

На правах рукописи

ГРЕБЕННИКОВА Татьяна Алексеевна

**Эпигенетические механизмы нарушений костного ремоделирования при
гиперкортицизме и акромегалии**

(14.01.02 – Эндокринология)

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации (Директор – академик РАН Дедов И.И.)

Научный руководитель

Белая Жанна Евгеньевна
доктор медицинских наук

Официальные оппоненты

Древаль Александр Васильевич
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой эндокринологии ФУВ
ГБУЗ МО «Московский областной научно-
исследовательский институт им. М.Ф.
Владимирского»

Торопцова Наталья Владимировна
доктор медицинских наук,
заведующая лабораторией остеопороза отдела
метаболических заболеваний костей и суставов
с Центром профилактики остеопороза ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт
ревматологии им. В.А. Насоновой»

Ведущая организация

**ФГАОУ ВО Первый Московский
государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 208.126.01 при ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117036, Москва, ул.
Дмитрия Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Суркова Елена Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Остеопороз развивается вследствие нарушений костного ремоделирования, что приводит к прогрессивной потере костной ткани, нарушению ее внутренней микроархитектоники и низкотравматичным переломам. Современный взгляд на процесс ремоделирования костной ткани затрагивает эпигенетические механизмы регуляции. [Vrtacnik P., 2014] МикроРНК (мкРНК) представляют собой группу некодирующих молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК), которые негативно регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Изучение роли мкРНК в регуляции костного обмена начаты относительно недавно, однако все более очевидно их участие в патогенезе остеопороза. Изменения экспрессии мкРНК непосредственно влияют на основные сигнальные пути остеокласто- и остеобластогенеза, к которым относятся система рецептора ядерного фактора κ B (RANK), лиганд рецептора ядерного фактора κ B (RANKL), остеопротегерин (OPG) и канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь (Wnt-сигнальный путь). [Karinas K., 2010] Устойчивость мкРНК к разрушению в периферической крови дает возможность рассматривать некоторые специфичные для костной ткани мкРНК в качестве потенциальных диагностических маркеров костного ремоделирования и таргетных молекул в лечении остеопороза.

К наиболее тяжелым формам остеопороза относится вторичный остеопороз, развивающийся вследствие таких эндокринных заболеваний, как гиперкортицизм и акромегалия. Патогенетические аспекты повышения хрупкости костной ткани при этих заболеваниях и нарушения регуляции костного ремоделирования у человека при гиперкортицизме и акромегалии в настоящее время мало изучены.

Исследование механизмов регуляции экспрессии генов, отвечающих за процессы ремоделирования костной ткани, будет служить основой для развития таргетной диагностики и терапии, и может найти свое приложение как при коррекции костных осложнений эндогенного гиперкортицизма (ЭГ) и акромегалии, так и при ведении пациентов с глюкокортикоидным остеопорозом вследствие экзогенного введения глюкокортикоидов и изучения возможных изменений костного ремоделирования при введении соматотропного гормона (СТГ), например, с анаболическими целями.

Степень разработанности темы исследования

Работы по изучению влияния глюкокортикоидов на изменение экспрессии матричных РНК (мРНК), вовлеченных в регуляцию костного ремоделирования, непосредственно в костной

ткани согласно последним литературным данным проводились только на животной модели. В то время как исследование профиля мРНК у пациентов с ЭГ не проводилось. Патогенез нарушений костного метаболизма при акромегалии недостаточно изучен ввиду ограниченного количества исследований, посвященных данной теме. Изучение регуляции изменения экспрессии мРНК и мкРНК, участвующих в костном обмене, при акромегалии не осуществлялось.

Цель работы

Изучить эпигенетические механизмы патогенеза нарушений костного ремоделирования при гиперкортицизме и акромегалии.

Задачи исследования

1. Изучить изменения уровней мРНК, вовлеченных в костное ремоделирование, в костной ткани у пациентов с ЭГ.
2. Описать изменения экспрессии мкРНК, регулирующих процессы костного ремоделирования, при ЭГ.
3. Исследовать механизмы нарушения костного обмена у пациентов с акромегалией на уровне экспрессии генов (мРНК, мкРНК).
4. Сопоставить изменения экспрессии мкРНК в костной ткани с уровнем экспрессии мкРНК в периферической крови у пациентов с ЭГ и акромегалией.
5. Оценить изменения экспрессии генов в костной ткани и их соответствие с уровнем Wnt-белков в периферической крови при ЭГ.
6. Выделить таргетные молекулы и потенциальные диагностические маркеры среди исследованных мкРНК и компонентов Wnt-сигнального пути.

Научная новизна

- Впервые произведен анализ изменений экспрессии мРНК и мкРНК специфичных для регуляции костного ремоделирования в образцах костной ткани у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга (БИК).
- Впервые в образцах костной ткани у пациентов с акромегалией исследованы изменения экспрессия специфичных для костной ткани мРНК и мкРНК в сопоставлении этих данных с уровнем маркеров костного ремоделирования в периферической крови.
- Впервые сопоставлены изменения экспрессии мРНК и мкРНК в костной ткани с конечными белковыми продуктами и мкРНК в периферической крови при ЭГ и избыточной секреции СТГ.

Теоретическая и практическая значимость работы

- На основании определения изменений экспрессии мкРНК и генов, регулирующих костное ремоделирование, описан патогенез ГКО и вторичного остеопороза вследствие акромегалии.
- Предложены потенциальные таргетные молекулы для медикаментозного влияния на регуляцию костного обмена, коррекции осложнений со стороны опорно-двигательного аппарата у пациентов с гиперкортицизмом и акромегалией.
- Предложены новые биомаркеры (мкРНК и Wnt3a,10b) нарушений костного ремоделирования при ЭГ или акромегалии.

Положения, выносимые на защиту

1. Развитие глюкокортикоидного остеопороза обусловлено подавлением остеобластогенеза за счет нарушения регуляции экспрессии антагонистов Wnt-сигнального пути – генов, кодирующих образование диккопфа 1 и склеростина, дисрегуляции мкРНК и как следствие угнетения экспрессии *RUNX2*, *TWIST1* – факторов транскрипции остеобластогенеза.
2. Изменения костного ремоделирования при акромегалии заключается в подавлении экспрессии гена костно-специфической щелочной фосфатазы необходимой для финальной дифференцировки остеобласта, повышения экспрессии *Dkk1*, дисрегуляции мкРНК и как следствие подавления *TWIST1*.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 6 декабря 2017 года на расширенной межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Результаты работы были представлены в виде устных докладов на III Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2017) и 20-м Европейском курсе повышения квалификации врачей (ESE, Москва, 2017), в виде тезисных докладов на 17-м международном конгрессе по остеопорозу, остеоартриту и скелетно-мышечным заболеваниям (WCO-IOF-ESCEO, Флоренция, 2017), 19 Европейском эндокринологическом конгрессе (ECE, Лиссабон, 2017), Ежегодной конференции Американского общества по исследованию костного и минерального обмена (ASMBR, Denver, Colorado USA, 2017).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на русском языке в объеме 137 страниц машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 12 рисунками. Список использованной литературы включает 225 источников: 10 отечественных и 215 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно поставленным целям и задачам в исследование было включено 116 человек: 42 пациента с установленным в ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом БИК; 22 пациента с акромегалией; 10 пациентов с неактивными аденомами гипофиза (НАГ) и 42 здоровых добровольца. Все участники исследования проходили обследование или обращались за медицинской консультацией в отделение нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава РФ в период 2015-2017гг.

Диагнозы БИК, акромегалия, НАГ устанавливались ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» в соответствии с современными клиническими рекомендациями. Окончательный нозологический диагноз подтверждался результатами гистологического исследования послеоперационного материала.

Здоровые добровольцы, принявшие участие в исследовании, осматривались врачом-исследователем, не имели клинических признаков гиперкортицизма и акромегалии, а также других острых или хронических серьезных заболеваний; постоянно не получали никакого медикаментозного лечения. Кроме того, беременность на момент обследования, была критерием исключения.

Распределение пациентов и здоровых добровольцев по группам для проведения различных разделов исследования и решения поставленных задач приведено в Таблице 1.

Таблица 1 - Основные разделы исследования

Раздел исследования	Критерии включения	Тип исследования	Количество пациентов
1.Анализ экспрессии мРНК и мкРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии ЭГ и акромегалии	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом БИК, акромегалия и НАГ, имеющие показания к оперативному лечению	Одномоментное исследование случай-контроль	16 пациентов с БИК, 14 пациентов с акромегалией и 10 пациентов с НАГ
2.Анализ экспрессии мкРНК в плазме крови у пациентов в активной стадии ЭГ и акромегалии	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом БИК, акромегалия и здоровые добровольцы	Одномоментное исследование случай-контроль	24 пациента с БИК, 22 пациента с акромегалией и 18 здоровых добровольцев
3.Состояние внеклеточных агонистов Wnt-сигнального пути среди пациентов в активной стадии ЭГ	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом БИК и здоровые добровольцы	Одномоментное исследование случай-контроль	42 пациента с БИК и 42 здоровых добровольца

Критерии исключения: беременность, использование глюкокортикоидов, злоупотребление алкоголем, обострение хронических заболеваний, тяжелые угрожающие жизни состояния (такие как, почечная и печеночная недостаточность, инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения), терминальные состояния, длительная общая иммобилизация (более 1 недели), клинически выраженный перелом в течение предыдущих 6 месяцев, любая другая причина вторичного остеопороза в момент проведения исследования или в течение 5-летней истории болезни или любое длительное лечение препаратами, имеющими доказанное влияние на ремоделирование костной ткани у людей в течение предыдущих 12 месяцев, включая лечение антирезорбтивными или анаболическими препаратами, аналогами соматостатина, агонистами дофаминовых рецепторов и ингибиторами стероидогенеза.

Забор образцов костной ткани осуществлялся во время трансназальной трансфеноидальной аденомэктомии гипофиза из клиновидной кости (дна турецкого седла) до непосредственного удаления аденомы гипофиза у пациентов с БИК, акромегалией, НАГ. В течение 15 минут после забора образцы подвергались механической очистке, промывались в физиологическом растворе 0,9% NaCl и помещались в пробирку с 1 мл раствора для консервации и лизиса ткани QIAzol Lysis Reagent («Qiagen», Германия). Измельчение образцов проводилось с помощью стальных шариков диаметром 5 мм («Qiagen», Германия) на лабораторном гомогенизаторе TissueLyser LT («Qiagen», Германия).

Забор крови из периферической вены выполнялся утром натощак в промежуток 8.00-10.00, за исключением вечернего кортизола и адренокортикотропного гормона. Далее образцы

подвергались двукратному центрифугированию (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов (А-4-81, Ф-4-81-МТР/Flex, FA-45-30-11 и F-45-48-PCR)) в течение 15 минут после забора крови из вены при температуре +5⁰С при скорости вращения 3000 оборотов/мин в течение 20 минут. Образцы сыворотки и плазмы были заморожены и хранились при температуре -80⁰С.

Изоляция тотальной РНК из образцов костной ткани

Выделение тотальной РНК из образцов костной ткани с обработкой ДНКазой I проводили с помощью miR-Neasy Mini Kit (Qiagen, 217004) на автоматической станции «QIAcube» в соответствии с протоколом производителя. Для предотвращения деградации на 1 мкл раствора РНК добавляли 1 ед. ингибитора РНКазы RiboLock (Thermo Fisher Scientific, EO0382). Концентрацию тотальной РНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus (GE Healthcare).

Количественная оценка транскриптов мРНК с помощью qRT-PCR

Двухстадийную количественную обратную транскрипцию-полимеразную цепную реакцию в режиме «реального времени» (qRT-PCR) проводили с использованием High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher, 4368814) и Custom TaqMan Array 48 Plus (Thermo Fisher Scientific, 4413258), в 96-луночном формате на термоциклере StepOnePlus (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя. Анализ данных проводился с использованием SDS Software (версия 2.3, Applied Biosystems) и DataAssist Software (версия 3.01, Applied Biosystems). Все образцы были нормированы на ген домашнего хозяйства *GUSB*, а уровни *GAPDH*, *HPRT* служили вторичным внутренним контролем.

Выделение мкРНК из плазмы

Выделение мкРНК из 200 мкл плазмы проводили с помощью miRNeasy Serum/Plasma Kit («Qiagen», Германия) согласно инструкции компании-производителя на автоматической станции QIAcube («Qiagen», Германия). Для предотвращения деградации в выделенную РНК добавляли 1 ед. RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Fisher Scientific», США) на 1 мкл раствора нуклеиновых кислот. Концентрацию суммарной РНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare», Великобритания). Обратная транскрипция для мкРНК осуществлялась с помощью TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit («Applied Biosystems», США).

Количественная оценка транскриптов мкРНК с помощью qRT-PCR

Анализ экспрессии мкРНК, участвующих в костном ремоделировании, проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) «в реальном времени». Для ПЦР «в реальном времени» использовали термоциклер StepOnePlus (Applied Biosystems, USA). В смесь для ПЦР

добавляли Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, USA), раскапывали в 96-луночную плашку с праймерами и флуоресцентными зондами наборов TaqMan Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, USA). 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 контроля выделения и обратной транскрипции использовались мкРНК мкРНК-191 и искусственный экзогенный контроль cel-39.

Статистическая обработка данных

Основные количественные характеристики пациентов представлены в виде среднего (М) и 95% доверительного интервала (95%ДИ). Сравнение между описательными параметрами пациентов и группой контроля проводили с использованием непарных 2-сторонних t-тестов или критерия Манна-Уитни. Точный критерий Фишера был использован для сравнения двух независимых групп для качественных параметров.

Весь статистический анализ и графическое представление выполнялись с использованием программного обеспечения R версии 3.4.0 (2017-04-21). Исходный масштаб и данные, преобразованные в \log_2 , были построены с использованием пакета «ggplot», а описательная статистика была рассчитана с использованием базового пакета «stats». Каждый параметр тестировался с использованием парного t-теста для оценки любых различий между группами пациентов. Корреляционный анализ проводился с применением корреляционного анализа Спирмана (ρ).

Значение p менее 0,05 считалось статистически значимым.

В качестве поправки на множественные сравнения использовался метод коррективы Бенджамини-Хохберга (q -значения $< 0,10$) [Reiner A., 2003; Hirakawa A, 2008].

Ввиду отсутствия подобных исследований и его экспериментального, а не подтверждающего характера, а также редкости заболеваний, предварительной статистической гипотезы не было.

При post-hock расчете мощности исследования по анализу экспрессии генов в костной ткани было подтверждено, что для большинства сравнений мощность расчета превышала 90% (от 39,2% до 99,9% по сравнению с параметрами мРНК и мкРНК).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Анализ экспрессии мРНК и мкРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии ЭГ и акромегалии

Общая характеристика и биохимические показатели пациентов с БИК, акромегалией и НАГ, у которых проводился забор образцов костной ткани, представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Основные характеристики включенных пациентов с БИК, акромегалией и НАГ*

Параметры	НАГ М (95% ДИ)	БИК М (95% ДИ)	Акромегалия М (95% ДИ)	Р	Р*
Количество пациентов	10	16	14		
Возраст (годы)	45 (33-57)	40 (33-48)	37 (32-41)	0,353	0,057
Индекс массы тела (ИМТ) (кг/м ²)	27 (23-31)	30 (26-35)	28 (25-31)	0,55	0,941
Пол (Ж(%): М(%))	6 (60) : 4 (40)	14 (87,5) : 2 (12,5)	8 (51,8) : 6 (48,2)	0,16	0,895
Кальций общий (ммоль/л)	2,35 (2,33-2,43)	2,38 (2,33-2,43)	2,38 (2,32-2,44)	0,93	0,742
Креатинин (мкмоль/л)	72 (64-79)	69 (63-75)	65 (59-71)	0,67	0,116
Остеокальцин (нг/мл)	23,5 (12,3-34,6)	9,1 (5,8-12,4)	48,6 (30,7-66,5)	0,015	0,015
СТх (нг/мл)	0,58 (0,28-0,89)	0,33 (0,24-0,41)	1,16 (0,67-1,64)	0,102	0,039
Витамин D (нг/мл)	12,2 (5,9-18,4)	11,5 (8,0-13,1)	10,9 (8,4-13,6)	0,932	0,879
L1-L4 Z-критерий	-0,4 (-1,8 – 0,9)	-1,2 (-2,1 - -0,2)	0,2 (-0,5 – 1,1)	0,297	0,302
Femur Neck Z-критерий	-0,2 (-1,2 – 0,7)	-0,8 (-1,5 - -0,07)	0,6 (-0,3 – 1,43)	0,325	0,167
Низкотравматичные переломы	1 (10%), Компрессионный перелом тела позвонка	9 (56%), в 6 случаях компрессионные переломы тел позвонков и в 6-ти случаях внепозвоночные переломы	3 (21%), в двух случаях компрессионные переломы тел позвонков и в одном перелом лучевой кости	0,037	0,468

Примечания: р – вероятность ошибки между группами БИК и НАГ, р - вероятность ошибки между группами акромегалия и НАГ, СТх - С-концевой телопептид коллагена I-го типа.*

В Таблице 3 представлены данные об изменении экспрессии основных мРНК, регулирующих костное ремоделирование, непосредственно в образцах костной ткани у пациентов с БИК в сравнении с пациентами с НАГ.

Таблица 3 - Результаты изменения экспрессии мРНК у пациентов с БИК по сравнению с НАГ с поправками для множественных сравнений

Ген	Полное название гена	НАГ	БИК М (95% ДИ)	Р	q
<i>ACP5</i>	Кислая фосфатаза 5	1	0,32 (0,21-0,43)	< 0,001	< 0,001
<i>ALP</i>	Щелочная фосфатаза	1	0,35 (0,26-0,45)	< 0,001	< 0,001
<i>BGLAP</i>	Белок костного гамма-карбоксиглутамата	1	0,42 (0,30-0,54)	< 0,001	< 0,001
<i>BMP2</i>	Костный морфогенетический белок 2	1	0,51 (0,38-0,64)	< 0,001	< 0,001
<i>BMP7</i>	Костный морфогенетический белок 7	1	2,04 (1,29-2,78)	0,01	0,165
<i>CA2</i>	Карбоновая ангидраза 2	1	3,68 (0,87-6,50)	0,06	0,84
<i>CD40</i>	CD 40 молекула	1	3,5 (3,13-3,87)	< 0,001	< 0,001
<i>CLCN7</i>	Потенциал-зависимый хлоридный канал 7	1	1,12 (0,84-1,41)	0,375	1
<i>COL1A1</i>	Коллаген тип I альфа 1	1	0,27 (0,16-0,38)	< 0,001	< 0,001
<i>COL1A2</i>	Коллаген тип I альфа 2	1	0,53 (0,36-0,70)	< 0,001	0,001
<i>Dkk1</i>	Диккопф 1	1	3,24 (1,98-4,50)	0,002	0,039
<i>FGFR1</i>	Рецептор фактора роста фибробластов 1	1	1,09 (0,87-1,30)	0,41	1
<i>FGFR2</i>	Рецептор фактора роста фибробластов 1	1	0,53 (0,44-0,62)	< 0,001	< 0,001
<i>HPRT1</i>	Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза 1	1	1,03 (0,83-1,24)	0,735	1
<i>IGF1</i>	Инсулиноподобный фактор роста 1	1	0,48 (0,37-0,60)	< 0,001	< 0,001
<i>IGFBP2</i>	Белок 2, связывающий инсулиноподобный фактор роста	1	2,14 (0,84-3,44)	0,08	1
<i>IL15</i>	Интерлейкин 15	1	0,98 (0,72-1,23)	0,852	1
<i>IL6</i>	Интерлейкин 6	1	0,06 (0-0,13)	< 0,001	< 0,001
<i>IL6R</i>	Рецептор интерлейкина 6	1	0,9 (0,71-1,10)	0,304	1
<i>ITGA1</i>	Интегрин альфа 1	1	1,34 (1,04-1,63)	0,028	0,421
<i>ITGB3</i>	Интегрин бета 3	1	0,85 (0,62-1,08)	0,179	1
<i>LEP</i>	Лептин	1	2,53 (0,42-4,64)	0,142	1
<i>LRP1</i>	Рецептор липопротеида низкой плотности 1	1	1,08 (0,82-1,33)	0,533	1
<i>LRP5</i>	Рецептор липопротеида низкой плотности 5	1	1,5 (1,30-1,69)	< 0,001	0,002
<i>LRP6</i>	Рецептор липопротеида низкой плотности 6	1	1,28 (1,12-1,45)	0,002	0,046
<i>MMP2</i>	Матриксная металлопротеиназа 2	1	0,52 (0,43-0,62)	< 0,001	< 0,001
<i>PCDHA6</i>	протокатгерин альфа 6	1	0,8 (0,54-1,05)	0,112	1
<i>RUNX2</i>	Runt-зависимый транскрипционный фактор 2	1	0,53 (0,43-0,62)	< 0,001	< 0,001
<i>SFRP1</i>	Связывающий белок фризельда 1	1	1,1 (0,51-1,69)	0,726	1
<i>SFRP4</i>	Связывающий белок фризельда 4	1	0,46 (0,32-0,59)	< 0,001	< 0,001
<i>SOST</i>	Склеростин	1	5,13 (1,86-8,41)	0,017	0,259
<i>SPP1</i>	Остеопонтин	1	0,51 (0,35-0,67)	< 0,001	< 0,001
<i>STAT1</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 1	1	1,93 (1,54-2,32)	< 0,001	0,004
<i>TGFB1</i>	Трансформирующий фактор роста бета 1	1	1,49 (1,26-1,71)	< 0,001	0,008
<i>TIMP2</i>	Ингибитор металлопептидазы TIMP 2	1	0,55 (0,41-0,69)	< 0,001	< 0,001
<i>TNFRSF11A (RANK)</i>	Рецептор ядерного фактора κB	1	0,78 (0,64-0,93)	0,006	0,111
<i>TNFRSF11B (OPG)</i>	Остеопротегерин	1	1,09 (0,86-1,31)	0,422	1
<i>TNFSF11 (RANKL)</i>	Лиганд рецептора ядерного фактора κB	1	0,48 (0,18-0,79)	0,002	0,047
<i>TWIST1</i>	Транскрипционный фактор 1 семейства twist	1	0,66 (0,46-0,86)	0,002	0,046
<i>VEGFA</i>	Сосудистый эндотелиальный фактор роста A	1	0,53 (0,32-0,74)	< 0,001	0,007
<i>WNT10b</i>	Wnt белок 10B	1	12,22 (7,31-17,13)	< 0,001	0,008
<i>WNT3a</i>	Wnt белок 3A	1	1,59 (0,40-2,78)	0,303	1

У пациентов с БИК наблюдалось общее подавление процессов костеобразования как за счет снижения функции зрелых остеобластов (снижение экспрессии всех неколлагеновых и коллагеновых белков: *ALP*, *ACP5*, *BGLAP*, *COL1A1*, *COL1A2*), так и из-за значительного

снижения экспрессии основных факторов транскрипции остеобластогенеза: *RUNX2* и *TWIST1*, то есть подавления процессов образования остеобластов. Подавление остеобластогенеза, наиболее вероятно, обусловлено повышением экспрессии антагонистов основного сигнального пути дифференцировки остеобластов - Wnt-сигнального пути (*SOST* и *Dkk1*), а также подавлением экспрессии ростовых факторов, отвечающих за остеобластогенез (*BMP2*, *BMP7*, *FGFR2*, *IGF1*, *VEGFA*). [Gifre L, 2013; Belaya ZE, 2016] Вместе с тем, впервые в данной работе были выявлены компенсаторные механизмы, направленные на поддержание остеобластогенеза, - повышение экспрессии агонистов Wnt-сигнального пути: мРНК *Wnt10b*, *LRP5* и *LRP6*. Таким образом, мы выявили механизмы подавления костеобразования и компенсаторных реакций при ЭГ, которые можно рассматривать для дальнейшего изучения в качестве возможностей таргетной терапии и диагностики дисрегуляции костного обмена при гиперкортицизме.

Также в работе анализировалась экспрессия генов, вовлеченных в регуляцию костного разрушения у пациентов с БИК. В костной ткани у пациентов с гиперкортицизмом было выявлено подавление экспрессии генов *RANK/RANKL/OPG* - основного сигнального пути остеокластогенеза, возможно, вследствие снижения количества и функции остеобластов. Однако ввиду отсутствия подавления маркеров костного разрушения можно предположить, что резорбция поддерживается за счет других механизмов, которые требуют дальнейшего изучения.

Для наглядности изменения экспрессии генов в костной ткани у пациентов с БИК приведены на Рисунке 1.

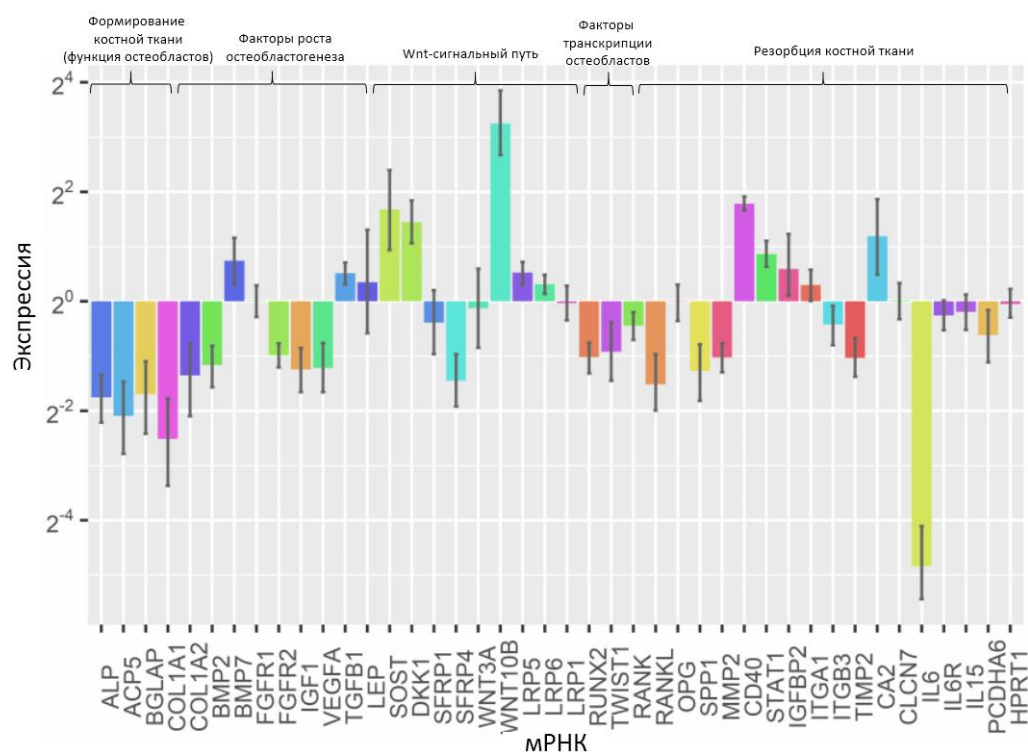


Рисунок 1 - Экспрессия мРНК у пациентов с БИК в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

Помимо экспрессии мРНК, в костной ткани у пациентов с БИК также исследовались мкРНК, которые по данным литературы вовлечены в регуляцию дифференцировки мезенхимальной стволовой клетки (МСК) по направлению к остеобласту, хондробластам и адипоцитам (Таблица 4).

Таблица 4 - Результаты изменения экспрессии мкРНК у пациентов при БИК по сравнению с НАГ с поправками для множественных сравнений

мкРНК	НАГ	БИК, М (95% ДИ)	Р	q
мкРНК-21-5p	1	0,94 (0,67-1,21)	0,663	1
мкРНК-210-5p	1	2,97 (2,29-3,65)	< 0,001	0,001
мкРНК-135a-5p	1	0,39 (0,27-0,51)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-155-5p	1	1,64 (1,22-2,07)	0,005	0,103
мкРНК-148a-3p	1	2,22 (1,66-2,77)	< 0,001	0,007
мкРНК-122-5p	1	1,22 (0,78-1,66)	0,311	1
мкРНК-125b-5p	1	2,35 (1,56-3,13)	0,002	0,05
мкРНК-9-5p	1	1,93 (1,30-2,57)	0,007	0,116
мкРНК-328-3p	1	1,62 (1,13-2,11)	0,016	0,246
мкРНК-211	1	0,57 (0,42-0,72)	< 0,001	0,001
мкРНК-31-5p	1	0,51 (0,37-0,64)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-34a-5p	1	2,17 (1,61-2,74)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-7b-5p	1	1,64 (1,22-2,06)	0,005	0,103
мкРНК-10b-5p	1	1,75 (1,38-2,12)	0,001	0,015
мкРНК-22-3p	1	1,60 (1,14-2,06)	0,014	0,217
мкРНК-203a-5p	1	2,07 (1,21-2,93)	0,019	0,280
мкРНК-100-5p	1	1,43 (0,85-2,01)	0,134	1
мкРНК-133a-5p	1	0,78 (0,49-1,07)	0,128	1
мкРНК-21-3p	1	1,91 (1,50-2,32)	< 0,001	0,007
мкРНК-550a-5p	1	1,09 (0,74-1,44)	0,576	1
мкРНК-550b-2-5p	1	0,63 (0,33-0,93)	0,02	0,262
мкРНК-199a-5p	1	0,44 (0,32-0,56)	< 0,001	0,001
мкРНК-320a	1	0,59 (0,41-0,76)	< 0,001	0,004
мкРНК-26a-5p	1	2,17 (1,41-2,93)	0,005	0,103
мкРНК-27a-5p	1	1,33 (0,78-1,88)	0,219	1
мкРНК-96-5p	1	0,92 (0,58-1,26)	0,627	1
мкРНК-188-3p	1	2,28 (1,65-2,90)	0,001	0,013
мкРНК-133a-3p	1	1,86 (1,10-2,62)	0,029	0,345
мкРНК-204-5p	1	0,45 (0,23-0,66)	< 0,001	0,002
мкРНК-218-5p	1	0,37 (0,25-0,49)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-23a-3p	1	0,44 (0,37-0,51)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-27a-3p	1	0,93 (0,72-1,14)	0,476	1
мкРНК-29a-3p	1	0,86 (0,67-1,06)	0,15	1
мкРНК-29b-3p	1	0,77 (0,55-0,98)	0,038	0,414
мкРНК-29c-3p	1	0,87 (0,60-1,13)	0,302	1

У пациентов с БИК в костной ткани мы выявили изменения экспрессии мкРНК, усиливающих дифференцировку МСК по отношению как к адипоциту ((мкРНК-34a-5p, мкРНК-125b-5p, мкРНК-188-3p, мкРНК-218-5p), так и к хондроциту (мкРНК-199a-5p). Также обнаружено изменение экспрессии нескольких мкРНК, которые обуславливают компенсаторное поддержание остеобластогенеза при гиперкортицизме. Таким образом, при ЭГ эпигенетические

механизмы подавления костеобразование реализуется, в основном, через усиление дифференцировки МСК в адипоциты и хондроциты, а не полностью за счет разрушения факторов транскрипции остеобластогенеза. Изменения экспрессии мкРНК в образцах костной ткани наглядно представлены на Рисунке 2.

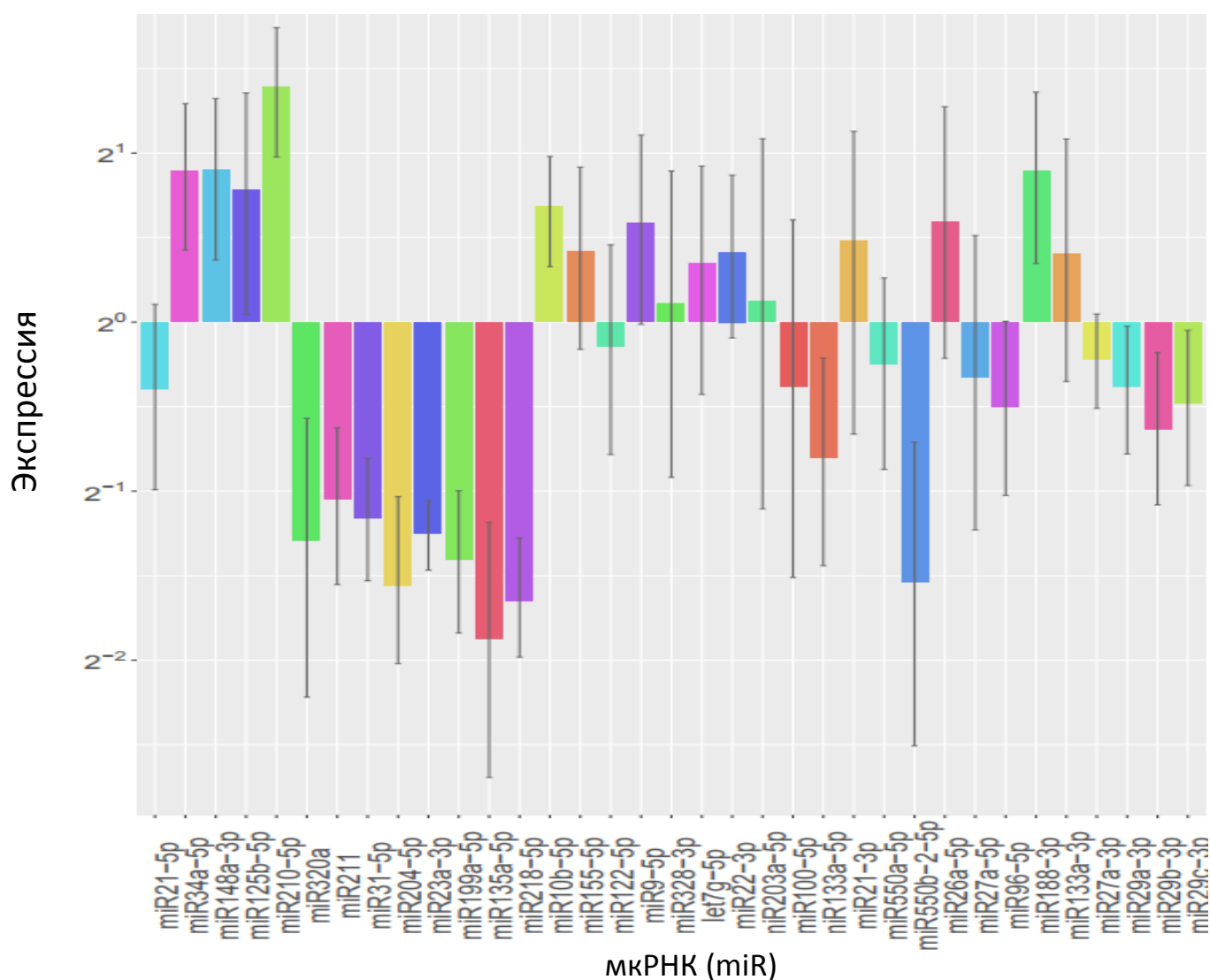


Рисунок 2 - Экспрессия мкРНК у пациентов с БИК в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

При акромегалии формирование костной ткани оказалось не изменено, хотя в виду значимого повышения маркеров костеобразования, ожидалось повышение экспрессии генов, отвечающих за остеобластогенез и функцию остеобластов (Таблица 5 и Рисунок 3).

Таблица 5 - Результаты изменения экспрессии мРНК у пациентов с акромегалией по сравнению с НАГ

Ген	Полное название гена	НАГ	Акромегалия М (95% ДИ)	р	q
<i>ACP5</i>	Кислая фосфатаза 5	1	1,09 (0,59-1,59)	0,704	1
<i>ALP</i>	Щелочная фосфатаза	1	0,51 (0,39-0,62)	< 0,001	< 0,001
<i>BGLAP</i>	белок костного гамма-карбоксиглутамата	1	1,36 (0,74-1,97)	0,235	1
<i>BMP2</i>	Костный морфогенетический белок 2	1	0,82 (0,75-0,90)	< 0,001	0,011
<i>BMP7</i>	Костный морфогенетический белок 7	1	1,86 (1,59-2,14)	< 0,001	0,001
<i>CA2</i>	Карбоновая ангидраза 2	1	1,05 (0,82-1,29)	0,629	1
<i>CD40</i>	CD 40 молекула	1	1,33 (0,94-1,71)	0,093	1
<i>CLCN7</i>	Потенциал-зависимый хлоридный канал 7	1	1,01 (0,83-1,19)	0,918	1
<i>COL1A1</i>	Коллаген тип I альфа 1	1	1,24 (0,57-1,92)	0,45	1
<i>COL1A2</i>	Коллаген тип I альфа 2	1	1,69 (0,61-2,76)	0,192	1
<i>Dkk1</i>	Диккопф 1	1	7,7 (4,69-10,71)	< 0,001	0,011
<i>FGFR1</i>	Рецептор фактора роста фибробластов 1	1	1,16 (1,02-1,31)	0,032	0,858
<i>FGFR2</i>	Рецептор фактора роста фибробластов 1	1	0,89 (0,66-1,12)	0,327	1
<i>HPRT1</i>	Гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза 1	1	0,8 (0,67-0,94)	0,007	0,217
<i>IGF1</i>	Инсулиноподобный фактор роста 1	1	0,33 (0,20-0,47)	< 0,001	< 0,001
<i>IGFBP2</i>	Белок 2, связывающий инсулиноподобный фактор роста	1	0,67 (0,24-1,11)	0,131	1
<i>IL15</i>	Интерлейкин 15	1	0,85 (0,58-1,12)	0,256	1
<i>IL6</i>	Интерлейкин 6	1	0,03 (0,02-0,05)	< 0,001	< 0,001
<i>IL6R</i>	Рецептор интерлейкина 6	1	0,49 (0,36-0,63)	< 0,001	< 0,001
<i>ITGA1</i>	Интегрин альфа 1	1	0,99 (0,69-1,28)	0,922	1
<i>ITGB3</i>	Интегрин бета 3	1	0,82 (0,60-1,04)	0,095	1
<i>LEP</i>	Лептин	1	0,01 (-0,05-0,08)	0,003	0,1
<i>LRP1</i>	Рецептор липопротеида низкой плотности 1	1	0,99 (0,77-1,20)	0,887	1
<i>LRP5</i>	Рецептор липопротеида низкой плотности 5	1	1,24 (0,98-1,49)	0,066	1
<i>LRP6</i>	Рецептор липопротеида низкой плотности 6	1	1,04 (0,81-1,27)	0,705	1
<i>MMP2</i>	Матриксная металлопротеиназа 2	1	1,3 (0,87-1,74)	0,156	1
<i>PCDHA6</i>	Протокатгерин альфа 6	1	0,55 (0,38-0,72)	< 0,001	0,003
<i>RUNX2</i>	Runt-зависимый транскрипционный фактор 2	1	1,01 (0,76-1,25)	0,965	1
<i>SFRP1</i>	Связывающий белок фризельда 1	1	1 (0,38-1,62)	0,998	1
<i>SFRP4</i>	Связывающий белок фризельда 4	1	0,97 (0,68-1,27)	0,851	1
<i>SOST</i>	Склеростин	1	5,18 (1,16-9,20)	0,043	1
<i>SPP1</i>	Остеопонтин	1	1,02 (0,72-1,31)	0,91	1
<i>STAT1</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 1	1	1,2 (1,04-1,35)	0,019	0,564
<i>TGFB1</i>	Трансформирующий фактор роста бета 1	1	0,88 (0,71-1,04)	0,136	1
<i>TIMP2</i>	Ингибитор металлопептидазы TIMP 2	1	1,08 (0,86-1,30)	0,445	1
<i>TNFRSF11A (RANK)</i>	Рецептор ядерного фактора κB	1	1,38 (1,06-1,69)	0,022	0,607
<i>TNFRSF11B (OPG)</i>	Остеопротегерин	1	1,05 (0,51-1,60)	0,831	1
<i>TNFSF11 (RANKL)</i>	Лиганд рецептора ядерного фактора κB	1	0,98 (0,74-1,22)	0,849	1
<i>TWIST1</i>	Транскрипционный фактор 1 семейства twist	1	0,56 (0,41-0,71)	< 0,001	0,001
<i>VEGFA</i>	Сосудистый эндотелиальный фактор роста A	1	0,48 (0,30-0,65)	< 0,001	0,001
<i>WNT10b</i>	Wnt белок 10B	1	10,11 (5,96-14,26)	0,001	0,017
<i>WNT3a</i>	Wnt белок 3A	1	1,18 (0,41-1,96)	0,619	1

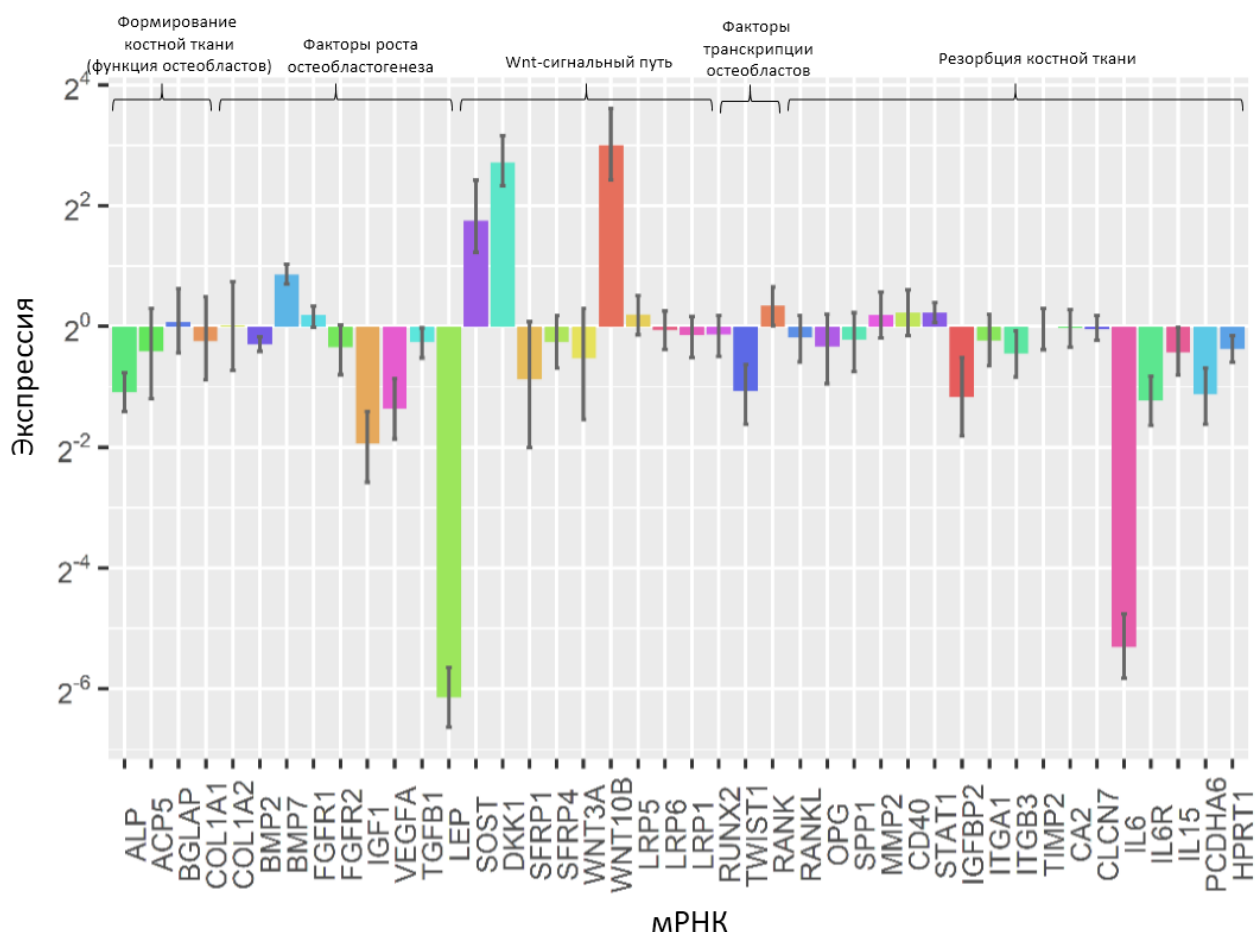


Рисунок 3 - Экспрессия мРНК у пациентов с акромегалией в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

Несмотря на увеличение уровня СТх в сыворотке крови, не выявлено повышения экспрессии мРНК, регулирующих костную резорбцию, что делает нецелесообразным использование данного сывороточного маркера для клинической диагностики нарушений костного обмена при гиперсекреции СТГ.

Таким образом, общее повышение маркеров костного ремоделирования в сыворотке крови у больных с акромегалией не отражает усиление скорости костного обмена в костной ткани, а также отдельного увеличения костеобразования или костного разрушения. По всей видимости, повышение маркеров костного обмена, многократно описанное ранее и выявленное также в нашем исследовании у пациентов с акромегалией, отражает процессы эндохондральной оссификации, описанные в период роста скелета или заживления перелома. Можно прийти к заключению, что при акромегалии происходят процессы аналогичные эндохондральной оссификации, однако без достижения остеобластами функциональной зрелости, т.к. экспрессия гена щелочной фосфатазы (*ALP*) оказалась значимо сниженной, что негативно сказывается на

качестве костной ткани и может обуславливать возникновение низкотравматичных переломов без изменения минеральной плотности костной ткани (МПК).

Нарушения костного ремоделирования может быть реализовано, в том числе через изменение эпигенетической регуляции костного обмена. По аналогии с ранее представленными результатами изменения экспрессии мкРНК при БИК, анализ экспрессии тех же мкРНК был проведен при акромегалии и результаты сведены в Таблице 6.

Таблица 6 - Результаты изменения экспрессии мкРНК у пациентов с акромегалией по сравнению с НАГ

мкРНК	НАГ	Акромегалия, М (95% ДИ)	p	q
мкРНК-21-5p	1	1,8 (1,45-2,15)	< 0,001	0,007
мкРНК-210-5p	1	2,66 (1,85-3,48)	0,001	0,017
мкРНК-135a-5p	1	0,55 (0,36-0,75)	< 0,001	0,007
мкРНК-155-5p	1	1,38 (0,93-1,83)	0,092	0,959
мкРНК-148a-3p	1	1,51 (0,97-2,05)	0,063	0,757
мкРНК-122-5p	1	1,64 (1,18-2,10)	0,01	0,156
мкРНК-125b-5p	1	2,62 (1,75-3,49)	0,001	0,03
мкРНК-9-5p	1	2,23 (1,48-2,98)	0,004	0,07
мкРНК-328-3p	1	2,91 (2,03-3,79)	< 0,001	0,01
мкРНК-211	1	0,53 (0,38-0,68)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-31-5p	1	0,45 (0,25-0,65)	< 0,001	0,001
мкРНК-34a-5p	1	2,52 (1,87-3,16)	< 0,001	0,006
мкРНК-7b-5p	1	0,96 (0,57-1,35)	0,84	1
мкРНК-10b-5p	1	1,64 (1,01-2,27)	0,048	0,621
мкРНК-22-3p	1	1,72 (1,21-2,23)	0,009	0,153
мкРНК-203a-5p	1	2,12 (1,21-3,03)	0,02	0,298
мкРНК-100-5p	1	1,38 (0,91-1,85)	0,104	0,959
мкРНК-133a-5p	1	1,34 (0,71-1,97)	0,265	1
мкРНК-21-3p	1	1,48 (0,92-2,05)	0,087	0,959
мкРНК-550a-5p	1	0,69 (0,40-0,99)	0,043	0,604
мкРНК-550b-2-5p	1	1,03 (0,68-1,38)	0,865	1
мкРНК-199a-5p	1	0,63 (0,45-0,82)	0,001	0,022
мкРНК-320a	1	0,97 (0,72-1,22)	0,805	1
мкРНК-26a-5p	1	1,94 (1,29-2,58)	0,008	0,138
мкРНК-27a-5p	1	0,44 (0,25-0,62)	< 0,001	0,001
мкРНК-96-5p	1	0,86 (0,56-1,16)	0,332	1
мкРНК-188-3p	1	2,95 (2,33-3,56)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-133a-3p	1	0,86 (0,62-1,09)	0,207	1
мкРНК-204-5p	1	0,31 (0,25-0,38)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-218-5p	1	0,75 (0,45-1,04)	0,089	0,959
мкРНК-23a-3p	1	0,62 (0,52-0,73)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-27a-3p	1	1,08 (0,82-1,34)	0,502	1
мкРНК-29a-3p	1	0,34 (0,24-0,44)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-29b-3p	1	0,44 (0,30-0,58)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-29c-3p	1	0,36 (0,27-0,45)	< 0,001	< 0,001

При акромегалии в костной ткани обнаружено подавление экспрессии мкРНК-199a-5p, основным таргетом для которой является ключевой фактор дифференцировки хондобластов – *SMAD1*. Снижение экспрессии этой мкРНК должно способствовать увеличению *SMAD1* и

соответственно способствовать формированию эндохондральной кости через пролиферацию хондроцитов. Изменения экспрессии остальных мкРНК в костной ткани при акромегалии в совокупности способствуют подавлению остеогенеза, а также включает компенсаторные механизмы, что, в целом не способствует полному угнетению костеобразования, хотя экспрессия одного из ключевых факторов транскрипции остеобластогенеза – *TWIST1* подавляется. Полученные результаты наглядно представлены на Рисунке 4.

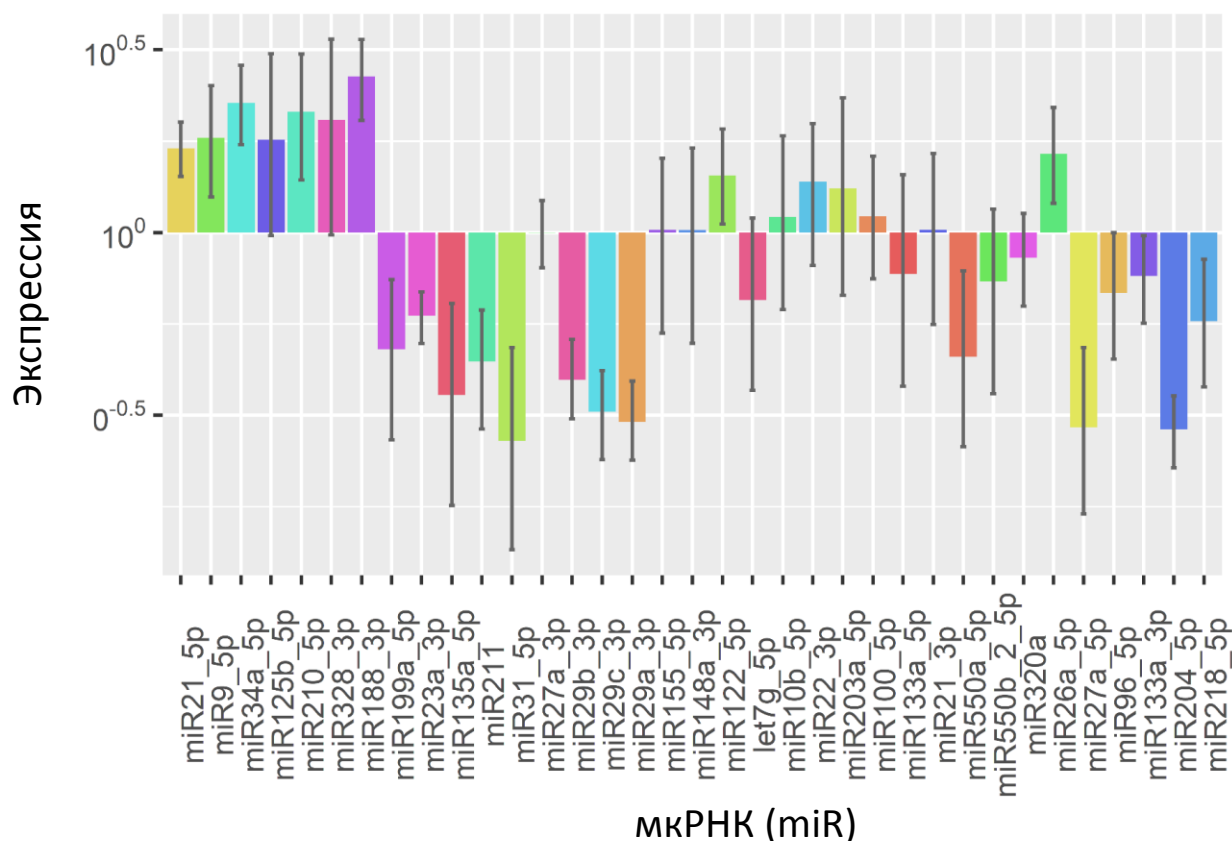


Рисунок 4 - Экспрессия мкРНК у пациентов с акромегалией в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

2. Анализ экспрессии мкРНК в плазме крови у пациентов в активной стадии ЭГ и акромегалии

МкРНК в отличие от мРНК устойчивы к разрушению РНКазами, выделяются в периферическую кровь в комплексе с липопротеинами или в составе микровезикул. По мнению исследователей, циркулирующие в крови человека мкРНК могут осуществлять регуляцию метаболических процессов в других тканях, связываясь с рецепторами, которые ранее считались филогенетически устаревшими.

Выявив изменения экспрессии мкРНК в костной ткани пациентов с БИК и акромегалией, мы исследовали экспрессию этих же мкРНК в периферической крови пациентов по сравнению с группой здорового контроля. Количество пациентов и группы контроля было увеличено для увеличения вероятности выявления различий по уровню мкРНК в периферической крови. Общая характеристика пациентов с БИК, акромегалией и здорового контроля, включенных в анализ экспрессии мкРНК в периферической крови сведена в Таблице 7.

Таблица 7 - Основные характеристики включенных пациентов с БИК, акромегалией и группы здорового контроля для анализа экспрессии мкРНК в периферической крови

Параметры	БИК, М (95% ДИ)	Акромегалия, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	P	P*
Количество пациентов	24	22	18		
Возраст (годы)	35 (29-42)	40 (36-44)	35 (30-39)	0,722	0,205
ИМТ (кг/м ²)	30 (27-33)	28 (25-31)	27 (22-32)	0,064	0,253
Пол (Ж(%): М(%))	20 (83) : 4 (17)	17 (77) : 5 (23)	17 (94) : 1 (6)	0,371	0,135
Кальций общий (ммоль/л)	2,38 (2,32-2,44)	2,33 (2,25-2,42)	2,33 (2,29-2,37)	0,108	0,131
Креатинин (мкмоль/л)	70 (65-75)	63 (58-67)	61 (50-73)	0,17	0,112
Остеокальцин (нг/мл)	8,6 (6,5-10,8)	50 (36-63,9)	16,7 (12,5-20,9)	0,001	<0,001
СТх (нг/мл)	0,31 (0,23-0,39)	1,11 (0,73-1,49)	0,32 (0,24-0,41)	0,884	<0,001
ИРФ-1	212 (154-271)	752 (577-926)	195 (139-251)	0,671	<0,001
L1-L4 Z- критерий	-1,15 (-2,06 - -0,24)	0,49 (-0,17 - 1,16)	-0,08 (-0,7 - 0,55)	0,015	0,189
Femur Neck Z- критерий	-0,76 (-1,52 - -0,01)	0,75 (0,05-1,44)	0,13 (-0,54 - 0,79)	0,077	0,345
Низкотравматич- ные переломы, Количество (%), Тип	9 (38%). В 7 случаях компрессионные переломы тел позвонков, в 7 - внепозвоночные переломы (в 5 перелом ребер и в 2-х лодыжки)	4 (18%). В 3-х случаях компрессионный перелом тел позвонков и в одном внепозвоночный перелом (лучевая кость)	0	0,002	0,06

Примечание: p – вероятность ошибки между группами БИК и здоровыми добровольцами, p - вероятность ошибки между группами акромегалия и здоровыми добровольцами, ИРФ-1 – инсулиноподобный фактор роста 1.*

Изменение мкРНК в плазме крови как при БИК, так и при акромегалии не было сопоставимо с их экспрессией в костной ткани, что свидетельствует о сложности эпигенетической регуляции экспрессии генов и необходимости дальнейших исследований. Полученные результаты для наглядности представлены на Рисунке 5.

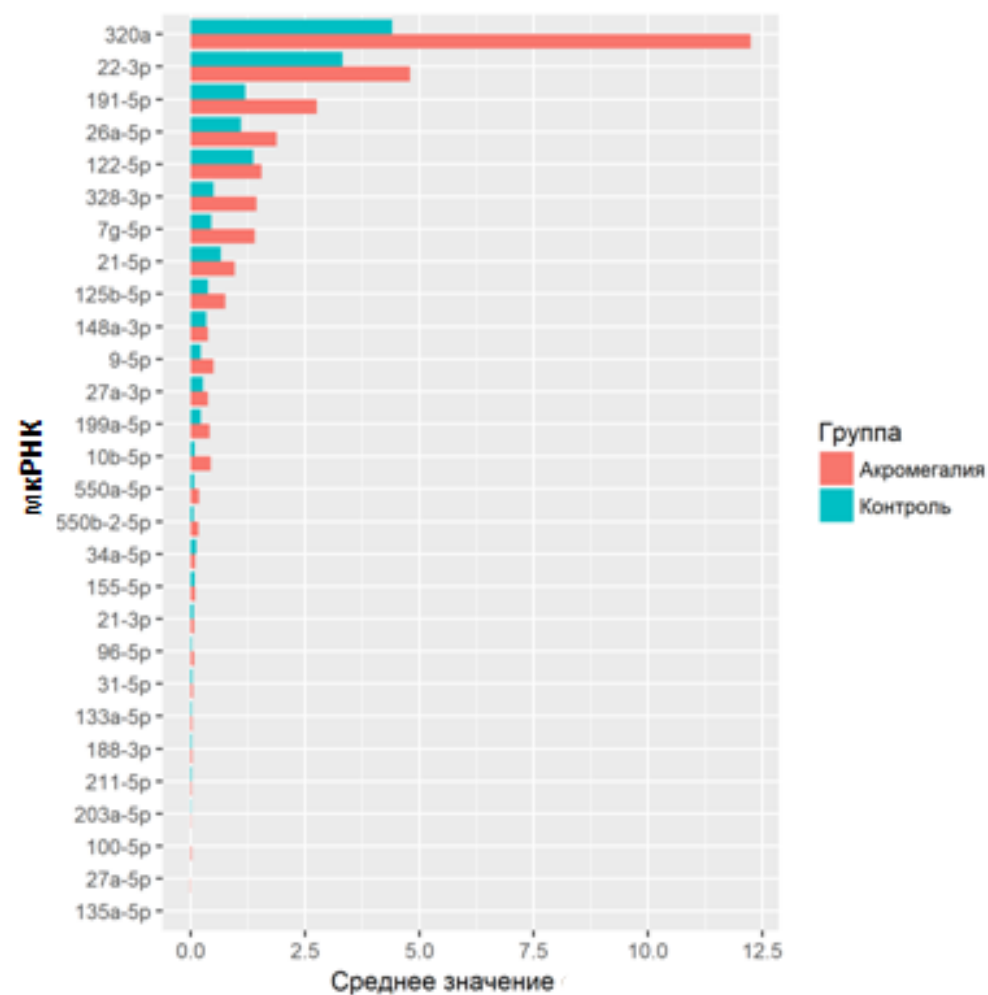
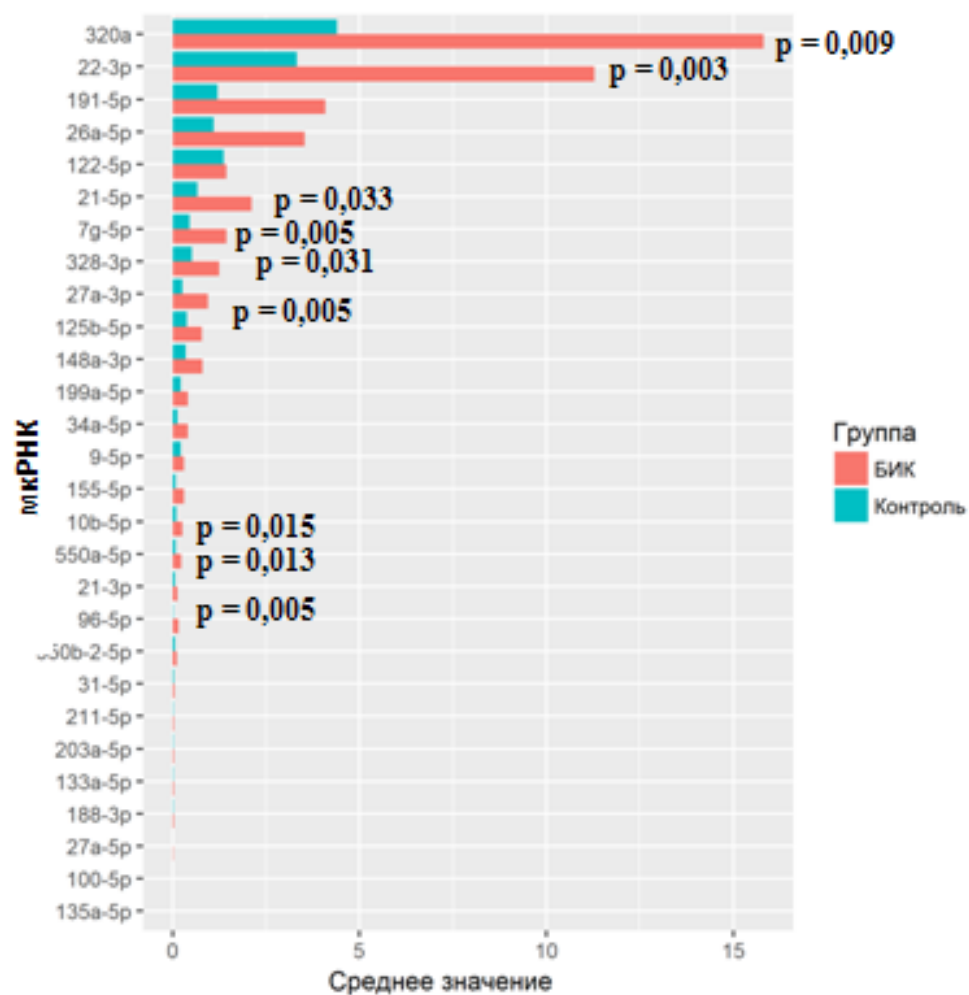


Рисунок 5 - Экспрессия мкРНК в плазме крови у пациентов с БИК и акромегалией по сравнению с группой контроля

3. Состояние внеклеточных агонистов канонического Wnt/ β -катенин-сигнального пути среди пациентов в активной стадии ЭГ

Помимо изменения экспрессии мРНК, в периферической крови человека можно выявить изменения концентрации белков, если мРНК этих белков была изменена в костной ткани и белки потенциально могут попадать в циркуляцию. Мы изучили экспрессию агонистов Wnt-сигнального пути: мРНК *Wnt10b* и *Wnt3a*, и выявили компенсаторное увеличение *Wnt10b*, но не *Wnt3a*. Соответственно оба эти белка были исследованы в периферических образцах крови пациентов с БИК по сравнению с здоровым контролем. Общая характеристика пациентов и контрольной группы, включенных в эту часть исследования представлена в Таблице 8.

Таблица 8 - Основные характеристики пациентов с БИК и группы здорового контроля, включенных в исследование концентрации Wnt-белков в периферической крови*

Параметры	БИК, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	Р
Количество пациентов	42	42	
Возраст (годы)	36 (29-40)	33 (30-36)	0,936
ИМТ (кг/м ²)	29 (27-32)	27 (24-29)	0,094
Пол (Ж(%): М(%))	32 (76) : 10 (24)	37 (88) : 5 (12)	0,254
Кальций общий (ммоль/л)	2,39 (2,34-2,43)	2,34 (2,3-2,39)	0,078
Креатинин (мкмоль/л)	73 (68-77)	64 (57-70)	0,157
Остеокальцин (нг/мл)	10,8 (8,3-13,4)	19,5 (16,5-22,6)	< 0,001
СТх (нг/мл)	0,37 (0,29-0,45)	0,36 (0,29-0,42)	0,147
ИРФ-1	219 (181-257)	197 (161-232)	0,179
L1-L4 Z-критерий	-0,97 (-1,55 - -0,38)	0,22 (-0,22 – 0,66)	< 0,001
Femur Neck Z-критерий	-0,72 (-1,22 - -0,22)	0,19 (-0,22 – 0,61)	0,001
Низкотравматичные переломы. Количество (%). Тип	13 (31%). В 9-ти случаях компрессионный перелом тел позвонков и в 7-ми случаях внепозвоночные переломы (в 4-х случаях переломов ребер, в 2-х – лодыжки, в 1-м – плюсневой кости)	1 (2%). Низкотравматичный перелом лодыжки.	0,001

Изменения концентрации обоих Wnt белков представлены на Рисунке 6.

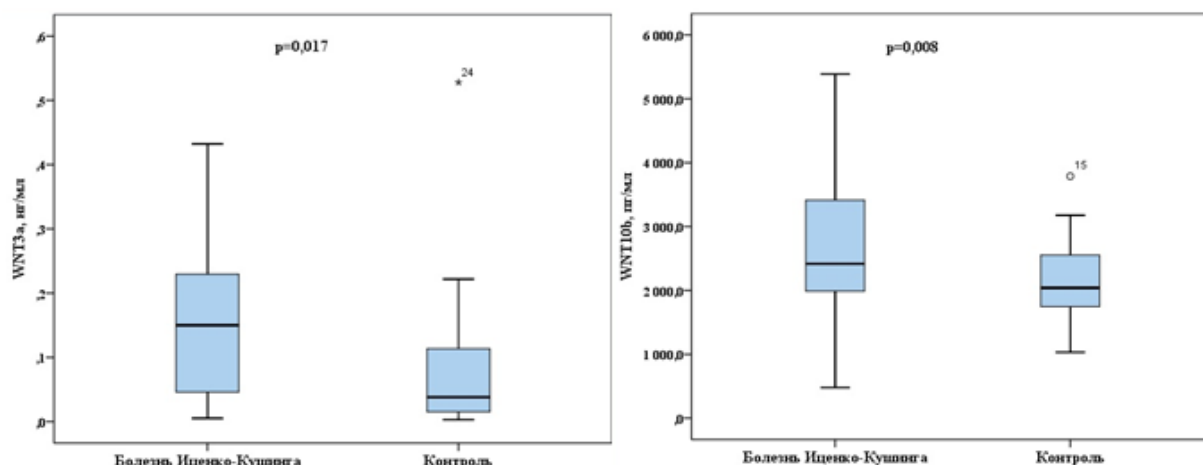


Рисунок 6 - Wnt3a и Wnt10b в периферической крови у пациентов с БИК по сравнению с группой контроля

Выявленное в настоящей работе повышение агонистов Wnt-сигнального пути в сыворотке крови у пациентов с ЭГ не свидетельствует об активации этого сигнального пути, а скорее о дисрегуляции по аналогии с традиционными маркерами костного ремоделирования. Вместе с тем, уровень Wnt3a в сыворотке крови коррелировал с уровнем свободного кортизола в суточной моче ($\rho = 0,367$ $p = 0,007$), Wnt10b – с сывороточным уровнем остеокальцина $\rho = -0,334$ $p = 0,002$.

ВЫВОДЫ

1. В костной ткани пациентов с гиперкортицизмом вследствие БИК подавляется экспрессия генов, отражающих костеобразование (*ACP5*, *ALP*, *BGLAP*, *COL1A1*, *COL1A2*) и остеобластогенез (*RUNX2*, *TWIST1*), что сочетается с дисрегуляцией Wnt-сигнального пути с увеличением экспрессии антагонистов (*SOST* и *Dkk1*) и компенсаторным усилением экспрессии агонистов Wnt-сигнального пути (*Wnt10b*, *LRP5*, *LRP6*), а также подавлением экспрессии *RANKL*.
2. Подавление остеобластогенеза в костной ткани пациентов с БИК, в том числе, реализуется через изменения экспрессии мкРНК (мкРНК34a-5p, мкРНК125b-5p, мкРНК188-3p, мкРНК199a-5p, мкРНК218-5p), регулирующих дифференцировку МСК по направлению адипогенеза и хондрогенеза вместо остеобластогенеза.
3. При акромегалии не увеличивается экспрессия генов, отвечающих за образование и резорбцию костной ткани, однако снижается экспрессия мРНК костноспецифической щелочной фосфатазы. Снижение экспрессии *TWIST1* в совокупности с изменением уровня мкРНК (мкРНК199a-5p, мкРНК27a-5p и мкРНК188-3p) свидетельствуют о преобладающей дифференцировке МСК по линии хондрогенеза и адипогенеза.

4. Как при ЭГ, так и при акромегалии не выявлено корреляции между уровнями мкРНК в костной ткани и в периферической крови, что свидетельствует о сложности эпигенетической регуляции экспрессии генов. Тем не менее, при указанных патологиях выявлено повышение экспрессии мкРНК-320а в плазме, что обуславливает целесообразность ее дальнейшего изучения в качестве потенциального диагностического маркера остеопороза.
5. Сывороточные уровни Wnt10b, а также Wnt3a при гиперкортицизме отражают интенсивность дисрегуляции Wnt-сигнального пути, в связи с чем, их можно рассматривать в качестве новых биомаркеров нарушения костного ремоделирования.
6. Для коррекции костных осложнений при ЭГ *SOST*, *Dkk1*, мкРНК34а-5р, мкРНК125b-5р, мкРНК188-3р, мкРНК218-5р, а при акромегалии *Dkk1*, мкРНК34а-5р, мкРНК125b-5р, мкРНК188-3р, мкРНК218-5р могут быть использованы для дальнейшего изучения в качестве таргетных молекул.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Ввиду выявленного подавления экспрессии *RANK* и *RANKL* в костной ткани при БИК, не рекомендуется использовать таргетную терапию, направленную на блокирование *RANKL* (деносумаб) для терапии глюкокортикоидного остеопороза в активную фазу ЭГ.
2. Антагонисты Wnt-сигнального пути (склеростин и диккопф1) являются наиболее оптимальными мишенями для терапевтического воздействия, направленного на усиление костеобразования у пациентов с БИК.
3. Уровни маркеров костного ремоделирования при акромегалии не позволяют оценить дисрегуляцию костного обмена, поэтому их исследование в рутинной клинической практике нецелесообразно, а назначение антирезорбтивной терапии у пациентов с низкотравматичными переломами вследствие акромегалии требует дальнейших исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БИК - болезнь Иценко-Кушинга

ДИ - доверительный интервал

ИМТ - индекс массы тела

ИРФ-1 - инсулиноподобный фактор роста 1

мкРНК – микроРНК (miR)

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

МПК – минеральная плотность кости
 МСК - мезенхимальная стволовая клетка
 НАГ - неактивная аденома гипофиза
 ПЦР - полимеразная цепная реакция
 РНК - рибонуклеиновая кислота
 СТГ - соматотропный гормон
 ЭГ - эндогенный гиперкортицизм
 СТх – С-концевой телопептид коллагена I типа
 OPG - остеопротегерин
 RANK - рецептор ядерного фактора каппа бета
 RANKL - лиганд рецептора активатор ядерного фактора каппа бета
 Wnt-сигнальный путь - канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. **Гребенникова Т.А.**, Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Дедов И.И. Эпигенетические аспекты остеопороза // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. - №3. – С. 28-36.
2. **Гребенникова Т.А.**, Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. Канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь: от истории открытия до путей клинического применения // Терапевтический архив. - 2016. – Т. 88. - №10. – С. 74-81.
3. **Гребенникова Т.А.**, Белая Ж.Е., Никитин А.Г., Бровкина О.И., Солодовников А.Г., Дзеранова Л.К., Мельниченко Г.А. Экспрессия микроРНК, регулирующих костное ремоделирование, в плазме крови у пациентов с акромегалией // Ожирение и метаболизм. – 2017. – Т. 14. - №3. – С. 32-37.
4. Бровкина О.И., **Гребенникова Т.А.**, Белая Ж.Е., Ходырев Д.С., Григорьев А.Ю., Хандаева П.М., Кошкин Ф.А., Мельниченко Г.А., Никитин А.Г. Экспрессия генов, регулирующих остеогенез, в костной ткани пациентов с акромегалией и эндогенным гиперкортицизмом// Генетика. – 2017. – Т. 53. – №8. – С. 981-987.
5. Belaya ZE, **Grebennikova TA**, Melnichenko GA, Nikitin AG, Solodovnikov AG, Brovkina OI, Grigoriev AU, Rozhinskaya LY, Dedov II. Effects of endogenous hypercortisolism on bone mRNA and microRNA expression in humans // Osteoporos International. – 2018. – Vol.29. - №1. – P. 211-221. doi: 10.1007/s00198-017-4241-7.
6. **Гребенникова Т.А.**, Белая Ж.Е., Мельниченко Г.А., Бровкина О.И., Никитин А.Г., Астафьева Л.И., Григорьев А.Ю., Дедов И.И. Эпигенетические аспекты нарушения

костного ремоделирования при эндогенном гиперкортицизме // Сборник тезисов III Всероссийского эндокринологического конгресса с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии». – 2017.

7. **Grebennikova TA**, Belaya ZE, Melnichenko GA, Brovkina OI, Nikitin AG, Astaf'eva LI, Grigor'ev AYU, Dedov II. Effects of endogenous hypercortisolism on bone tissue mRNA levels relevant to bone metabolism // *Osteoporosis International*. – 2017. – Vol. 8 – p. 416.
8. **Grebennikova T.**, Belaya Zh., Melnichenko G., Brovkina O., Nikitin A., Astaf'eva L., Grigoriev A., Dedov I. Effects of acromegaly on bone tissue mRNA levels relevant to bone metabolism // *Endocrine Abstracts*. - 2017. – Vol.49. - EP.220.
9. **Grebennikova T.**, Belaya Zh., Melnichenko G., Nikitin A., Dedov I. Epigenetic aspects of bone metabolism regulation in patients with endogenous hypercortisolism // *Problemy Endocrinologii*. – 2017. – Vol. 63. - №1S. - C. 37.
10. Belaya Zh., **Grebennikova T.**, Nikitin A., Brovkina O., Solodovnikov A., Rozhinskaya L., Melnichenko G. Effects of Endogenous Hypercortisolism on bone specific microRNA in bone tissue samples of patients with Cushing's disease // *J Bone Miner Res*. – 2017. - Vol. 32. – Suppl. 1. Доступно 26.01.2018: <http://www.asbmr.org/education/AbstractDetail?aid=e5918830-ba04-4717-bef4-3705ad4ade50>