГ-АГ – соматотропинома; НЭО – нейроэндокринное образование; ГНО – гормонально-неактивное образование; ОЩЖ – околощитовидная железа; ж – женщины; м – мужчины.

3.3.4 Анализ экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1, спорадическими акромегалией, первичным гиперпаратиреозом, генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами методом RT-qPCR

Амплификации таких микроРНК как hsa-miR-335-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-1976, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-944, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-3613-5p не было обнаружено в изученных образцах. Ниже представлены показатели экспрессии микроРНК плазмы у пациентов и относительно здоровых добровольцев в таблице 27. После поправки на множественность сравнений получены статистически значимые различия по микроРНК hsa-miR-576-5p между группами.

Таблица 27 – Экспрессия микроРНК плазмы крови у пациентов и у лиц из группы относительно здоровых добровольцев, измеренная методом RTqPCR

Показатель	N	З	N	гМЭН-1	N	фМЭН-1	N	сПГПТ	N	СА	P-value	*P _{adj}
hsa-miR-98-5p	6	2,682 (4,827)	14	1,898 (1,274)	11	1,756 (1,609)	10	1,071 (1,187)	11	0,7368 (0,499)	0,085	0,170
hsa-miR-576-5p	9	1,162 (0,528)	10	2,725 (1,776)	12	0,709 (0,529)	14	1,140 (1,157)	14	1,007 (1,844)	0,003	0,030
hsa-miR-32-5p	13	2,792 (3,563)	17	0,6127 (0,649)	16	1,524 (1,876)	14	0,2701 (0,192)	15	0,4445 (0,501)	0,040	0,100
hsa-miR-30a-3p	9	1,118 (0,437)	14	2,335 (1,347)	15	2,682 (2,620)	14	1,079 (0,445)	15	1,296 (0,521)	0,037	0,100
hsa-miR-144-5p	13	2,904 (6,476)	17	1,027 (0,944)	16	2,582 (7,012)	14	0,6971 (0,363)	15	0,5533 (0,341)	0,254	0,317
hsa-miR-486-5p	9	1,182 (2,314)	17	1,790 (1,760)	16	1,721 (2,068)	14	0,4201 (0,340)	14	0,4791 (0,328)	0,021	0,100
hsa-let-7d-5p	13	2,303 (4,830)	17	1,062 (0,749)	16	1,796 (1,365)	14	1,144 (0,980)	15	4,040 (10,73)	0,289	0,321
hsa-miR-24-3p	13	1,307 (1,384)	17	1,197 (0,656)	16	1,041 (0,402)	14	0,9934 (0,519)	15	0,7561 (0,299)	0,189	0,270
hsa-miR-760	10	8,806 (17,42)	14	4,425 (8,971)	14	1,045 (0,862)	12	1,976 (4,880)	12	8,750 (23,10)	0,724	0,724
hsa-miR-141-3p	9	1,559 (1,376)	13	3,842 (3,049)	11	4,619 (3,526)	11	2,043 (0,562)	11	3,716 (3,624)	0,153	0,255

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Данные по экспрессии представлены в виде средней и стандартного отклонения. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Краскела-Уоллиса. *Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга (полужирным выделены статистически значимые результаты). фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, СА – спорадическая акромегалия, сПГПТ – спорадический первичный гиперпаратиреоз, гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, З – относительно здоровые добровольцы.

В дальнейшем сравнение проводилось по тем микроРНК, по которым были выявлены статистически значимые результаты.

При сравнении групп гМЭН-1 и фМЭН-1 (табл. 28) получены статистически значимые различия в экспрессии hsa-miR-576-5p у пациентов с гМЭН-1 (2,725, 95% ДИ: 1,048; 4,116) от пациентов с фМЭН-1 (0,709, 95% ДИ: 0,374; 0,898) ($P_{adj} = 0,004$).

Таблица 28 – Экспрессия микроРНК плазмы крови у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и фенокопиями синдрома МЭН-1, измеренная методом RTqPCR

Показатель	N	гМЭН-1	N	фМЭН-1	Log2FC	P-value	* P_{adj}
hsa-miR-576-5p	10	2,725 (1,776)	12	0,709 (0,529)	2,067	0,001	0,004
hsa-miR-32-5p	17	0,6127 (0,649)	16	1,524 (1,876)	-0,834	0,245	0,490
hsa-miR-30a-3p	14	2,335 (1,347)	15	1,931 (2,135)	0,601	0,621	0,828
hsa-miR-486-5p	17	1,790 (1,760)	16	1,721 (2,068)	0,406	0,986	0,986

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Данные по экспрессии представлены в виде средней и стандартного отклонения. Log2FC – бинарные логарифмы значений кратности изменений, рассчитанных как отношения геометрических средних значений $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни. *Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга (полужирным выделены статистически значимые результаты). фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа.

Графически выявленные различия представлены на рисунке 23.

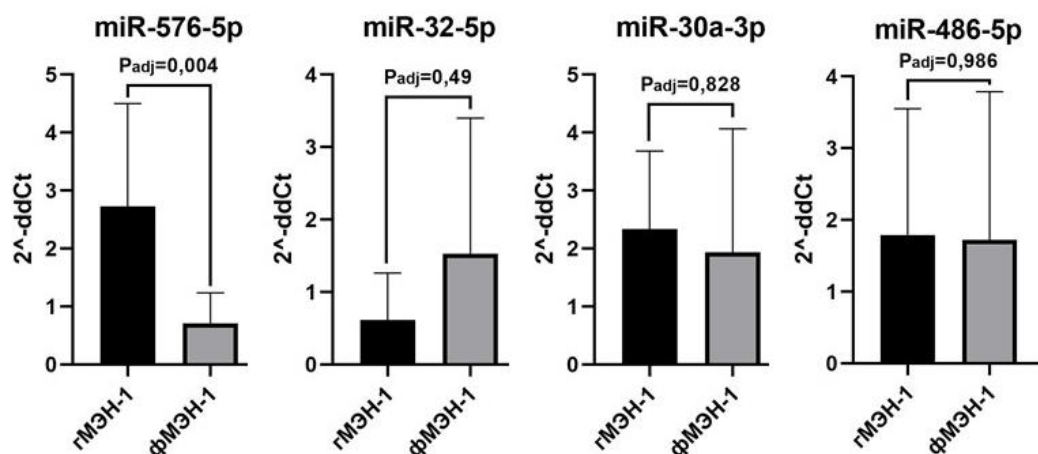


Рисунок 23 – Экспрессия микроРНК в плазме крови у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 ($n_{\text{miR-576-5p}}=10$; $n_{\text{miR-32-5p}}=17$; $n_{\text{miR-30a-3p}}=14$; $n_{\text{miR-486-5p}}=17$) в сравнении с фенокопиями синдрома МЭН-1 ($n_{\text{miR-576-5p}}=12$; $n_{\text{miR-32-5p}}=16$; $n_{\text{miR-30a-3p}}=15$; $n_{\text{miR-486-5p}}=16$). Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Данные представлены в виде средней, стандартного отклонения и 95% доверительного

интервала. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни. *гМЭН-1* – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, *фМЭН-1* – фенотипии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа.

При сравнении фМЭН-1 с группами пациентов с СА и сПППТ (таблицы 29 и 30) после поправки на множественность сравнений не было выявлено различий по нижеуказанным микроРНК.

Таблица 29 – Экспрессия микроРНК плазмы крови у пациентов с фенотипиями синдрома МЭН-1 и спорадической акромегалией, измеренная методом RTqPCR

Показатель	N	фМЭН-1	N	СА	Log2FC	P-value	*P _{adj}
hsa-miR-576-5p	10	0,766 (0,564)	14	1,007 (1,844)	0,098	0,931	0,931
hsa-miR-32-5p	14	1,175 (0,800)	15	0,4445 (0,5006)	1,637	0,029	0,073
hsa-miR-30a-3p	13	2,931 (2,738)	15	1,296 (0,5210)	0,660	0,235	0,391
hsa-miR-486-5p	14	3,319 (3,971)	14	0,4791 (0,3277)	1,960	0,014	0,070

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Данные по экспрессии представлены в виде средней и стандартного отклонения. Log2FC – бинарные логарифмы значений кратности изменений, рассчитанных как отношения геометрических средних значений $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни. *Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга (полужирным выделены статистически значимые результаты). фМЭН-1 – фенотипии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, СА – спорадическая акромегалия.

Таблица 30 – Экспрессия микроРНК плазмы крови у пациентов с фенотипиями синдрома МЭН-1 и спорадическим гиперпаратиреозом, измеренная методом RTqPCR

Показатель	N	фМЭН-1	N	сПППТ	Log2FC	P-value	*P _{adj}
hsa-miR-576-5p	12	0,709 (0,529)	14	1,140 (1,157)	-0,513	0,432	0,432
hsa-miR-32-5p	16	1,524 (1,876)	14	0,2701 (0,1917)	1,860	0,027	0,067
hsa-miR-30a-3p	15	1,931 (2,135)	14	1,079 (0,4449)	0,383	0,102	0,169
hsa-miR-486-5p	16	2,926 (3,850)	14	0,4201 (0,3399)	1,872	0,027	0,067

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Данные по экспрессии представлены в виде средней и стандартного отклонения. Log2FC – бинарные логарифмы значений кратности изменений, рассчитанных как отношения геометрических средних значений $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни. *Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга (полужирным выделены статистически значимые результаты). фМЭН-1 – фенотипии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, СА – спорадическая акромегалия, сПППТ – спорадический первичный гиперпаратиреоз.

При сравнении группы фМЭН-1 с относительно здоровыми добровольцами, не было выявлено различий в экспрессии указанных микроРНК (табл. 31). При сравнении пациентов с гМЭН-1 со здоровыми добровольцами (табл. 32) изменения экспрессии hsa-miR-576-5p и hsa-miR-30a-3p были, в целом, аналогичны результатам метода NGS, хотя и не достигли статистической значимости после поправки на множественность сравнений.

Таблица 31 – Экспрессия микроРНК плазмы крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами, измеренная методом RTqPCR.

Показатель	N	фМЭН-1	N	З	Log2FC	P-value	*P _{adj}
hsa-miR-576-5p	12	0,709 (0,529)	9	1,162 (0,528)	-0,895	0,095	0,237
hsa-miR-32-5p	16	1,524 (1,876)	13	2,792 (3,563)	-0,587	0,531	0,531
hsa-miR-30a-3p	15	1,931 (2,135)	9	1,118 (0,4373)	0,383	0,238	0,397
hsa-miR-486-5p	16	2,926 (3,850)	9	1,182 (2,314)	1,035	0,394	0,492

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Данные по экспрессии представлены в виде средней и стандартного отклонения. Log2FC – бинарные логарифмы значений кратности изменений, рассчитанных как отношения геометрических средних значений $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни. *Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга (полужирным выделены статистически значимые результаты). фМЭН-1 – фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа, З – относительно здоровые добровольцы.

Таблица 32 – Экспрессия микроРНК плазмы крови у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 и относительно здоровыми добровольцами, измеренная методом RTqPCR.

Показатель	N	гМЭН-1	N	З	Log2FC	P-value	*P _{adj}
hsa-miR-576-5p	10	2,725 (1,776)	9	1,162 (0,528)	1,172	0,031	0,077
hsa-miR-32-5p	17	0,6127 (0,6490)	13	2,792 (3,563)	-1,421	0,157	0,157
hsa-miR-30a-3p	14	2,335 (1,347)	9	1,118 (0,4373)	0,984	0,019	0,077
hsa-miR-486-5p	17	1,790 (1,760)	9	1,182 (2,314)	0,094	0,053	0,088

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Данные по экспрессии представлены в виде средней и стандартного отклонения. Log2FC – бинарные логарифмы значений кратности изменений, рассчитанных как отношения геометрических средних значений $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни. *Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга (полужирным выделены статистически значимые результаты). гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа, З – относительно здоровые добровольцы.

3.3.5 Обсуждение полученных результатов

В ходе экспериментальной части исследования впервые в мире проанализирован профиль экспрессии микроРНК плазмы крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 методом NGS, а также проведено сравнение профилей экспрессии микроРНК с пациентами из группы генетически подтвержденного синдрома МЭН-1, спорадических акромегалии и первичного гиперпаратиреоза, и относительно здоровыми добровольцами. По данным NGS экспрессия микроРНК в группе фМЭН-1 достаточно хорошо различалась от группы гМЭН-1 и была схожа с группами спорадических акромегалии и ПГПТ. Полученные результаты позволили отобрать микроРНК для валидации методом RT-qPCR на другой выборке пациентов (группы СА, сПГПТ, 3 – полностью новые наблюдения, в группах гМЭН-1 и фМЭН-1 по половине новых пациентов). Одиннадцать из отобранных микроРНК, полученных в ходе NGS, не удалось амплифицировать в плазме крови у всех или у большинства пациентов методом RT-qPCR (hsa-miR-335-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-1976, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-944, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-3613-5p). Отсутствие амплификации в крови указанных микроРНК методом RT-qPCR может быть следствием их низкого содержания в плазме крови [166, 199]. Из оставшихся микроРНК (hsa-miR-98-5p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-760, hsa-miR-141-3p) у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 отмечено статистически значимое снижение уровня hsa-miR-576-5p по сравнению с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 ($\log_2FC = -2,067$; $P = 0,001$; $P_{adj} = 0,004$). Следует подчеркнуть, что изменения экспрессии между группами гМЭН-1 и фМЭН-1 были конкордантны с результатами метода NGS. Также следует отметить, что, как и по данным метода NGS, группа фМЭН-1 особо не отличалась от групп СА и сПГПТ.

Данное исследование является первой работой по оценке профиля экспрессии микроРНК в периферической крови пациентов с фМЭН-1 методом высокопроизводительного секвенирования и валидацией методом RT-qPCR. Ранее оценка экспрессии микроРНК в сыворотке крови у пациентов с гМЭН-1 по сравнению с их здоровыми родственниками проводилась в работе Kooblall K.G. и соавт., где оценивалась экспрессия циркулирующих микроРНК методом NGS с последующей валидацией методом RT-qPCR [209]. В своей работе авторы выявили, что экспрессия miR-3156-5p в плазме крови была значительно снижена у пациентов с гМЭН-1, чем у их родственников [209]. Авторы обнаружили, что мишенью данной микроРНК являлся ген *MORF4L2*, который ассоциирован с различными НЭО [209]. В нашей работе экспрессия miR-3156-5p не была выявлена.

В настоящее время нет работ по изучению экспрессии микроРНК miR-576-5p в образованиях ОЩЖ, гипофиза, НЭО ПЖ. По данным мировой литературы микроРНК miR-576-

5p играет важную роль в развитии различных видов рака человека. Так, в исследовании Wang Y.N. и соавт., экспрессия miR-576-5p в сыворотке крови наряду с другими микроРНК (miR-31, miR-141, miR-224-3p) была повышена у пациентов с колоректальным раком по сравнению со здоровыми добровольцами, как по данным анализа микрочипов, так и при последующей валидации методом PCR [236]. Усиленная экспрессия miR-576-5p была также выявлена в тканях аденокарциномы толстого кишечника, и способствовала пролиферации, миграции и инвазии клеток через регулятор роста нейронов 1 (NEGR1), который может являться основной терапевтической мишенью при аденокарциноме толстого кишечника [237]. А в исследовании Kordaß T. и соавт., экспрессия miR-576-5p в отличие от miR-193b и miR-30c-1 коррелировала с инвазивным потенциалом различных линий клеток меланомы человека, являясь таким образом онкогенной микроРНК [238]. Также повышенная экспрессия miR-576-5p была выявлена при раке эндометрия, где miR-576-5p способствовала пролиферации и метастазированию клеток рака эндометрия путем ингибирования экспрессии ZBTB4 [239]. В том числе повышение экспрессии miR-576-5p было обнаружено в плазме крови пациентов с глиобластомой методом NGS [240]. Повышенная экспрессия miR-576-5p в группе гМЭН-1 по сравнению с фМЭН-1 в нашем исследовании может быть, скорее всего, следствием большего количества НЭО с высоким злокачественным потенциалом, чем в группе фМЭН-1.

Как уже было указано выше, следующим этапом в изучении экспрессии микроРНК является определение функции микроРНК и поиск ее мишеней. Для этого могут быть использованы биоинформатические инструменты для идентификации мРНК-мишеней на основе их комплементарности с микроРНК [170]. Мы использовали 3 базы данных TargetScan [171], miRNet [172], miRDB [241] для поиска генов-мишеней выявленной микроРНК (таблица 33). При комбинации вышеуказанных методов возможно увеличить число истинных предсказаний мишеней микроРНК и ограничить количество ложноположительных результатов [161].

Таблица 33. Некоторые мишени микроРНК miR-576-5p, представленные в базах данных TargetScan, miRNet, miRDB

Базы данных Гены мишени	TargetScan	miRNet	miRDB
	n=5567	n=1214	n=1182
<i>CDKN1B</i>	—	+	—
<i>CDKN1A</i>	+ (-0,07)*	+	—
<i>CDKN2C</i>	+ (-0,01)*	—	—
<i>CDKN2B</i>	+ (-0,12)*	—	+ (78)#
<i>MAX</i>	+ (-0,01)*	+	—

<i>CDC73</i>	+	+	+
	(-0,07)*		(54)#
<i>CDKN2A</i>	+	—	—
	(-0,12)*		
<i>CCND1</i>	—	+	—
<i>PIK3CA</i>	+	+	—
	(-0,05)*		
<i>RBI</i>	+	—	+
	(-0,35)*		(98)#

Примечание: * – индекс cumulative weighted context++ score, отражающий вклад 14 показателей вероятности связывания, чем ближе значение к -3, тем больше вероятность воздействия микроРНК на мРНК гена-мишени. # – target score, результат прогнозирования гена-мишени (оценка предсказания мишени варьирует от 50 до 100. Чем выше оценка, тем больше уверенность в предсказании гена-мишени).

Большинство предсказанных генов-мишеней микроРНК miR-576-5p связаны со злокачественными опухолями, а также с образованиями, которые могут поражаться при синдроме МЭН-1 (например, *CDKN2A*, *CCND1*, *PIK3CA*, *RBI*). Указанные гены, в основном, влияют на фазы клеточного цикла (блокируют переход из G1 в S-фазу) и на сигнальные пути, участвующие в онкогенезе (например, PI3K/АКТ/mTOR). Также некоторые из них описаны как возможная альтернативная причина развития МЭН-1 подобных клинических проявлений (*CDKN1B*, *CDKN1A*, *CDKN2C*, *CDKN2B*, *MAX*, *CDC73*) [242].

Для подтверждения найденных биоинформатическим анализом генов-мишеней, необходимо проведение экспериментов *in vitro* и *in vivo* [161]. По данным литературы, из представленных взаимодействий экспериментально пока ни одна не подтверждалась. Однако было выявлено влияние miR-576-5p на часть сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR. Так в исследовании Hai R. и соавт., уровень экспрессии miR-576-5p в тканях папиллярного РЦЖ и клетках ПРЦЖ (TPC-1) был значительно повышен. *In vitro* сверхэкспрессия miR-576-5p способствовала пролиферации, миграции и инвазии клеток TPC-1, частично через сигнальный путь АКТ. Также авторы доказали *in vivo*, что при повышении уровня miR-576-5p скорость роста опухолей значительно увеличивалась, в то же время после снижения экспрессии miR-576-5p скорость роста опухоли существенно снижалась. Кроме того, экспрессия miR-576-5p приводила к повышенной экспрессии MAPK4 и усилению активности АКТ в клетках TPC-1, и, что вызванная miR-576-5p пролиферация клеток опосредована сигнальным путем MAPK4-АКТ в клетках TPC-1 [243].

Таким образом, при оценке профиля экспрессии микроРНК у пациентов с фМЭН-1 можно отметить, в целом, схожую со спорадическими аналогами заболеваний экспрессию микроРНК, и различную – с пациентами группы гМЭН-1. Также интересно, что при сравнении групп гМЭН-1 и фМЭН-1 не было выявлено различий в экспрессии miR-24-3p, что могло бы натолкнуть на мысль о схожей посттранскрипционной регуляции и вовлеченности сигнальных путей, в которых

участвует менин [7], однако различий по данной микроРНК не было выявлено и при сравнении группы ф-МЭН-1 с СА, сППТ и здоровыми добровольцами.

Полученные в данном разделе результаты были частично опубликованы автором диссертационной работы в 2023 г. [244].

Ограничения исследования

Несмотря на то, что все пациенты имели образования ОЩЖ и АГ, у пациентов в группе гМЭН-1 наблюдались, по большей части, различные проявления синдрома (НЭО легких, различные НЭО ПЖ, другие образования), которые в том числе могли вносить изменения в профиль экспрессии циркулирующих микроРНК. Стоит отметить, что ограничениями данной части исследования являлись различия по возрасту среди групп гМЭН-1 и фМЭН-, преобладание женского пола над мужским в группах, наличие аденом гипофиза с разным типом секреции (при исследовании методом RT-qPCR в группу фМЭН-1 добавлены АКТГ-секретирующие АГ). Также ограничением явилось и то, что больше половины микроРНК, выявленных методом NGS, не были амплифицированы должным образом в плазме крови методом RT-qPCR, что в свою очередь могло быть связано с их низкой концентрацией в крови при этих состояниях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа (МЭН-1), обусловленный мутациями в гене *MEN1*, предрасполагает к развитию сочетанного опухолевого поражения нескольких эндокринных желез, а также внеэндокринных проявлений. В случае выявления у пациента фенотипа МЭН-1 при отсутствии мутаций в гене *MEN1*, состояние расценивается как фенокопия данного синдрома. Одной из причин развития фенокопий МЭН-1 могут быть мутации в других генах, однако даже при полногеномном секвенировании остаётся группа пациентов с фенотипом синдрома МЭН-1, у которых мутации не выявляются. Исходя из этого, поиск клинических признаков, способных своевременно определять пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 или фенокопиями синдрома остается актуальной задачей. Другими возможными причинами сочетания нескольких эндокринных опухолей у таких пациентов могут быть эпигенетические изменения, влияющие на экспрессию менина, в том числе вследствие изменений профиля экспрессии микроРНК.

В ходе нашего исследования продемонстрированы существенные различия в группах генетически подтвержденного синдрома МЭН-1 (95 пациентов) и пациентов с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1 без мутаций (60 пациентов): пациенты с фенокопиями синдрома МЭН-1 чаще имеют поздний возраст дебюта заболевания, преимущественно имеют женский пол, а также отсутствие отягощенной семейной наследственности. У таких пациентов обычно имеется сочетание поражения одной околощитовидной железы и аденомы гипофиза, которая, в подавляющем большинстве, секретирует соматотропный гормон. В то время как у пациентов с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 чаще всего имеется множественное поражение околощитовидных желез, а аденомы гипофиза в основном секретируют пролактин. В группе фенокопий синдрома МЭН-1 заболевание преимущественно манифестирует с аденомы гипофиза, в отличие от группы генетически подтвержденного синдрома МЭН-1. Также у пациентов с фенотипом МЭН-1 без мутаций крайне редко проявляется третий компонент синдрома. Таким образом, сомнительно, что пациенты с фенотипом МЭН-1, а именно, сочетанием АГ и поражением одной ОЩЖ, без отягощенного наследственного анамнеза и отсутствием мутаций подвержены риску развития других опухолей, ассоциированных с МЭН-1, и что тактика их ведения должна быть схожей с истинным синдромом МЭН-1.

Нами был разработан метод определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа у пациентов с его фенокопиями, используя модель из 6 клинико-диагностических показателей, доступных при рутинном обследовании пациентов с фенотипом МЭН-1: количество пораженных ОЩЖ, возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1, наличие НЭО поджелудочной железы, отягощенная семейная наследственность, секреция аденомой гипофиза СТГ, пол, объединенных

при помощи метода k-ближайших соседей (kNN). Разработанная диагностическая модель обладает достаточной чувствительностью 94,4% и специфичностью 100% для прогнозирования вероятности наличия генетически верифицированного синдрома МЭН-1.

В ходе иммуногистохимического исследования мы выявили, что экспрессия менина в образцах аденом гипофиза у пациентов с фМЭН-1 сохранена и схожа с образцами от пациентов со спорадической акромегалией, хотя и несколько разной локализацией в структуре клетки, и отличается от образцов аденом гипофиза пациентов с гМЭН-1. Однако несмотря на выявленные различия, в группе пациентов с гМЭН-1 в части образцов может быть сохранена цитоплазматическая экспрессия менина, но не ядерная. По полученным данным можно предположить, что патогенез аденом гипофиза при фенокопиях синдрома МЭН-1 и спорадической акромегалии может иметь сходства, однако в группе фенокопий синдрома МЭН-1, по всей видимости, имеются и другие факторы, которые способствуют возникновению нескольких опухолей эндокринных желез у одного человека. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования с определением соматических мутаций, а также исследование эпигенетических факторов, сигнальных путей, в которых может участвовать менин.

В рамках работы впервые в мире оценена экспрессия микроРНК у пациентов с фМЭН-1 в плазме крови и проведен сравнительный анализ с профилем экспрессии микроРНК пациентов с гМЭН-1, спорадическими акромегалией и ПГПТ, а также здоровыми добровольцами методом высокопроизводительного секвенирования. По результатам исследования экспрессия циркулирующих микроРНК в плазме крови методом высокопроизводительного секвенирования группа фМЭН-1 отличалась от группы гМЭН-1 и была схожа с группами спорадических акромегалии и ПГПТ. Из всего пула микроРНК, полученных методом высокопроизводительного секвенирования, при подтверждении методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на другой выборке пациентов удалось получить статистически значимые различия по микроРНК miR-576-5p между группами гМЭН-1 и фМЭН-1. От групп спорадических акромегалии и ПГПТ пациенты с фМЭН-1 не отличались. Таким образом, при оценке профиля экспрессии микроРНК у пациентов с фМЭН-1 можно отметить, в целом, схожую со спорадическими аналогами заболеваний экспрессию циркулирующих микроРНК, и различную – с пациентами группы гМЭН-1. Учитывая повышенную экспрессию микроРНК miR-576-5p в группе гМЭН-1 по сравнению с группой фенокопий, и связь miR-576-5p со злокачественными образованиями, в дальнейшем представляется перспективным изучение miR-576-5p как маркера нейроэндокринных новообразований.

ВЫВОДЫ

1. Характерными отличительными особенностями пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 по сравнению с пациентами с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 являются присутствие только двух компонентов синдрома (88,3%, 95% ДИ 77,4–95,2%), а именно, сочетание первичного гиперпаратиреоза с поражением только 1 околощитовидной железы и СТГ-секретирующей аденомы гипофиза. Третье проявление синдрома у пациентов с фенокопиями МЭН-1 развивается редко (6,7%, 95% ДИ 1,8–16,2%).

2. Разработана диагностическая модель при помощи модели k-ближайших соседей (kNN), включающая такие признаки, как количество измененных ОЩЖ, возраст на момент постановки клинического диагноза, наличие НЭО поджелудочной железы, отягощенная наследственность, секреция аденомой гипофиза СТГ и пол, которая позволяет с чувствительностью 94,4% и специфичностью 100% определять вероятность генетически подтвержденного синдрома МЭН-1 среди пациентов с клиническими проявлениями синдрома МЭН-1.

3. Экспрессия менина в образцах тканей аденом гипофиза пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 не отличается от спорадических форм, но отличается от группы генетически подтвержденного синдрома МЭН-1.

4. Группа фенокопий синдрома МЭН-1 отличается сниженной экспрессией микроРНК в плазме крови (miR-944, miR-760, miR-25-5p, miR-3613-5p, miR-141-3p, miR-576-5p, miR-32-5p, miR-335-5p, miR-30a-3p, miR-425-3p, miR-501-3p) от группы генетически подтвержденного синдрома МЭН-1 по результатам высокопроизводительного секвенирования, в меньшей степени отличается от группы спорадического гиперпаратиреоза (miR-6124) и не отличается от группы спорадической акромегалии.

5. Валидизировано снижение концентрации miR-576-5p в периферической крови у пациентов с фенокопиями синдрома МЭН-1 по сравнению с генетически подтвержденным синдромом МЭН-1 при исследовании методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При оценке вероятности наличия фенокопий синдрома МЭН-1 необходимо обращать внимание на перечисленные клинические проявления: более старший возраст на момент постановки клинического диагноза МЭН-1, поражение только одной околощитовидной железы, секрецию аденомой гипофиза соматотропного гормона, отсутствие нейроэндокринного новообразования поджелудочной железы и какого-либо другого третьего проявления синдрома МЭН-1, отсутствиеотягощенной наследственности.

2. Для прогнозирования вероятности наличия генетически обусловленного синдрома МЭН-1 среди пациентов с его клиническими проявлениями в качестве первичного скрининга можно использовать диагностическую модель при помощи модели k-ближайших соседей (kNN) (<https://r-datascience.shinyapps.io/mencalc/>).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CaSR – calcium-sensing receptor, кальций чувствительный рецептор

CDKI – cyclin-dependent kinases inhibitors, ингибиторы циклин-зависимых киназ

Ct – cycle threshold, пороговый цикл

FIPA – familiar isolated pituitary adenomas, семейные изолированные аденомы гипофиза

HPT-JT – hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome, синдром гиперпаратиреоза с опухолью челюсти

kNN – k-nearest neighbors, метод k-ближайших соседей

Me – медиана

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, мультиплексная амплификация лигированных зондов

NEGR1 – Neuronal growth regulator 1, регулятор роста нейронов 1

NGS – next-generation sequencing, высокопроизводительное секвенирование

NLS – nuclear localization signal, сигнал ядерной локализации

pre-микроРНК – микроРНК-предшественница

pri-микроРНК – первичная микроРНК

Q25 – 25 перцентиль

Q75 – 75 перцентиль

RISC – RNA-induced silencing complex, РНК-индуцированный комплекс выключения гена

ROC AUC – Receiver Operating Characteristic curve Area Under Curve, площадь под кривой операционных характеристик

RT-qPCR – reverse-transcription quantitative polymerase-chain reaction, количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

UMI – уникальные молекулярные идентификаторы

АГ – аденома гипофиза

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АТ – антитела

гМЭН-1 – генетически подтвержденный синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа

ГН – гормонально-неактивное

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

З – относительно здоровые добровольцы

ИГХ – иммуногистохимия

ИМТ – индекс массы тела

ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста 1
кДНК – комплементарная ДНК
КТ – компьютерная томография
ЛГ – лютеинизирующий гормон
микроРНК – малые некодирующие РНК
мРНК – матричная РНК
МРТ – магнитно-резонансная томография
МЭН-1 – синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа
НАГ – неактивные аденомы гипофиза
нкРНК – некодирующие РНК
НТО – нетранслируемые области
НЭО – нейроэндокринное образование
ОЩЖ – околощитовидная железа
ПГС – плотногранулированная соматотропинома
ПЖ – поджелудочная железа
ПРЛ – пролактин
ПТГ – паратгормон
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РГС – редкогранулированная соматотропинома
РИ – референсный интервал
РНК – рибонуклеиновая кислота
СА – спорадическая акромегалия
сППТ – спорадический первичный гиперпаратиреоз
ССЛ – смешанная сомато-лактотрофная аденома
СТГ – соматотропный гормон
ТТГ – тиреотропный гормон
УЗИ – ультразвуковое исследование
фМЭН-1 – фенокопии синдрома МЭН-1
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agarwal, S. K. Multiple endocrine neoplasia type 1 / S. K. Agarwal // *Frontiers in Hormone Research*. – 2013. – № 41. – P. 1–15.
2. Brandi, M. L. Multiple endocrine neoplasia type 1: Latest insights / M. L. Brandi, S. K. Agarwal, N. D. Perrier [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2021. – Vol. 42, № 2. – P. 133–170.
3. Thakker, R. V. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) / R. V. Thakker, P. J. Newey, G. V. Walls [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2012. – Vol. 97, № 9. – P. 2990–3011.
4. Brandi, M.L. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): recommendations and guidelines for best practice / M.L. Brandi, C.R.C. Pieterman, K.A. English [et al.] // *The Lancet. Diabetes & endocrinology*. – 2025. – Vol.13, №8. – P. 699-721.
5. Backman, S. Whole genome sequencing of apparently mutation-negative MEN1 patients / S. Backman, D. Bajic, J. Crona [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2020. – Vol. 182, № 1. – P. 35–45.
6. Nagy, Z. MEN1 and microRNAs: the link between sporadic pituitary, parathyroid and adrenocortical tumors? / Z. Nagy, P. M. Szabó, V. K. Grolmusz [et al.] // *Medical Hypotheses*. – 2017. – Vol. 99. – P. 40–44.
7. Luzi, E. The negative feedback-loop between the oncomir Mir-24-1 and menin modulates the Men1 tumorigenesis by mimicking the "Knudson's second hit" / E. Luzi, F. Marini, F. Giusti [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 6. – P. e39767.
8. Luzi, E. The regulatory network menin-microRNA 26a as a possible target for RNA-based therapy of bone diseases / E. Luzi, F. Marini, I. Tognarini [et al.] // *Nucleic acid therapeutics*. – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 103–108.
9. Anfossi, S. Clinical utility of circulating non-coding RNAs – an update / S. Anfossi, A. Babayan, K. Pantel, G. A. Calin // *Nature reviews. Clinical oncology*. – 2018. – Vol. 15, № 9. – P. 541–563.
10. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [Электронный ресурс]. – 2025. – Режим доступа: <https://www.omim.org/entry/131100>. – Дата обращения: 28.05.2025.
11. Al-Salameh, A. Clinical aspects of multiple endocrine neoplasia type 1 / A. Al-Salameh, G. Cadiot, A. Calender, P. Goudet, P. Chanson // *Nature reviews. Endocrinology*. – 2021. – Vol. 17, № 4. – P. 207–224.
12. Giusti, F. Multiple endocrine neoplasia syndrome type 1: institution, management, and data analysis of a nationwide multicenter patient database / F. Giusti, L. Cianferotti, F. Boaretto [et al.] // *Endocrine*. – 2017. – Vol. 58, № 2. – P. 349–359.

13. Goudet, P. Gender-related differences in MEN1 lesion occurrence and diagnosis: a cohort study of 734 cases from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines / P. Goudet, C. Bonithon-Kopp, A. Murat [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2011. – Vol. 165, № 1. – P. 97–105.
14. Sakurai, A. Multiple endocrine neoplasia type 1 in Japan: establishment and analysis of a multicentre database / A. Sakurai, S. Suzuki, S. Kosugi [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2012. – Vol. 76, № 4. – P. 533–539.
15. Romanet, P. UMD-MEN1 Database: an overview of the 370 MEN1 variants present in 1676 patients from the French population / P. Romanet, A. Mohamed, S. Giraud [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2019. – Vol. 104, № 3. – P. 753–764.
16. Wermer, P. Endocrine adenomatosis and peptic ulcer in a large kindred: inherited multiple tumors and mosaic pleiotropism in man / P. Wermer // *The American journal of medicine*. – 1963. – Vol. 35. – P. 205–212.
17. Dreijerink, K. M. Breast-cancer predisposition in multiple endocrine neoplasia type 1 / K. M. Dreijerink, P. Goudet, J. R. Burgess, G. D. Valk // *The New England journal of medicine*. – 2014. – Vol. 371, № 6. – P. 583–584.
18. Machens, A. Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): a multicentre study of 258 gene carriers / A. Machens, L. Schaaf, W. Karges [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2007. – Vol. 67, № 4. – P. 613–622.
19. Клинические рекомендации «Первичный гиперпаратиреоз» [Электронный ресурс]. – 2025. – Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/88_5. – Дата обращения: 14.05.2025.
20. Eller-Vainicher, C. Sporadic and MEN1-related primary hyperparathyroidism: differences in clinical expression and severity / C. Eller-Vainicher, I. Chiodini, C. Battista [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2009. – Vol. 24, № 8. – P. 1404–1410.
21. Goudet, P. MEN1 disease occurring before 21 years old: a 160-patient cohort study from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines / P. Goudet, A. Dalac, M. Le Bras [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2015. – Vol. 100, № 4. – P. 1568–1577.
22. Vannucci, L. MEN1 in children and adolescents: data from patients of a regional referral center for hereditary endocrine tumors / L. Vannucci, F. Marini, F. Giusti [et al.] // *Endocrine*. – 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 438–448.
23. Twigt, B. A. Differences between sporadic and MEN-related primary hyperparathyroidism: clinical expression, preoperative workup, operative strategy and follow-up / B. A. Twigt, A. Scholten, G. D. Valk, I. H. Rinkes, M. R. Vriens // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2013. – Vol. 8. – P. 50.

24. Christakis, I. Parathyroid carcinoma and atypical parathyroid neoplasms in MEN1 patients: a clinico-pathologic challenge. The MD Anderson case series and review of the literature / I. Christakis, N. L. Busaidy, G. J. Cote [et al.] // *International Journal of Surgery*. – 2016. – Vol. 31. – P. 10–16.
25. Singh Ospina, N. Prevalence of parathyroid carcinoma in 348 patients with multiple endocrine neoplasia type 1: case report and review of the literature / N. Singh Ospina, T. J. Sebo, G. B. Thompson [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2016. – Vol. 84, № 2. – P. 244–249.
26. Mokrysheva, N. G. The Russian registry of primary hyperparathyroidism: latest update / N. G. Mokrysheva, A. K. Eremkina, A. R. Elfimova [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1203437.
27. Song, A. Trabecular bone score as a more sensitive tool to evaluate bone involvement in MEN1-related primary hyperparathyroidism [published correction appears in *J Clin Endocrinol Metab*. 2024 Jul 12;109(8):e1688. doi: 10.1210/clinem/dgae186.] / A. Song, R. Chen, W. Guan [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2023. – Vol. 109, № 1. – P. 135–142.
28. Пылина, С. В. Сравнительный анализ костных осложнений при МЭН1-ассоциированном и спорадическом первичном гиперпаратиреозе / С. В. Пылина, А. К. Еремкина, А. Р. Елфимова, А. М. Горбачева, Н. Г. Мокрышева // *Проблемы эндокринологии*. – 2024. – Т. 70, № 1. – С. 81–90.
29. Pieterman, C. R. Update on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 1 / C. R. Pieterman, G. D. Valk // *Clinical Endocrinology*. – 2022. – Vol. 97, № 4. – P. 409–423.
30. Kong, J. Clinical and genetic analysis of multiple endocrine neoplasia type 1-related primary hyperparathyroidism in Chinese / J. Kong, O. Wang, M. Nie [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 11. – P. e0166634.
31. Lairmore, T. C. A randomized, prospective trial of operative treatments for hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 / T. C. Lairmore, C. M. Govednik, C. E. Quinn [et al.] // *Surgery*. – 2014. – Vol. 156, № 6. – P. 1326–1335.
32. Pieterman, C. R. Primary hyperparathyroidism in MEN1 patients: a cohort study with long-term follow-up on preferred surgical procedure and the relation with genotype / C. R. Pieterman, L. T. van Hulsteijn, M. den Heijer [et al.] // *Annals of Surgery*. – 2012. – Vol. 255, № 6. – P. 1171–1178.
33. Nilubol, N. Limited parathyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 1-associated primary hyperparathyroidism: a setup for failure / N. Nilubol, L. S. Weinstein, W. F. Simonds [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2016. – Vol. 23, № 2. – P. 416–423.

34. Manoharan, J. Single gland excision for MEN1-associated primary hyperparathyroidism / J. Manoharan, M. B. Albers, C. Bollmann [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2020. – Vol. 92, № 1. – P. 63–70.
35. Montenegro, F. L. M. Could the less-than-subtotal parathyroidectomy be an option for treating young patients with multiple endocrine neoplasia type 1-related hyperparathyroidism? / F. L. M. Montenegro, M. D. G. Brescia, D. M. Lourenço Jr. [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 123.
36. Bouriez, D. Less than subtotal parathyroidectomy for multiple endocrine neoplasia type 1 primary hyperparathyroidism: a systematic review and meta-analysis / D. Bouriez, C. Gronnier, M. Haissaguerre, A. Tabarin, H. Najah // *World Journal of Surgery*. – 2022. – Vol. 46, № 11. – P. 2666–2675.
37. de Laat, J. M. Long-term natural course of pituitary tumors in patients with MEN1: results from the DutchMEN1 Study Group (DMSG) / J. M. de Laat, O. M. Dekkers, C. R. Pieterman [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2015. – Vol. 100, № 9. – P. 3288–3296.
38. Le Bras, M. Pituitary adenoma in patients with multiple endocrine neoplasia type 1: a cohort study / M. Le Bras, H. Leclerc, O. Rousseau [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2021. – Vol. 185, № 6. – P. 863–873.
39. Wu, Y. Pituitary adenomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 1: a single-center experience in China / Y. Wu, L. Gao, X. Guo [et al.] // *Pituitary*. – 2019. – Vol. 22, № 2. – P. 113–123.
40. Cohen-Cohen, S. Pituitary adenomas in the setting of multiple endocrine neoplasia type 1: a single-institution experience / S. Cohen-Cohen, D. A. Brown, B. T. Himes [et al.] // *Journal of Neurosurgery*. – 2020. – Vol. 134, № 3. – P. 1132–1138.
41. Trouillas, J. Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome (MEN1): a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients / J. Trouillas, F. Labat-Moleur, N. Sturm [et al.] // *American Journal of Surgical Pathology*. – 2008. – Vol. 32, № 4. – P. 534–543.
42. Anlauf, M. Microadenomatosis of the endocrine pancreas in patients with and without the multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome / M. Anlauf, R. Schlenger, A. Perren [et al.] // *American Journal of Surgical Pathology*. – 2006. – Vol. 30, № 5. – P. 560–574.
43. Donegan, D. Long-term outcomes in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and pancreaticoduodenal neuroendocrine tumours / D. Donegan, N. Singh Ospina, R. Rodriguez-Gutierrez [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2017. – Vol. 86, № 2. – P. 199–206.

44. Yates, C. J. Challenges and controversies in management of pancreatic neuroendocrine tumours in patients with MEN1 / C. J. Yates, P. J. Newey, R. V. Thakker // *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. – 2015. – Vol. 3, № 11. – P. 895–905.
45. Ito, T. Causes of death and prognostic factors in multiple endocrine neoplasia type 1: a prospective study / T. Ito, H. Igarashi, H. Uehara [et al.] // *Medicine*. – 2013. – Vol. 92, № 3. – P. 135–181.
46. Goudet, P. Risk factors and causes of death in MEN1 disease. A GTE cohort study among 758 patients / P. Goudet, A. Murat, C. Binquet [et al.] // *World Journal of Surgery*. – 2010. – Vol. 34, № 2. – P. 249–255.
47. Vinault, S. Metastatic potential and survival of duodenal and pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: a GTE and AFCE cohort study / S. Vinault, A. S. Mariet, M. Le Bras [et al.] // *Annals of surgery*. – 2022. – Vol. 272, № 6. – P. 1094–1101.
48. Effraimidis, G. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1) and neuroendocrine neoplasms (NENs) / G. Effraimidis, U. Knigge, M. Rossing [et al.] // *Seminars in Cancer Biology*. – 2022. – Vol. 79. – P. 141–162.
49. Nell, S. Management of MEN1 related nonfunctioning pancreatic NETs: a shifting paradigm / S. Nell, H. M. Verkooijen, C. R. C. Pieterman [et al.] // *Annals of Surgery*. – 2018. – Vol. 267, № 6. – P. 1155–1160.
50. Thomas-Marques, L. Prospective endoscopic ultrasonographic evaluation of the frequency of nonfunctioning pancreaticoduodenal endocrine tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 / L. Thomas-Marques, A. Murat, B. Delemer [et al.] // *The American journal of gastroenterology*. – 2006. – Vol. 101, № 2. – P. 266–273.
51. de Laat, J. M. Low accuracy of tumor markers for diagnosing pancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 patients / J. M. de Laat, C. R. Pieterman, M. Weijmans [et al.] *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2013. – Vol. 98, № 10. – P. 4143–4151.
52. Qiu, W. Utility of chromogranin A, pancreatic polypeptide, glucagon and gastrin in the diagnosis and follow-up of pancreatic neuroendocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 patients / W. Qiu, I. Christakis, A. Silva [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2016. – Vol. 85, № 3. – P. 400–407.
53. van Treijen, M. J. C. Diagnosing nonfunctional pancreatic NETs in MEN1: the evidence base / M. J. C. van Treijen, D. J. van Beek, R. S. van Leeuwen [et al.] // *Journal of the Endocrine Society*. – 2018. – Vol. 2, № 9. – P. 1067–1088.

54. Howe, J. R. The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus paper on the surgical management of pancreatic neuroendocrine tumors / J. R. Howe, N. B. Merchant, C. Conrad [et al.] // *Pancreas*. – 2020. – Vol. 49, № 1. – P. 1–33.
55. Sadowski, S. M. Prognostic factors for the outcome of nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors in MEN1: a systematic review of literature / S. M. Sadowski, C. R. C. Pieterman, N. D. Perrier [et al.] // *Endocrine-Related Cancer*. – 2020. – Vol. 27, № 6. – P. R145–R161.
56. La Salvia, A. Somatostatin analogue therapy in MEN1-related pancreatic neuroendocrine tumors from evidence to clinical practice: a systematic review / A. La Salvia, F. Sesti, C. Grinzato [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14, № 10. – P. 1039.
57. Sada, A. Comparison between sporadic and multiple endocrine neoplasia type 1-associated insulinoma / A. Sada, E. B. Habermann, T. Szabo Yamashita [et al.] // *Journal of the American College of Surgeons*. – 2022. – Vol. 235, № 5. – P. 756–763.
58. Vezzosi, D. Long-term results of the surgical management of insulinoma patients with MEN1: a Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines (GTE) retrospective study / D. Vezzosi, C. Cardot-Bauters, N. Bouscaren [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2015. – Vol. 172, № 3. – P. 309–319.
59. Imamura, M. How to treat gastrinomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 1: surgery or long-term proton pump inhibitors? / M. Imamura, I. Komoto, Y. Taki // *Surgery Today*. – 2023. – Vol. 53, № 12. – P. 1325–1334.
60. Shah, M. H. Neuroendocrine and adrenal tumors, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology / M. H. Shah, W. S. Goldner, A. B. Benson [et al.] // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. – 2021. – Vol. 19, № 7. – P. 839–868.
61. Niederle, B. Multiple endocrine neoplasia type 1 and the pancreas: diagnosis and treatment of functioning and non-functioning pancreatic and duodenal neuroendocrine neoplasia within the MEN1 syndrome – an international consensus / B. Niederle, A. Selberherr, D. K. Bartsch [et al.] // *Neuroendocrinology*. – 2021. – Vol. 111, № 7. – P. 609–630.
62. van Beek, D. J. Prognostic factors and survival in MEN1 patients with gastrinomas: results from the DutchMEN study group (DMSG) / D. J. van Beek, S. Nell, C. R. C. Pieterman [et al.] // *Journal of Surgical Oncology*. – 2019. – Vol. 120, № 6. – P. 966–975.
63. Manoharan, J. Gastric enterochromaffin-like cell changes in multiple endocrine neoplasia type 1 / J. Manoharan, M. Anlauf, M. B. Albers [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2021. – Vol. 95, № 3. – P. 439–446.
64. Sato, Y. Management of gastric and duodenal neuroendocrine tumors / Y. Sato, S. Hashimoto, K. Mizuno [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 22, № 30. – P. 6817–6828.

65. Lamberti, G. Gastric neuroendocrine neoplasms / G. Lamberti, F. Panzuto, M. Pavel [et al.] // Nature reviews. Disease primers. – 2024. – Vol. 10, № 1. – P. 25.
66. van den Broek, M. F. M. Well-differentiated bronchopulmonary neuroendocrine tumors: more than one entity / M. F. M. van den Broek, S. Levy, W. A. Buikhuisen [et al.] // Journal of Thoracic Oncology. – 2021. – Vol. 16, № 11. – P. 1810–1820.
67. Yliaska, I. Thymic neuroendocrine tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 / I. Yliaska, H. Tokola, T. Ebeling [et al.] // Endocrine. – 2022. – Vol. 77, № 3. – P. 527–537.
68. Sakurai, A. Thymic neuroendocrine tumour in multiple endocrine neoplasia type 1: female patients are not rare exceptions / A. Sakurai, T. Imai, T. Kikumori [et al.] // Clinical Endocrinology. – 2013. – Vol. 78. – P. 248–254.
69. Ye, L. Clinical features and prognosis of thymic neuroendocrine tumours associated with multiple endocrine neoplasia type 1: a single-centre study, systematic review and meta-analysis / L. Ye, W. Wang, N. S. Ospina [et al.] // Clinical Endocrinology. – 2017. – Vol. 87, № 6. – P. 706–716.
70. Ventura, M. Outcome and long-term follow-up of adrenal lesions in multiple endocrine neoplasia type 1 / M. Ventura, M. Melo, F. Carrilho // Archives of Endocrinology and Metabolism. – 2019. – Vol. 63, № 5. – P. 516–523.
71. Waldmann, J. Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: results of 7 years prospective screening / J. Waldmann, D. K. Bartsch, P. H. Kann [et al.] // Langenbeck's archives of surgery. – 2007. – Vol. 392, № 4. – P. 437–443.
72. Gatta-Cherifi, B. Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines database / B. Gatta-Cherifi, O. Chabre, A. Murat [et al.] // European journal of endocrinology. – 2012. – Vol. 166, № 2. – P. 269–279.
73. Pieterman, C. R. C. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 [Электронный ресурс] / C. R. C. Pieterman, R. S. van Leeuwen, M. F. M. van den Broek [et al.] // In: Feingold K. R., Anawalt B., Blackman M. R. [et al.], eds. Endotext [Internet]. – South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000–. – Updated 2021 Dec 22. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481897/> (дата обращения: [28.05.2025]).
74. Del Rivero, J. American Association of Clinical Endocrinology Consensus Statement on Management of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 / J. Del Rivero, A. Gangi, J. P. Annes [et al.] // Endocrine practice. – 2025. – Published online March 26.
75. de Laat, J. M. The Importance of an Early and Accurate MEN1 Diagnosis / J. M. de Laat, R. S. van Leeuwen, G. D. Valk // Frontiers in endocrinology. – 2018. – Vol. 9. – P. 533.
76. Newey, P. J. MEN1 Surveillance Guidelines: Time to (Re)Think? / P. J. Newey, J. Newell-Price // Journal of the Endocrine Society – 2022. – Vol. 6, № 2. – P. bvac001.

77. van Leeuwaarde, R. S. High Fear of Disease Occurrence Is Associated With Low Quality of Life in Patients With Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: Results From the Dutch MEN1 Study Group / R. S. van Leeuwaarde, C. R. C. Pieterman, E. M. A. Bleiker [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2018. – Vol. 103, № 6. – P. 2354–2361.
78. van Leeuwaarde, R. S. Impact of Delay in Diagnosis in Outcomes in MEN1: Results From the Dutch MEN1 Study Group / R. S. van Leeuwaarde, B. P. van Nesselrooij, A. R. Hermus [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2016. – Vol. 101, № 3. – P. 1159–1165.
79. Kooblall, K. G. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) 5'UTR Deletion, in MEN1 Family, Decreases Menin Expression / K. G. Kooblall, H. Boon, T. Cranston [et al.] // Journal of bone and mineral research. – 2021. – Vol. 36, № 1. – P. 100–109.
80. Carvalho, R. A. Germline mutation landscape of multiple endocrine neoplasia type 1 using full gene next-generation sequencing / R. A. Carvalho, B. Urtremari, A. A. L. Jorge [et al.] // European journal of endocrinology. – 2018. – Vol. 179, № 6. – P. 391–407.
81. Sahakian, N. Updates on the genetics of multiple endocrine neoplasia / N. Sahakian, F. Castinetti, P. Romanet, Y. Reznik, T. Brue // Annales d'endocrinologie (Paris). – 2024. – Vol. 85, № 2. – P. 127–135.
82. Lagarde, A. Early Detection of Relapse by ctDNA Sequencing in a Patient with Metastatic Thymic Tumor and MEN1 Mosaicism / A. Lagarde, L. Le Collen, C. Boulagnon [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2022. – Vol. 107, № 10. – P. e4154–e4158.
83. English, K. A. The role of DNA methylation in human pancreatic neuroendocrine tumours / K. A. English, R. V. Thakker, K. E. Lines // Endocrine oncology. – 2023. – Vol. 3, № 1. – P. e230003.
84. Lin, W. Dynamic epigenetic regulation by menin during pancreatic islet tumor formation / W. Lin, H. Watanabe, S. Peng [et al.] // Molecular cancer research: MCR. – 2015. – Vol. 13, № 4. – P. 689–698.
85. Feng, Z. Epigenetic regulation by the menin pathway / Z. Feng, J. Ma, X. Hua // Endocrine-related cancer. – 2017. – Vol. 24, № 10. – P. T147–T159.
86. De Paoli-Iseppi, R. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical correlates of MEN1 gene methylation / R. De Paoli-Iseppi, L. Prentice, J.R. Marthick [et al.] // Pathology. – 2018. – Vol. 50, № 6. – P. 622–628.
87. Luzi, E. Analysis of differentially expressed microRNAs in MEN1 parathyroid adenomas / E. Luzi, S. Ciuffi, F. Marini [et al.] // American journal of translational research. – 2017. – Vol. 9, № 4. – P. 1743–1753.

88. Vijayaraghavan, J. miR-24 regulates menin in the endocrine pancreas / J. Vijayaraghavan, E.C. Maggi, J.S. Crabtree // American journal of physiology. Endocrinology and metabolism. – 2014. – Vol. 307, № 1. – P. E84–E92.
89. Agarwal, S.K. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states / S.K. Agarwal, C.M. Mateo, S.J. Marx [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2009. – Vol. 94, № 5. – P. 1826–1834.
90. Larsson, C. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma / C. Larsson, B. Skogseid, K. Oberg [et al.] // Nature. – 1988. – Vol. 332, № 6159. – P. 85–87.
91. Chandrasekharappa, S.C. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1 / S.C. Chandrasekharappa, S.C. Guru, P. Manickam [et al.] // Science. – 1997. – Vol. 276, № 5311. – P. 404–407.
92. GeneCards: MEN1 gene [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEN1>, свободный. – Дата обращения: 28.05.2025.
93. Mele, C. Phenotypes associated with MEN1 syndrome: a focus on genotype-phenotype correlations / C. Mele, M. Mencarelli, M. Caputo [et al.] // Frontiers in endocrinology. – 2020. – Vol. 11. – P. 591501.
94. Lemos, M.C. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene / M.C. Lemos, R.V. Thakker // Human mutation. – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 22–32.
95. Falchetti, A. Genetics of multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: what's new and what's old / A. Falchetti // F1000Research. – 2017. – Vol. 6. – P. F1000 Faculty Rev-73.
96. Knudson, A.G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma / A.G. Knudson Jr. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1971. – Vol. 68, № 4. – P. 820–823.
97. Costa-Guda, J. Genetic and epigenetic changes in sporadic endocrine tumors: parathyroid tumors / J. Costa-Guda, A. Arnold [et al.] // Molecular and cellular endocrinology. – 2014. – Vol. 386, № 1–2. – P. 46–54.
98. Corbo, V. MEN1 in pancreatic endocrine tumors: analysis of gene and protein status in 169 sporadic neoplasms reveals alterations in the vast majority of cases / V. Corbo, I. Dalai, M. Scardoni [et al.] // Endocrine-related cancer. – 2010. – Vol. 17, № 3. – P. 771–783.
99. Evans, C.O. Screening for MEN1 tumor suppressor gene mutations in sporadic pituitary tumors / C.O. Evans, M.R. Brown, J.S. Parks [et al.] // Journal of endocrinological investigation. – 2000. – Vol. 23, № 5. – P. 304–309.

100. Agarwal, S.K. The future: genetics advances in MEN1 therapeutic approaches and management strategies / S.K. Agarwal // *Endocrine-related cancer*. – 2017. – Vol. 24, № 10. – P. T119–T134.
101. Мамедова, Е.О. Роль некодирующих РНК в патогенезе синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа / Е.О. Мамедова, Д.А. Димитрова, Ж.Е. Белая, Г.А. Мельниченко // *Проблемы Эндокринологии*. – 2020. – Т. 66, № 2. – С. 4–12.
102. Matkar, S. Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling / S. Matkar, A. Thiel, X. Hua [et al.] // *Trends in biochemical sciences*. – 2013. – Vol. 38. – P. 394–402.
103. Kaji H. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling / H. Kaji, L. Canaff, J.J. Lebrun [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98. – P. 3837–3842.
104. Hughes, C.M. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus / C.M. Hughes, O. Rozenblatt-Rosen, T.A. Milne [et al.] // *Molecular cell*. – 2004. – Vol. 13, № 4. – P. 587–597.
105. Franklin, D.S. Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity / D.S. Franklin, V.L. Godfrey, D.A. O'Brien [et al.] // *Molecular and cellular biology*. – 2000. – Vol. 20. P. 6147–6158
106. Schnepf, R.W. Mutation of tumor suppressor gene Men1 acutely enhances proliferation of pancreatic islet cells / R.W. Schnepf, Y.X. Chen, H. Wang [et al.] // *Cancer research*. – 2006. – Vol. 66. – P. 5707–5715.
107. Wang, P. Global analysis of H3K4 methylation defines MLL family member targets and points to a role for MLL1-mediated H3K4 methylation in the regulation of transcriptional initiation by RNA polymerase II / P. Wang, C. Lin, E. R. Smith [et al.] *Molecular and cellular biology*. – 2009. – Vol. 29, № 22. – P. 6074–6085
108. Verschuur, A. V. D. Diagnostic Utility of Menin Immunohistochemistry in Patients With Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Syndrome / A. V. D. Verschuur, A. S. M. Kok, F. H. M. Morsink [et al.] // *The American journal of surgical pathology*. – 2023. – Vol. 47, № 7. – P. 785–791.
109. Lines, K. E. Genetic background influences tumour development in heterozygous Men1 knockout mice / K. E. Lines, M. Javid, A. A. C. Reed [et al.] // *Endocrine connection*. – 2020. – Vol. 9, № 5. – P. 426–437.
110. Wrocklage, C. Increased menin expression in sporadic pituitary adenomas / C. Wrocklage, H. Gold, W. Hackl [et al.] // *Clinical endocrinology*. – 2002. – Vol. 56, № 5. – P. 589–594.

111. Theodoropoulou, M. Differential expression of menin in sporadic pituitary adenomas / M. Theodoropoulou, I. Cavallari, L. Barzon [et al.] // *Endocrine-related cancer*. – 2004. – Vol. 11, № 2. – P. 333–344.
112. Lairmore, T. C. Loss of tumor suppressor menin expression in high grade cholangiocarcinomas / T. C. Lairmore, J. Abdulsattar, A. De Benedetti [et al.] // *BMC research notes*. – 2023. – Vol. 16, № 1. – P. 15.
113. Teinturier, R. Reduced menin expression leads to decreased ER α expression and is correlated with the occurrence of human luminal B-like and ER-negative breast cancer subtypes / R. Teinturier, R. Abou Ziki, L. Kassem [et al.] // *Breast cancer research and treatment*. – 2021. – Vol. 190, № 3. – P. 389–401.
114. Wang, Z. F. Abnormal expression of menin predicts the pathogenesis and poor prognosis of adult gliomas / Z. F. Wang, X. Y. Hong, L. Y. Zhu [et al.] // *Cancer gene therapy*. – 2020. – Vol. 27, № 7–8. – P. 539–547.
115. Turner, J. J. Diagnostic challenges due to phenocopies: lessons from Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) / J. J. Turner, P. T. Christie, S. H. Pearce [et al.] // *Human mutation*. – 2010. – Vol. 31, № 1. – P. E1089–E1101.
116. Alrezk, R. MEN4 and CDKN1B mutations: the latest of the MEN syndromes / R. Alrezk, F. Hannah-Shmouni, C. A. Stratakis // *Endocrine-related cancer*. – 2017. – Vol. 24, № 10. – P. T195–T208.
117. Ozawa, A. The parathyroid/pituitary variant of multiple endocrine neoplasia type 1 usually has causes other than p27Kip1 mutations / A. Ozawa, S. K. Agarwal, C. M. Mateo [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2007. – Vol. 92, № 5. – P. 1948–1951.
118. Pardi, E. Mutational and large deletion study of genes implicated in hereditary forms of primary hyperparathyroidism and correlation with clinical features / E. Pardi, S. Borsari, F. Saponaro [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 10. – P. e0186485.
119. Nachtigall, L. B. Clinical MEN-1 Among a Large Cohort of Patients With Acromegaly / L. B. Nachtigall, F. J. Guarda, K. E. Lines [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2020. – Vol. 105, № 6. – P. e2271–e2281.
120. Chevalier, B. Beyond MEN1, When to Think About MEN4? Retrospective Study on 5600 Patients in the French Population and Literature Review / B. Chevalier, L. Coppin, P. Romanet [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2024. – Vol. 109, № 7. – P. e1482–e1493.
121. Frederiksen, A. Clinical Features of Multiple Endocrine Neoplasia Type 4: Novel Pathogenic Variant and Review of Published Cases / A. Frederiksen, M. Rossing, P. Hermann

- [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2019. – Vol. 104, № 9. – P. 3637–3646.
122. Costa-Guda, J. Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas / J. Costa-Guda, C. P. Soong, V. I. Parekh [et al.] // Hormones & cancer. – 2013. – Vol. 4, № 5. – P. 301–307.
 123. Mazarico-Altisent, I. Genetic testing for familial hyperparathyroidism: clinical-genetic profile in a Mediterranean cohort / I. Mazarico-Altisent, I. Capel, N. Baena [et al.] // Frontiers in endocrinology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1244361.
 124. Cowgill, S. M. The genetics of pancreatic cancer / S. M. Cowgill, P. Muscarella // American journal of surgery. – 2003. – Vol. 186, № 3. – P. 279–286.
 125. Roy, S. Loss of Chromatin-Remodeling Proteins and/or CDKN2A Associates With Metastasis of Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Reduced Patient Survival Times / S. Roy, W. A. LaFramboise, T. C. Liu [et al.] // Gastroenterology. – 2018. – Vol. 154, № 8. – P. 2060–2063.e8.
 126. Lines, K. E. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) Phenocopy Due to a Cell Cycle Division 73 (CDC73) Variant / K. E. Lines, L. B. Nachtigall, L. E. Dichtel [et al.] Journal of the Endocrine Society. – 2020. – Vol. 4, № 11. – P. bvaa142.
 127. Cuny, T. Genetic analysis in young patients with sporadic pituitary macroadenomas: besides AIP don't forget MEN1 genetic analysis / T. Cuny, M. Pertuit, M. Sahnoun-Fathallah [et al.] // European journal of endocrinology. – 2013. – Vol. 168, № 4. – P. 533–541.
 128. van den Broek, M. F. M. Clinical Relevance of Genetic Analysis in Patients With Pituitary Adenomas: A Systematic Review / M. F. M. van den Broek, B. P. M. van Nesselrooij, A. A. Verrijn Stuart [et al.] // Frontiers in endocrinology. – 2019. – Vol. 10. – P. 837.
 129. Belar, O. Novel mutations in MEN1, CDKN1B and AIP genes in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome in Spain / O. Belar, C. De La Hoz, G. Pérez-Nanclares [et al.] // Clinical endocrinology. – 2012. – Vol. 76, № 5. – P. 719–724.
 130. Newey, P. J. Hereditary Primary Hyperparathyroidism / P. J. Newey // Endocrinology and metabolism clinics of North America. – 2021. – Vol. 50, № 4. – P. 663–681.
 131. Minisola, S. Epidemiology, Pathophysiology, and Genetics of Primary Hyperparathyroidism / S. Minisola, A. Arnold, Z. Belaya [et al.] // Journal of bone and mineral research. – 2022. – Vol. 37, № 11. – P. 2315–2329.
 132. Hannan, F. M. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases / F. M. Hannan, E. Kallay, W. Chang [et al.] // Nature reviews. Endocrinology. – 2018. – Vol. 15, № 1. – P. 33–51.

133. Naziat, A. Confusing genes: a patient with MEN2A and Cushing's disease / A. Naziat, N. Karavitaki, R. Thakker [et al.] // *Clinical endocrinology*. – 2013. – Vol. 78, № 6. – P. 966–968.
134. Мамедова, Е.О. Редкие формы наследственных новообразований эндокринной системы: аденома гипофиза в сочетании с феохромоцитомой и/или параганглиомой. / Е.О. Мамедова, Д.В. Лисина, Ж.Е. Белая // *Проблемы Эндокринологии*. – 2023. – Т. 69, № 2. – С. 24–30.
135. Seabrook, A. J. Multiple Endocrine Tumors Associated with Germline MAX Mutations: Multiple Endocrine Neoplasia Type 5? / A. J. Seabrook, J. E. Harris, S. B. Velosa [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2021. – Vol. 106, № 4. – P. 1163–1182.
136. Wasserman, J. D. Multiple endocrine neoplasia and hyperparathyroid-jaw tumor syndromes: clinical features, genetics, and surveillance recommendations in childhood / J. D. Wasserman, G. E. Tomlinson, H. Druker [et al.] // *Clinical cancer research*. – 2017. – Vol. 23, № 13. – P. e123–e132.
137. Zhao, Y. X. The risk of concurrent malignancies in patients with multiple endocrine neoplasia type 1: insights into clinical characteristics of those with multiple endocrine neoplasia type 1 / Y. X. Zhao, O. Wang, A. Song [et al.] // *Journal of endocrinological investigation*. – 2024. – Vol. 47, № 8. – P. 1931–1939.
138. Kremer, L. S. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing / L. S. Kremer, D. M. Bader, C. Mertes [et al.] // *Nature communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 15824.
139. Ellard, S. Detection of an MEN1 gene mutation depends on clinical features and supports current referral criteria for diagnostic molecular genetic testing / S. Ellard, A. T. Hattersley, C. M. Brewer, B. Vaidya // *Clinical endocrinology*. – 2005. – Vol. 62, № 2. – P. 169–175.
140. Tham, E. Clinical testing for mutations in the MEN1 gene in Sweden: a report on 200 unrelated cases / E. Tham, U. Grandell, E. Lindgren [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2007. – Vol. 92, № 9. – P. 3389–3395.
141. de Laat, J. M. MEN1 redefined, a clinical comparison of mutation-positive and mutation-negative patients / J. M. de Laat, R. B. van der Luijt, C. R. Pieterman [et al.] // *BMC medicine*. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 182.
142. Pieterman, C. R. C. Understanding the clinical course of genotype-negative MEN1 patients can inform management strategies / C. R. C. Pieterman, S. M. Hyde, S. Y. Wu [et al.] // *Surgery*. – 2021. – Vol. 169, № 1. – P. 175–184.
143. Hai, N. Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) phenocopy without germline MEN1 gene mutations: analysis of 20 Japanese sporadic cases with MEN1 / N. Hai, N. Aoki, A. Shimatsu [et al.] // *Clinical endocrinology*. – 2000. – Vol. 52, № 4. – P. 509–518.

144. Kövesdi, A. True MEN1 or phenocopy? Evidence for geno-phenotypic correlations in MEN1 syndrome / A. Kövesdi, M. Tóth, H. Butz [et al.] // *Endocrine*. – 2019. – Vol. 65, № 2. – P. 451–459.
145. Klein, R. D. Clinical testing for multiple endocrine neoplasia type 1 in a DNA diagnostic laboratory / R. D. Klein, S. Salih, J. Bessoni, A. E. Bale // *Genetics in medicine*. – 2005. – Vol. 7, № 2. – P. 131–138.
146. Мамедова, Е. О. Фенокопии синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа: роль генов, ассоциированных с развитием аденом гипофиза / Е. О. Мамедова, Н. Г. Мокрышева, Е. А. Пигарова [и др.] // *Проблемы эндокринологии*. – 2016. – Т. 62, № 4. – С. 4–10.
147. Yeh, M. W. Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population / M. W. Yeh, P. H. Ituarte, H. C. Zhou [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2013. – Vol. 98, № 3. – P. 1122–1129.
148. Daly, A. F. The epidemiology of pituitary adenomas / A. F. Daly, A. Beckers // *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. – 2020. – Vol. 49, № 3. – P. 347–355.
149. Scangas, G. A. Pituitary incidentalomas / G. A. Scangas, E. R. Laws Jr. // *Pituitary*. – 2014. – Vol. 17, № 5. – P. 486–491.
150. Daly, A. F. The epidemiology and genetics of pituitary adenomas / A. F. Daly, M. A. Tichomirowa, A. Beckers // *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. – 2009. – Vol. 23, № 5. – P. 543–554.
151. de Laat, J. M. Predicting the risk of multiple endocrine neoplasia type 1 for patients with commonly occurring endocrine tumors / J. M. de Laat, E. Tham, C. R. Pieterman [et al.] // *European journal of endocrinology*. – 2012. – Vol. 167, № 2. – P. 181–187.
152. Ростомян, Л. Г. Синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа: распространенность среди пациентов с первичным гиперпаратиреозом, клинические и молекулярно-генетические характеристики: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.02 / Л. Г. Ростомян. – М., 2011. – 22 с.
153. Мокрышева, Н. Г. Прогнозирование наличия мутации в гене MEN1 на основании клинического фенотипа пациентов с первичным гиперпаратиреозом / Н. Г. Мокрышева, А. К. Еремкина, А. П. Милютин [и др.] // *Проблемы эндокринологии*. – 2023. – Т. 69, № 5. – С. 4–15.
154. Fritz, J. V. Sources and Functions of Extracellular Small RNAs in Human Circulation / J. V. Fritz, A. Heintz-Buschart, A. Ghosal [et al.] // *Annual review of nutrition*. – 2016. – Vol. 36. – P. 301–336.

155. O'Brien, J. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation / J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, C. Peng // *Frontiers in endocrinology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 402.
156. Vorozheykin, P. S. How miRNA Structure of Animals Influences Their Biogenesis / P. S. Vorozheykin, I. I. Titov // *Russian Journal of Genetics*. – 2020. – Vol. 56, № 1. – P. 1012–1024.
157. Ha, M. Regulation of microRNA biogenesis / M. Ha, V. N. Kim // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2014. – Vol. 15, № 8. – P. 509–524.
158. Annese, T. microRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis / T. Annese, R. Tamma, M. De Giorgis, D. Ribatti // *Frontiers in oncology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 581007.
159. Vasudevan, S. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation / S. Vasudevan, Y. Tong, J. A. Steitz // *Science*. – 2007. – Vol. 318, № 5858. – P. 1931–1934.
160. Liu, H. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer / H. Liu, C. Lei, Q. He [et al.] // *Molecular cancer*. – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 64.
161. Riolo, G. miRNA Targets: From Prediction Tools to Experimental Validation / G. Riolo, S. Cantara, C. Marzocchi, C. Ricci // *Methods and protocols*. – 2020. – Vol. 4, № 1. – P. 1.
162. Kozomara, A. miRBase: from microRNA sequences to function / A. Kozomara, M. Birgaoanu, S. Griffiths-Jones // *Nucleic acids research*. – 2019. – Vol. 47, D1. – P. D155–D162.
163. Cortez, M. A. MicroRNAs in body fluids – the mix of hormones and biomarkers / M. A. Cortez, C. Bueso-Ramos, J. Ferdin [et al.] // *Nature reviews. Clinical oncology*. – 2011. – Vol. 8, № 8. – P. 467–477.
164. Chen, X. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases / X. Chen, Y. Ba, L. Ma [et al.] // *Cell research*. – 2008. – Vol. 18, № 10. – P. 997–1006.
165. Abramowicz, A. The Long and Short of It: The Emerging Roles of Non-Coding RNA in Small Extracellular Vesicles / A. Abramowicz, M. D. Story // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 6. – P. 1445.
166. Butz, H. Circulating non-coding RNA biomarkers of endocrine tumours / H. Butz, A. Patócs, P. Igaz // *Nature reviews. Endocrinology*. – 2024. – Vol. 20, № 10. – P. 600–614.
167. van Rooij, E. The art of microRNA research / E. van Rooij // *Circulation research*. – 2011. – Vol. 108, № 2. – P. 219–234.
168. Siddika, T. Bringing MicroRNAs to Light: Methods for MicroRNA Quantification and Visualization in Live Cells / T. Siddika, I. U. Heinemann // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2021. – Vol. 8. – P. 619583.

169. Darvasi, O. Limitations of high throughput methods for miRNA expression profiles in non-functioning pituitary adenomas / O. Darvasi, P. M. Szabo, K. Nemeth [et al.] // *Pathology oncology research: POR.* – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 169–182.
170. Panni, S. Non-coding RNA regulatory networks / S. Panni, R. C. Lovering, P. Porras, S. Orchard // *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms.* – 2020. – Vol. 1863, № 6. – P. 194417.
171. McGeary, S. E. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy / S. E. McGeary, K. S. Lin, C. Y. Shi [et al.] // *Science (New York, N.Y.).* – 2019. – Vol. 366, № 6472. – P. eaav1741.
172. Chang, L. MicroRNA Regulatory Network Analysis Using miRNet 2.0 / L. Chang, J. Xia // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* – 2023. – Vol. 2594. – P. 185–204.
173. Grolmusz, V. K. MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN1 syndrome-associated primary hyperparathyroidism / V. K. Grolmusz, K. Borka, A. Kövesdi [et al.] // *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* – 2017. – Vol. 471, № 3. – P. 401–411.
174. Donati, S. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: The Potential Role of microRNAs in the Management of the Syndrome / S. Donati, S. Ciuffi, F. Marini [et al.] *International journal of molecular sciences.* – 2020. – Vol. 21, № 20. – P. 7592.
175. Ehrlich, L. miR-24 Inhibition Increases Menin Expression and Decreases Cholangiocarcinoma Proliferation / L. Ehrlich, C. Hall, J. Venter [et al.] // *The American journal of pathology.* – 2017. – Vol. 187, № 3. – P. 570–580.
176. Hall, C. Inhibition of microRNA-24 increases liver fibrosis by enhanced menin expression in Mdr2^{-/-} mice / C. Hall, L. Ehrlich, F. Meng [et al.] // *The Journal of surgical research.* – 2017. – Vol. 217. – P. 160–169.
177. Pan, Y. miR-24 may be a negative regulator of menin in lung cancer / Y. Pan, H. Wang, D. Ma [et al.] // *Oncology reports.* – 2018. – Vol. 39, № 5. – P. 2342–2350.
178. Gurung, B. Menin is required for optimal processing of the microRNA let-7a / B. Gurung, A.B. Muhammad, X. Hua // *The Journal of biological chemistry.* – 2014. – Vol. 289, № 14. – P. 9902–9908.
179. Gurung, B. Menin-mediated regulation of miRNA biogenesis uncovers the IRS2 pathway as a target for regulating pancreatic beta cells / B. Gurung, B.W. Katona, X. Hua // *Oncoscience.* – 2014. – Vol. 1. – P. 562–566.
180. Li, Y. Downregulation of tumor suppressor menin by miR-421 promotes proliferation and migration of neuroblastoma / Y. Li, W. Li, J.-G. Zhang [et al.] // *Tumour biology.* – 2014. – Vol. 35, № 10. – P. 10011–10017.

181. Wang, L.Q. microRNA-802 promotes lung carcinoma proliferation by targeting the tumor suppressor menin / L.Q. Wang, G. Chen, X.Y. Liu [et al.] // *Molecular medicine reports*. – 2014. – Vol. 10, № 3. – P. 1537–1542.
182. Lu, Y. Glucose-induced microRNA-17 promotes pancreatic beta cell proliferation through down-regulation of Menin / Y. Lu, X.Q. Fei, S.F. Yang, B.K. Xu, Y.Y. Li // *European review for medical and pharmacological sciences*. – 2015. – Vol. 19, № 4. – P. 624–629.
183. Ouyang, M. Modulation by miR-29b of intestinal epithelium homeostasis through the repression of menin translation / M. Ouyang, W. Su, L. Xiao [et al.] // *The Biochemical journal*. – 2015. – Vol. 465, № 2. – P. 315–323.
184. Hou, R. miR-762 can negatively regulate menin in ovarian cancer / R. Hou, Z. Yang, S. Wang [et al.] // *OncoTargets and therapy*. – 2017. – Vol. 10. – P. 2127–2137.
185. Hussain, S. Hyperglycemia Induces Myocardial Dysfunction via Epigenetic Regulation of JunD / S. Hussain, A.W. Khan, A. Akhmedov [et al.] // *Circulation research*. – 2020. – Vol. 127, № 10. – P. 1261–1273.
186. Hwang, S. Differential expression of miRNA-199b-5p as a novel biomarker for sporadic and hereditary parathyroid tumors / S. Hwang, J.J. Jeong, S.H. Kim [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 12016.
187. Yavropoulou, M.P. Circulating and Tissue Expression Profile of MicroRNAs in Primary Hyperparathyroidism Caused by Sporadic Parathyroid Adenomas / M.P. Yavropoulou, K. Pazaitou-Panayiotou, J.G. Yovos [et al.] // *JBMR Plus*. – 2020. – Vol. 5, № 2. – P. e10431.
188. Lines, K.E. MiR-15a/miR-16-1 expression inversely correlates with cyclin D1 levels in Men1 pituitary NETs / K.E. Lines, P.J. Newey, C.J. Yates [et al.] // *Journal of Endocrinology*. – 2018. – Vol. 240, № 1. – P. 41–50.
189. Bottoni, A. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas / A. Bottoni, D. Piccin, F. Tagliati [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2005. – Vol. 204, № 1. – P. 280–285.
190. Trivellin, G. MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in vitro / G. Trivellin, H. Butz, J. Delhove [et al.] // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. – 2012. – Vol. 303, № 6. – P. E708–E719.
191. Dénes, J. Regulation of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) protein expression by MiR-34a in sporadic somatotropinomas / J. Dénes, L. Kasuki, G. Trivellin [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. e0117107.

192. Bogner, E.M. miR-34a is upregulated in AIP-mutated somatotropinomas and promotes octreotide resistance / E.M. Bogner, A.F. Daly, S. Gulde [et al.] // International journal of cancer. – 2020. – Vol. 147, № 12. – P. 3523–3538.
193. D'Angelo, D. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1 / D. D'Angelo, D. Palmieri, P. Mussnich [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2012. – Vol. 97, № 7. – P. E1128–E1138.
194. He, Z. Next-generation sequencing of microRNAs reveals a unique expression pattern in different types of pituitary adenomas / Z. He, L. Chen, X. Hu [et al.] // Endocrine journal. – 2019. – Vol. 66, № 8. – P. 709–722.
195. Müssnich, P. Downregulation of miR-410 targeting the cyclin B1 gene plays a role in pituitary gonadotroph tumors / P. Müssnich, G. Raverot, M.L. Jaffrain-Rea [et al.] // Cell cycle (Georgetown, Tex.). – 2015. – Vol. 14, № 16. – P. 2590–2597.
196. Grzywa, T.M. 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 / T.M. Grzywa, K. Klicka, B. Rak [et al.] // Endocrine. – 2019. – Vol. 65, № 3. – P. 646–655
197. Mossakowska, B.J. Difference in miRNA Expression in Functioning and Silent Corticotroph Pituitary Adenomas Indicates the Role of miRNA in the Regulation of Corticosteroid Receptors / B.J. Mossakowska, P. Kober, N. Rusetska [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, № 5. – P. 2867.
198. Zhou, K. MicroRNA-106b promotes pituitary tumor cell proliferation and invasion through PI3K/AKT signaling pathway by targeting PTEN / K. Zhou, T. Zhang, Y. Fan [et al.] // Tumour biology. – 2016. – Vol. 37, № 10. – P. 13469–13477.
199. Németh, K. Comprehensive Analysis of Circulating miRNAs in the Plasma of Patients With Pituitary Adenomas / K. Németh, O. Darvasi, I. Likó [et al.] // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2019. – Vol. 104, № 9. – P. 4151–4168.
200. Belaya, Z. Circulating Plasma microRNA to Differentiate Cushing's Disease From Ectopic ACTH Syndrome / Z. Belaya, P. Khandaeva, L. Nonn [et al.] // Frontiers in endocrinology. – 2020. – Vol. 11. – P. 331.
201. Малыгина, А. А. Экспрессии микроРНК в плазме крови, оттекающей от гипофиза, у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга и АКТГ-эктопированным синдромом / А. А. Малыгина, Ж. Е. Белая, А. Г. Никитин [и др.] // Проблемы Эндокринологии. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 18–30.

202. Vetrivel, S. Circulating microRNA Expression in Cushing's Syndrome / S. Vetrivel, R. Zhang, M. Engel [et al.] // *Frontiers in endocrinology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 620012.
203. Lutsenko, A. Circulating Plasma MicroRNA in Patients With Active Acromegaly / A. Lutsenko, Z. Belaya, A. Nikitin [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2022. – Vol. 107, № 2. – P. 500–511.
204. Korkmaz, H. Circulating miR-29c-3p is downregulated in patients with acromegaly / H. Korkmaz, Ö. Hekimler Öztürk, B. Torus // *Turkish journal of medical sciences*. – 2021. – Vol. 51, № 4. – P. 2081–2086.
205. Luzi, E. MicroRNAs regulatory networks governing the epigenetic landscape of MEN1 gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumor: A case report / E. Luzi, L. Pandolfini, S. Ciuffi [et al.] // *Clinical and translational medicine*. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. e351.
206. Bösch, F. Treatment with somatostatin analogs induces differentially expressed let-7c-5p and mir-3137 in small intestine neuroendocrine tumors / F. Bösch, A. V. Bazhin, S. Heublein [et al.] // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 575.
207. Nyirő, G. miRNA Expression Profiling in G1 and G2 Pancreatic Neuroendocrine Tumors / G. Nyirő, B. K. Szeredás, Á. Decmann [et al.] // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16, № 14. – P. 2528.
208. Kövesdi, A. Circulating miRNA Increases the Diagnostic Accuracy of Chromogranin A in Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumors / A. Kövesdi, P. A. Kurucz, G. Nyíró [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 9. – P. 2488.
209. Kooblall, K. G. miR-3156-5p is downregulated in serum of MEN1 patients and regulates expression of MORF4L2 / K. G. Kooblall, V. J. Stokes, O. A. Shariq [et al.] // *Endocrine-related cancer*. – 2022. – Vol. 29, № 10. – P. 557–568.
210. Пржиялковская, Е. Г. Клинические рекомендации «Акромегалия» (проект) / Е. Г. Пржиялковская, Н. Г. Мокрышева, Е. А. Трошина [и др.] // *Ожирение и метаболизм*. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 215–249.
211. Kurs, M. B. Feature Selection with the Boruta Package / M. B. Kurs, W. R. Rudnicki // *Journal of Statistical Software*. – 2010. – Vol. 36, № 11. – P. 1–13.
212. Carroll, R. W. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) / R. W. Carroll // *Asia-Pacific journal of clinical oncology*. – 2013. – Vol. 9, № 4. – P. 297–309.
213. Bergman, L. Identification of MEN1 gene mutations in families with MEN1 and related disorders / L. Bergman, B. Teh, J. Cardinal [et al.] // *British journal of cancer*. – 2000. – Vol. 83, № 8. – P. 1009–1014.
214. Shyamasunder, A. H. Clinical Profile and Mutations Associated with Multiple Endocrine Neoplasia-Type1 (MEN1) and Their First-Degree Relatives at Risk of Developing MEN1: A Prospective Study / A. H. Shyamasunder, R. Pai, H. Ramamoorthy [et al.] // *Hormone and*

- metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme. – 2021. – Vol. 53, № 4. – P. 245–256.
215. Mathew, U. E. Clinical profile and treatment outcomes among patients with sporadic and multiple endocrine neoplasia syndrome-related primary hyperparathyroidism / U. E. Mathew, A. Goyal, A. D. Upadhyay [et al.] // *Clinical endocrinology*. – 2023. – Vol. 99, № 5. – P. 449–458.
 216. Marini, F. Bone phenotypes in multiple endocrine neoplasia type 1: survey on the MEN1 Florentine database / F. Marini, F. Giusti, T. Iantomasi, F. Cioppi, M. L. Brandi // *Endocrine connections*. – 2022. – Vol. 11, № 5. – P. e210456.
 217. Tonelli, F. Pancreatic Neuroendocrine Tumors in MEN1 Patients: Difference in Post-Operative Complications and Tumor Progression between Major and Minimal Pancreatic Surgeries / F. Tonelli, F. Marini, F. Giusti [et al.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15, № 20. – P. 4919.
 218. Christakis, I. Clinical Features, Treatments, and Outcomes of Patients with Thymic Carcinoids and Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Syndrome at MD Anderson Cancer Center / I. Christakis, W. Qiu, A. M. Silva Figueroa [et al.] // *Hormones & cancer*. – 2016. – Vol. 7, № 4. – P. 279–287.
 219. van den Broek, M. F. M. The Management of Neuroendocrine Tumors of the Lung in MEN1: Results From the Dutch MEN1 Study Group / M. F. M. van den Broek, J. M. de Laat, R. S. van Leeuwen [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2021. – Vol. 106, № 2. – P. e1014–e1027.
 220. Bartsch, D. K. Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms and Their Precursor Lesions in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 / D. K. Bartsch, M. B. Albers, C. L. Lopez [et al.] // *Neuroendocrinology*. – 2016. – Vol. 103, № 3–4. – P. 240–247.
 221. Berna, M. J. A prospective study of gastric carcinoids and enterochromaffin-like cell changes in multiple endocrine neoplasia type 1 and Zollinger-Ellison syndrome: identification of risk factors / M. J. Berna, B. Annibale, M. Marignani [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2008. – Vol. 93, № 5. – P. 1582–1591.
 222. Sok, C. Management of Gastric Neuroendocrine Tumors: A Review / C. Sok, A. P. S. Ajay, V. Tsagkalidis, D. A. Kooby, M. M. Shah // *Annals of surgical oncology*. – 2024. – Vol. 31, № 3. – P. 1509–1518.
 223. Laffi, A. Gastric Neuroendocrine Tumors (g-NETs): A Systematic Review of the Management and Outcomes of Type 3 g-NETs / A. Laffi, A. G. A. Lania, A. Ragni [et al.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15, № 8. – P. 2202.
 224. Sconfienza, E. Prevalence of Functioning Adrenal Incidentalomas: A Systematic Review and Meta-analysis / E. Sconfienza, M. Tetti, V. Forestiero, F. Veglio, P. Mulatero, S. Monticone

- // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2023. – Vol. 108, № 7. – P. 1813–1823.
225. Young, W. F. The Incidentally Discovered Adrenal Mass / W. F. Young // The New England journal of medicine. – 2007. – Vol. 356, № 6. – P. 601–610.
 226. Hill, K. A. Concomitant Thyroid Cancer in Patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Undergoing Surgery for Primary Hyperparathyroidism / K. A. Hill, L. Yip, S. E. Carty, K. L. McCoy // Thyroid. – 2019. – Vol. 29, № 2. – P. 252–257.
 227. Woliński, K. Thyroid lesions in patients with acromegaly – case-control study and update to the meta-analysis / K. Woliński, A. Stangierski, E. Gurgul [et al.] // Endokrynologia Polska. – 2017. – Vol. 68, № 1. – P. 2–6.
 228. Tirosh, A. Complications of acromegaly: thyroid and colon / A. Tirosh, I. Shimon // Pituitary. – 2017. – Vol. 20, № 1. – P. 70–75.
 229. Petrossians, P. Acromegaly at diagnosis in 3173 patients from the Liège Acromegaly Survey (LAS) Database / P. Petrossians, A. F. Daly, E. Natchev [et al.] // Endocrine-related cancer. – 2017. – Vol. 24, № 10. – P. 505–518.
 230. Nunes, V. S. Frequency of multiple endocrine neoplasia type 1 in a group of patients with pituitary adenoma: genetic study and familial screening / V. S. Nunes, G. L. Souza, D. Perone, S. J. Conde, C. R. Nogueira // Pituitary. – 2014. – Vol. 17, № 1. – P. 30–37.
 231. Трухина, Д. А. Способ определения вероятности наличия генетически верифицированного синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа среди пациентов с его фенотипами / Д. А. Трухина, Ж. Е. Белая, К. А. Воронов [и др.]; заявка № 2024107693 заявл. 25.03.2024; опубл. 22.04.2025, Бюл. № 12. – Патент на изобретение RU 2838817 C1.
 232. Sonoda, A. Clinicopathological features and menin expression of pancreatic neuroendocrine neoplasm associated with multiple endocrine neoplasia type 1 / A. Sonoda, Y. I. Yamashita, T. Kondo [et al.] // Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences. – 2020. – Vol. 27, № 12. – P. 984–991.
 233. Cao, Y. Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of β -catenin / Y. Cao, R. Liu, X. Jiang [et al.] // Molecular and cellular biology. – 2009. – Vol. 29, № 20. – P. 5477–5487.
 234. Kim, B. Direct interaction of menin leads to ubiquitin-proteasomal degradation of β -catenin / B. Kim, T. Y. Song, K. Y. Jung, S. G. Kim, E. J. Cho // Biochemical and biophysical research communications. – 2017. – Vol. 492, № 1. – P. 128–134.
 235. Трухина, Д. А. Морфологические характеристики аденом гипофиза в рамках фенотипов синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа / Д. А. Трухина, Е.

- О. Мамедова, А. М. Лапшина, Е. В. Васильев, А. Н. Тюльпаков, Ж. Е. Белая // Проблемы Эндокринологии. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 50–58.
236. Wang, Y. N. Novel circulating microRNAs expression profile in colon cancer: a pilot study / Y. N. Wang, Z. H. Chen, W. C. Chen // European journal of medical research. – 2017. – Vol. 22, № 1. – P. 51.
237. Jin, L. miR-576-5p Facilitates Aggressive Cell Behaviors in Colon Adenocarcinoma via Targeting NEGR1 / L. Jin, X. Li, Y. Zhao, G. Zhu, W. Shen // Critical reviews in eukaryotic gene expression. – 2022. – Vol. 32, № 7. – P. 25–33.
238. Kordaß, T. miR-193b and miR-30c-1* inhibit, whereas miR-576-5p enhances melanoma cell invasion in vitro / T. Kordaß, C. E. M. Weber, D. Eisel, A. A. Pane, W. Osen, S. B. Eichmüller // Oncotarget. – 2018. – Vol. 9, № 65. – P. 32507–32522.
239. Chen, C. miRNA-576-5p promotes endometrial cancer cell growth and metastasis by targeting ZBTB4 / C. Chen, Q. Zhang, B. Kong // Clinical & translational oncology. – 2023. – Vol. 25, № 3. – P. 706–720.
240. Гвалдин, Д. Ю. Сравнительный анализ профиля циркулирующих микроРНК в плазме крови пациентов с глиальными опухолями мозга / Д. Ю. Гвалдин, Н. А. Петрусенко, Э. Е. Росторгуев, С. Н. Димитриади, С. Э. Кавицкий, Н. Н. Тимошкина // Research'n Practical Medicine Journal. – 2024. – Т. 11, № 2. – С. 36–45.
241. Chen, Y. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets / Y. Chen, X. Wang // Nucleic acids research. – 2020. – Vol. 48, № D1. – P. D127–D131.
242. GeneCards: The Human Gene Database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.genecards.org/>. – Свободный. – Дата обращения: 02.06.2025.
243. Hai, R. miR-576-5p Promotes the Proliferation of Papillary Thyroid Carcinoma through the MAPK4-AKT Pathway / R. Hai, Y. Zhou, F. Li [et al.] // International journal of analytical chemistry. – 2022. – Vol. 2022. – P. 1428411.
244. Трухина, Д. А. Различия в экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов с генетически подтвержденным синдромом множественных эндокринных неоплазий 1 типа и их фенокопиями / Д. А. Трухина, Е. О. Мамедова, А. Г. Никитин, Ф. А. Кошкин, Ж. Е. Белая, Г. А. Мельниченко // Проблемы Эндокринологии. – 2023. – Т. 69, № 6. – С. 70–85.