

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭНДОКРИНОЛОГИИ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ГРЕБЕННИКОВА Татьяна Алексеевна

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ КОСТНОГО
РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ПРИ ГИПЕРКОРТИЦИЗМЕ И АКРОМЕГАЛИИ**

14.01.02 – Эндокринология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Белая Жанна Евгеньевна

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Основы регуляции костного ремоделирования.....	9
1.2 Эпигенетические механизмы контроля экспрессии генов.....	12
1.3 Канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь в регуляции остеобластогенеза	19
1.4 Патогенез глюкокортикоидного остеопороза.....	26
1.5 Патогенез остеопороза вследствие акромегалии	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	31
2.1. Пациенты, включенные в исследование.....	31
2.2 Дизайн исследования	32
2.3. Методика забора биологического материала и проведения фармакологических проб.....	35
2.4 Генетические методы исследования	36
2.5 Лабораторные методы исследования.....	38
2.6 Инструментальные методы исследования.....	38
2.7 Статистическая обработка данных.....	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	41
3.1 Анализ экспрессии матричных РНК и микроРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии эндогенного гиперкортицизма	41
3.2 Анализ экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов в активной стадии эндогенного гиперкортицизма	58
3.3 Состояние внеклеточных агонистов канонического Wnt/ β -катенин- сигнального пути среди пациентов в активной стадии эндогенного гиперкортицизма	65
3.4 Анализ экспрессии матричных РНК и микроРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии акромегалии.....	71
3.5 Анализ экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов в активной стадии акромегалии	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	102

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104
ПРИЛОЖЕНИЯ	134
Приложение А. Информация об использованных реактивах для измерения экспрессии матричных РНК и микроРНК	134

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. 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) [2]. 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

(ГКО) 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 мкРНК 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 диккофа 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).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе 4 в отечественных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК, и 1 в зарубежном журнале *Osteoporosis International*, представленном в Scopus и индексируемом в PubMed.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Основы регуляции костного ремоделирования

Для поддержания прочности скелета в костной ткани непрерывно протекают процессы ремоделирования, которые основаны на взаимодействии костеобразующих (остеобластов) и разрушающих (остеокластов) костную ткань клеток. Osteoblastы образуются из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга и осуществляют синтез органической составляющей костного матрикса. Osteocytes (конечная стадия дифференцировки остеобластов) остаются в костном матриксе и в последующем играют важную роль в регуляции костного ремоделирования [3; 4]. Osteoclastы представляют собой крупные многоядерные гигантские клетки, образованные в результате слияния моноядерных предшественников моноцитов/макрофагов в процессе остеокластогенеза. Нарушение баланса между резорбцией кости и ее образованием может привести к прогрессивной потере минеральной плотности кости (МПК), нарушению ее внутренней микроархитектоники, развитию остеопороза и низкотравматичных переломов.

Процесс ремоделирования кости контролируется различными местными и системными факторами. Паратгормон (ПТГ), витамин D и половые гормоны являются основными эндокринными регуляторами резорбции костной ткани, контролируя физиологический уровень кальция в крови. Однако, изменение уровней практически всех гормонов, в том числе, СТГ и глюкокортикоидов также влияет на костный метаболизм, приводя к развитию вторичного остеопороза. В дополнение к системной гормональной регуляции становится все более очевидным, что факторы роста, такие как инсулиноподобный фактор роста 1 (ИРФ-1), трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β), факторы роста фибробластов, эпидермальные факторы роста (EGF), винглесс-белки (Wnt) и костные морфогенетические белки (BMP) осуществляют паракринную регуляцию физиологического ремоделирования кости. Перечисленные биологические

молекулы участвуют в регуляции костного обмена посредством влияния на основные сигнальные пути остеокласто- и остеобластогенеза, к которым относятся система RANK/RANKL/OPG и Wnt-сигнальный путь (Рисунок 1) [5].

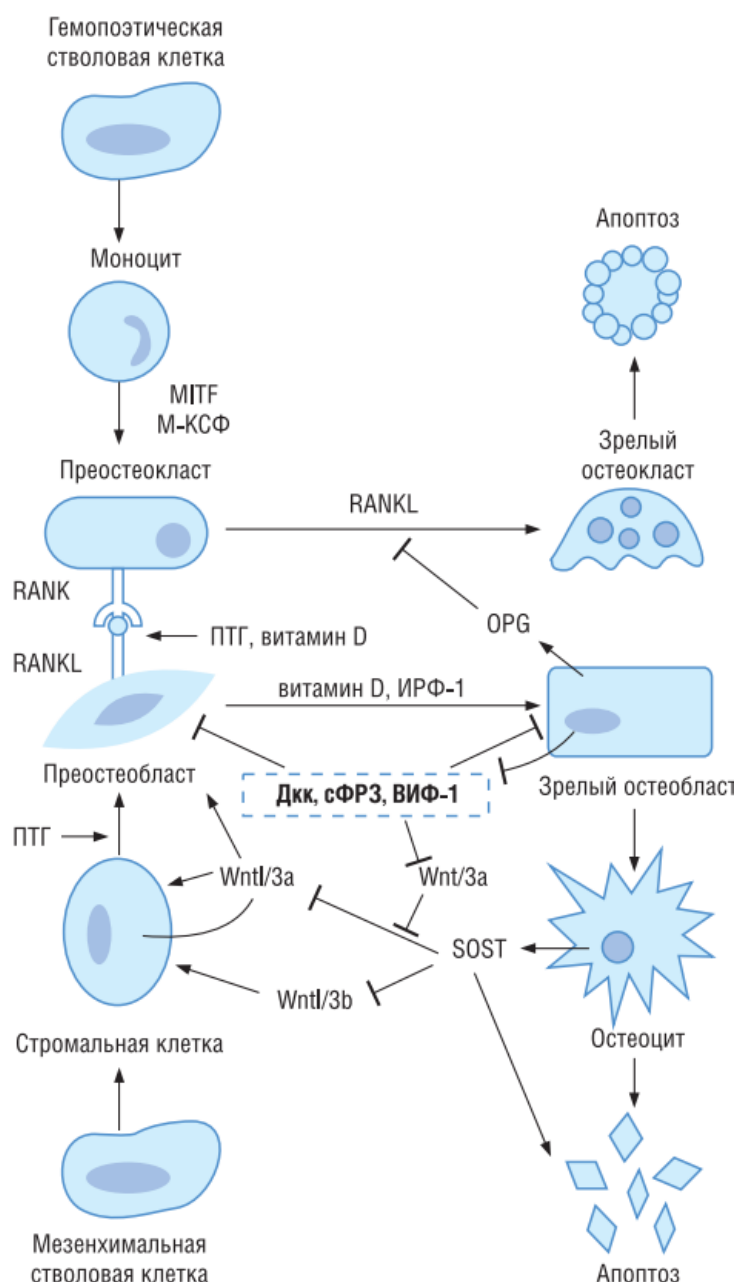


Рисунок 1 - Регуляция остеобласто- и остеокластогенеза

На рисунке показаны стадии дифференциации остеобластов и остеокластов, начиная с мезенхимальной и гемопоэтической стволовых клеток, соответственно. Регуляция остеокластогенеза осуществляется через сигнальную систему рецептора ядерного фактора κB (RANK)/лиганда рецептора ядерного фактора κB (RANKL)/остеопротегерина (OPG). Регуляция

остеобластогенеза происходит за счет Wnt-сигнального пути. MITF — ассоциированный с микрофальмией фактор транскрипции, М-КСФ - макрофагальный колониестимулирующий фактор, Дкк — Диккопф, сФРЗ - секреторный белок, связывающий фризельд, ВИФ-1 - Wnt-ингибирующий фактор 1, SOST - склеростин, Wnt 1/3a, 3a, 10b - винглес-белки, ПТГ — паратгормон, ИРФ-1 — инсулиноподобный фактор роста 1.

Система RANK/RANKL/OPG представляет собой механизм регуляции костной резорбции. Именно остециты и остеобласты на различных стадиях дифференцировки экспрессируют RANKL, влияя на остеокластогенез. Связывание RANK с RANKL на поверхности остеокласта способствует активации факторов транскрипции (NF- κ B и NFATC1) и последовательной дифференцировке клетки-предшественника остеокласта в зрелый остеокласт. По мере созревания остеобласты начинают экспрессировать OPG, который, за счет конкурентного связывания с RANKL, останавливает остеокластогенез [6].

Ключевую роль в регуляции остеобластогенеза играет Wnt-сигнальный путь, чье действие основано на стабилизации β -катенина посредством ингибирования GSK-3- β -опосредованного фосфорилирования. После перехода β -катенина в ядро клетки активируются факторы транскрипции TCF/LEF, что способствует дифференцировке МСК по линии остеобластогенеза с последующим увеличением интенсивности костеобразования. Кроме того, активация Wnt-сигнального пути приводит к изменению соотношения RANK/RANKL/OPG в пользу OPG и снижению остеокластогенеза [7].

Перечисленные выше сигнальные пути участвуют в костном ремоделировании, воздействуя на экспрессию генов-мишеней непосредственно в костной ткани. Однако изучаются и другие механизмы влияния на экспрессию генов, которые вносят свой вклад в поддержание костного гомеостаза.

1.2 Эпигенетические механизмы контроля экспрессии генов

Эпигенетика – это направление в генетике, предметом изучения которого является изменение экспрессии генов и/или их функции без модификации структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в ответ на внешние и внутренние воздействия, включающие в себя питание, стресс, нарушение гормонального статуса, старение [8]. К эпигенетическим механизмам контроля экспрессии генов относят метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и изменение экспрессии мкРНК, опосредующее транскрипционное регулирование. Данные пути регуляции изучаются современной наукой в аспекте влияния на костный метаболизм.

Метилирование ДНК

Метилирование ДНК представляет собой один из ключевых механизмов клеточной дифференцировки, сущность которого заключается в образовании модифицированной молекулы ДНК без изменения нуклеотидной последовательности. Данный процесс не нарушает способность нити ДНК к комплементарному взаимодействию и приводит к стабилизации двойной спирали. Метилирование ДНК осуществляется за счет присоединения метильной группы к цитозину в 5'-углеродном положении с образованием 5-метил-цитозина. Около 70% генов содержат CpG-островки (участки ДНК с высоким содержанием цитозин–гуанин динуклеотидов), вследствие чего подвержены контролю посредством метилирования ДНК.

В целом, выделяют два вида метилирования: *de novo*, когда возникают новые элементы метилирования, и поддерживающий процесс, обеспечивающий сохранение ранее сформированного профиля [9]. В метилировании ДНК задействованы следующие ферменты ДНК-метилтрансфераз (DNMT): DNMT1, DNMT3a и DNMT3b. DNMT1 в основном участвует в поддерживающем метилировании, т.е. способствует копированию метилированной нити ДНК во время репликации. DNMT3a и DNMT3b ответственны за возникновение новых метилированных CpG в соматических и эмбриональных клетках, и, вместе с тем,

могут участвовать в поддерживающем метилировании ДНК. Процесс метилирования ДНК является обратимым за счет возможности деметилирования цитозина, которое может происходить как активно, так и пассивно за счет ингибирования поддерживающего метилирования ДНК во время репликации [10; 11].

Известно, что метилирование ДНК участвует в регуляции экспрессии генов, ответственных за костный метаболизм: *SOST* (склеростин) [12], *SPP1* (остеопонтин) [13], *OPG* [12], *RANKL* [12; 14; 15] и др. [1]. Регуляция остеокластогенеза посредством поддерживающего метилирования ДНК осуществляется, в основном, за счет влияния на экспрессию гена *RANKL*, подавляя его транскрипционную активность, в независимости от процессов остеобластогенеза.

Посттрансляционные модификации гистонов

Гистоны представляют собой класс ядерных белков, которые стабилизируют, упорядочивают, конденсируют ДНК в ограниченных пределах ядра клетки и накручивают нить ДНК вокруг внешней поверхности, формируя нуклеосому. В состав нуклеосомы входит 4 типа гистонов: H2A, H2B, H3, H4, а гистон H1/H5 фиксирует нить ДНК с внешней стороны. Гистоны содержат положительно заряженные аминокислоты (лизин и аргинин), которые формируют концевые фрагменты гистона, участвующие (главным образом, N-терминальный участок) в контроле экспрессии генов. Гистоны поддерживают структуру хроматина, регулируя транскрипцию за счет модификаций: фосфорилирования, метилирования, ацетилирования и деацетилирования. Согласно исследованиям именно ацетилирование гистонов является наиболее важным в контроле процессов костного ремоделирования.

В исследованиях *in vitro* было показано, что ингибирование трансфераз, отвечающих за деацетилирование гистонов (HDAC), усиливает остеобластогенез и повышает экспрессию генов, регулирующих дифференцировку остеобластов (*RUNX2* и др.). При этом изменения в экспрессии генов затрагивают и компоненты Wnt-сигнального пути — *SFRP1* (белок связывающий фризельд 1) и

SFRP4. Также следует отметить, что экспрессия *RANKL* повышается при ацетилировании гистонов H3 и H4 в промоторе *RANKL* [16; 17].

HDAC1, HDAC3-5 влияют на дифференцировку остеобластов. В исследованиях на мышинной модели блокирование HDAC1 способствовало стимуляции остеобластогенеза [18]. Сиртуин 1 (sirtuin 1, SIRT1) является наиболее изученным из группы HDAC. SIRT1 посредством деацетилирования гистонов в промоторе *SOST* ингибирует его экспрессию и предотвращает негативное влияние проведение Wnt сигнала, играя важную роль в формировании костной ткани [19].

Ацетилирования гистонов затрагивает также регуляцию остеокластогенеза. Так, снижение экспрессии HDAC1-3 подавляет дифференцировку остеокластов *in vitro*. HDAC5 и HDAC6 деацетилируют NFATC1, тормозя остеокластогенез. Напротив, супрессия HDAC7 стимулирует остеокластогенез за счет деацетилирования [20-22].

МкРНК и их роль в костном ремоделировании и развитии остеопороза

Среди некодирующих молекул РНК наиболее широко изученными являются мкРНК, которые состоят из 20–24 нуклеотидов. МкРНК негативно регулируют экспрессию генов посредством 3-х основных механизмов:

1. За счет связывания с комплементарными последовательностями в 3'-нетранслируемом участке мРНК, вызывая деградацию с помощью РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RNA-induced silencing complex - RISC). RISC включает в себя мкРНК, связанную с транскриптом мРНК, и различные белки расщепления, в частности белков семейства Argonaute [23].
2. Связывание и дестабилизация мРНК без деградации.
3. Угнетение трансляции белка [23].

Образование мкРНК начинается в ядре, в котором при участии рибонуклеазы типа III (Drosha) образуется предварительная мкРНК (пре-мкРНК). После этого пре-мкРНК экспортируется из ядра в цитоплазму, где обрабатывается

рибонуклеазой типа II (Dicer), превращаясь в двухцепочечную мкРНК, которая далее преобразуется в зрелую мкРНК с помощью RISC [1].

МкРНК участвуют в формировании скелета, начиная с эмбрионального периода, регулируя рост, дифференцировку и функциональную активность клеток, составляющих костную ткань. Согласно современным представлениям, именно мкРНК играют ключевую роль в регуляции костного ремоделирования среди других типов эпигенетического контроля экспрессии генов. В исследованиях доказана тканеспецифичность мкРНК [24-26], при этом некоторые мкРНК уже используются в качестве маркеров некоторых заболеваний [27-29], например, лейкемии [10] или глиом [30]. Однако следует учитывать, что мкРНК может регулировать экспрессию нескольких генов одновременно, в то время как мРНК может иметь несколько участков для связывания различных мкРНК, что требует более детального изучения.

Роль мкРНК в костном ремоделировании

Наиболее изучено влияние мкРНК на остеобластогенез посредством воздействия на экспрессию *RUNX2* (фактора транскрипции 2, содержащего домен Runt) - основного транскрипционного фактора, регулирующего дифференцировку остеобластов. Таргетом *RUNX2* является *OSE2*, который располагается в промоторной зоне генов, отвечающих за костный обмен, например, таких как, *COL1A1* (кодирует белок альфа-1 цепи коллагена I типа), *SPP1*, *ALP* (ген щелочной фосфатазы) и другие [31; 32]. К группе мкРНК, подавляющих экспрессию *RUNX2*, относятся: мкРНК-23а [33], мкРНК-30а [34], мкРНК-135а [35], мкРНК-204 [36], мкРНК-335 [37], мкРНК-433 [38], мкРНК-34с, мкРНК-133а, мкРНК-137, мкРНК-205, мкРНК-211, мкРНК-217, мкРНК-218 и мкРНК-338 [39]. Вместе с тем, мкРНК-2861 и мкРНК-3960, наоборот, стимулируют экспрессию *RUNX2*, посредством подавления его ингибиторов HDAC5 и NOXA2 [40, 41]. Более того, показано, что остерикс (OSX) – другой транскрипционный фактор, необходимый для формирования и минерализации костной ткани, образует, уникальную ауторегуляторную петлю обратной связи с мкРНК-93 [42].

Некоторые мкРНК контролируют передачу Wnt сигнала через подавление экспрессии его компонентов. Например, мкРНК-29а, мкРНК-218 и мкРНК-335-5р снижают экспрессию антагонистов Wnt-сигнального пути (диккофа 1 (Дкк1), Дкк2; секреторного белка, связывающего фризельд 2 (сФР32) и склеростина [43-45]. Активации Wnt-сигнального пути также способствуют мкРНК-27 и мкРНК-142-3р [46; 47].

В исследованиях на мышинной модели было показано, что снижение активности мкРНК в пре-остеокластах и зрелых остеокластах приводит к повышению костной плотности за счет подавления остеокластогенеза [48; 49]. Кроме того, при подавлении ферментного комплекса Drosha или RISC, участвующих в биосинтезе мкРНК, также отмечалось угнетение остеокластогенеза [49]. В другой работе доказана негативная роль мкРНК-155 на образование клеток-предшественников остеокластов из гемопоэтических клеток за счет подавления транскрипционного фактора MITF (ассоциированного с микрофталмией фактора транскрипции) [50]. Вместе с тем, несколько мкРНК обладают стимулирующим эффектом на остеокластогенез: мкРНК-127, мкРНК-136, мкРНК-133а, мкРНК-148а [51; 52]. Например, мкРНК-21 блокирует ингибитор макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ), вследствие чего повышается интенсивность экспрессии рецептора М-КСФ, необходимого для дифференцировки остеокластов [49]. Таким образом, мкРНК оказывают влияние и на дифференцировку остеокластов, однако их участие в остеокластогенезе менее изучено по сравнению с остеобластогенезом.

мкРНК, ассоциированные с развитием остеопороза

Остеопороз возникает вследствие дисрегуляции процессов образования и разрушения костной ткани. Результаты исследований показали вовлеченность мкРНК в контроль дифференцировки и функции клеток костной ткани, а также определения дифференцировки МСК по направлению к определенной клеточной линии. Понимание путей регуляции мкРНК и идентификация мкРНК, участвующих в костном обмене, имеет стратегическое значение для развития диагностики и терапевтических возможностей метаболических заболеваний

скелета. Однако в настоящее время, имеется недостаточное количество информации о влиянии мкРНК на патогенез остеопороза.

Li и соавторы описали мутацию в пре-мкРНК2861, которая блокировала экспрессию мкРНК-2861 и способствовала развитию первичного остеопороза у двух родственников подросткового возраста [40]. Однако данная мутация является чрезвычайно редкой и маловероятно ассоциирована с развитием постменопаузального остеопороза. В другом исследовании полиморфизм гена *FGF2* в месте расположения целевых последовательностей для мкРНК-146a и мкРНК-146b был связан с низкой МПК шейки бедренной кости [53].

В экспериментальной работе на модели грызунов после овариэктомии в образцах костной ткани обнаружено повышение экспрессии мкРНК-127, мкРНК-133a, мкРНК-133b, мкРНК-136, мкРНК-206, мкРНК-378a и снижение уровня мкРНК-204, в то время как в МСК выявлено усиление мкРНК-705, мкРНК-3077-5p и уменьшение экспрессии мкРНК-21 [54; 55].

В другой работе установили корреляцию между повышением экспрессии мкРНК-214 и снижением остеобластогенеза. Подавление активности остеобластов в данном случае связали с негативным влиянием мкРНК-214 на активатор фактора транскрипции 4. В эксперименте на мышинной модели при блокировании мкРНК-214 отмечалось усиление костеобразования и повышение МПК [56].

Изучение мкРНК в плазме и/или сыворотке крови является перспективным направлением для поиска новых биомаркеров нарушения костного обмена в виду хорошего кровоснабжения костной ткани [57]. Этому способствует и устойчивость мкРНК к разрушению РНКазами в периферической крови [58]. Так, при сравнении профиля экспрессии мкРНК у женщин в постменопаузе с низкой и высокой МПК было выявлено значимое повышение экспрессии мкРНК-133a и снижение уровня мкРНК-503 у пациенток с остеопорозом [51]. В экспериментах на мышинной модели и *in vivo* блокирование мкРНК-503 приводило к повышению экспрессии *RANK*, форсируя остеокластогенез и резорбцию костной ткани. Также было показано, что мкРНК-148a и мкРНК-133a стимулировали дифференцировку остеокластов, способствуя развитию остеопороза [51; 52]. В другой работе

экспрессия 4-х мкРНК из 153 была увеличена у пациентов с сахарным диабетом (СД) и остеопорозом по сравнению с пациентами без остеопороза вне зависимости от наличия СД. Среди мкРНК с измененным уровнем экспрессии мкРНК-155-5p и мкРНК-96-5p являются негативными маркерами функции остеоцитов, мкРНК-188-3p способствует дифференцировке МСК в адипоцит вместо остеобласта, а функция мкРНК-203a продолжает изучаться. Кумулятивный анализ перечисленных 4-х мкРНК показал их высокую диагностическую ценность с площадью под кривой операционных характеристик AUC 0.978 для выявления пациентов с СД и остеопорозом [59].

В недавних исследованиях под руководством Seeliger [60] и Garmilla-Ezquerri [61] был проведен анализ экспрессии мкРНК в образцах костной ткани при остеопоротических переломах по сравнению с травматическими. Seeliger и соавторы выявили изменение экспрессии 6 мкРНК в образцах костной ткани у пациентов с остеопоротическими переломами: мкРНК-21, мкРНК-23a, мкРНК-24, мкРНК-25, мкРНК-100 и мкРНК-125b, при этом уровень 5-ти из них (все, кроме мкРНК-25) был повышен и в циркулирующей крови [60]. В то же время Garmilla-Ezquerri и соавторы обнаружили изменение экспрессии мкРНК-187 и мкРНК-518f. [61] Примечательно, что в обоих исследованиях выявлены различные мкРНК, вовлеченные в патогенез остеопороза. Одним из препятствий при изучении патофизиологии мкРНК является выраженное колебание их экспрессии, на которое влияет этап клеточного цикла (дифференциация, пролиферация), а также различные внешние факторы (гормоны, цитокины и другие сигнальные молекулы). Кроме того, антропометрические параметры, такие как возраст, пол и индекс массы тела (ИМТ) также могут влиять на экспрессию мкРНК.

С точки зрения поиска новых таргетов для лекарственной терапии остеопороза, особое внимание привлекают мкРНК, которые непосредственно воздействуют на предшественников остеобластов (например, мкРНК-218, регулирующая передачу Wnt сигнала) и остеокластов (например, мкРНК-148a). Вместе с тем, для использования мкРНК в медикаментозной терапии необходимо понимание точного механизма действия определенной мкРНК на костный обмен.

В экспериментах на мышинной модели внутривенное введение мкРНК-133а, мкРНК-141, мкРНК-190 и мкРНК-219 подавляло остеокластогенез [62]. Для преодоления плеiotропного влияния мкРНК на процессы регуляции экспрессии генов возможно создание высокоспецифичных систем доставки препарата. Для увеличения эффективности трансфекции мкРНК проводили исследования по использованию микропористой поверхности оксида титана с мкРНК-29b/анти-мкРНК-138 или мкРНК-148b/анти-мкРНК-148b с высокой остеогенной активностью [63; 64]. Также предпринимались попытки доставки мкРНК с использованием серебряных наночастиц, содержащих мкРНК-148b [65]. Тем не менее, перспективы этих методов пока неясны.

1.3 Канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь в регуляции остеобластогенеза

Wnt-сигнальный путь – это филогенетически древний сигнальный путь, который развился еще у первых анаэробных многоклеточных организмов. Биологическая роль передачи Wnt сигнала заключается в регуляции физиологического эмбрионального и постнатального развития, поддержании клеточного гомеостаза в течение всей жизни организма и регенерации тканей в зрелом возрасте [66-68]. Нарушения в регуляции Wnt-сигнального пути могут привести к развитию онкологических заболеваний: раку толстой кишки [69], меланоме [70], карциноме [71] и др. [72].

Известно, что посредством Wnt-сигнального пути осуществляется процесс закладки скелета в эмбриогенезе. Поэтому при наличии мутаций в генах, отвечающих за синтез компонентов Wnt-сигнального пути, развиваются тяжелые заболевания скелета (Таблица 1).

Таблица 1 - Генетические заболевания скелета, вызванные нарушением канонического Wnt-сигнального пути

Ген	Заболевание	Роль в WNT-сигнальном пути	Костный фенотип	Литература
<i>LRP5</i>	Синдром «остеопороз-псевдоглиома»	Корецептор	Снижение МПК	[73]
<i>LRP5</i>	Ювенильный остеопороз	Корецептор	Снижение МПК	[73; 74]
<i>LRP5</i>	Феномен повышенной минеральной плотности	Корецептор	Увеличение МПК	[75; 76]
<i>LRP6</i>	Остеопороз	Корецептор	Снижение МПК	[77]
<i>SOST</i>	Склеростоз, болезнь Ван Бучема	Нарушения ингибитор бета-катенин сигнального пути	Увеличение МПК, костные разрастания	[78; 79]
<i>AXIN2</i>	Агенез зубов	Подавляет сигнализацию бета-катенина	Отсутствие постоянных зубов	[69]
<i>WNT3</i>	Тетра-амелия	Активирует бета-катениновый сигнальный путь	Отсутствие верхних и нижних конечностей	[80]

Примечания: *LRP5/LRP6* - рецепторы липопротеидов низкой плотности 5,6, *SOST* – склеростин, *AXIN2* – белок, ингибирующий Wnt-сигнальный путь, *WNT3* - Wnt белок 3.

Согласно современным представлениям, в патогенезе остеопороза немаловажную роль играет наследственная предрасположенность к изменению костного обмена, однако полный профиль генов, регулирующих изменение МПК, не известен. Тем не менее, согласно проведенным исследованиям полиморфизм генов *LRP5*, *LRP6*, *GPR177*, *SFRP1*, *SOST* и *RSPO3*, отвечающих за экспрессию компонентов Wnt-сигнального пути, коррелирует с изменениями МПК [81].

Компоненты Wnt-сигнального пути

Wnt-сигнальный путь является ключевым механизмом регуляции костеобразования за счет влияния на дифференцировку МСК, стимуляции репликации преosteобластов, индукции остеобластогенеза и подавления апоптоза остеобластов и остеоцитов [82; 83]. Передача Wnt сигнала регулируется биологическими агонистами и антагонистами.

К агонистам (лигандам) Wnt-сигнального пути относятся 19 Wnt белков, которые представляют собой богатые цистеином гликопротеины, обладающие некоторыми характеристиками секретируемых факторов роста [84]. На биологическую активность Wnt белков влияют посттрансляционные липидные модификации, обуславливающие гидрофильность молекул [85]. Из всего многообразия Wnt белков в костной ткани была обнаружена экспрессия генов, отвечающих за синтез Wnt1, Wnt4 и Wnt14. Однако наиболее костно-специфическими Wnt белками являются Wnt3a и Wnt10b. Рекомбинантный Wnt3a направляет дифференцировку МСК по линии остеобластогенеза, улучшает пролиферацию и выживаемость клеток остеобластической линии [86]. Wnt10b, в свою очередь, подавляет адипогенез, переключая дифференцировку МСК в сторону остеобласта [86]. Вместе с тем, потенциально важными для регуляции остеобластогенеза считаются Wnt1 и Wnt5a [25; 87].

Комбинация Wnt лиганда, его рецептора и корецептора определяет тип запускаемого сигнального пути. Согласно современным представлениям, белки Wnt1, Wnt3a, Wnt8, Wnt10b активируют канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь, а Wnt4, Wnt5a, Wnt11 – неканонические (Wnt/ Ca^{2+} -сигнальный путь, путь клеточной поляризации) [88]. Вместе с тем, Wnt1, Wnt5a и Wnt11 могут запускать несколько вышеупомянутых сигнальных путей в зависимости от ситуации, что определяет паракринную регуляцию дифференцировки клетки [88; 89]. Канонический Wnt-сигнальный путь основан на накоплении β -катенина в ядре клетки, в то время как неканонические сигнальные пути не влияют на его уровень, регулируя полярность клетки, метаболизм кальция и др. [88].

Передача Wnt сигнала внутрь клетки осуществляется посредством связывания Wnt белка с группой рецепторов на ее поверхности. 7-доменный трансмембранный рецептор фризельда (Фзд) относится к обширной группе рецепторов, связанных с G-белками (G-protein-coupled receptors, GPCR), которые осуществляют передачу сигнала через гетеротримерные G-белки [90]. Другие рецепторы, способные связывать Wnt белок, представлены семейством рецепторных молекул LRP (рецепторы липопротеидов низкой плотности 5, 6). Белки LRP5 и LRP6 обеспечивает передачу Wnt-сигнала посредством единственного трансмембранного домена [91]. В итоге, активация тройного Wnt рецепторного комплекса Wnt-белок/Фзд/LRP5,6 способствует транслокации на мембрану белков Disheveled, Axin, Flat-1, ингибируя активность киназы гликоген синтетазы 3 (GSK3) [87]. Данное взаимодействие подавляет фосфорилирование β -катенина, способствуя его стабилизации и накоплению в цитозоле с дальнейшей транслокацией в ядро. В ядре β -катенин активирует транскрипционные факторы TCF/LEF (Т-клеточный фактор/лимфоидный фактор, повышающий процесс связывания внутриядерных компонентов), контролируя экспрессию генов, участвующих в остеобластогенезе [5].

К антагонистам Wnt-сигнального пути относятся:

- Белки диккопф 1-4 (Дкк 1-4). Среди 4-х типов Дкк в костной ткани выявлена экспрессия только *Dkk1* [92]. Дкк-1 связывается с LRP6, конкурентно снижая количество свободных рецепторов для взаимодействия с Wnt белками, тем самым, нарушая проведение Wnt сигнала.
- Белки, связывающие фризельд (сФРЗ). Согласно экспериментальным исследованиям на мышинной модели сФРЗ1 подавляет активацию Wnt-сигнального пути [93]. Кроме того, экспрессия сФРЗ4 обнаружена в МСК в зоне костеобразования [94]. сФРЗ связываются с Wnt-лигандами блокируя их действие.
- Wnt ингибирующий фактор 1 (ВИФ1). ВИФ1 непосредственно взаимодействует с Wnt3a и Wnt5a [95], нейтрализуя Wnt белки еще до их взаимодействия с рецепторным комплексом на поверхности клетки.

- Склеростин (SOST). Склеростин является наиболее костно-специфическим антагонистом Wnt-сигнального пути [96; 97]. Он образует связь с LRP5 на поверхности клетки, нарушая взаимодействие Wnt белка с рецептором [98].
- Склеростин домен содержащий 1 (Sost-dc1). Данный белок связывается с Wnt1, Wnt3a и Wnt10b, подавляя остеобластогенез [99].

Медикаментозные возможности регуляции канонического Wnt/ β -катенин сигнального пути

Выделяют два основных подхода к воздействию на регуляцию Wnt-сигнального пути: синтез агонистов или блокирование естественных антагонистов. В первом случае использование рекомбинантных Wnt белков затруднено в виду дороговизны и сложности технологии производства [85], кроме того, следует учитывать, что Wnt белки могут вызывать изменение регуляции неканонических сигнальных путей, приводя к развитию нежелательных явлений [100]. Ингибирование антагонистов проведения Wnt сигнала является более предпочтительным способом воздействия на Wnt-сигнальный путь. Возможности медикаментозного влияния на передачу Wnt сигнала представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Потенциальные терапевтические стратегии воздействия на регуляцию Wnt-сигнального пути

Мишень	Механизм	Воздействие	Терапевтический эффект	Литература
Агонисты Wnt-сигнального пути				
β -катенин	Передаёт Wnt-сигнал в ядро	DCA (активирует β -катенин)	Стимулирует остеобластогенез	[101]
Антагонисты Wnt-сигнального пути				
Склеростин	Ингибирует передачу Wnt сигнала за счёт связывания с LRP5	Антитела к склеростину	Увеличение МПК в позвоночнике и бедре, предупреждение переломов	[102; 103]

Продолжение таблицы 2

Мишень	Механизм	Воздействие	Терапевтический эффект	Литература
Дкк1	Способствует связыванию корцепторо в LRP5	Антитела к Дкк-1	Стимуляция остеогенеза, увеличение МПК	[104]
сФРЗ	Конкурентно ингибирует винглесс-белки до их взаимодействия с ФЗД	Малые молекулы, ингибирующие сФРЗ	Увеличивают костеобразование и МПК	[93]
GSK3	Фосфорилирует β -катенин, способствуя его деградации	Препараты лития и молекулы GSK3 α/β двойного ингибитора (блокируют GSK3, способствуя накоплению β -катенина)	Повышают МПК на мышинной модели постменопаузального остеопороза, снижают риск переломов	[105-107]

Примечание: Дкк1 – Диккопф 1, сФРЗ - белок, связывающий фризельд, GSK3 - киназа гликоген синтетазы 3.

В виду наличия данных об участии β -катенина, Axin, Tcf/Lef1 и Wnt1 в развитии онкологических заболеваний следует учитывать возможность канцерогенеза при избыточной стимуляции Wnt-сигнального пути [108]. Например, мутации β -катенина связывают с развитием злокачественных заболеваний кроветворной системы [109]. Активация Wnt-сигнального пути меняет клеточный цикл, что потенциально может привести к развитию остеосаркомы, которая представляет собой злокачественное новообразование из клеток костной ткани, характеризующегося снижением дифференциации клеток и склонностью к метастазированию [110; 111].

Перспективным считается воздействие на склеростин, как на наиболее костно-специфический антагонист Wnt-сигнального пути. В физиологических условиях на экспрессию склеростина в остеоцитах влияют ПТГ, кальцитонин, эстрогены, глюкокортикоидные гормоны [112]. ПТГ оказывает ингибирующее действие на *SOST*, что было продемонстрировано в исследованиях *in vitro* и на животной модели [113]. Негативное влияние ПТГ на экспрессию склеростина было доказано в исследовании уровня склеростина у пациентов до и после оперативного лечения первичного гиперпаратиреоза. Согласно результатам работы, высокий уровень ПТГ сопровождался снижением склеростина, экспрессия которого восстанавливалась после оперативного лечения. Кальцитонин наоборот увеличивает экспрессию склеростина [112; 114; 115]. При ЭГ уровень склеростина был значимо повышен и располагался преимущественно в верхнем диапазоне референсных значений, однако не было выявлено корреляционной связи между уровнем склеростина в сыворотке крови и кортизолом в суточной моче [116]. В другой работе была показана обратная зависимость между уровнем сывороточного склеростина и эстрогенов [117], а менопаузальная заместительная гормональная терапия способствовала снижению уровня склеростина [118].

В настоящее время, препараты ромосозумаб и блосозумаб, которые представляют собой структурно отличные друг от друга антитела к склеростину, проходят III и II фазу клинических исследований соответственно. На фоне введения препаратов наблюдалось кратковременное повышение маркеров костеобразования, и подавление показателей резорбции кости. Негативное влияние на маркеры костной резорбции может быть обусловлено снижением *RANKL* и увеличением *OPG* [119]. Оба препарата способствовали приросту МПК [120; 121]. В настоящее время, опубликованны данные об эффективности ромосозумаба для предупреждения переломов тел позвонков [122] и лучшей эффективности для предупреждения переломов тел позвонков и внепозвоночных переломов по сравнению с алендронатом [123]. Однако сохраняются сомнения касательно профиля сердечно-сосудистой безопасности.

1.4 Патогенез глюкокортикоидного остеопороза

ГКО является наиболее распространенной и тяжелой формой вторичного остеопороза и приводит к развитию низкотравматичных переломов в 50% случаев [124; 125]. У пациентов, получающих лечение глюкокортикоидными препаратами, наблюдается быстрая потеря костной ткани, обусловленная повышением резорбции и подавлением костеобразования. Следует отметить, что при ГКО переломы чаще происходят в участках кости с высоким содержанием губчатой костной ткани, таких как позвонки и шейка бедренной кости [126]. Согласно исследованиям на мышинной модели, гиперкортицизм приводит к ранней стимуляции экспрессии генов, отвечающих за остеокластогенез, и в последующем к подавлению генов, связанных с остеобластогенезом [127]. Однако в рамках исследования патогенеза ГКО модель грызунов имеет некоторые ограничения в виду отсутствия изменения губчатой костной ткани у мышей [128]. У пациентов с БИК развивается ЭГ вследствие чрезмерного синтеза кортизола в надпочечниках в ответ на гиперсекрецию аденокортикотропного гормона (АКТГ) аденомой гипофиза [129]. При БИК из-за перманентного ЭГ возникают аналогичные изменения в костной ткани, что и при длительном введении супрафизиологичных доз глюкокортикоидных препаратов [126; 129]. Поэтому БИК может рассматриваться в качестве модели для изучения патогенеза ГКО.

Исследования патофизиологии ГКО на культурах клеток и мышинных моделях продемонстрировали увеличение экспрессии антагонистов Wnt-сигнального пути [130; 131].

Уровень *Dkk1* повышался при воздействии дексаметазоном на культуру клеток остеобластического ряда за счет повышения рецепторной активности промотора *Dkk1* [132; 133]. Кроме того, подавление экспрессии *Dkk1* в МСК мышей позволило избежать отрицательного влияния дексаметазона на остеобластогенез [130]. Однако, результаты, полученные при исследовании ГКО на мышинной модели неоднозначны. Экспрессия *Dkk1* и *Sost* снижалась через 7 дней терапии преднизолоном, но после 56 дней лечения уровень экспрессии *Dkk1*

возрастал, а экспрессия *Sost* возвращалась к исходным значениям [127]. У людей наблюдалось повышение уровня Дкк1 и склеростина на фоне как краткосрочного, так и долгосрочного лечения глюкокортикоидами [134]. В другой работе, у пациентов с ЭГ уровень сывороточного склеростина был статистически значимо выше, чем в группе контроля, однако не было выявлено отличий по уровню Дкк1 [7]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* под влиянием глюкокортикоидов отмечалось повышение другого антагониста Wnt-сигнального пути - сФР31, а его блокирование позволило нивелировать негативное влияние глюкокортикоидов на остеобластогенез [131]. Однако, при изучении сФР31 в сыворотке крови у пациентов с БИК не было отмечено статистически значимого изменения по сравнению с контрольной группой [7]. Таким образом, участие антагонистов Wnt-сигнального пути в патогенезе ГКО по-прежнему вызывает споры и требует дальнейшего изучения.

Имеются данные об участии нескольких мкРНК, вовлеченных в регуляцию костного метаболизма, в развитии ГКО. При гиперкортицизме снижается экспрессия мкРНК-29а, а при избытке мкРНК-29а негативные эффекты глюкокортикоидов на костную ткань сглаживаются за счет повышения уровня Wnt3а и β -катенина, усиления экспрессии мРНК *RUNX2* и *IGF1* и подавления мРНК *Dkk1* и *RANKL* [135]. Кроме того, сообщалось, что мкРНК-29а ослабляет глюкокортикоид-опосредованное деацетилирование β -катенина и усиливает собственную транскрипцию за счет снижения экспрессии *HDAC4* [136]. Под влиянием глюкокортикоидов снижается экспрессия мкРНК-34а-5р во время остеобластогенеза, приводя к активации сигнальной передачи Notch и ингибированию остеогенной дифференцировки МСК костного мозга через подавление белков клеточного цикла (CDK4, CDK6 и Cyclin D1) [137]. Кроме того, показано, что дексаметазон усиливает экспрессию мкРНК-199а-5р, которая посредством снижения Фзд4 и Wnt2 ингибирует остеобластогенез. В то время как, делеция мкРНК-199а-5р ослабляет действие дексаметазона на костный обмен. Тем не менее, профиль мкРНК, влияющих на костное ремоделирование, весьма обширен и их вклад в развитие ГКО только начинает изучаться.

Глюкокортикоиды усиливают остеокластогенез и резорбцию костной ткани *in vitro* [138-140]. В культурах клеток глюкокортикоиды снижают экспрессию мРНК *OPG* и умеренно увеличивают экспрессию мРНК *RANKL*, что приводит к изменению соотношения *RANKL/OPG* [141-143]. Глюкокортикоид-опосредованное подавление остеобластогенеза и апоптоз остеоцитов способствуют снижению *OPG* ввиду его секреции клетками остеобластического ряда [144]. Преобладание экспрессии *RANKL* над *OPG* приводит к резкому увеличению активных остеокластов и, наиболее вероятно, является причиной быстрой потери костной ткани уже в начале терапии глюкокортикоидами или при повышении уровня эндогенного кортизола. В условиях гиперкортицизма уменьшается количество предшественников остеокластов за счет продления продолжительности жизни зрелых остеокластов [145]. Глюкокортикоиды также усиливают экспрессию макрофаг колоний-стимулирующего фактора 1 [146], что способствует еще большему привлечению предшественников остеокласта. Согласно некоторым исследованиям, под влиянием глюкокортикоидов остеокласты увеличивают размеры лакун, а не мигрируют в новый участок резорбции [147]. Данные изменения могут объяснить непропорциональную потерю прочности костной ткани при относительно небольшой потере костной массы.

1.5 Патогенез остеопороза вследствие акромегалии

Акромегалия является редким эндокринным заболеванием, которое обусловлено избыточной секрецией СТГ аденомой гипофиза. СТГ стимулирует линейный рост и развитие скелета в детском возрасте, а также способствует поддержанию МПК у взрослых людей. СТГ увеличивает костеобразование, как непосредственно взаимодействуя с рецепторами на остеобластах, так и опосредованно через синтез ИРФ-1 в печени и периферических тканях. Дефицит СТГ ассоциирован с замедлением формирования кости, снижением МПК, остеопорозом и повышенным риском низкотравматичных переломов [148].

Заместительная терапия СТГ способствует набору пика костной массы при взрослении пациентов с дефицитом СТГ и предотвращает развитие вторичного остеопороза [149]. Рекомбинантный человеческий СТГ оказывает двухфазное действие на кость. Во время первой фазы увеличивается костная резорбция и снижается МПК, тем не менее, примерно через 6-12 месяцев терапии наступает вторая фаза, характеризующаяся повышением костеобразования и прогрессивным набором МПК [149].

В культуре клеток СТГ стимулирует пролиферацию клеток остеобластической линии и влияет на судьбу МСК костного мозга, направляя ее дифференцировку по линии остеобластогенеза и хондрогенеза, угнетая адипогенез [150]. Кроме того, СТГ прямо или косвенно через ИРФ-1 регулирует функционирование зрелого остеобласта. Согласно имеющимся исследованиям, СТГ стимулирует карбоксилирование остеокальцина, который является маркером костеобразования, и усиливает секрецию OPG, тем самым угнетая остеокластогенез [148]. Таким образом, по результатам экспериментальных исследований предполагалось, что СТГ оказывает анаболический эффект на костную ткань, однако это не было подтверждено в клинических исследованиях у пожилых пациентов, вероятнее всего, в виду двухфазного действия рекомбинантного человеческого СТГ [149].

Пациенты с акромегалией имеют повышенный риск низкотравматичных переломов, в особенности, компрессионных переломов тел позвонков по сравнению с общей популяцией (39-59% против 14% соответственно) [151]. При обследовании пациентов с избытком СТГ и ИРФ-1 отмечается повышение маркеров образования и резорбции костной ткани, уровень которых, согласно некоторым исследованиям, коррелирует с длительностью и биохимической активностью акромегалии [152]. Ускорение процессов костного ремоделирования с преобладанием резорбции над формированием кости, в настоящее время, рассматривается в качестве основной гипотезы развития вторичного остеопороза при акромегалии в условиях длительного постоянного повышения СТГ и ИРФ-1 [153]. Предполагается, что за счет повышения процессов резорбции происходит

прогрессивная потеря МПК с последующим развитием низкотравматичных переломов. Однако результаты исследований МПК достаточно противоречивы: в одних работах показано повышение [154], в других – снижение МПК [155], а некоторые исследователи не выявили значимой разницы между МПК у пациентов с акромегалией и группой контроля [156]. Представленная гетерогенность результатов может быть связана с различными факторами, влияющими на костное ремоделирование: длительностью и биохимической активностью акромегалии, наличием или отсутствием осложнений заболевания (гипогонадизма и СД). Повышенный риск переломов, вероятнее всего, обусловлен не потерей МПК, а снижением качества костной ткани. Периферическая количественная компьютерная томография с высокой разрешающей способностью позволила выявить повышенную плотность кортикальной ткани, но при этом микроархитектоника костной ткани была нарушена и плотность трабекул снижена у пациентов с акромегалией по сравнению с группой контроля [157].

Таким образом, патогенез развития вторичного остеопороза при акромегалии изучен недостаточно глубоко, т.к. не проводились исследования, посвященные изменению регуляции костного метаболизма, с использованием современных методов лабораторной и генетической диагностики.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Пациенты, включенные в исследование

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 «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ (в настоящее время ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава РФ) в период 2015-2017гг.

Наличие ЭГ было подтверждено повышением уровня кортизола в суточной моче, в слюне в 23:00, в крови в 23:00 и отрицательной малой пробы с 1 мг дексаметазона [129]. БИК устанавливался на основании нормальных или повышенных уровней АКТГ утром, наличия аденомы гипофиза на МРТ и/или результатами селективного забора из нижних каменистых синусов [158]. Результаты гистологического исследования послеоперационного материала также подтвердили наличие БИК у включенных пациентов.

Акромегалия диагностировалась на основании высокого уровня ИРФ-1 и отсутствия подавления СТГ в ходе перорального глюкозотолерантного теста с 82,5 мг моногидрата глюкозы в сочетании с наличием аденомы гипофиза по результатам МРТ. Окончательный нозологический диагноз подтверждался результатами гистологического исследования послеоперационного материала.

В группе пациентов с НАГ аденома гипофиза устанавливалась на основании МРТ головного мозга, а гормональная активность образования была исключена исследованием полного спектра гормонов гипофиза. Пациентам была проведено оперативное лечение в виду наличия хиазмального синдрома в 9-случаях и наличием выраженной головной боли в одном случае.

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.

2.2 Дизайн исследования

Распределение пациентов и здоровых добровольцев по группам для проведения различных разделов исследования и решения поставленных задач приведено в Таблице 3.

Таблица 3 - Основные разделы исследования

Раздел исследования	Критерии включения	Критерии исключения	Тип исследования	Количество пациентов
2.2.1 Анализ экспрессии мРНК и мкРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии ЭГ	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом БИК и НАГ, имеющие показания к оперативному лечению	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	Одномоментное исследование случай-контроль	16 пациентов с БИК и 10 пациентов с НАГ
2.2.2 Анализ экспрессии мкРНК в плазме крови у 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	24 пациента с БИК и 18 здоровых добровольцев
2.2.3 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
2.2.4 Анализ экспрессии мРНК и мкРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии акромегалии	Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом акромегалия и НАГ, имеющие показания к оперативному лечению		Одномоментное исследование случай-контроль	14 пациентов с акромегалией и 10 пациентов с НАГ

<p>2.2.5 Анализ экспрессии мкРНК в плазме крови у пациентов в активной стадии акромегалии</p>	<p>Пациенты с установленным и верифицированным в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ диагнозом акромегалия и здоровые добровольцы</p>	<p>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.</p>	<p>Одномоментное исследование случай-контроль</p>	<p>22 пациента с акромегалией и 18 здоровых добровольцев</p>
--	---	--	---	--

2.3. Методика забора биологического материала и проведения фармакологических проб

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 АКТГ. Далее образцы подвергались двукратному центрифугированию (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов (A-4-81, Ф-4-81-MTP/Flex, FA-45-30-11 и F-45-48-PCR)) в течение 15 минут после забора крови из вены при температуре +5°C при скорости вращения 3000 оборотов/мин в течение 20 минут. Образцы сыворотки и плазмы были заморожены и хранились при температуре -80°C.

Забор вечерних образцов крови для определения кортизола и АКТГ проводился у бодрствующих стационарных пациентов в 23.00.

Сбор суточной мочи проводился пациентом за 24 часа в единую ёмкость. После измерения общего объема и перемешивания, образец мочи не менее 50 мл доставлялся в лабораторию. Пациенту было рекомендовано соблюдать обычный питьевой режим, избегать стрессовых ситуаций, исключались препараты, влияющие на содержание кортизола в суточном образце мочи.

Сбор слюны производился в 23.00 с использованием специальной системы для сбора слюны Salivette Sarstedt. Пациенту рекомендовалось не употреблять спиртные напитки за сутки, не есть, не курить, не чистить зубы и не употреблять

напитков, кроме простой воды, в течение 30 минут до сбора слюны. После сбора слюны пробирка помещалась в холодильник (не в морозильное отделение).

Малая проба с дексаметазоном (МДП) проводилась по стандартному протоколу: в 23.00 (после последнего сбора слюны и после сбора мочи) пациент принимал 1 мг дексаметазона, затем утром между 8.00-9.00 часами проводился забор крови на кортизол. Современными клиническими рекомендациями для выявления ЭГ рекомендована точка разделения выше 50 нмоль/л после МДП [129], и этот критерий был принят нами в работе.

Исследование СТГ в ходе ПГТТ

Уровень СТГ определялся натощак и во время проведения перорального глюкозотолерантного теста (ПГТТ) с 82,5 мг моногидрата глюкозы на 30, 60, 90, 120 минутах согласно клиническим рекомендациям [159]. Диагноз акромегалии подтверждался при отсутствии подавления СТГ менее 1 нг/мл после зафиксированной гипергликемии.

2.4 Генетические методы исследования

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. Наборы, используемые для qRT-PCR, перечислены в Таблице А.1 (Приложение А. Таблица А.1 «Список исследованных мРНК и каталожные номера использованных реактивов», страница 134). 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). Наборы, используемые для qRT-PCR, перечислены в Таблице А.2 (Приложение А. Таблица А.2 «Список исследованных мкРНК и каталожные номера использованных реактивов», страница 136). 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.

2.5 Лабораторные методы исследования

Рутинное биохимическое исследование крови (кальций общий и ионизированный, фосфор, щелочная фосфатаза, креатинин, глюкоза) было выполнено на Architect 8000 (Abbott, USA).

Гормональный анализ крови на кортизол в сыворотке крови (референсный интервал утро 123-626 нмоль/л; вечер 46,0-270,0 нмоль/л), АКТГ (референсный интервал утро 7,0-66,0 пг/мл; вечер 0,0-30,0 пг/мл), остеокальцин (референсный интервал 11,0-43,0 нг/мл), С-концевой телопептид коллагена 1-го типа (СТх) (референсный интервал 0,01-0,69 нг/мл), тиреотропный гормон (ТТГ) (0,25-3,5 мМЕ/л), пролактин (референсный интервал 60-510 мЕД/л), а также определение свободного кортизола в вечерней слюне (0,5-9,4 нмоль/л) и суточной моче (референсный интервал 60-413 нмоль/сут) проводилось электрохемилюминесцентным методом (ECLIA) на анализаторе Cobas 6000 Module e601 (Roche). ИРФ-1 (референсные значения по возрасту: 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), СТГ, витамин D измеряли иммунохемилюминесцентным методом на аппарате Liaison.

Оценка уровней Wnt белков проводилась иммуноферментным методом (ELISA) с использованием наборов WNT3a SEL818Hu (USCN) и WNT10b SEP553Hu (USCN).

2.6 Инструментальные методы исследования

Рост измеряли с помощью стадиометра, ИМТ рассчитывался как масса тела (килограммы) деленная на квадрат роста (метры).

Рентгенологическое исследование позвоночника выполняли в боковой проекции грудного и поясничного отделов Th4-L4 (Axiom Icons R200 “Siemens”). Перелом позвонка диагностировался на основании визуального осмотра при снижении высоты тела позвонка (передней, средней, задней проекции) на 20% и более [160].

МПК измеряли методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (iDXA) на аппарате GE LUNAR Prodigy в поясничных позвонках (L1-L4), шейке бедра (Neck) и в проксимальном отделе бедренной кости в целом (Total Hip).

Магнитно-резонансное исследование головного мозга (МРТ) проводилось для выявления аденомы гипофиза на магнитно-резонансном томографе Magnetom Harmony фирмы Siemens (Германия) с введением контрастных препаратов по показаниям.

2.7 Статистическая обработка данных

Основные количественные характеристики пациентов представлены в виде среднего (M) и 95% доверительного интервала (95%ДИ). В частности, 95% ДИ традиционно указывался при анализе экспрессии генов в образцах костной ткани [161; 162].

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 графический вывод 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

пацинтов. 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 корректировки Бенджамини-Хохберга (q -значения $< 0,10$) [161; 162].

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

При post-hoc 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).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ экспрессии матричных РНК и микроРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии эндогенного гиперкортицизма

Общая характеристика и биохимические показатели пациентов с БИК и НАГ, у которых проводился забор образцов костной ткани, представлены в Таблице 4.

Таблица 4 - Основные характеристики включенных пациентов с БИК и НАГ*

Параметры	НАГ М (95% ДИ)	БИК М (95% ДИ)	Р
Количество пациентов	10	16	
Возраст (годы)	45 (33-57)	40 (33-48)	0,353
ИМТ (кг/м ²)	27 (23-31)	30 (26-35)	0,55
Пол (Ж(%): М(%))	6 (60) : 4 (40)	14 (87,5) : 2 (12,5)	0,16
Кальций общий (ммоль/л)	2,35 (2,33-2,43)	2,38 (2,33-2,43)	0,93
Креатинин (мкмоль/л)	72 (64-79)	69 (63-75)	0,67
Остеокальцин (нг/мл)	23,5 (12,3-34,6)	9,1 (5,8-12,4)	0,015
СТх (нг/мл)	0,58 (0,28-0,89)	0,33 (0,24-0,41)	0,102
Витамин D (нг/мл)	12,2 (5,9-18,4)	11,5 (8,0-13,1)	0,932
L1-L4 Z-критерий	-0,4 (-1,8 – 0,9)	-1,2 (-2,1 - -0,2)	0,297
Femur Neck Z-критерий	-0,2 (-1,2 – 0,7)	-0,8 (-1,5 - - 0,07)	0,325
Низкотравматичные переломы	1 (10%), компрессионный перелом тела позвонка	9 (56%), в 6 случаях компрессионные переломы тел позвонков и в 6-ти случаях внепозвоночные переломы (в 4-х случаях переломов ребер и в 2-х - лодыжки)	0,037

**Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). НАГ – неактивная аденома гипофиза; БИК – болезнь Иценко-Кушинга; ИМТ – индекс массы тела; СТх – С-концевой телопептид коллагена I-го типа.*

Пациенты с БИК имели повышенные уровни кортизола в суточной моче - 1243 (95% ДИ 633-1853) нмоль/сут, в крови вечером - 649 (95% ДИ 403-895) нмоль/л и в слюне вечером - 13,6 (95% ДИ 7,3-20,0) нмоль/л. Эти показатели были значимо выше по сравнению с пациентами с НАГ ($p < 0,001$), составляющих контрольную группу, что подтверждает активность заболевания. Средняя расчетная продолжительность БИК составила 2 (95% ДИ 0,5-5) года. ТТГ, ИРФ-1, пролактин у всех пациентов, включенных в эту часть исследования, находились в референсном интервале. Как и ожидалось, уровень остеокальцина в сыворотке был значимо снижен у пациентов с БИК по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). Более чем у 50% пациентов с БИК наблюдались низкотравматические, главным образом, компрессионные переломы тел позвонков, при этом разница по сравнению с группой пациентов с НАГ была статистически значимой ($p = 0,001$) (Таблица 4).

В Таблице 5 представлены данные об изменении экспрессии основных мРНК, регулирующих костное ремоделирование и процессы минерализации, непосредственно в образцах костной ткани у пациентов с БИК в сравнении с пациентами с НАГ.

Таблица 5 - 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)	$< 0,001$	$< 0,001$

Продолжение таблицы 5

Ген	Полное название гена	НАГ	БИК М (95% ДИ)	p	q
<i>BGLAP</i>	белок костного гамма- карбоксиглутамата	1	0,42 (0,30-0,54)	< 0,001	< 0,001
<i>BMP2</i>	Костный морфогенетически й белок 2	1	0,51 (0,38-0,64)	< 0,001	< 0,001
<i>BMP7</i>	Костный морфогенетически й 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- фосфорибозилтран- сфераза 1	1	1,03 (0,83-1,24)	0,735	1
<i>IGF1</i>	Инсулиноподобны й фактор роста 1	1	0,48 (0,37-0,60)	< 0,001	< 0,001
<i>IGFBP2</i>	Белок 2, связывающий инсулиноподобны й 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

Продолжение таблицы 5

Ген	Полное название гена	НАГ	БИК М (95% ДИ)	р	q
<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

Продолжение таблицы 5

Ген	Полное название гена	НАГ	БИК М (95% ДИ)	p	q
<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 κВ	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 κВ	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 А	1	0,53 (0,32-0,74)	< 0,001	0,007
<i>WNT10b</i>	Wnt белок 10В	1	12,22 (7,31-17,13)	< 0,001	0,008
<i>WNT3a</i>	Wnt белок 3А	1	1,59 (0,40-2,78)	0,303	1

*Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). НАГ – неактивная аденома гипофиза; БИК – болезнь Иценко-Кушинга.

Как показано в Таблице 5, мы обнаружили статистически значимое снижение экспрессии генов, ответственных за функцию зрелых остеобластов и формирование органической составляющей костной ткани [163] (*ACP5*, *ALP*, *BGLAP*), включая более чем двукратное снижение экспрессии генов, отвечающих за синтез коллагена (*COL1A1*, *COL1A2*). Это ожидаемые результаты исходя из гистологических исследований костной ткани у человека и изучения экспрессии

генов в образцах костной ткани животных, получающих супрафизиологические дозы глюкокортикоидов [127].

В соответствии с предыдущими исследованиями влияния гиперкортицизма на костный обмен [134; 164; 165] было выявлено значительное снижение активности остеобластов вместе с подавлением нескольких факторов роста (*BMP2*, *BMP7*, *FGFR2*, *IGF1*, *VEGFA*) и повышенной экспрессией антагонистов Wnt-сигнального пути (*Dkk1*, *SOST*) непосредственно в костной ткани. Кроме изменения уровней *Dkk1* и *SOST*, в экспериментах на животной модели на фоне избыточного влияния глюкокортикоидов было зарегистрировано увеличение *SFRP1* [127; 131]. Однако в нашем исследовании у пациентов с БИК не было выявлено изменения экспрессии *SFRP1*, а уровень другого антагониста – *SFRP4* даже был снижен. Данные различия, вероятнее всего, связаны с тем, что пациенты с БИК находились в состоянии гиперкортицизма более длительный период времени по сравнению с продолжительностью лабораторного эксперимента. Более того, в костной ткани выявлено выраженное компенсаторное повышение экспрессии агонистов Wnt-сигнального пути – *Wnt10b*, *LRP5* и *LRP6*, а также *TGFB1*, стимулирующего синтез матричного белка. Вместе с тем, отмечено снижение экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих созревание остеобластов (*TWIST1* и *RUNX2*), более чем на 50%, что показывает общее подавление остеобластогенеза у пациентов с БИК. Полученные данные представляют собой возможные механизмы компенсации негативного влияния глюкокортикоидов на остеобластогенез у пациентов с ЭГ.

По результатам корреляционного анализа у пациентов с БИК были выявлены статистически значимые зависимости между уровнями свободного кортизола в суточной моче, сывороточных маркеров костного ремоделирования и экспрессии мРНК в образцах костной ткани (Таблица 6).

Таблица 6 - Статистически значимые корреляции экспрессии мРНК в образцах костной ткани с кортизолом в суточной моче и маркерами костного ремоделирования в сыворотке крови у пациентов с БИК

мРНК	Кортизол в суточной моче	Остеокальцин	СТх
<i>ACP5</i>	$\rho = -0,663$ $p < 0,001$	$\rho = 0,663$ $p = 0,002$	-
<i>ALP</i>	$\rho = -0,586$ $p = 0,002$	$\rho = 0,499$ $p = 0,043$	-
<i>BGLAP</i>	$\rho = -0,518$ $p = 0,002$	$\rho = 0,518$ $p = 0,023$	-
<i>BMP2</i>	$\rho = -0,494$ $p = 0,01$	$\rho = 0,534$ $p = 0,019$	-
<i>CD40</i>	$\rho = 0,605$ $p = 0,001$	$\rho = -0,523$ $p = 0,022$	-
<i>COL1A1</i>	$\rho = -0,668$ $p < 0,001$	$\rho = 0,497$ $p = 0,030$	-
<i>COL1A2</i>	$\rho = -0,546$ $p = 0,004$	$\rho = 0,419$ $p = 0,074$	-
<i>Dkk1</i>	$\rho = 0,444$ $p = 0,023$	$\rho = -0,500$ $p = 0,029$	-
<i>FGFR2</i>	$\rho = -0,472$ $p = 0,015$	$\rho = 0,507$ $p = 0,027$	$\rho = 0,536$ $p = 0,022$
<i>IGF1</i>	$\rho = -0,524$ $p = 0,016$	$\rho = 0,544$ $p = 0,016$	-
<i>IL6</i>	$\rho = -0,656$ $p < 0,001$	$\rho = 0,667$ $p = 0,003$	-
<i>MMP2</i>	$\rho = -0,741$ $p < 0,001$	$\rho = 0,595$ $p = 0,007$	-
<i>RUNX2</i>	$\rho = -0,785$ $p < 0,001$	$\rho = 0,691$ $p = 0,001$	-
<i>SFRP1</i>	-	$\rho = 0,451$ $p = 0,042$	-
<i>SFRP4</i>	$\rho = -0,576$ $p = 0,002$	$\rho = 0,499$ $p = 0,054$	-
<i>SOST</i>	-	$\rho = -0,509$ $p = 0,026$	$\rho = -0,513$ $p = 0,029$
<i>SPP1</i>	$\rho = -0,448$ $p = 0,022$	$\rho = 0,483$ $p = 0,036$	$\rho = 0,465$ $p = 0,052$
<i>STAT1</i>	-	$\rho = -0,516$ $p = 0,024$	-
<i>TGFB1</i>	-	$\rho = -0,493$ $p = 0,032$	-
<i>TIMP2</i>	$\rho = -0,573$ $p = 0,002$	$\rho = 0,504$ $p = 0,028$	-
<i>TNFSF11</i>	-	$\rho = 0,518$ $p = 0,023$	-
<i>TNFSF11A</i>	$\rho = -0,465$ $p = 0,017$	-	-
<i>TWIST1</i>	-	-	$\rho = 0,510$ $p = 0,031$
<i>VEGFA</i>	$\rho = -0,49$ $p = 0,011$	$\rho = 0,554$ $p = 0,014$	-
<i>WNT10B</i>	$\rho = 0,645$ $p = 0,001$	$\rho = -0,634$ $p = 0,06$	-

Выявленные корреляции показывают биологическую значимость полученных результатов. Наличие зависимости между экспрессией мРНК и уровнем свободного кортизола в суточной моче подтверждает ключевое значение

стойкого повышения суточной секреции кортизола для подавления функции зрелых остеобластов и остеобластогенеза. В более ранних работах было доказано, что именно уровень кортизола в суточной моче [166] или доза глюкокортикоидов [124] являются основными предикторами низкотравматичных переломов при ГКО. Известно также, что подавление маркеров костеобразования, в частности остеокальцина может служить диагностическим тестом для выявления гиперкортицизма и уровень остеокальцина в сыворотке крови также коррелирует с уровнем свободного кортизола в суточной моче [167].

В настоящей работе изучалось также изменение экспрессии мРНК, влияющих на резорбцию костной ткани. Неожиданно мы выявили подавление генов *TNFRSF11A (RANK)* и *TNFSF11 (RANKL)*, что показывает подавление основного механизма остеокластогенеза – системы *RANK/RANKL/OPG* [168]. При этом следует отметить, что экспрессия *OPG*, несмотря на подавление остеобластогенеза и функции зрелых остеобластов, не изменена. В более ранней работе, исследовавшей влияние глюкокортикоидов на экспрессию генов костной ткани у мышей, не было выявлено изменения экспрессии генов *RANK* и *RANKL* в течение 56-дневного наблюдения [127]. В нашем исследовании, кроме того, наблюдалось выраженное снижение экспрессии других генов, связанных с костной резорбцией - *TIMP2*, *SPP1*, *MMP2* (Таблица 5).

Вероятнее всего, при ЭГ вследствие БИК остеокластогенез уменьшается после длительного подавления остеобластогенеза. С другой стороны, уровни маркеров костного разрушения никогда не подавляются по аналогии с маркерами костеобразования и в целом не отличаются от контрольной группы. Так за 56 дней наблюдения у грызунов значимых изменений экспрессии *RANK/RANKL* не происходит [127], а за 2 года гиперкортицизма в представленном исследовании у человека наблюдается подавление экспрессии *RANKL*. С другой стороны, уровни маркеров костного разрушения при ЭГ никогда не подавляются по аналогии с маркерами костеобразования и в целом не отличаются от контрольной группы [166; 167; 169]. В экспериментальных исследованиях увеличение костного разрушения наблюдалось на ранних этапах применения глюкокортикоидов [124].

Мы полагаем, что активность костного разрушения может поддерживаться посредством других механизмов. Так в нашем исследовании было обнаружено усиление экспрессии *CD40* и *STAT1*, которые могут положительно влиять на остеокластогенез. Снижение экспрессии гена интерлейкина-6 (*IL6*) также должно оказывать положительный эффект на остеокластогенез, поскольку было показано, что интерлейкин-6 непосредственно ингибирует дифференцировку остеокластов, подавляя RANK/RANKL/OPG сигнальный путь [170].

Для наглядности изменения экспрессии генов в костной ткани у пациентов с БИК приведены на Рисунке 2.

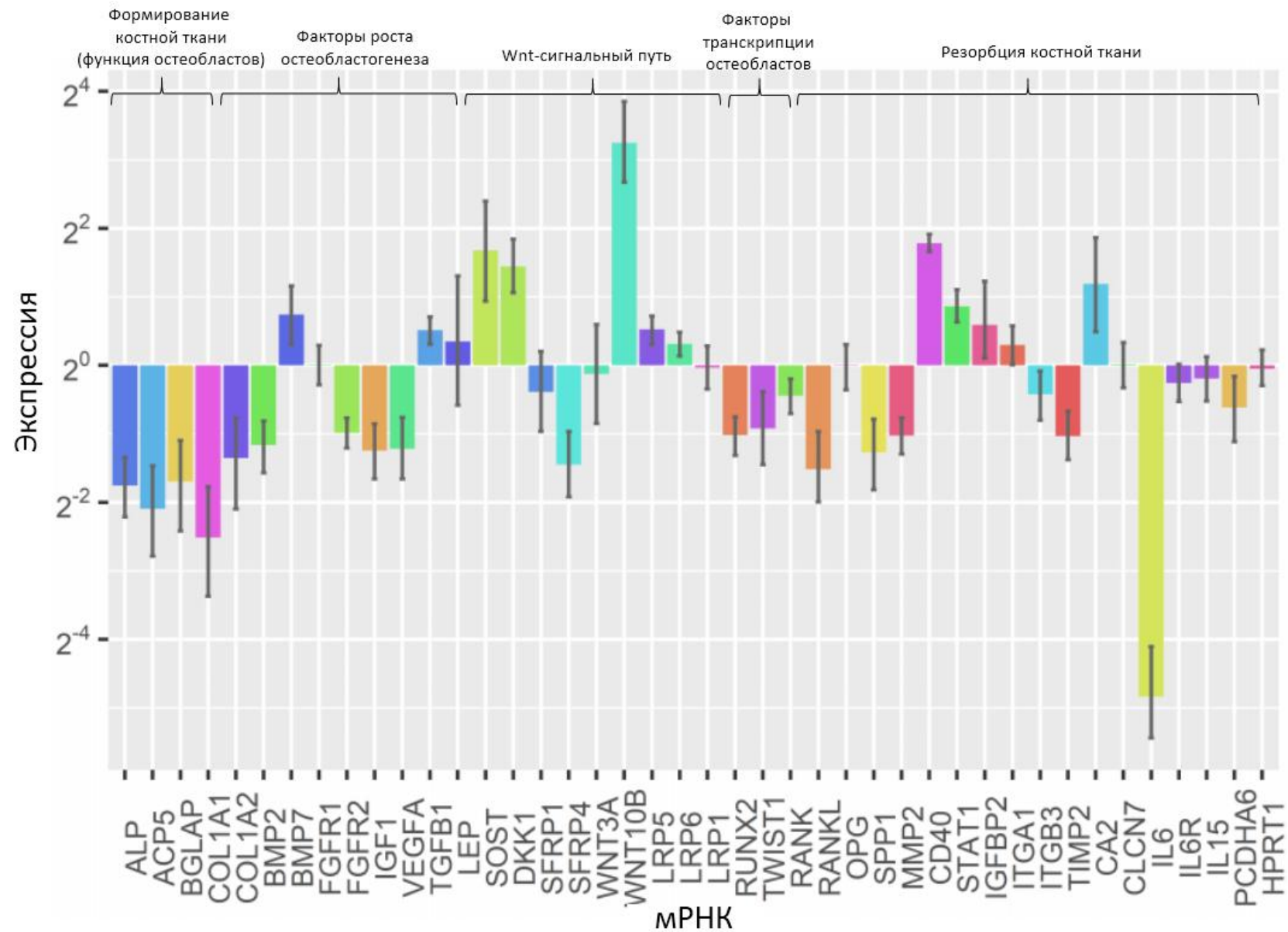


Рисунок 2 - Экспрессия мРНК у пациентов с БИК в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

Изменение экспрессии генов может быть реализовано как напрямую через регуляцию промотора стероидными гормонами, так и опосредовано через эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов. До 60% эпигенетической регуляции осуществляется на посттрансляционном уровне посредством некодирующих мкРНК. В настоящей работе изучалась экспрессия мкРНК, которые вовлечены в регуляцию остеобластогенеза и остеокластогенеза, согласно литературным данным [168; 171; 172].

Результаты экспрессии всех исследованных мкРНК в костной ткани пациентов с БИК по сравнению с НАГ сведены в Таблице 7.

Таблица 7 - 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

Продолжение таблицы 7

мкРНК	НАГ	БИК, М (95% ДИ)	р	q
мкРНК-26а-5р	1	2,17 (1,41-2,93)	0,005	0,103
мкРНК-27а-5р	1	1,33 (0,78-1,88)	0,219	1
мкРНК-96-5р	1	0,92 (0,58-1,26)	0,627	1
мкРНК-188-3р	1	2,28 (1,65-2,90)	0,001	0,013
мкРНК-133а-3р	1	1,86 (1,10-2,62)	0,029	0,345
мкРНК-204-5р	1	0,45 (0,23-0,66)	< 0,001	0,002
мкРНК-218-5р	1	0,37 (0,25-0,49)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-23а-3р	1	0,44 (0,37-0,51)	< 0,001	< 0,001
мкРНК-27а-3р	1	0,93 (0,72-1,14)	0,476	1
мкРНК-29а-3р	1	0,86 (0,67-1,06)	0,15	1
мкРНК-29b-3р	1	0,77 (0,55-0,98)	0,038	0,414
мкРНК-29с-3р	1	0,87 (0,60-1,13)	0,302	1

**Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). НАГ – неактивная аденома гипофиза; БИК – болезнь Иценко-Кушинга.*

Как видно из Таблицы 7, при анализе экспрессии мкРНК в образцах костной ткани пациентов с БИК было выявлено повышение активности мкРНК-125b-5р, мкРНК-188-3р и мкРНК-34а-5р, которые, согласно литературным данным, оказывают негативное влияние на остеобластогенез и положительное на адипогенез [137; 173; 174]. Так, мкРНК125-b-5р способствует подавлению пролиферации и остеогенной дифференцировки МСК [173; 175]. Специфическое повышение экспрессии мкРНК-188 в МСК на модели грызунов способствовало снижению костеобразования и увеличению накопление жира в костном мозге [174]. МкРНК-34а-5р негативно влияет на синтез белков, участвующих в клеточном цикле (CDK4, CDK6, Cyclin D1), что приводит к ингибированию пролиферации клеток и остеобластогенеза [137]. В культуре МСК также, как и в нашей работе, было получено увеличение экспрессии мкРНК34а-5р в ответ на воздействие избытка глюкокортикоидных гормонов [137].

Подавление мкРНК-218-5р, выявленное в нашем исследовании скорее всего также имеет негативный эффект на остеобластогенез, так как повышение

экспрессии или экзогенное введение мкРНК-218 усиливает остеогенез *in vitro* [176].

Таким образом, подавление мкРНК-218-5р и повышение активности мкРНК-125b-5р, мкРНК-188-3р, мкРНК-34a-5р в образцах костной ткани у пациентов с БИК, вероятнее всего, способствуют подавлению костеобразования.

Кроме исследования экспрессии мкРНК, регулирующих дифференцировку МСК по направлению к остеобласту, мы проанализировали уровни мкРНК, участвующих в адипогенезе и хондрогенезе. В отличие от нашего исследования, экспрессия мкРНК-199a-5р была увеличена в остеобластах, подвергнутых обработке дексаметазоном. Shi С и соавторы сообщили, что повышение экспрессии мкРНК-199a-5р способствовало снижению пролиферации остеобластов, а при истощении концентрации мкРНК-199a-5р остеобластогенез усиливался [177]. Однако другие исследования показывают, что мкРНК-199a является чувствительной к уровню *BMP2* и ингибирует ранний хондрогенез посредством прямого воздействия на экспрессию *SMAD1*, что подтверждается снижением уровня биомаркеров хондрогенеза (олигомерного матриксного белка хряща (*COMP*), коллагена типа II и *Sox9*) [178]. Действительно, в нашем исследовании у пациентов с БИК экспрессия *BMP2* и мкРНК-199a-5р была снижена, в то время как *RUNX2* и все биомаркеры активности остеобластов оставались подавленными. Следовательно, мы предполагаем, что подавление мкРНК-199a-5р, вероятнее всего, вызывает увеличение уровня *SMAD1* и улучшение дифференцировки хрящевой ткани, а не активацию передачи Wnt сигнала и остеобластогенеза.

Интересным представляется снижение экспрессии мкРНК-320a, которая имеет несколько таргетов. С одной стороны, за счет нивелирования ее негативного влияния на трансляцию увеличивается уровень β -катенина и *RUNX2*, способствуя остеобластогенезу [179]. С другой стороны, ее подавление должно положительно сказаться на хондрогенезе в виду снижения IL-1 β -индуцируемого подавления *Col2 α 1*, *ACAN*, *sGAG* и подавления *MMP-13* ($p < 0,01$) [180]. Таким образом, мы предполагаем, что снижение экспрессии мкРНК-320a способствует

процессам дифференцировки МСК, что можно рассматривать как компенсаторный механизм.

Изменения экспрессии других мкРНК в образцах костной ткани пациентов с БИК, по-видимому, носят характер компенсаторных реакций поддержания процесса костеобразования. Так, мкРНК-204, мкРНК-211 и мкРНК-23а являются негативными регуляторами ключевого фактора транскрипции остеобластов – *RUNX2* [33; 36] и снижение их экспрессии, которое наблюдалось в нашей работе, могло бы оказывать положительный эффект на остеобластогенез. Однако экспрессия *RUNX2* в костной ткани оставалась подавленной. Кроме того, у пациентов с БИК выявлено подавление мкРНК-135, мишенью которой является *SMAD5* - ключевой транскрипционный фактор в BMP2-зависимом остеогенезе [35]. мкРНК-210, экспрессия которой была повышена в данном исследовании, действует как положительный регулятор остеобластогенеза, ингибируя сигнальный путь TGF-бета/активин посредством ингибирования экспрессии гена активина А рецептора типа 1В (*AcvR1b*) и, как было показано, способствует BMP4-зависимой остеобластной дифференцировке МСК, полученных из костного мозга [181].

На модели грызунов показано, что при гиперкортицизме снижается экспрессия мкРНК-29а. Введение мкРНК-29а крысам ослабляло неблагоприятные эффекты глюкокортикоидов на кости, повышая уровни *Wnt3a*, *RUNX*, *IGF1* и снижая *Dkk*, *RANKL* [135]. В нашем исследовании мы не обнаружили статистически значимых изменений экспрессии мкРНК-29а или мРНК *Wnt3a* в образцах костной ткани у пациентов с БИК, хотя экспрессия мкРНК-29b-3р была снижена на 30% $p = 0,038$, $q = 0,412$.

В настоящей работе наблюдалось значимое снижение экспрессии мкРНК-31-5р, что, по данным экспериментальных исследований может приводить к ингибированию RANKL-опосредованного остеокластогенеза и резорбции костей посредством регуляции RhoA [182]. С другой стороны, было показано, что повышение активности мкРНК-148a-3р, мкРНК-133a-3р и мкРНК-21-3р, зафиксированное в данном исследовании, может положительно влиять на

дифференцировку остеокластов [52; 168]. Таргетом для мкРНК-148а является MAFB (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B), который представляет собой транскрипционный фактор, отрицательно регулирующий RANKL-зависимый остеокластогенез [52]. По результатам ряда экспериментальных исследований мкРНК-21 и мкРНК-133 способствуют повышению функциональной активности и выживаемости остеокластов [49; 169]. Однако согласно результатам другой работы, мкРНК-21-3р ингибирует Spry-1 и, следовательно, способствует дифференцировке остеобластов [55]. Аналогично нашему исследованию, экспрессия мкРНК-21-3р была значительно повышена в МСК костного мозга у мышей со стероид-индуцированным остеонекрозом головки бедренной кости [183].

Для выявления возможных взаимосвязей между экспрессией мкРНК и содержанием кортизола и маркеров костного ремоделирования проводился корреляционный анализ, результаты которого представлены в Таблице 8.

Таблица 8 - Статистически значимые корреляции экспрессии мкРНК в образцах костной ткани с кортизолом в суточной моче и маркерами костного ремоделирования в сыворотке крови у пациентов с БИК*

мкРНК	Кортизол в суточной моче	Остеокальцин	СТх
мкРНК-203а-5р	$\rho = 0,515$ $p = 0,041$	-	-
мкРНК-135а-5р	-	$\rho = 0,618$ $p = 0,005$	-
мкРНК-148а-3р	-	$\rho = -0,502$ $p = 0,029$	$\rho = -0,523$ $p = 0,026$
мкРНК-125b-5р	-	$\rho = -0,477$ $p = 0,039$	-
мкРНК-211	-	$\rho = 0,492$ $p = 0,032$	$\rho = 0,595$ $p = 0,009$
мкРНК-10b-5р	-	$\rho = -0,480$ $p = 0,037$	-
мкРНК-22-3р	-	$\rho = -0,473$ $p = 0,041$	-

Продолжение таблицы 8

мкРНК	Кортизол в суточной моче	Остеокальцин	СТх
мкРНК-320a	-	$\rho = 0,501$ $p = 0,029$	-
мкРНК-26a-5p	-	$\rho = -0,519$ $p = 0,023$	-
мкРНК-96-5p	-	$\rho = 0,748$ $p < 0,001$	-
мкРНК-188-3p	-	$\rho = -0,657$ $p = 0,002$	-
мкРНК-199a-5p	-	$\rho = 0,476$ $p = 0,039$	-
мкРНК-204-5p	-	$\rho = 0,561$ $p = 0,012$	$\rho = 0,605$ $p = 0,008$
мкРНК-218-5p	-	$\rho = 0,736$ $p < 0,001$	-
мкРНК-23a-3p	-	$\rho = 0,722$ $p < 0,001$	$\rho = 0,491$ $p = 0,039$
мкРНК-27a-3p	-	$\rho = 0,493$ $p = 0,032$	-
мкРНК-29a-3p	-	$\rho = 0,481$ $p = 0,037$	$\rho = 0,491$ $p = 0,038$
мкРНК-29c-3p	-	$\rho = 0,695$ $p = 0,01$	-
мкРНК-210-5p	-	-	$\rho = -0,469$ $p = 0,05$

Изменения экспрессии мкРНК в образцах костной ткани наглядно представлены на Рисунке 3.

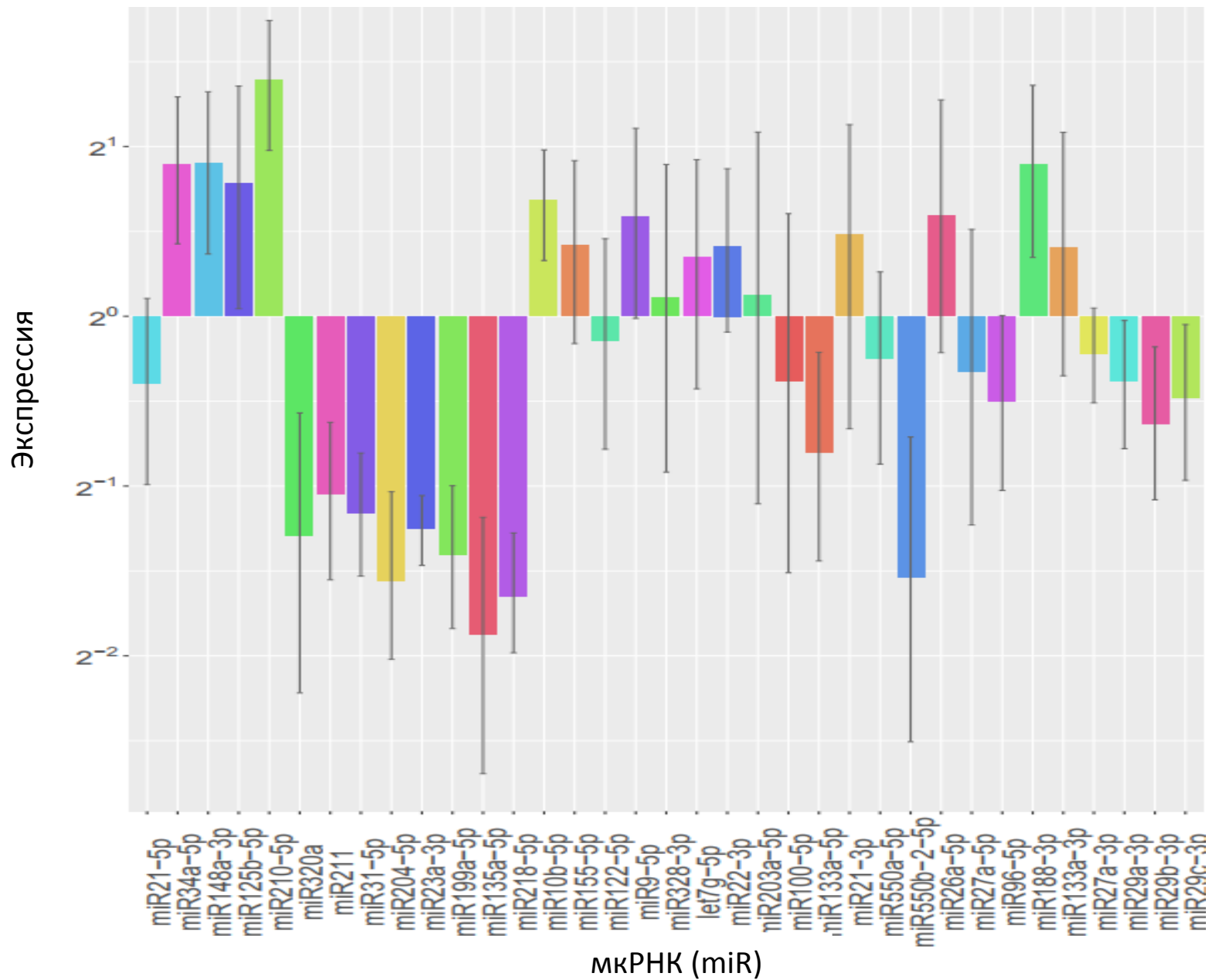


Рисунок 3 - Экспрессия мкРНК у пациентов с БИК в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

Среди всех включенных в исследование пациентов с БИК только одна женщина сообщила об отсутствии нарушения менструального цикла, тем не менее, это не повлияло на экспрессию мРНК и мкРНК. Также не обнаружено различий в значениях мРНК или мкРНК у пациентов с БИК, осложненного СД, и с нормальным углеводным обменом. Чтобы проанализировать, влияет ли продолжительность ЭГ на экспрессию генов, мы разделили пациентов на 2 подгруппы: с продолжительностью заболевания приблизительно 2 года или менее и с более длительным ЭГ. Единственное различие, которое мы обнаружили, заключалось в различном уровне мкРНК210-5p, который составил 4,2 (95% ДИ 1,41-4,99) у пациентов с 2-летними или менее симптомами ЭГ и 2,68 (95% ДИ 1,93-3,44) в другой подгруппе, $p = 0,012$.

3.2 Анализ экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов в активной стадии эндогенного гиперкортицизма

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 [184].

Выявив изменения экспрессии мкРНК в костной ткани пациентов с БИК, 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 и здорового контроля, включенных в анализ экспрессии мкРНК в периферической крови сведена в Таблице 9.

Таблица 9- Основные характеристики включенных пациентов с БИК и группы здорового контроля для анализа экспрессии мкРНК в периферической крови*

Параметры	БИК, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	р
Количество пациентов	24	18	
Возраст (годы)	35 (29-42)	35 (30-39)	0,722
ИМТ (кг/м²)	30 (27-33)	27 (22-32)	0,064
Пол (Ж(%): М(%))	20 (83) : 4 (17)	17 (94) : 1 (6)	0,371
Кальций общий (ммоль/л)	2,38 (2,32-2,44)	2,33 (2,29-2,37)	0,108
Креатинин (мкмоль/л)	70 (65-75)	61 (50-73)	0,17
Остеокальцин (нг/мл)	8,6 (6,5-10,8)	16,7 (12,5-20,9)	0,001
СТх (нг/мл)	0,31 (0,23-0,39)	0,32 (0,24-0,41)	0,884
ИРФ-1	212 (154-271)	195 (139-251)	0,671
L1-L4 Z-критерий	-1,15 (-2,06 - -0,24)	-0,08 (-0,7 - 0,55)	0,015
Femur Neck Z-критерий	-0,76 (-1,52 - -0,01)	0,13 (-0,54 - 0,79)	0,077
Низкотравматичные переломы, Количество (%), Тип	9 (38%). В 7 случаях компрессионные переломы тел позвонков и в 7 случаях внепозвоночные переломы (в 5-х случаях перелом ребер и в 2-х лодыжки)	0	0,002

**Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). БИК – болезнь Иценко-Кушинга; ИМТ – индекс массы тела; СТх – С-концевой телопептид коллагена I-го типа.*

У пациентов с БИК был повышен уровень кортизола в суточной моче 1305 (870-1740) нмоль/сут, крови вечером 632 (481-782) нмоль/л и в слюне вечером 18 (10-27) нмоль/л, что подтверждает активность ЭГ. Средняя продолжительность

ЭГ составила 7 (5-9) лет. У здоровых добровольцев, составивших группу контроля, уровень кортизола в слюне вечером находился в пределах референсных значений 2,1 (0,04-4,2) нмоль/л.

Результаты анализа уровней мкРНК в плазме у пациентов с БИК и здорового контроля представлены в Таблице 10.

Таблица 10 - Результаты всех измеренных уровней мкРНК в образцах плазмы пациентов с БИК по сравнению с группой здорового контроля с поправками для множественных сравнений *

мкРНК	БИК, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	Р	q
мкРНК-22-3p	11,280 (6,604 - 15,956)	3,318 (1,445 - 5,190)	0,003	0,038
мкРНК-27a-3p	0,948 (0,524 - 1,373)	0,265 (0,059 - 0,471)	0,005	0,038
мкРНК-7b-5p	1,433 (0,818 - 2,048)	0,447 (0,190 - 0,705)	0,005	0,038
мкРНК-96-5p	0,158 (0,066 - 0,249)	0,021 (0,007 - 0,034)	0,005	0,038
мкРНК-320a	15,811 (7,633 - 23,989)	4,402 (2,751 - 6,053)	0,009	0,050
мкРНК-10b-5p	0,264 (0,144 - 0,384)	0,091 (0,017 - 0,166)	0,015	0,061
мкРНК-550a-5p	0,228 (0,123 - 0,333)	0,079 (0,025 - 0,132)	0,013	0,061
мкРНК-100-5p	0,006 (0,002 - 0,010)	0,002 (0,001 - 0,003)	0,024	0,085
мкРНК-21-5p	2,118 (0,849 - 3,387)	0,666 (0,239 - 1,092)	0,033	0,091
мкРНК-328-3p	1,251 (0,655 - 1,848)	0,506 (0,159 - 0,854)	0,031	0,091
мкРНК-26a-5p	3,538 (1,252 - 5,823)	1,096 (0,368 - 1,824)	0,044	0,113
мкРНК-34a-5p	0,405 (0,153 - 0,658)	0,126 (-0,011 - 0,262)	0,051	0,119
мкРНК-155-5p	0,300 (0,086 - 0,515)	0,085 (0,003 - 0,167)	0,062	0,123
мкРНК-191-5p	4,077 (1,145 - 7,008)	1,199 (0,534 - 1,864)	0,058	0,123
мкРНК-203a-5p	0,042 (0,017 - 0,066)	0,018 (0,008 - 0,027)	0,070	0,130
мкРНК-211-5p	0,040 (0,023 - 0,058)	0,022 (0,012 - 0,033)	0,079	0,138
мкРНК-125b-5p	0,776 (0,372 - 1,180)	0,375 (0,136 - 0,615)	0,084	0,139
мкРНК-199a-5p	0,406 (0,203 - 0,610)	0,222 (0,113 - 0,331)	0,106	0,165
мкРНК-148a-3p	0,796 (0,182 - 1,409)	0,344 (0,068 - 0,620)	0,174	0,247
мкРНК-550b-2-5p	0,111 (0,060 - 0,162)	0,066 (0,021 - 0,111)	0,176	0,247
мкРНК-133a-5p	0,037 (0,011 - 0,063)	0,021 (0,006 - 0,037)	0,287	0,372
мкРНК-9-5p	0,307 (0,176 - 0,438)	0,215 (0,094 - 0,336)	0,292	0,372
мкРНК-21-3p	0,124 (0,004 - 0,244)	0,061 (0,002 - 0,120)	0,331	0,386
мкРНК-27a-5p	0,014 (-0,006 - 0,034)	0,004 (-0,001 - 0,009)	0,329	0,386

Продолжение таблицы 10

мкРНК	БИК, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	р	q
мкРНК-135a-5p	0,001 (0,000 - 0,001)	0,001 (0,000 - 0,002)	0,360	0,403
мкРНК-188-3p	0,036 (-0,002 - 0,075)	0,022 (-0,001 - 0,044)	0,512	0,551
мкРНК-31-5p	0,055 (0,016 - 0,093)	0,042 (0,008 - 0,077)	0,621	0,644
мкРНК-122-5p	1,438 (0,842 - 2,033)	1,366 (0,304 - 2,428)	0,903	0,903

**Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). БИК – болезнь Иценко-Кушинга.*

Несмотря на снижение экспрессии мкРНК-320a в образцах костной ткани при ЭГ, ее уровень в плазме оказался значимо повышен, что свидетельствует о ее экспрессии вне костной ткани. Вместе с тем негативное влияние высокого уровня мкРНК-320a на клеточной цикл, в том числе на остеобластогенез [179], может осуществляться и путем ее взаимодействия с рецепторами в тканях. В данной работе мы не выявили корреляции между уровнем свободного кортизола в суточной моче и мкРНК-320a, поэтому для уточнения влияния гиперкортицизма на ее экспрессию требует дальнейшего изучения на большем количестве пациентов. Вместе с тем, интересным является тот факт, что в костной ткани выявлено повышение мкРНК-21-3p, а в плазме крови – мкРНК-21-5p, которые противоречиво влияют на костное ремоделирование согласно данным литературы [49; 55; 168; 183].

У пациентов с БИК повышение мкРНК-550a-3p угнетает остеобластогенез и минерализацию кости посредством подавления трансляции *RUNX2* и синтеза щелочной фосфатазы [185]. Повышение экспрессии при ЭГ мкРНК-10b-5p способствует ингибированию фактора транскрипции *BCL6* (белок 6 В-клеточной лимфомы). В норме *BCL6* усиливает дифференцировку остеобластов и угнетает остеокластогенез [186]. При снижении уровня *BCL6* повышается экспрессия *STAT1* (активатор транскрипции 1), который угнетает ядерную транслокацию *RUNX2*, нарушая остеобластогенез [187].

С другой стороны, в плазме у пациентов с БИК отмечено повышение экспрессии мкРНК-96-5p, которая отрицательно влияет на HB-EGF (гепарин-

связывающий фактор роста эпидермального фактора роста), что способствует дифференцировке МСК по линии остеобластогенеза [188]. Кроме того, 5-кратное повышение мкРНК-22-3р через подавление HDAC6 предположительно стимулирует остеобластную дифференцировку МСК [189]. МкРНК-27а-3р, по-видимому, компенсаторно повышает BMP-зависимое костеобразование через подавление гремлин 1 (GREM1) и негативно влияет на адипогенез, снижая экспрессию *PPAR-γ* [190-192]. В свою очередь, мкРНК-328-3р способствует увеличению экспрессии *ALP*, однако не влияет на минерализацию кости [193]. мкРНК-7b-5р способствует ингибированию ключевой регулирующей молекулы остеокластогенеза DC-STAMP (дендритного клеточно-специфичного трансмембранного белка) [194], который опосредует слияние моноядерных остеокластов в гигантские многоядерные клетки [195], в то время как многоядерность остеокластов обуславливает их резорбтивную активность.

Следует отметить, что при ЭГ мы не выявили корреляций между мкРНК в плазме, уровнем кортизола в суточной моче и сывороточными маркерами костного ремоделирования, что может быть предметом дальнейшего изучения. Вместе с тем, изменение экспрессии мкРНК в плазме крови можно рассматривать не как прямое следствие дисбаланса мкРНК в костной ткани и регистрацию этих изменений мкРНК в периферической крови, а как биомаркеры негативных процессов в костной ткани. Так у пациентов с остеопорозом и переломами и у пациентов с остеопорозом на фоне СД были выявлены изменения экспрессии целого ряда мкРНК в периферической крови [185; 196]. Следует отметить, что и в той, и в другой группе пациентов было выявлено изменение уровня мкРНК-550а. У пациентов с ЭГ мы также выявили значимое повышение мкРНК-550а-3р, что подтверждает ее возможную роль в качестве потенциального биомаркера изменений костного метаболизма.

Изменения экспрессии мкРНК в плазме у пациентов с ЭГ наглядно представлены на Рисунке 4, а распределение по значимости на Рисунке 5.

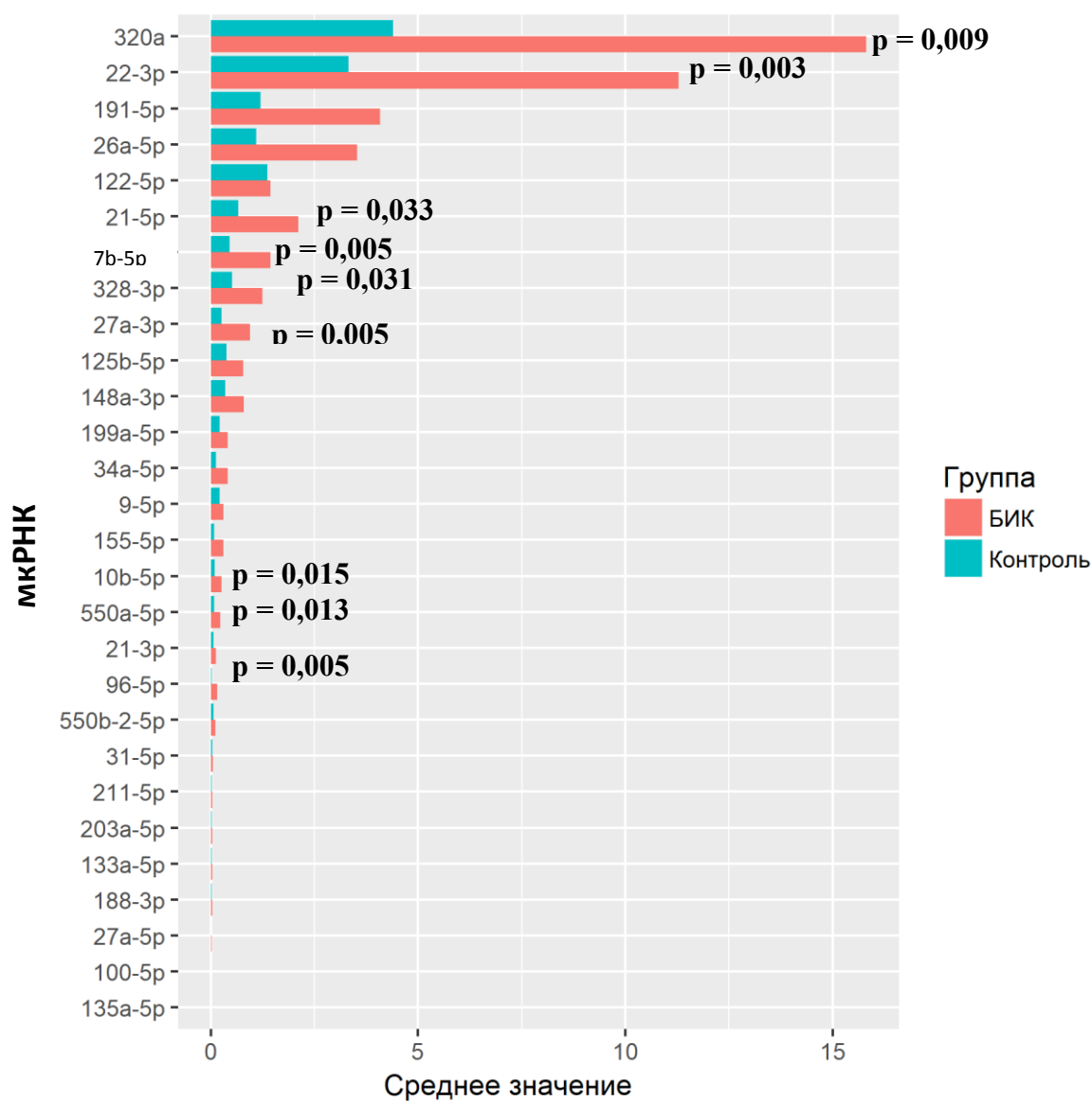


Рисунок 4 - Экспрессия мкРНК в плазме крови у пациентов с БИК по сравнению с группой контроля

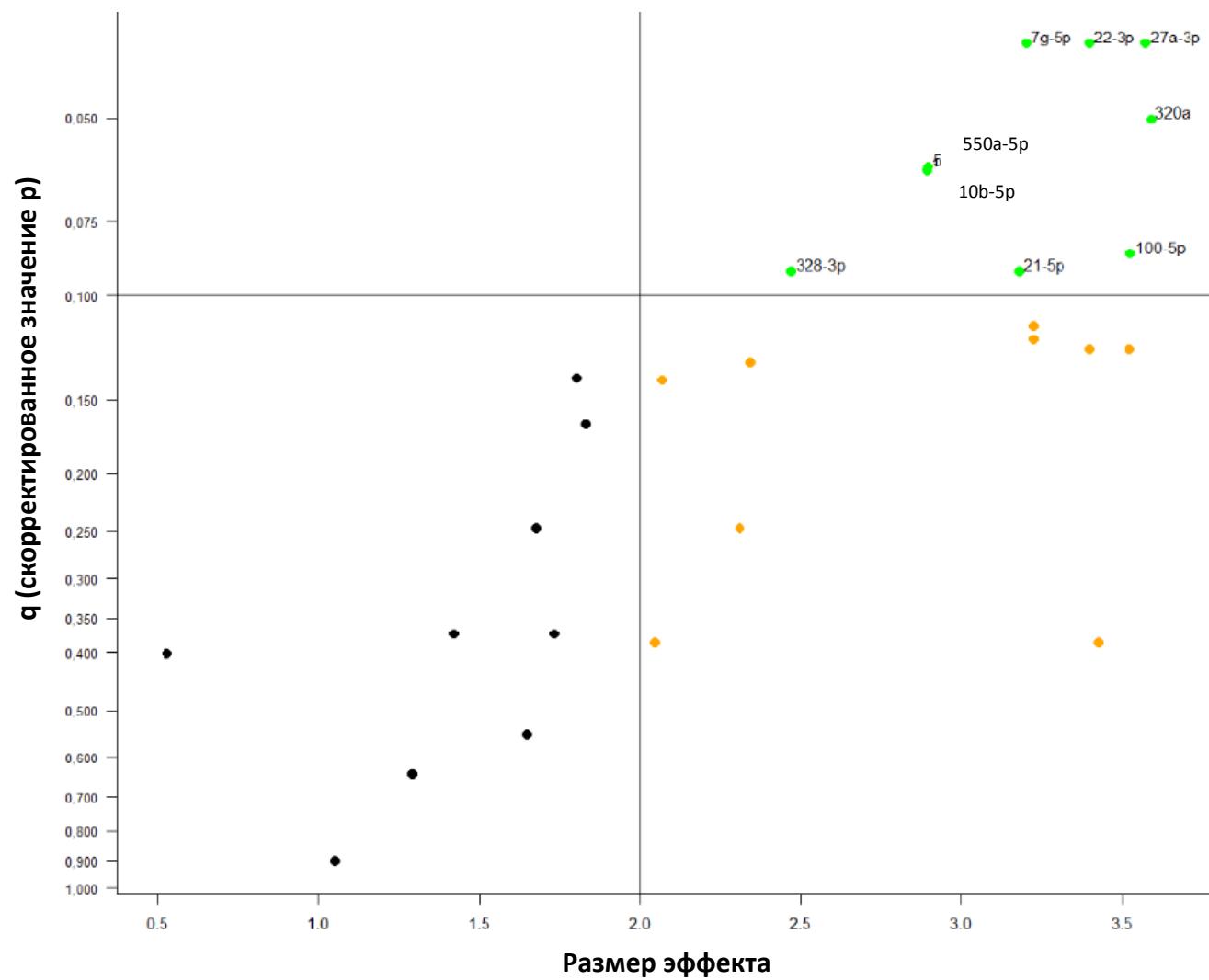


Рисунок 5 - Распределение значений экспрессии мкРНК в плазме у пациентов с ЭГ

3.3 Состояние внеклеточных агонистов канонического Wnt/ β -катенин-сигнального пути среди пациентов в активной стадии эндогенного гиперкортицизма

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. Так, уровень склеростина был статистически значимо повышен в периферической крови пациентов с ЭГ [197], а в настоящем исследовании экспрессия гена склеростина была повышена в костной ткани пациентов с БИК. 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 11.

Таблица 11 - 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

Продолжение таблицы 11

Параметры	БИК, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	Р
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

**Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). БИК – болезнь Иценко-Кушинга; ИМТ – индекс массы тела; СТх – С-концевой телопептид коллагена I-го типа.*

Пациенты с БИК имели повышенный уровень свободного кортизола в суточной моче – 1387 (10,31-1743) нмоль/сут, в слюне в 23:00 - 18,1 (12,8-23,3) нмоль/л ($p < 0,001$ против контроля) и отсутствие подавления кортизола в сыворотке крови на фоне приема 1 мг дексаметазона. Средняя расчетная продолжительность БИК составила приблизительно 6 (4-8) лет. Уровень остеокальцина в сыворотке крови был значимо снижен у пациентов с БИК по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). В группе пациентов с БИК наблюдались низкотравматические переломы, главным образом, компрессионные переломы тел позвонков, при этом разница по сравнению с группой контроля была статистически значимой ($p = 0,001$) (Таблица 11).

У пациентов с БИК по сравнению с группой контроля, составленной из здоровых добровольцев, в сыворотке крови впервые обнаружено выраженное повышение Wnt3a до 0,15 (0,04; 0,23) нг/мл против 0,04 (0,01-0,13) нг/мл $p = 0,017$

и Wnt10b до 2621 (2226; 3688) пг/мл против 1917 пг/мл (1722-2550) $p = 0,008$.
Изменения концентрации обоих Wnt белков представлены на Рисунках 6 и 7.

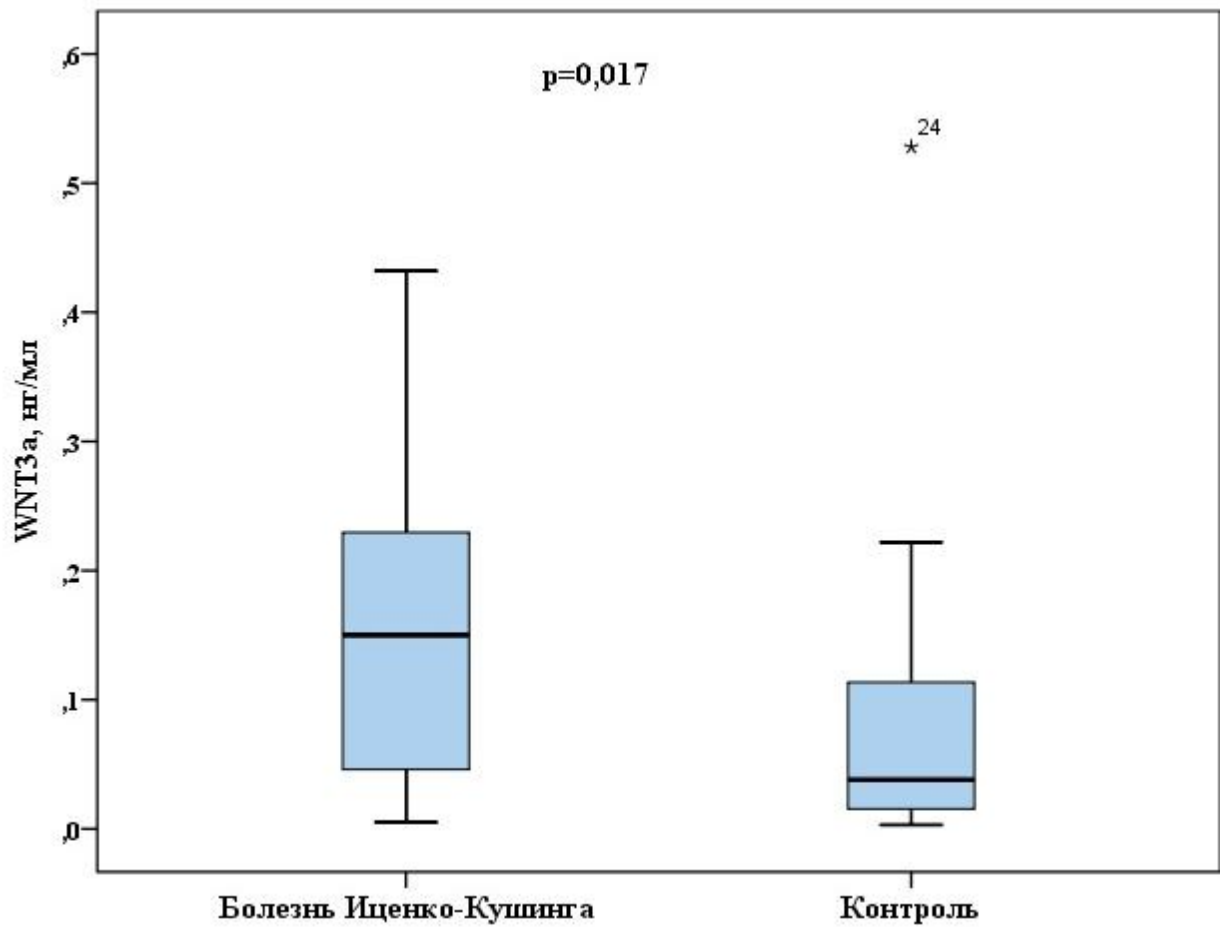


Рисунок 6 - Wnt3a в периферической крови у пациентов с БИК по сравнению с группой контроля

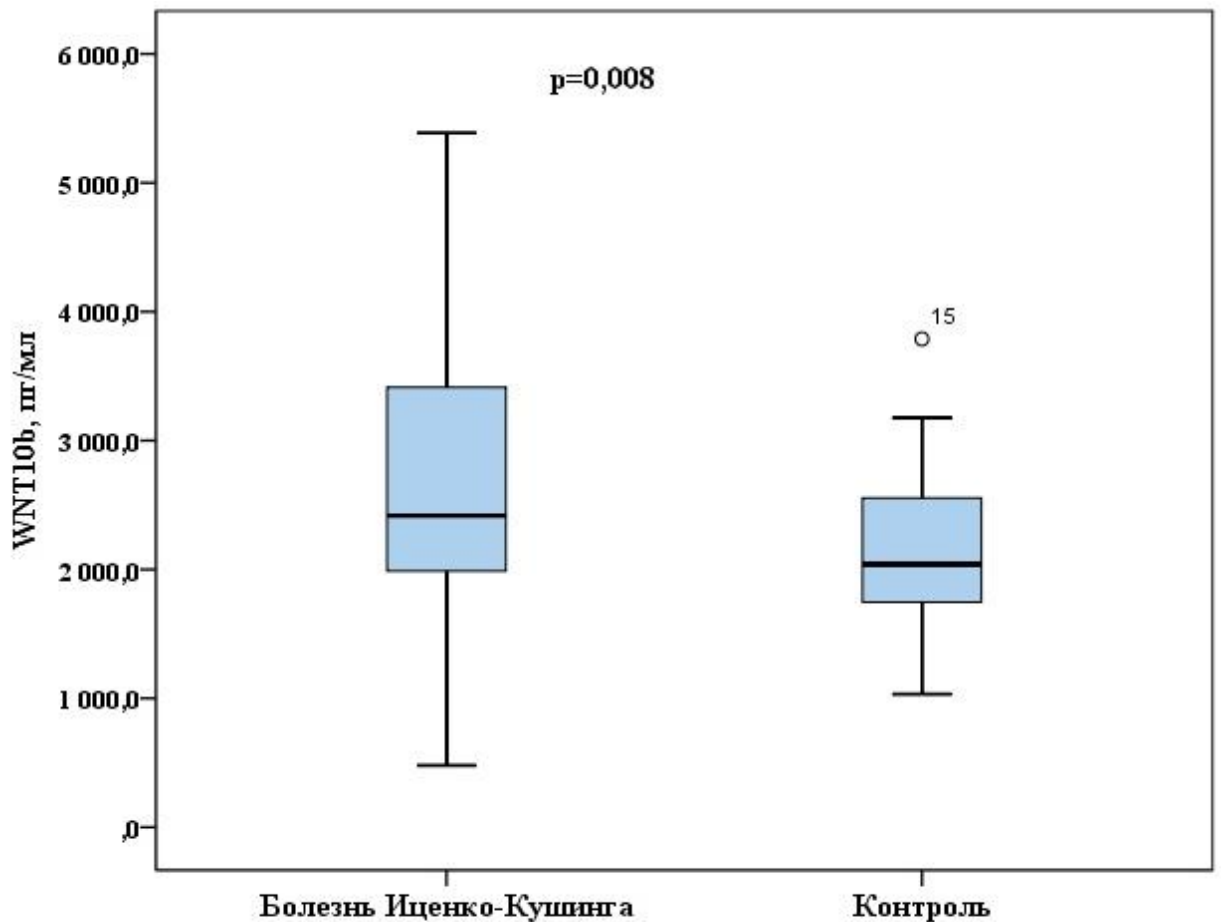


Рисунок 7 - Wnt10b в периферической крови у пациентов с БИК по сравнению с группой контроля

Повышение обоих исследованных агонистов Wnt-сигнального пути в сыворотке крови, по всей видимости, носит компенсаторный характер. Интересно, что в костной ткани пациентов с БИК экспрессия *Wnt3a* не изменялась, однако уровень белка в периферической крови был значимо выше по сравнению с контрольной группой. Данный феномен может быть объяснен увеличением свободной фракции Wnt3a в циркулирующей крови в виду снижения образования комплекса Wnt3a с антагонистом SFRP4 [198] за счет подавления экспрессии последнего в костной ткани. Представленную гипотезу также подтверждает корреляция уровня Wnt3a в сыворотке крови с уровнем свободного кортизола в суточной моче ($\rho = 0,367$ $p = 0,007$) (Рисунок 8).

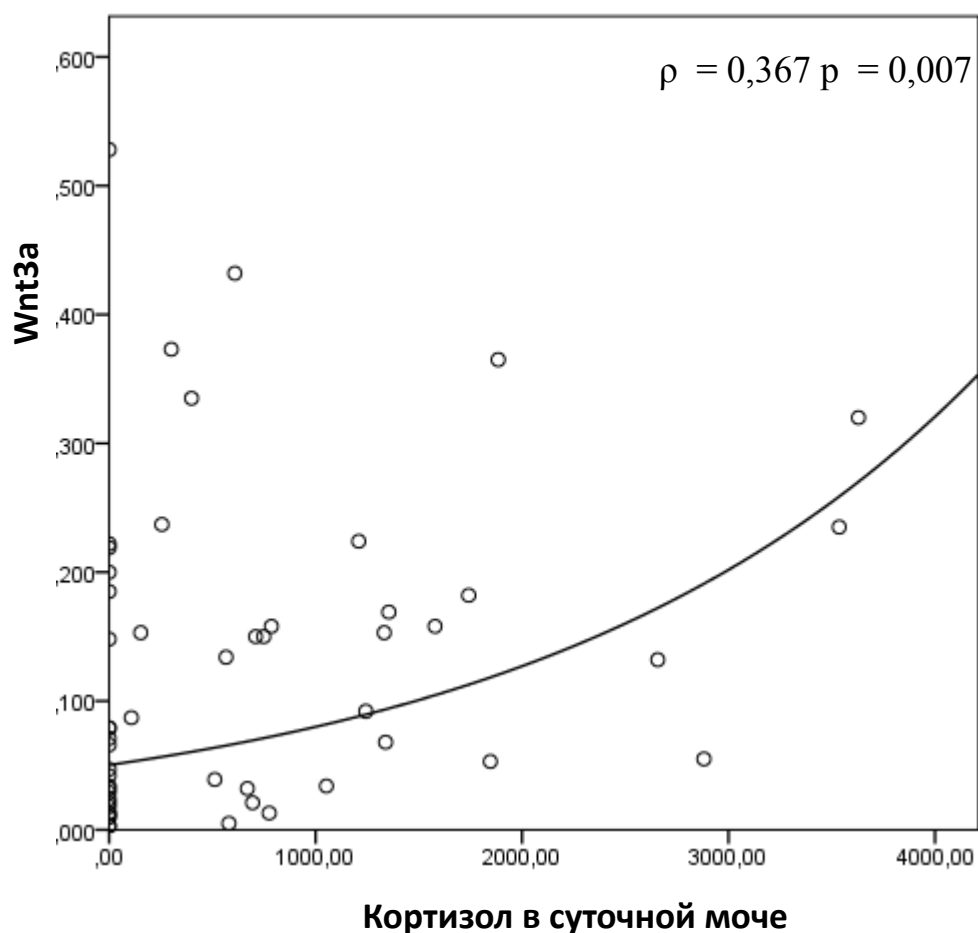


Рисунок 8 - Корреляция сывороточного уровня Wnt3a с уровнем кортизола в суточной моче у пациентов с БИК

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 остеокальцина обратно коррелировал с кортизолом в суточной моче $\rho = -0,562$ $p < 0,001$ и одновременно с Wnt10b в сыворотке крови $\rho = -0,334$ $p = 0,002$ (Рисунок 9). При этом непосредственной зависимости между Wnt10b и кортизолом в суточной моче выявлено не было $\rho = 0,202$ $p = 0,071$.

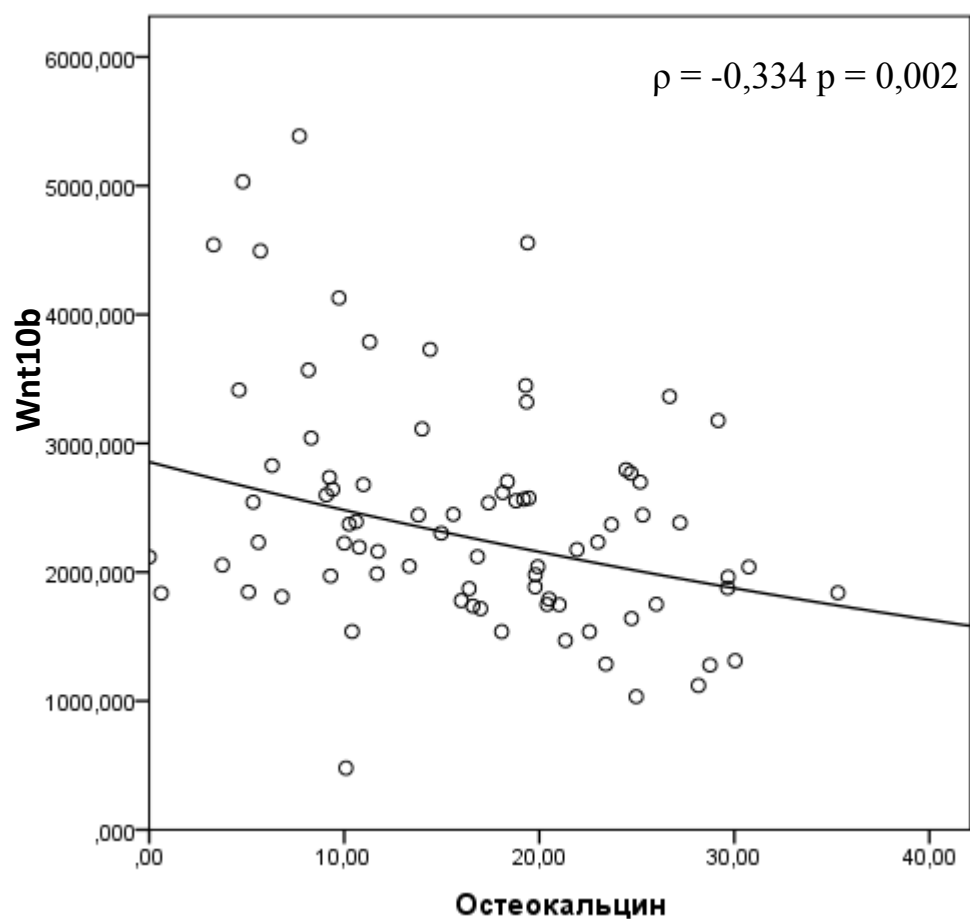


Рисунок 9 - Отрицательная корреляция сывороточного уровня Wnt10b с остеокальцином у пациентов с БИК

3.4 Анализ экспрессии матричных РНК и микроРНК в костной ткани у пациентов в активной стадии акромегалии

Общие характеристики пациентов с акромегалией и НАГ, включенных в исследование по оценке изменения экспрессии мРНК и мкРНК в образцах костной ткани, приведены в Таблице 12.

Таблица 12 - Основные характеристики пациентов с акромегалией и НАГ, включенных в исследование по оценке экспрессии мРНК и мкРНК в образцах костной ткани*

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

**Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). НАГ – неактивная аденома гипофиза; ИМТ – индекс массы тела; СТх – С-концевой телопептид коллагена I-го типа.*

Биохимическая активность акромегалии была подтверждена высокими уровнями ИРФ-1 - 792 (95% ДИ 582-1003) нг/мл и базального СТГ - 10,1 (2,34-22,5) нг/мл, а продолжительность заболевания составила приблизительно 7 (3-10) лет. У пациентов с НАГ уровни ИРФ-1 - 110 (45-175) нг/мл и гормонов гипофиза (ТТГ, пролактина) находились в пределах референсных значений. Уровни остеокальцина и СТх в сыворотке крови были, ожидаемо, повышены у пациентов с акромегалией по сравнению с пациентами с НАГ ($p < 0,05$). В группе пациентов с акромегалией наблюдались низкотравматические переломы, однако разница не была статистически значимой (Таблица 12).

В Таблице 13 представлены данные об изменении экспрессии мРНК в образцах костной ткани у пациентов с акромегалией по сравнению с НАГ.

Таблица 13 - Результаты изменения экспрессии мРНК у пациентов с акромегалией по сравнению с НАГ с поправками для множественных сравнений*

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

Продолжение таблицы 13

Ген	Полное название гена	НАГ	Акромегалия М (95% ДИ)	p	q
<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- гуанинфосфорибозилтра нсфераза 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

Продолжение таблицы 13

Ген	Полное название гена	НАГ	Акромегалия М (95% ДИ)	p	q
<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 фризеда 1	1	1 (0,38-1,62)	0,998	1
<i>SFRP4</i>	Связывающий белок фризеда 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>TNFRSF1 1A (RANK)</i>	Рецептор ядерного фактора κB	1	1,38 (1,06-1,69)	0,022	0,607
<i>TNFRSF1 1B (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

Продолжение таблицы 13

Ген	Полное название гена	НАГ	Акромегалия М (95% ДИ)	р	q
<i>WNT10b</i>	Wnt белок 10В	1	10,11 (5,96-14,26)	0,001	0,017
<i>WNT3a</i>	Wnt белок 3А	1	1,18 (0,41-1,96)	0,619	1

*Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). НАГ – неактивная аденома гипофиза.

При акромегалии, несмотря на повышенные уровни маркеров костного ремоделирования в сыворотке крови, мы не обнаружили существенных изменений в экспрессии генов, ответственных за функцию остеобластов и формирование костной ткани, а также резорбцию костной ткани [163; 172; 199]. Вместе с тем, выявлено двукратное снижение экспрессии мРНК щелочной фосфатазы (*ALP*), которая является маркером активности зрелых остеобластов и фактора транскрипции *TWIST1*, влияющего на остеогенную дифференцировку. Кроме того, обращает на себя внимание сильное подавление экспрессии гена лептина (*LEP*), который согласно некоторым исследованиям способствует накоплению бета-катенина (компонента Wnt-сигнального пути) в ядре клетки, а также снижает экспрессию *ALP* [200].

В условиях избытка СТГ и ИРФ-1 выявлено повышение экспрессии как агониста (*Wnt10b*), так и антагониста (*Dkk1*) Wnt-сигнального пути, тем не менее, ключевой фактор транскрипции остеобластов (*RUNX2*) не изменился, вероятно, из-за достигнутого баланса между формированием и резорбцией костной ткани при длительном течении акромегалии. Экспрессия *SOST* была повышена $p = 0,043$, однако после применения коррекции множественных сравнений $q = 1$, данное изменение оказалось незначимым. Также при акромегалии не была нарушена регуляция *SFRP1* и *Wnt3a*. Экспрессия мРНК *IGF1* в костной ткани была, ожидаемо, подавлена в ответ на высокий уровень ИРФ-1 в сыворотке.

Учитывая отсутствие изменения экспрессии генов, способствующих формированию костной ткани, несмотря на повышение маркеров костного

ремоделирования при акромегалии (как в нашем исследовании, так и во всех опубликованных ранее работах) увеличения скорости костного обмена не происходит. Кроме того, повышение скорости костного обмена, которое наблюдается при тиреотоксикозе, гиперпаратиреозе или в постменопаузе, как правило, характеризуется значимым снижением МПК [201], что не характерно для пациентов с акромегалией, имеющих даже повышенную МПК. Вместе с тем, другим состоянием, характеризующимся повышением маркеров, является эндохондральная оссификация в период роста человека и формирования скелета или при заживлении переломов [202; 203], что было критерием исключения из исследования. Кальцификация матрикса требуется в качестве каркаса для клеток-предшественников остеобластов, которые выделяют остеоид, формируя костную трабекулу. Во время физиологической эндохондральной оссификации хондроциты способствуют торможению синтеза коллагена, запуская синтез щелочной фосфатазы, что необходимо для минерализации кости [202]. Однако у пациентов с акромегалией, напротив, было выявлено подавление *ALP*.

Таким образом, мы полагаем, что при акромегалии, вероятнее всего, происходят процессы аналогичные эндохондральной оссификации с нарушением механизмов конечной дифференцировки остеобластов, а именно синтеза щелочной фосфатазы. И возможно вследствие этого нарушается качество костной ткани.

Данная гипотеза подтверждается наличием сильных отрицательных корреляций между уровнем ИРФ-1 и экспрессией *ALP* и *TWIST1* (Таблица 14). А также отсутствием связи между остеокальцином или СТх в сыворотке крови и экспрессией *COL1A1*, *COL1A2*, *BGLAP* или *ALP* в образцах костной ткани.

Таблица 14 - Статистически значимые корреляции экспрессии мРНК в образцах костной ткани с уровнями ИРФ-1, СТГ и маркеров костного ремоделирования в сыворотке крови у пациентов с акромегалией

мРНК	ИРФ-1	СТГ	Остеокальцин	СТх
<i>ALP</i>	$\rho = -0,579$ $p = 0,012$	-	-	-
<i>BMP7</i>	$\rho = 0,683$ $p = 0,002$	-	-	-
<i>Dkk1</i>	$\rho = 0,618$ $p = 0,006$	-	$\rho = 0,562$ $p = 0,015$	-
<i>FGFR1</i>	$\rho = 0,706$ $p = 0,001$	-	$\rho = 0,667$ $p = 0,002$	$\rho = 0,664$ $p = 0,002$
<i>HPRT1</i>	$\rho = -0,689$ $p = 0,002$	-	$\rho = -0,515$ $p = 0,029$	-
<i>IGF1</i>	$\rho = -0,642$ $p = 0,004$	-	-	-
<i>IGFBP2</i>	$\rho = -0,499$ $p = 0,050$	-	-	-
<i>IL6</i>	$\rho = -0,768$ $p < 0,001$	-	-	-
<i>IL6R</i>	$\rho = -0,577$ $p = 0,012$	-	-	-
<i>PCDHA6</i>	$\rho = -0,765$ $p < 0,001$	-	-	-
<i>SFRP1</i>	$\rho = -0,529$ $p = 0,024$	-	-	-
<i>SOST</i>	$\rho = 0,818$ $p < 0,001$	$\rho = 0,812$ $p = 0,008$	$\rho = 0,732$ $p = 0,001$	$\rho = 0,607$ $p = 0,006$
<i>STAT1</i>	$\rho = 0,500$ $p = 0,035$	-	-	-
<i>TNFSF11</i>	-	-	$\rho = 0,486$ $p = 0,041$	$\rho = 0,484$ $p = 0,041$
<i>TWIST1</i>	$\rho = -0,810$ $p < 0,001$	-	-	-
<i>VEGFA</i>	$\rho = -0,803$ $p < 0,001$	-	-	-
<i>WNT10B</i>	$\rho = 0,701$ $p = 0,003$	-	-	-

Следует отметить, что базальный СТГ значимо коррелировал с уровнем сывороточного остеокальцина $\rho = 0,821$ $p = 0,023$ и СТх $\rho = 0,810$ $p = 0,015$. При этом связь между ИРФ-1 и СТх была менее выраженной $\rho = 0,636$ $p = 0,011$, а с остеокальцином и вовсе не было выявлено статистически значимой корреляции $\rho = 0,503$ $p = 0,067$. Интересно, что ни уровень базального СТГ, ни ИРФ-1 не коррелировали с экспрессией генов *COL1A1*, *COL1A2* или *BGLAP* в образцах костной ткани.

При исследовании экспрессии мРНК, ответственных за функцию остеокластов и остеокластогенеза [168], значимых изменений, в основном, не выявлено, включая путь RANKL/RANK/OPG. Вместе с тем, *PCDHA6* (молекула, ответственная за адгезию и взаимодействие клеток с клетками [204]), *IL6* и *IL6R* были подавлены.

Изменения экспрессии мРНК в костной ткани пациентов с акромегалией сведены на Рисунке 10.

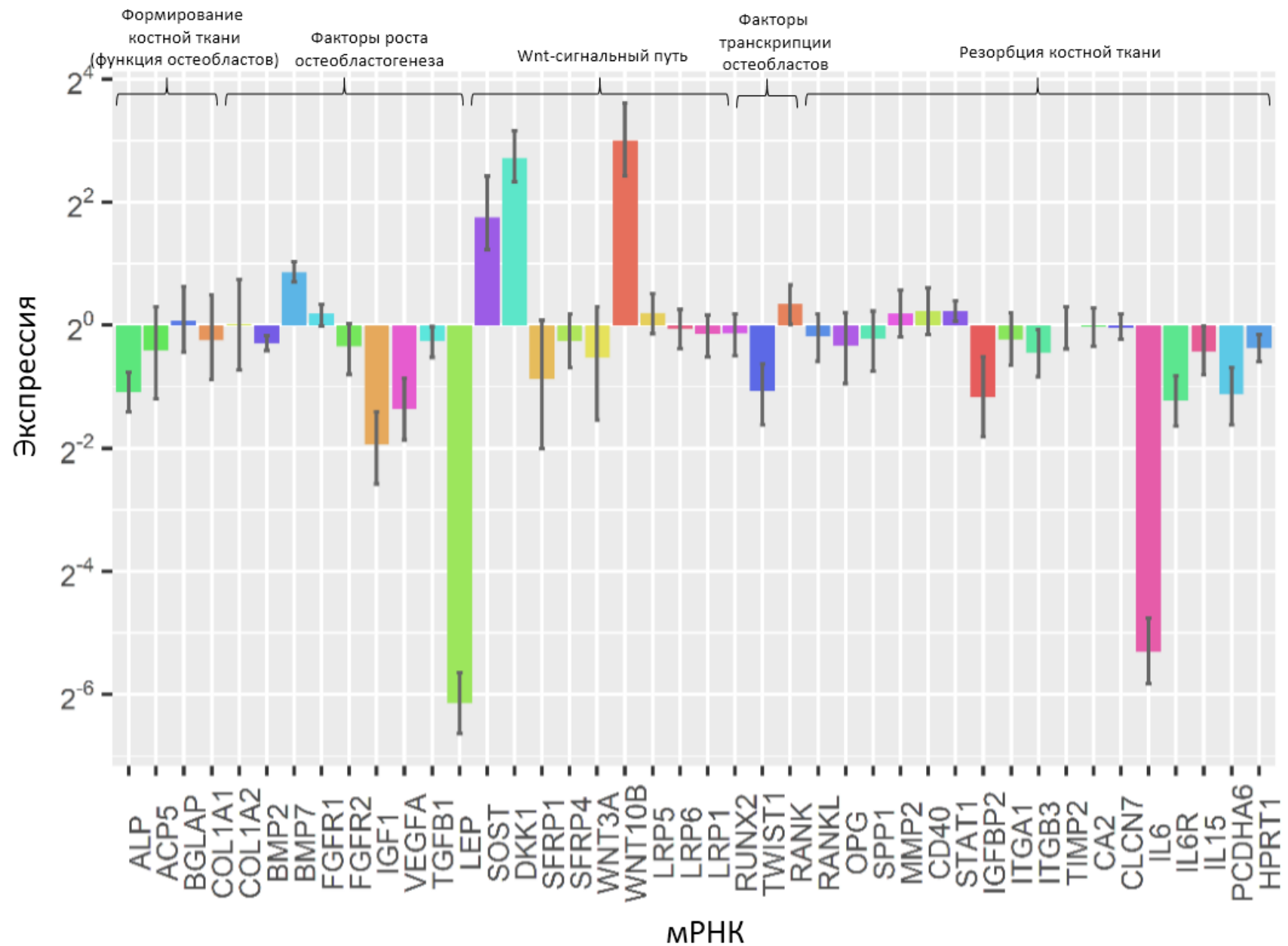


Рисунок 10. Экспрессия мРНК у пациентов с акромегалией в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

Нарушения костного ремоделирования может быть реализовано, в том числе через изменение эпигенетической регуляции костного обмена. Так, усиление *BMP7* при акромегалии способствует фосфорилированию SMAD1 и SMAD5, которые являются ключевыми факторами транскрипции дифференцировки МСК по линии остеобластов [205]. Вместе с тем, подавление мкРНК-199а-5р в сочетании со снижением экспрессии *BMP2* способствует повышению уровня SMAD1 и улучшению формирования эндохондральной кости через пролиферацию хондроцитов [205]. 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 15.

Таблица 15 - Результаты изменения экспрессии мкРНК у пациентов с акромегалией по сравнению с НАГ с поправками для множественных сравнений*

мкРНК	НАГ	Акромегалия, М (95% ДИ)	р	q
мкРНК-21-5р	1	1,8 (1,45-2,15)	< 0,001	0,007
мкРНК-210-5р	1	2,66 (1,85-3,48)	0,001	0,017
мкРНК-135а-5р	1	0,55 (0,36-0,75)	< 0,001	0,007
мкРНК-155-5р	1	1,38 (0,93-1,83)	0,092	0,959
мкРНК-148а-3р	1	1,51 (0,97-2,05)	0,063	0,757
мкРНК-122-5р	1	1,64 (1,18-2,10)	0,01	0,156
мкРНК-125b-5р	1	2,62 (1,75-3,49)	0,001	0,03
мкРНК-9-5р	1	2,23 (1,48-2,98)	0,004	0,07
мкРНК-328-3р	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-31-5р	1	0,45 (0,25-0,65)	< 0,001	0,001
мкРНК-34а-5р	1	2,52 (1,87-3,16)	< 0,001	0,006
мкРНК-7b-5р	1	0,96 (0,57-1,35)	0,84	1
мкРНК-10b-5р	1	1,64 (1,01-2,27)	0,048	0,621
мкРНК-22-3р	1	1,72 (1,21-2,23)	0,009	0,153
мкРНК-203а-5р	1	2,12 (1,21-3,03)	0,02	0,298
мкРНК-100-5р	1	1,38 (0,91-1,85)	0,104	0,959
мкРНК-133а-5р	1	1,34 (0,71-1,97)	0,265	1
мкРНК-21-3р	1	1,48 (0,92-2,05)	0,087	0,959
мкРНК-550а-5р	1	0,69 (0,40-0,99)	0,043	0,604

Продолжение таблицы 15

мкРНК	НАГ	Акромегалия, М (95% ДИ)	p	q
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

*Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). НАГ – неактивная аденома гипофиза.

Как показано в Таблице 15, в образцах костной ткани у пациентов с акромегалией обнаружено подавление экспрессии мкРНК-29а, мкРНК-29b и мкРНК-29с. Как уже было описано, мкРНК-29а участвует в регуляции Wnt-сигнального пути, влияя на трансляцию *Dkk1*, *Kremen2* и *SFRP1* [43]. Кроме того, в одном из исследований, усиление мкРНК-29а и мкРНК-29 коррелировало с уменьшением остеонектина во время фаз созревания и минерализации костного матрикса [206].

У пациентов с акромегалией в образцах костной ткани также было выявлено более чем двукратное повышение мкРНК-328-3p, которая ранее предлагалась в качестве сывороточного биомаркера для диагностики постменопаузального остеопороза [207], в виду выраженного снижения мкРНК-328 в сыворотке в когорте пациенток с ПМО [20] и остеопоротическим переломом [207] по сравнению с контрольной группой. Экспрессия мкРНК-328-5p была обнаружена во многих тканях, в том числе в клетках глиомы, способствуя инвазивному росту

опухоли посредством подавления *SFRP1* [209]. Известно, что другим таргетом мкРНК-328 является трансмембранный гликопротеин CD44, который экспрессируется в остеоцитах вместе с макрофагами, помогая внеклеточному связыванию с коллагеном. Кроме того, было показано, что подавление мкРНК-328-3р снижает активность *ALP*, но не влияет на кальцификацию новообразованной кости [193]. С учетом сниженной экспрессии *ALP*, повышение мкРНК-328-3р может носить и компенсаторный характер.

Некоторые из исследованных мкРНК необходимы для перехода от остеогенной к адипогенной дифференциации МСК. Так, таргетами мкРНК-27а являются ключевой транскрипционный фактор адипогенеза *PPAR-γ* и гремлин 1 (*GREM1*), ингибирующий BMP-зависимое костеобразование [190-192]. Следовательно, снижение мкРНК-27а-5р при акромегалии способствует дифференцировке МСК в сторону адипогенеза. Кроме того, при акромегалии оказалась повышена экспрессия мкРНК-188-3р, которая, согласно данным литературы, регулирует переключение между остеогенной и адипогенной дифференцировкой МСК костного мозга. Усиление экспрессии мкРНК-188-3р приводило к уменьшению костеобразования и увеличению накопления жировой ткани в костном мозге у мышей [174]. Также мы выявили повышение экспрессии мкРНК-125b-5р, которая ингибирует остеогенную дифференцировку посредством регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки МСК [173; 175]. Кроме того, у пациентов с акромегалией в образцах костной ткани было обнаружено усиление экспрессии мкРНК-34а-5р, что способствует подавлению остеобластогенеза посредством снижения уровня белков, связанных с клеточным циклом (*CDK4*, *CDK6*, *Cyclin D1*) [137]. Таким образом, подавление экспрессии мкРНК-27а-5р, мкРНК-29а, мкРНК-29b, мкРНК-29с и повышение активности мкРНК-125b-5р, мкРНК-188-3р, мкРНК-34а-5р в образцах костной ткани пациентов с акромегалией в совокупности способствуют подавлению остеогенеза.

Так же, как и у пациентов с БИК, у больных с акромегалией в костной ткани были запущены компенсаторные механизмы. Так, было выявлено значимое изменение экспрессии мкРНК-23а, мкРНК-135, мкРНК-204, мкРНК-210, мкРНК-

211, которые, в основном, через влияние на *RUNX2* [33; 35; 36; 181] поддерживают остеобластогенез. Интересно отметить, что мы обнаружили повышение экспрессии мкРНК-21-5p (но не мкРНК-21-3p), которая согласно данным литературы через ингибирование *Spry-1* способствует дифференцировке остеобластов из МСК [210], одновременно поддерживая выживаемость остеокластов [49; 55].

Сообщалось о нескольких потенциальных функциях мкРНК-31 [182; 211-214], экспрессия которой оказалась снижена на 50% в образцах костной ткани пациентов с акромегалией. В человеческих МСК избыточная экспрессия мкРНК31 подавляла остеогенез, тогда как снижение мкРНК-31 наоборот усиливала его [211]. В другом исследовании повышение экспрессии мкРНК-31 негативно влияло на экспрессию факторов транскрипции остеобластов, но не на *RUNX2* [212]. Кроме того, подавление мкРНК-31-5p может ослаблять RANKL-зависимый остеокластогенез и резорбцию кости посредством регуляции RhoA (сигнального белка, влияющего на клеточный цикл) [182].

Наблюдаемое подавление мкРНК-199a-5p способствует дифференциации МСК по линии хондрогенеза [178]. В настоящем исследовании мы также обнаружили повышенную экспрессию мкРНК-9-5p. Согласно опубликованным исследованиям [215-217], мкРНК-9 участвует в угнетении пролиферации и выживания клеток-предшественников хондроцитов через влияние на протогенин. Экспрессия мкРНК-9-5p была увеличена в образцах хрящевой ткани пациентов с остеоартритом [215; 216], повышая пролиферацию и подавляя апоптоз хондроцитов [217].

В целом изменения экспрессии мкРНК в костной ткани пациентов с акромегалией сведены на Рисунке 11.

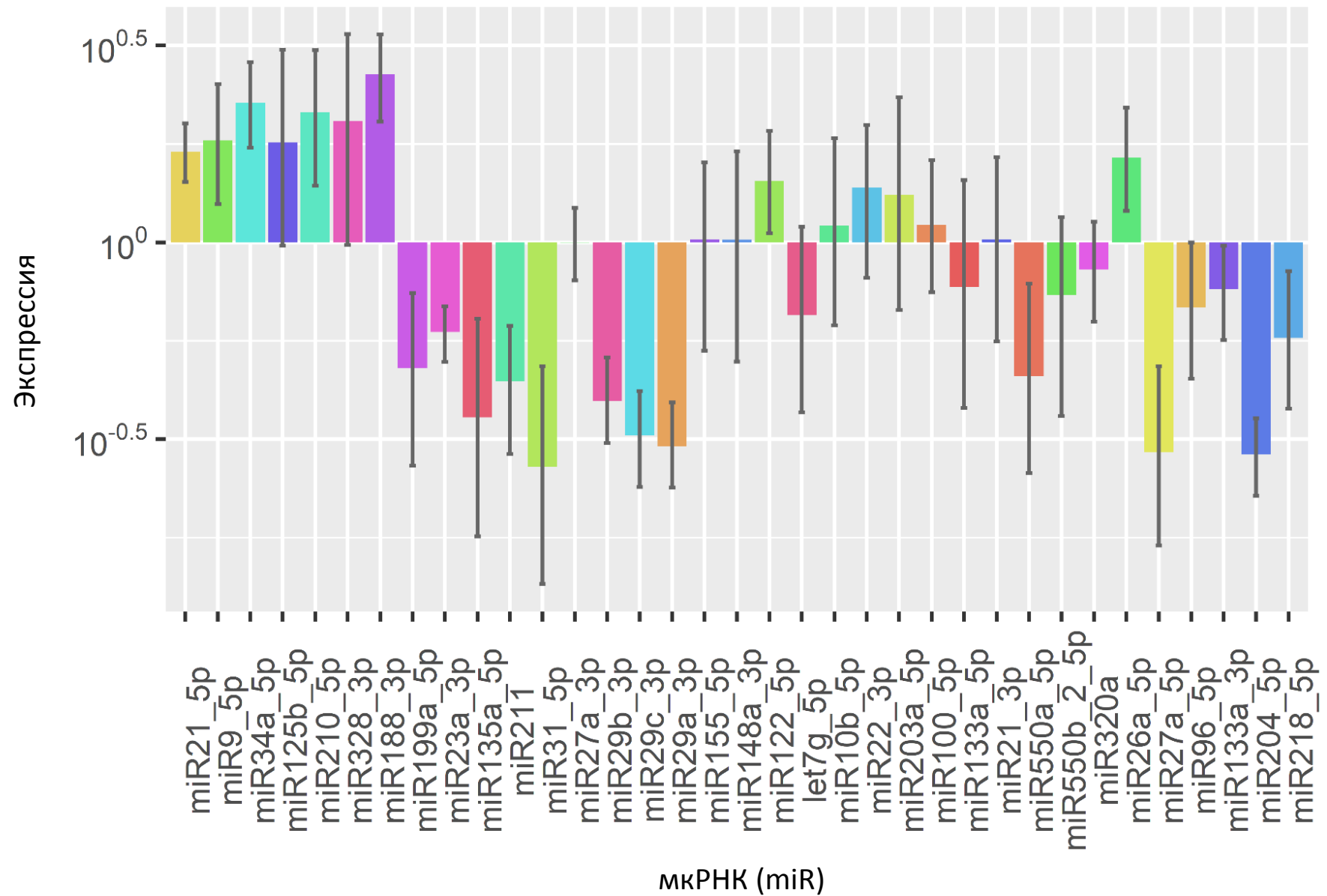


Рисунок 11 - Экспрессия мкРНК у пациентов с акромегалией в образцах костной ткани по сравнению с НАГ

У пациентов с акромегалией мы выявили значимые корреляционные зависимости между уровнями ИРФ-1, СТГ, маркерами костного ремоделирования и экспрессией некоторых мкРНК в образцах костной ткани, которые представлены в Таблице 16.

Таблица 16 - Статистически значимые корреляции экспрессии мкРНК в образцах костной ткани с уровнями ИРФ-1, СТГ и маркеров костного ремоделирования в сыворотке крови у пациентов с акромегалией

мкРНК	ИРФ-1	СТГ	Остеокальцин	СТх
мкРНК21-5p	-	-	$\rho = 0,482$ $p = 0,043$	-
мкРНК-135a-5p	$\rho = -0,528$ $p = 0,024$	-	-	-
мкРНК-125b-5p	-	-	-	$\rho = 0,519$ $p = 0,023$
мкРНК-125b-5p	$\rho = 0,610$ $p = 0,007$	-	-	-
мкРНК-211	$\rho = -0,530$ $p = 0,02$	-	-	-
мкРНК-31-5p	$\rho = -0,737$ $p < 0,001$	$\rho = -0,733$ $p = 0,025$	$\rho = -0,487$ $p = 0,041$	-
мкРНК-34a-5p	$\rho = 0,691$ $p = 0,001$	-	$\rho = 0,520$ $p = 0,027$	$\rho = 0,457$ $p = 0,049$
мкРНК-550a-5p	$\rho = -0,554$ $p = 0,017$	-	-	-
мкРНК-27a-5p	$\rho = -0,613$ $p = 0,007$	-	$\rho = -0,632$ $p = 0,005$	$\rho = -0,632$ $p = 0,026$
мкРНК-188-3p	$\rho = 0,652$ $p = 0,003$	$\rho = 0,917$ $p = 0,001$	$\rho = 0,585$ $p = 0,011$	$\rho = 0,506$ $p = 0,027$
мкРНК-133a-3p	$\rho = -0,652$ $p = 0,003$	-	-	-
мкРНК-204-5p	$\rho = -0,940$ $p < 0,001$	$\rho = -0,845$ $p = 0,004$	$\rho = -0,679$ $p = 0,002$	$\rho = -0,678$ $p = 0,001$
мкРНК-22-3p	-	$\rho = 0,700$ $p = 0,036$	-	-
мкРНК-23a-3p	$\rho = -0,584$ $p = 0,011$	-	-	-

Продолжение таблицы 16

мкРНК	ИРФ-1	СТГ	Остеокальцин	СТх
мкРНК-27a-5p	$\rho_0 = -0,613$ $p = 0,007$	-	-	-
мкРНК-27a-3p	-	-	-	-
мкРНК-29a-3p	$\rho_0 = -0,698$ $p = 0,001$	-	-	-
мкРНК-29b-3p	$\rho_0 = -0,510$ $p = 0,03$	-	-	-
мкРНК-29c-3p	$\rho_0 = -0,633$ $p = 0,005$	-	-	-

Необходимо отметить, что мы не выявили разницы между уровнями мРНК или мкРНК у пациентов с низкотравматичными переломами в анамнезе. Тем не менее, количество таких пациентов было невелико, и давность переломов превышала 6 месяцев и не могла сказаться на результатах исследования.

3.5 Анализ экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов в активной стадии акромегалии

По аналогии с БИК, мы также исследовали экспрессию мкРНК в плазме крови пациентов с акромегалией, расширив группы пациентов и контроля. Клиническая характеристика участников, у которых определялась экспрессия мкРНК в плазме приведены в Таблице 17.

Таблица 17. Основные характеристики пациентов с акромегалией и группой контроля, включенных для исследования мкРНК в периферической крови*

Параметры	Акромегалия, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	Р
Количество пациентов	22	18	
Возраст (годы)	40 (36-44)	35 (30-39)	0,205
ИМТ (кг/м ²)	28 (25-31)	27 (22-32)	0,253
Пол (Ж(%): М(%))	17 (77) : 5 (23)	17 (94) : 1 (6)	0,135
Кальций общий (ммоль/л)	2,33 (2,25-2,42)	2,33 (2,29-2,37)	0,131
Креатинин (мкмоль/л)	63 (58-67)	61 (50-73)	0,112
Остеокальцин (нг/мл)	50 (36-63,9)	16,7 (12,5-20,9)	< 0,001
СТх (нг/мл)	1,11 (0,73-1,49)	0,32 (0,24-0,41)	< 0,001
ИРФ-1	752 (577-926)	195 (139-251)	< 0,001
L1-L4 Z-критерий	0,49 (-0,17 – 1,16)	-0,08 (-0,71 – 0,55)	0,189
Femur Neck Z-критерий	0,75 (0,05-1,44)	0,13 (-0,54 – 0,79)	0,345
Низкотравматичные переломы, Количество (%), Тип	4 (18%). В 3-х случаях компрессионный перелом тел позвонков и в одном внепозвоночный перелом (лучевая кость)	0	0,06

*Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ). ИМТ – индекс массы тела; СТх – С-концевой телопептид коллагена I-го типа.

Пациенты с акромегалией имели повышенный уровень ИРФ-1 - 752 (577-926) нг/мл и отсутствие подавления СТГ в ходе проведения ПГТТ – 9,8 (1,56-18) нг/мл. Средняя расчетная продолжительность акромегалии составила

приблизительно 6 (3-8) лет. У лиц контрольной группы уровень ИРФ-1 был в пределах возрастных референсных значений и составил 195 (139-251) нг/мл, остальные гормоны гипофиза также находились в референсном интервале. Как и ожидалось, уровни остеокальцина и СТх в сыворотке были увеличены у пациентов с акромегалией по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). У 4-х пациентов с акромегалией наблюдались низкотравматические переломы, в основном компрессионные переломы тел позвонков, однако разница по сравнению с группой контроля была статистически незначимой ($p = 0,06$) (Таблица 17).

Результаты анализа уровней костноспецифических мкРНК в плазме крови у пациентов с акромегалией и здоровых добровольцев, составивших группу контроля, представлены в Таблице 18.

Таблица 18 - Результаты всех измеренных уровней мкРНК в образцах плазмы пациентов с акромегалией по сравнению с группой контроля с поправками для множественных сравнений*

мкРНК	Акромегалия, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	р	q
мкРНК-100-5p	0,022 (-0,001 - 0,045)	0,002 (0,001 - 0,003)	0,078	0,605
мкРНК-10b-5p	0,445 (-0,001 - 0,890)	0,091 (0,017 - 0,166)	0,118	0,605
мкРНК-125b-5p	0,755 (0,245 - 1,265)	0,375 (0,136 - 0,615)	0,171	0,605
мкРНК-199a-5p	0,414 (0,150 - 0,679)	0,222 (0,113 - 0,331)	0,173	0,605
мкРНК-320a	12,241 (4,324 - 20,157)	4,402 (2,751 - 6,053)	0,056	0,605
мкРНК-550a-5p	0,182 (0,061 - 0,303)	0,079 (0,025 - 0,132)	0,114	0,605
мкРНК-7b-5p	1,409 (0,367 - 2,451)	0,447 (0,190 - 0,705)	0,075	0,605
мкРНК-96-5p	0,080 (-0,002 - 0,162)	0,021 (0,007 - 0,034)	0,150	0,605
мкРНК-191-5p	2,766 (-0,146 - 5,677)	1,199 (0,534 - 1,864)	0,286	0,617
мкРНК-26a-5p	1,876 (0,840 - 2,913)	1,096 (0,368 - 1,824)	0,206	0,617
мкРНК-328-3p	1,438 (-0,264 - 3,140)	0,506 (0,159 - 0,854)	0,276	0,617
мкРНК-550b-2-5p	0,174 (-0,004 - 0,352)	0,066 (0,021 - 0,111)	0,233	0,617
мкРНК-9-5p	0,504 (-0,002 - 1,011)	0,215 (0,094 - 0,336)	0,261	0,617
мкРНК-22-3p	4,799 (2,114 - 7,484)	3,318 (1,445 - 5,190)	0,351	0,702
мкРНК-27a-3p	0,385 (0,193 - 0,577)	0,265 (0,059 - 0,471)	0,379	0,707

Продолжение таблицы 18

мкРНК	Акромегалия, М (95% ДИ)	Контроль, М (95% ДИ)	р	q
мкРНК-21-5p	0,961 (0,352 - 1,571)	0,666 (0,239 - 1,092)	0,411	0,719
мкРНК-135a-5p	0,001 (-0,000 - 0,001)	0,001 (0,000 - 0,002)	0,440	0,724
мкРНК-133a-5p	0,034 (-0,010 - 0,079)	0,021 (0,006 - 0,037)	0,563	0,789
мкРНК-188-3p	0,034 (0,004 - 0,063)	0,022 (-0,001 - 0,044)	0,515	0,789
мкРНК-203a-5p	0,015 (0,010 - 0,020)	0,018 (0,008 - 0,027)	0,545	0,789
мкРНК-27a-5p	0,006 (-0,001 - 0,014)	0,004 (-0,001 - 0,009)	0,603	0,803
мкРНК-21-3p	0,076 (0,033 - 0,119)	0,061 (0,002 - 0,120)	0,668	0,814
мкРНК-31-5p	0,054 (0,010 - 0,097)	0,042 (0,008 - 0,077)	0,662	0,814
мкРНК-122-5p	1,556 (0,423 - 2,689)	1,366 (0,304 - 2,428)	0,800	0,861
мкРНК-155-5p	0,101 (0,021 - 0,181)	0,085 (0,003 - 0,167)	0,776	0,861
мкРНК-34a-5p	0,101 (0,024 - 0,178)	0,126 (-0,011 - 0,262)	0,748	0,861
мкРНК-148a-3p	0,377 (0,117 - 0,638)	0,344 (0,068 - 0,620)	0,855	0,887
мкРНК-211-5p	0,023 (0,007 - 0,039)	0,022 (0,012 - 0,033)	0,915	0,915

**Данные представлены в виде средних (М) и 95% доверительного интервала (ДИ).*

При акромегалии так же, как и при ЭГ, мы обнаружили повышение экспрессии мкРНК-320a, которая негативно влияет на дифференцировку МСК в целом и на экспрессию генов транскрипционных и ростовых факторов различных тканей организма [179]. Тем не менее, после применения коррекции множественных сравнений, изменение уровня мкРНК-320a оказалось статистически незначимым ($q = 0,605$), что, вероятнее всего, обусловлено недостаточным размером выборки. Мы полагаем, что при увеличении числа участников исследования возможно выявление достоверного изменения уровня как мкРНК-320a, так, возможно, и других мкРНК, вовлеченных в регуляцию костного ремоделирования.

Изменения экспрессии мкРНК в плазме у пациентов с акромегалией наглядно представлены на Рисунке 12.

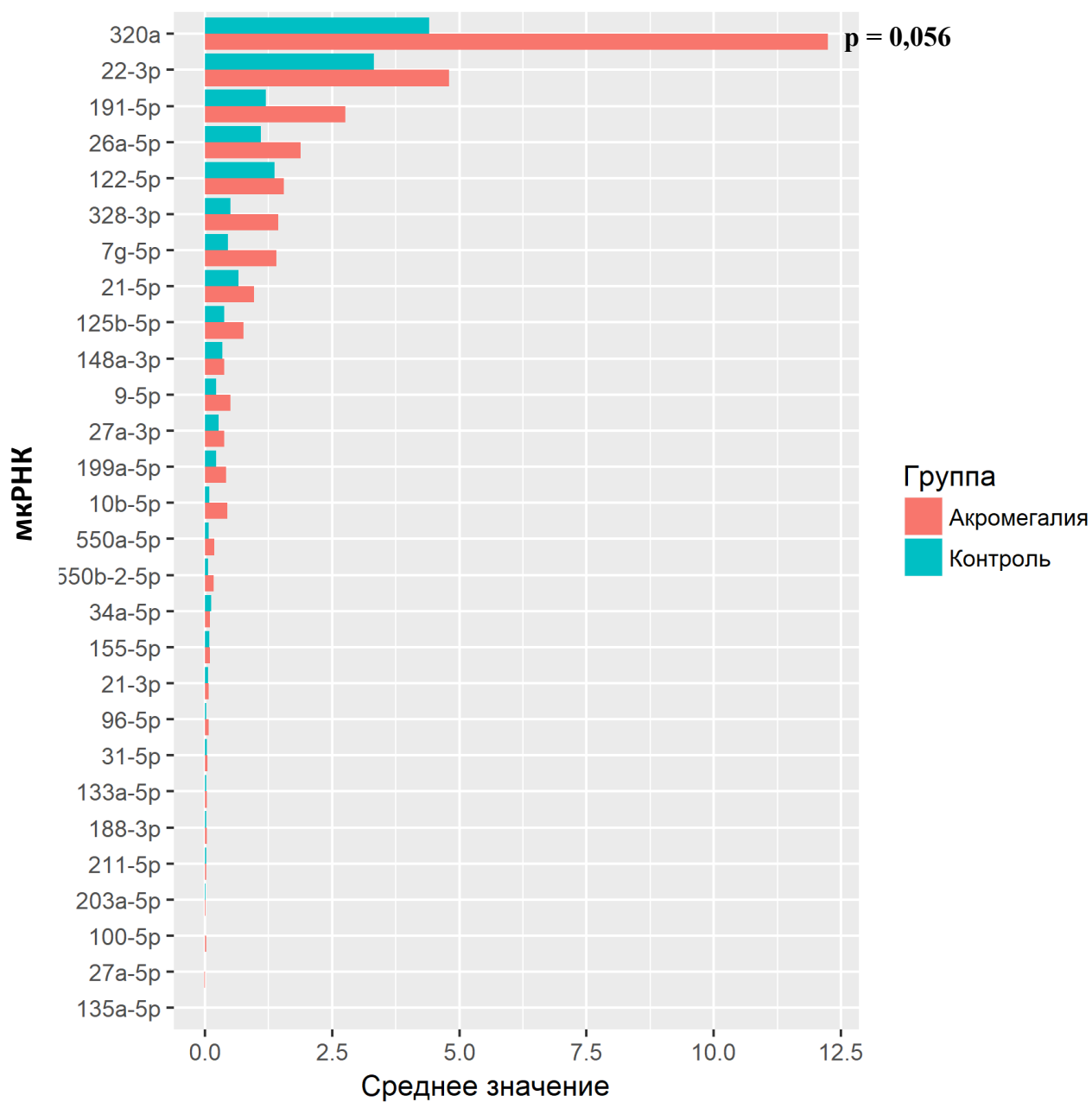


Рисунок 12 - Экспрессия мкРНК в плазме крови у пациентов с акромегалией по сравнению с группой контроля

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые изучена экспрессия мРНК и мкРНК в костной ткани и плазме крови у пациентов с БИК и акромегалией. В исследовании измерялась экспрессия генов, регулирующих формирование и резорбцию костной ткани, непосредственно в биологических образцах пациентов, получающих нейрохирургическое лечение по поводу активной стадии БИК и акромегалии по сравнению с контрольной группой больных с НАГ, у которых ни клинически, ни лабораторно не было выявлено гормональных нарушений.

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*). 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*. Более того обнаружено выраженное повышение сывороточных белков Wnt3a и Wnt10b, уровень которых коррелировал с кортизолом в суточной моче и остеокальцином соответственно. 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.

В работе анализировалась экспрессию 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.

Помимо экспрессии мРНК, в костной ткани также исследовались мкРНК, которые по данным литературы вовлечены в регуляцию дифференцировки МСК по направлению к остеобласту, хондробластам и адипоцитам. 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 костеобразования реализуется, в основном, через усиление дифференцировки МСК в адипоциты и хондроциты, а не полностью за счет разрушения факторов транскрипции остеобластогенеза.

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. 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 оказалась значимо сниженной, что негативно сказывается на качестве костной ткани и может обуславливать возникновение низкотравматичных переломов без изменения МПК.

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.

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.

В Таблице 19 объединены все включенные в анализ мкРНК, их функция по результатам ранее проведенных экспериментальных исследований, касающихся костной ткани, и выявленный характер изменений в костной ткани и плазме пациентов с БИК и акромегалией.

Таблица 19 - Сводные данные по характеру изменений мкРНК в костной ткани и плазме пациентов с БИК и акромегалией*

мкРНК	Функция	Костная ткань пациентов с БИК	Плазма крови пациентов с БИК	Костная ткань пациентов с акромега- лией	Плазма крови пациентов с акромегалией
мкРНК-21-5p	Повышает остеокласто- генез [169]	НД	↑	↑	НД
мкРНК-210-5p	Повышает остеобласто- генез [180]	↑	-	↑	-
мкРНК-135a-5p	Угнетает остеобласто- генез [35]	↓	НД	↓	НД
мкРНК-155-5p	Угнетает остеокласто- генез [217]	НД	НД	НД	НД
мкРНК-148a-3p	Повышает остеокласто- генез [52]	↑	НД	НД	НД
мкРНК-122-5p	Угнетает дифферен- цировку МСК [218]	НД	НД	НД	НД
мкРНК-125b-5p	Угнетает остеобласто- генез [173, 175]	↑	НД	↑	НД
мкРНК-9-5p	Повышает хондрогенез [213-215]	НД	НД	↑	НД
мкРНК-328-3p	Ассоцииро- вана с остеопоро- зом [205, 206]	НД	↑	↑	НД

Продолжение таблицы 19

мкРНК	Функция	Костная ткань пациентов с БИК	Плазма крови пациентов с БИК	Костная ткань пациентов с акромега- лией	Плазма крови пациентов с акромегалией
мкРНК-211	Угнетает остеобласто- генез [36]	↓	НД	↓	НД
мкРНК-31-5p	Повышает остеокласто- генез [181], угнетает остеобласто- генез [209, 210]	↓	НД	↓	НД
мкРНК-34a-5p	Угнетает остеобласто- генез [137]	↑	НД	↑	НД
мкРНК-7b-5p	Угнетает остеокласто- генез [193]	НД	↑	НД	НД
мкРНК-10b-5p	Угнетает остеобласто- генез и усиливает остеокласто- генез [185]	↑	↑	НД	НД
мкРНК-22-3p	Повышает остеобласто- генез [188]	НД	↑	НД	НД
мкРНК-203a-5p	Ассоцииров ана с остеопоро- зом [59]	НД	НД	НД	НД
мкРНК-100-5p	Угнетает остеобласто- генез [216]	НД	НД	НД	НД
мкРНК-133a-5p	Повышает остеокласто- генез [49; 169]	НД	НД	НД	НД
мкРНК-21-3p	Повышает остеобласто- генез [55; 182]	↑	НД	НД	НД

Продолжение таблицы 19

мкРНК	Функция	Костная ткань пациентов с БИК	Плазма крови пациентов с БИК	Костная ткань пациентов с акромега- лией	Плазма крови пациентов с акромегалией
мкРНК-550a-5p	Ассоцииро- вана с остеопоро- зом [195]	НД	↑	НД	НД
мкРНК-199a-5p	Угнетает хондрогенез [178]	↓	НД	↓	НД
мкРНК-320a	Угнетает хондрогенез [179]	↓	↑	НД	НД
мкРНК-26a-5p	Угнетает остеобласто- генез [219]	НД	НД	НД	НД
мкРНК-27a-5p	Повышает остеобласто- генез [189- 191]	НД	НД	↓	НД
мкРНК-96-5p	Повышает остеобласто- генез [187]	НД	↑	НД	НД
мкРНК-188-3p	Угнетает остеобласто- генез [174]	↑	НД	↑	НД
мкРНК-133a-3p	Повышает остеокласто- генез [169]	НД	-	НД	-
мкРНК-204-5p	Угнетает остеобласто- генез [36]	↓	-	↓	-
мкРНК-218-5p	Угнетает остеобласто- генез [176]	↓	-	НД	-
мкРНК-23a-3p	Угнетает остеобласто- генез [33]	↓	↑	↓	НД
мкРНК-27a-3p	Повышает остеобласто- генез [189- 191]	НД	НД	НД	НД

Продолжение таблицы 19

мкРНК	Функция	Костная ткань пациентов с БИК	Плазма крови пациентов с БИК	Костная ткань пациентов с акромега- лией	Плазма крови пациентов с акромегалией
мкРНК-29a-3p	Повышает остеобласто- генез [43; 135]	НД	-	↓	-
мкРНК-29b-3p	Повышает остеобласто- генез [43; 135]	НД	-	↓	-
мкРНК-29c-3p	Повышает остеобласто- генез [43; 135]	НД	-	↓	-
мкРНК-191-5p	Повышает остеобласто- генез [220]	-	НД	-	НД

**Примечания: ↑ - значимое повышение экспрессии, ↓ - значимое снижение экспрессии по сравнению с контрольной группой; НД - не достоверно. БИК – болезнь Иценко-Кушинга.*

Ограничения исследования

Данное исследование по описанию экспрессии генов в образцах костной ткани и плазмы крови, полученных от пациентов, страдающих ЭГ и акромегалией, проводилось впервые в мире, что определяет его значимость и научную новизну. Вместе с тем, исследование имеет ряд ограничений, которые необходимо учитывать при интерпретации данных. Так, ввиду отсутствия предварительных данных и редкости заболеваний размер выборки оценивался эмпирически без предварительной статистической гипотезы, а мощность исследования рассчитывалась ретроспективно (для экспрессии генов в костной ткани составила 90%).

Для выделения РНК использовались образцы цельной кости, включая костный мозг, поэтому невозможно отличить являются ли полученные изменения экспрессии генов следствием изменения в клеточном составе на

фоне заболевания или это ответ от определённого типа клеток. Образцы костной ткани были взяты из клиновидной кости (*cella turcica*) во время нейрохирургического лечения, тогда как, как правило, биопсия кости берется из подвздошного гребня. Тем не менее, обе кости не несут значимых механических нагрузок и согласно классификации по своей форме относятся к одной группе костей с нерегулярным строением. Кроме того, избыток гормонов при БИК и акромегалии обладает системным влиянием на весь скелет и мало вероятно различно влияет на экспрессию генов в этих тканях. Все включенные пациенты имели дефицит витамина D, что само по себе могло бы влиять на экспрессию генов. Однако уровень витамина D не отличался в обеих группах, и, следовательно, выявленные различия в экспрессии генов не зависят от содержания витамина D. Кроме того, все пациенты имели нормальный уровень кальция и соответственно уровень D-гормона, который и оказывает влияние на экспрессию генов, должен быть нормальным [221].

В ходе работы производилась оценка экспрессии генов, которые согласно литературным данным участвуют в ремоделировании костной ткани и дифференцировке МСК [65, 172, 222, 223], но в будущем могут быть найдены и другие гены, вовлеченные в костное ремоделирование, которые не исследовались в этой работе. Анализ результатов производился в совокупности с известными в настоящее время функциями мкРНК. К другим ограничениям исследования можно отнести развитие осложнений в том числе эндокринных при БИК и акромегалии, а также сложности в оценке длительности заболевания до установления диагноза. Поэтому к полученным результатам следует относиться как к комплексным изменениям в костной ткани человека вследствие гиперкортицизма или акромегалии, а не к изолированным эффектам гормона роста или кортизола.

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 (мкРНК34а-5р, мкРНК125b-5р, мкРНК188-3р, мкРНК199а-5р, мкРНК218-5р), 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 (мкРНК199а-5р, мкРНК27а-5р и мкРНК188-3р) 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.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 15-15-30032 и гранта Президента для молодых ученых МД-3204.2017.7

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АКТГ - адренокортикотропный гормон

БИК - болезнь Иценко-Кушинга

Виф 1 - Wnt-ингибирующий фактор 1

ГКО - глюкокортикоидный остеопороз

ДИ - доверительный интервал

Дкк1 - диккопф-1

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМТ - индекс массы тела

ИРФ-1 - инсулиноподобный фактор роста 1

мкРНК – микроРНК (miR)

М-КСФ - макрофагальный колониестимулирующий фактор

МПК - минеральная плотность кости

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

МСК - мезенхимальная стволовая клетка

НАГ - неактивная аденома гипофиза

Пре-мкРНК - предварительная мкРНК

ПТГ - паратиреоидный гормон

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

СД - сахарный диабет

СТГ - соматотропный гормон

сФРЗ - белок, связывающий фризельд -1

ТТГ - тиреотропный гормон

ЭГ - эндогенный гиперкортицизм

СТх - С-концевой телопептид коллагена 1-го типа

GSK3 - киназа гликоген синтетаза 3

HDAC - трансфераза, отвечающая за деацетилирование гистонов

In vitro - «в пробирке»

In vivo - внутри клетки

LRP 5, 6 - рецепторы липопротеидов низкой плотности 5,6

M - среднее

OPG - остеопротегерин

RANK - рецептор ядерного фактора каппа бета

RANKL - лиганд рецептора активатор ядерного фактора каппа бета

RISC - РНК-индуцируемый комплекс выключения гена

Wnt-сигнальный путь - канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vrtacnik P., Marc J., Ostanek B. Epigenetic mechanisms in bone. //Clin. Chem. Lab. Med. – 2014 - Vol.52 (5)- pp. 589–608. DOI: 10.1515/cclm-2013-0770
2. Kapinas K., et.al. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. //J Biol Chem. 2010 – Vol. 285(33) pp. 25221-31. Doi: 10.1074/jbc.M110.116137.
3. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. //Calcif Tissue Int. 2014 – Vol. 94(1) – pp. 25-34. Doi: 10.1007/s00223-013-9774-y.
4. Graham JM, Ayati BP, Holstein SA, Martin JA. The role of osteocytes in targeted bone remodeling: a mathematical model. //PLoS One. 2013 May 22 Vol. 8(5): e63884. Doi: 10.1371/journal.pone.0063884.
5. Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Дедов И.И. Эпигенетические аспекты остеопороза. // Вестник РАМН. - 2015. - Т.70 - №5.- с.541–548. Doi: 10.15690/vramn.v70.i5.1440
6. Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. //Acta Reumatol Port. 2011. – Vol. 36(3) – pp. 209-18
7. Belaya Z.E., Rozhinskaya L.Y., Melnichenko G.A., Solodovnikov A.G., Dragunova N.V., Iljin A.V., Dzeranova L.K., Dedov I.I. Serum extracellular secreted antagonists of the canonical Wnt/ β catenin signaling pathway in patients with Cushing's syndrome. //Osteoporos Int. 2013- Vol. 24 (8): pp. 2191–2199. DOI:10.1007/s00198-013-2268-y
8. Husain A, Jeffries MA. Epigenetics and Bone Remodeling. //Curr Osteoporos Rep. 2017. – Vol. 15(5). – pp. 450-458. Doi: 10.1007/s11914-017-0391-y.
9. Delgado–Calle J, Riancho J. The role of DNA methylation in common skeletal disorders. //Biology. 2012 - Vol. 1 (3) pp. 698–713. doi:10.3390/biology1030698

10. Gibney E., Nolan C. Epigenetics and gene expression. //Heredity. 2010.- Vol.105 (1).- pp. 4–13. DOI:10.1038/hdy.2010.54.
11. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. //Nat. Biotechnol. 2010.-Vol.28 (10). – pp. 1057–1068. DOI:10.1038/nbt.1685.
12. Delgado-Calle J., Sañudo C., Fernández A., García-Renedo R., Fraga M., Riancho J. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL–OPG system in human bone. //Epigenetics. 2012. Vol. 7 (1).- pp. 83–91. DOI:10.4161/epi.7.1.18753.
13. Arnsdorf E., Tummala P., Castillo A., Zhang F., Jacobs C. The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. //J. Biomech. 2010. – Vol. 43 (15). – pp. 2881–2886. DOI:10.1016/j.jbiomech.2010.07.033
14. Kitazawa S., Kitazawa R. Epigenetic control of mouse receptor activator of NF- κ B ligand gene expression. //Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 293 (1). - pp. 126–131. DOI:10.1016/S0006-291X(02)00189-4.
15. Kitazawa R., Kitazawa S. Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA box of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) gene promoter modulates cell and tissue specific RANKL expression and osteoclastogenesis. //Mol. Endocrinol. 2007.- Vol. 21 (1)- pp. 148–158. DOI:10.1210/me.2006-0205
16. Schroeder T., Nair A., Staggs R., Lamblin A., Westendorf J. Gene profile analysis of osteoblast genes differentially regulated by histone deacetylase inhibitors. //BMC Genomics. 2007. – Vol.8 (1)- p.362. DOI:10.1186/1471-2164-8-362.
17. Schroeder T., Westendorf J. Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. //J. Bone Miner Res. 2005. – Vol. 20 (12) – pp. 2254–2263. DOI:10.1359/jbmr.050813
18. Lee H., Suh J., Kim A., Lee Y., Park S., Kim J. Histone deacetylase-1 mediated histone modification regulates osteoblast differentiation. //Mol. Endocrinol. 2006. – Vol. 20 (10)- pp.2432–2443. doi:10.1210/me.2006-0061

- 19.Fusco S, Maulucci G., Pani G. Sirt1: Defeating senescence? //Cell. Cycle. 2012.- Vol. 11 (22) – pp.4135–4146. DOI:10.4161/cc.22074
- 20.Nakamura T., Kukita T., Shobuike T., Nagata K., Wu Z., Ogawa K., Hotokebuchi T., Kohashi O., Kukita A. Inhibition of histone deacetylase suppresses osteoclastogenesis and bone destruction by inducing IFN production. //J. Immunol. 2005.-Vol.175(9)-pp.5809–5816. DOI:10.4049/jimmunol.175.9.5809.
- 21.Takada Y. Suberoylanilide Hydroxamic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis by suppressing nuclear factor B activation. //J. Biol. Chem. 2005.-Vol. 281 (9) - pp. 5612–5622. DOI:10.1074/jbc.m507213200.
- 22.Kim H., Lee J., Jin W., Ko S., Jung K., Ha H., Lee Z. MS-275, a benzamide histone deacetylase inhibitor, prevents osteoclastogenesis by down-regulating c-Fos expression and suppresses bone loss in mice. //Eur. J. Pharmacol. 2012. – Vol. 691 (1–3) – pp. 69–76. DOI:10.1016/j.ejphar.2012.07.034
- 23.Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. //J Biol. Chem. 2009. – Vol. 284 – pp.17897–901
- 24.Lacey D., Boyle W., Simonet W., Kostenuik P., Dougall W., Sullivan J., San Martin J., Dansey R. Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. //Nat. Rev. Drug. Discov. 2012. – Vol.11 (5).-pp. 401–419. DOI:10.1038/nrd3705.
- 25.Monroe D., McGee-Lawrence M., Oursler M., Westendorf J. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. //Gene. 2012. – Vol. 492 (1). - pp. 1–18. DOI:10.1016/j.gene.2011.10.044.
- 26.Li X., Ominsky M.S., Warmington K.S., Morony S., Gong J., Cao J., Gao Y., Shalhoub V., Tipton B., Haldankar R., Chen Q., Winters A., Boone T., Geng Z., Niu Q.T., Ke H.Z., Kostenuik P.J., Simonet W.S., Lacey D.L., Paszty C. Sclerostin Antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone

- strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. //J. Bone Miner Res. 2009. - Vol. 24 (4). – pp. 578–588. DOI:10.1359/jbmr.081206
27. Centrella M., McCarthy T. Estrogen receptor dependent gene expression by osteoblasts – direct, indirect, circumspect, and speculative effects. //Steroids. 2012. – Vol. 77 (3) – pp.174–184. DOI:10.1016/j.steroids.2011.10.016.
28. Burgers T., Williams B. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling within and from osteocytes. //Bone. 2013. – Vol.54 (2) – pp. 244–249. DOI:10.1016/j.bone.2013.02.022.
29. Diarra D., Stolina M., Polzer K., Zwerina J., Ominsky M.S., Dwyer D., Korb A., Smolen J., Hoffmann M., Scheinecker C., van der Heide D., Landewe R., Lacey D., Richards W., Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. //Nat. Med. 2007. – Vol. 13 (2). - pp. 156–163. DOI:10.1038/nm1538
30. Semenova E., Filatov M. Genetic and epigenetic markers of gliomas. //Cell. Tiss. Biol. 2013. – Vol. 7 (4) – pp. 303–313. DOI:10.1134/s1990519x13040123
31. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. //Cell. 1997. – Vol.89 – pp. 747–54.
32. Cohen MM Jr. Perspectives on RUNX genes: an update. //Am J Me Genet A. 2009. – Vol. 149A. – pp. 629–46. doi: 10.1002/ajmg.a.33021
33. Hassan M., Gordon J., Beloti M., Croce C.M., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a 27a 24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2010. – Vol.107 (46) - pp. 19879–19884. DOI:10.1073/pnas.1007698107
34. Wu T., Zhou H., Hong Y., Li J., Jiang X., Huang H. MiR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation. //J. Biol. Chem. 2012. – Vol. 287 (10). - pp. 7503–7511. DOI:10.1074/jbc.m111.292722

35. Li Z., Hassan M.Q., Volinia S., van Wijnen A.J., Stein J.L., Croce C.M., Lian J.B., Stein G.S. A microRNA signature for a BMP2 induced osteoblast lineage commitment program. //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2008. – Vol.105 (37). - pp. 13906–13911. DOI:10.1073/pnas.0804438105.
36. Huang J., Zhao L., Xing L., Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. //Stem. Cells. 2010. – Vol. 28 (2). - pp. 357–364. DOI:10.1002/stem.288
37. Tomé M., López-Romero P., Albo C., Sepúlveda J.C., Fernández-Gutiérrez B., Dopazo A., Bernad A., González M.A. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. //Cell Death Differ. 2010. – Vol. 18 (6). – pp.985–995. DOI:10.1038/cdd.2010.167
38. Kim E., Kang I., Lee J., Jang W., Koh J. MiR-433 mediates ERR γ suppressed osteoblast differentiation via direct targeting to Runx2 mRNA in C3H10T1/2 cells. //Life Sci. 2013. - Vol. 92 (10). - pp. 562–568. DOI:10.1016/j.lfs.2013.01.015
39. Zhang Y., Xie R.L., Croce C.M., Stein J.L., Lian J.B., van Wijnen A.J., Stein G.S. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2011. – Vol. 108 (24). - pp. 9863–9868. DOI:10.1073/pnas.1018493108.
40. Li H., Xie H., Liu W., Hu R., Huang B., Tan Y.F., Xu K., Sheng Z.F., Zhou H.D., Wu X.P., Luo X.H. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. //J. Clin. Invest. 2009. - Vol. 119 (12). - pp. 3666–3677. DOI:10.1172/jci39832.
41. Hu R., Liu W., Li H., Yang L., Chen C., Xia Z.Y., Guo L.J., Xie H., Zhou H.D., Wu X.P., Luo X.H. A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation. //J. Biol. Chem. 2011. – Vol. 286 (14). - pp. 12328–12339. DOI:10.1074/jbc.m110.176099.

42. Yang L., Cheng P., Chen C., He H.B., Xie G.Q., Zhou H.D., Xie H., Wu X.P., Luo X.H. miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization. //J. Bone Miner. Res. 2012. – Vol. 27 (7). – pp. 1598–1606. DOI:10.1002/jbmr.1621
43. Kapinas K., Kessler C., Ricks T., Gronowicz G., Delany A. MiR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. //J. Biol. Chem. 2010. – Vol. 285 (33). – pp. 25221–25231. DOI:10.1074/jbc.m110.116137.
44. Hassan M., Maeda Y., Taipaleenmaki H., Zhang W., Jafferji M., Gordon J.A., Li Z., Croce C.M., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B. MiR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. //J. Biol. Chem. 2012. – Vol. 287 (50). – pp. 42084–42092. DOI:10.1074/jbc.m112.377515.
45. Zhang J., Tu Q., Bonewald L., He X., Stein G., Lian J., Chen J.. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically down regulating Wnt antagonist DKK1. //J. Bone Miner. Res. 2011. – Vol. 26 (8). – pp. 1953–1963. DOI:10.1002/jbmr.377
46. Wang T., Xu Z. MiR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. //Biochem Biophys Res Commun. 2010. – Vol. 402 (2). – pp. 186–189. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.08.031.
47. Hu W., Ye Y., Zhang W., Wang J., Chen A., Guo F. MiR-142 3p promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. //Mol. Med. Rep. 2013. – Vol. 7 (2). – pp. 689-93. DOI:10.3892/mmr.2012.1207
48. Mizoguchi F., Izu Y., Hayata T., Hemmi H., Nakashima K., Nakamura T., Kato S., Miyasaka N., Ezura Y., Noda M. Osteoclast specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. //J. Cell Biochem. 2010. Vol. 109(5). – pp. 866–875. DOI:10.1002/jcb.22228.

49. Sugatani T., Hruska K. Impaired Micro-RNA Pathways diminish osteoclast differentiation and function. //J. Biol. Chem. 2008. - Vol. 284 (7). – pp. 4667–4678. DOI:10.1074/jbc.m805777200
50. Mann M., Barad O., Agami R., Geiger B., Hornstein E. MiRNA based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2010. – Vol. 107 (36). – pp. 15804–15809. DOI:10.1073/pnas.0915022107
51. Wang Y., Li L., Moore B., Peng X.H., Fang X., Lappe J.M., Recker R.R., Xiao P. MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis.// PLoS ONE. 2012. - Vol. 7 (4). - P. 34641. DOI:10.1371/journal.pone.0034641.
52. Cheng P., Chen C., He H., Hu R., Zhou H.D., Xie H., Zhu W., Dai R.C., Wu X.P., Liao E.Y., Luo X.H. miR-148 a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. //J. Bone Miner Res. 2013. – Vol.28 (5). - pp.1180–1190. DOI:10.1002/jbmr.1845.
53. Lei SF, Papasian CJ, Deng HW. Polymorphisms in predicted miRNA binding sites and osteoporosis. //J Bone Miner Res. 2011. – Vol. 26(1). – p. 72-8. doi: 10.1002/jbmr.186.
54. Liao L, Yang X, Su X, Hu C, Zhu X, Yang N, Chen X, Shi S, Shi S, Jin Y. Redundant miR-3077-5p and miR-705 mediate the shift of mesenchymal stem cell lineage commitment to adipocyte in osteoporosis bone marrow. //Cell Death Dis. 2013. – Vol. 4(4). – e600. doi;10.1038/cddis.2013.130.,
55. Yang N., Wang G., Hu C., Shi Y., Liao L., Shi S., Cai Y., Cheng S., Wang X., Liu Y., Tang L., Ding Y., Jin Y. Tumor necrosis factor α suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency induced osteoporosis. //J. Bone Miner. Res. 2013. – Vol. 28 (3). – pp. 559–573. DOI:10.1002/jbmr.1798
56. Wang X., Guo B., Li Q., Peng J., Yang Z., Wang A., Li D., Hou Z., Lv K., Kan G., Cao H., Wu H., Song J., Pan X., Sun Q., Ling S., Li Y., Zhu M., Zhang P.,

- Peng S., Xie X., Tang T., Hong A., Bian Z., Bai Y., Lu A., Li Y., He F., Zhang G., Li Y. MiR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. //Nat. Med. 2012. – Vol. 19 (1). – pp. 93–100. DOI:10.1038/nm.3026.
57. Weber J., Baxter D., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. //Clin. Chem. 2010. – Vol. 56 (11). – pp. 1733–1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405
58. Gilad S., Meiri E., Yogev Y., Benjamin S., Lebanony D., Yerushalmi N., Benjamin H., Kushnir M., Cholak H., Melamed N., Bentwich Z., Hod M., Goren Y., Chajut A. Serum MicroRNAs are promising novel biomarkers. //PLoS ONE. 2008. – Vol. 3 (9) – e3148. DOI:10.1371/journal.pone.0003148.
59. Heilmeier U., Hackl M., Skalicky S., Schroeder F., Vierlinger K., Burghardt A., Schwartz A., Grillari J., Link T. Blood circulating miRNAs are indicative of skeletal fractures in postmenopausal women with and without type 2 diabetes and may be promising candidates for general fracture risk prediction. //Paper presented at: 4th Joint meeting of ECTS and IBMS. April 25–28, 2015.-Netherlands, Rotterdam. URL:
<http://abstracts.ectsibms2015.org/ectsibms/0001/ectsibms0001OC6.6.htm>
 (Доступно на 17.11.2017)
60. Seeliger C, Karpinski K, Haug A, Vester H, Schmitt A, Bauer J, et al. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with Osteoporotic fractures. //J Bone Miner Res. 2014.- Vol. 29(8). – pp.1718-28. doi: 10.1002/jbmr.2175
61. Garmilla-Ezquerria P, Sanudo C, Delgado-Calle J, Perez-Nunez MI, Sumillera M, Riancho JA. Analysis of the bone MicroRNome in Osteoporotic fractures. //Calcif Tissue Int. 2014. – Vol. 96(1). – pp. 30-7. Epub 2014 Nov 29. doi:10.1007/s00223-014-9935-7.
62. Ell B., Mercatali L., Ibrahim T., Campbell N., Schwarzenbach H., Pantel K., Amadori D., Kang Y. Tumor induced osteoclast miRNA changes as regulators

- and biomarkers of osteolytic bone metastasis. //Cancer Cell. 2013. Vol. 24 (4). – pp. 542–556. DOI:10.1016/j.ccr.2013.09.008.
63. Wu K., Song W., Zhao L., Liu M., Yan J., Andersen M., Kjems J., Gao S., Zhang Y. MicroRNA functionalized microporous titanium oxide surface by lyophilization with enhanced osteogenic activity. //ACS Appl. Mater Interfaces. 2013. – Vol. 5 (7). – pp. 2733–2744. DOI:10.1021/am400374c.
64. Wu K., Xu J., Liu M., Song W., Yan J., Gao S., Zhao L., Zhang Y. Induction of osteogenic differentiation of stem cells via a lyophilized microRNA reverse transfection formulation on a tissue culture plate. //Int. J. Nanomedicine. 2013. – Vol. 8. – e1595. DOI:10.2147/ijn.s43244.
65. Jing D., Hao J., Shen Y., Tang G., Li M.L., Huang S.H., Zhao Z.H. The role of microRNAs in bone remodeling. //Int. J. Oral. Sci. 2015. – Vol. 7. – pp.131–143. DOI:10.1038/ijos.2015.22.
66. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. //EMBO J. 2012. – Vol. 31(12). – pp. 2670-84. doi: 10.1038/emboj.2012.146.
67. De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, Wavrant De-Vrieze F, Avila ME, Major MB, Myers A, Sáez K, Henríquez JP, Zhao A, Wollmer MA, Nitsch RM, Hock C, Morris CM, Hardy J, Moon RT. Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. //Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Epub 2007 May 21. Vol. 104(22). – pp. 9434–9.
68. Polakis P. The many ways of wnt in cancer. //Curr Opin Genet Dev. 2007. Vol. 17(1). – pp. 45–51.
69. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. //Am J Hum Genet. 2004 - Vol. 74 – pp. 1043-50
70. Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. //Bioessays. 1999. – Vol. 21(12). – pp. 1021-30.

71. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. //Nat Genet. 2000. – Vol. 24 – pp. 245-50
72. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. //Cell. 2006. - Vol. 127(3). – pp. 469-80
73. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. //Cell. 2001. – Vol. 107(4). – pp. 513-23
74. Saarinen A, Välimäki VV, Välimäki MJ, Löyttyniemi E, Auro K, Uusen P, Kuris M, Lehesjoki AE, Mäkitie O. The A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) associates with low peak bone mass in young healthy men. //Bone. 2007. – Vol. 40(4). – pp. 1006-12
75. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. //N Engl J Med. 2002. – Vol. 346(20). – pp. 1513-21.

76. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W 2003 Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. //Am J Hum Genet. 2003. – Vol. 72(3). – pp. 763-71
77. Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, Mani A, Mani MA, Nelson-Williams C, Carew KS, Mane S, Najmabadi H, Wu D, Lifton RP. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. //Science. 2007. – Vol. 315(5816). – pp. 1278-82
78. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). //Hum Mol Genet. 2001. – Vol. 10(5). – pp. 537-43.
79. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. //Am J Hum Genet. 2001. – Vol. 68(3). – pp. 577-89
80. Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Müller U. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. //Am J Hum Genet. 2004. – Vol. 74(3) – pp. 558-63
81. Uitterlinden AG, Arp PP, Paeper BW, Charmley P, Proll S, Rivadeneira F, Fang Y, van Meurs JB, Britschgi TB, Latham JA, Schatzman RC, Pols HA, Brunkow ME. Polymorphisms in the sclerosteosis/van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. //Am J Hum Genet. 2004. – Vol. 75(6) – pp. 1032-45

82. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. //Dev Cell. 2005. – Vol. 8(5). – pp. 739-50.
83. Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. //Development 2006. – Vol. 133(16). – pp. 3231-44
84. Smolich B.D., McMahon J.A., McMahon A.P., Papkoff J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. //Mol Biol Cell 1993. – Vol. 4(12). – pp. 1267–1275
85. Willert K., Brown J.D., Danenberg E., Duncan A.W., Weissman I.L., Reya T., Yates J.R., Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. //Nature 2003. – Vol. 423(6938). – pp. 448–452
86. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. //J Biol Chem. 2005. – Vol. 280(50). – pp. 41342-51
87. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. //J Clin. Invest. 2006. – Vol. 116(5). – pp. 1202-9.
88. Van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. //Sci Signal. 2008. – Vol. 1(35). – re9. doi: 10.1126/scisignal.135re9
89. Mikels AJ, Nusse R. Purified wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-tcf signaling depending on receptor context. //PLoS Biol. 2006. – Vol. 4(4). – e115
90. Slusarski D.C., Corces V.G., Moon R.T. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. //Nature 1997. – Vol. 390(6658). – pp. 410–413

- 91.Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? //Nat Rev Drug Discov. 2014. – Vol. - 13(7). – pp. 513-32. doi: 10.1038/nrd4233
- 92.Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, Shaughnessy JD Jr. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. //Blood. 2009. – Vol. 113(3). – pp. 517-25. doi: 10.1182/blood-2008-03-145169
- 93.Bodine PV, Stauffer B, Ponce-de-Leon H, Bhat RA, Mangine A, Seestaller-Wehr LM, Moran RA, Billiard J, Fukayama S, Komm BS, Pitts K, Krishnamurthy G, Gopalsamy A, Shi M, Kern JC, Commons TJ, Woodworth RP, Wilson MA, Welmaker GS, Trybulski EJ, Moore WJ. A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. //Bone. 2009. – Vol. 44(6). – pp.1063-8. doi: 10.1016/j.bone.2009.02.013
- 94.Witte F, Dokas J, Neuendorf F, Mundlos S, Stricker S. Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. //Gene Expr Patterns. 2009. – Vol. 9(4). – pp. 215-23. doi: 10.1016/j.gep.2008.12.009
- 95.Malinauskas T, Aricescu AR, Lu W, Siebold C, Jones EY. Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1. //Nat Struct Mol Biol. 2011. – Vol.18(8). – pp. 886-93. doi: 10.1038/nsmb.2081
- 96.Krause C, Korchynskiy O, de Rooij K, Weidauer SE, de Gorter DJ, van Bezooijen RL, Hatsell S, Economides AN, Mueller TD, Löwik CW, ten Dijke P. Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. //J Biol Chem. 2010. – Vol. 285(53). – pp. 41614-26. doi: 10.1074/jbc.M110.153890.
- 97.van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. //J Exp Med. 2004. – Vol.199(6). – pp. 805-14

98. Kneissel M. The promise of sclerostin inhibition for the treatment of osteoporosis. //IBMS BoneKEy. 2009. – Vol. 6 – pp. 259-264
99. Lintern KB, Guidato S, Rowe A, Saldanha JW, Itasaki N. Characterization of wise protein and its molecular mechanism to interact with both Wnt and BMP signals. //J Biol Chem. 2009. – Vol. 284(34). – pp. 23159-68. doi: 10.1074/jbc.M109.025478.
100. Wagner ER, Zhu G, Zhang BQ, Luo Q, Shi Q, Huang E, Gao Y, Gao JL, Kim SH, Rastegar F, Yang K, He BC, Chen L, Zuo GW, Bi Y, Su Y, Luo J, Luo X, Huang J, Deng ZL, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, He TC. The therapeutic potential of the Wnt signaling pathway in bone disorders. //Curr Mol Pharmacol. 2011. – Vol. 4(1). – pp. 14-25. doi:10.2174/1874467211104010014.
101. Pai R, Tarnawski AS, Tran T. Deoxycholic acid activates betacatenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. //Mol Biol Cell. 2004. – Vol. 15(5). – pp. 2156-2163.
102. Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. //J Bone Miner Metab. 2009. – Vol. 27(3). – pp. 265-271. doi: 10.1007/s00774-009-0064-8.
103. PETERS E, Boudin E, Van Hul W. Wnt signaling: a win for bone. //Arch Biochem Biophys. 2008. – Vol. 473(2). – pp. 112-116. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.006
104. Deal C. Potential new drug targets for osteoporosis. //Nat Clin Pract Rheumatol. 2009. – Vol. 5(1). – pp. 20-27. doi: 10.1038/ncprheum0977
105. Kulkarni NH, Onyia JE, Zeng Q, Tian X, Liu M, Halladay DL, Frolik CA, Engler T, Wei T, Kriauciunas A, Martin TJ, Sato M, Bryant HU, Ma YL. Orally bioavailable GSK-3 α /3 β dual inhibitor increases markers of cellular differentiation in vitro and bone mass in vivo. //J Bone Miner Res. 2006. – Vol. 21(6). – pp. 910-920

106. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Reduced relative risk of fractures among users of lithium. //Calcif Tissue Int. 2005. – Vol. -77(1). – pp.1-8.
107. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. //Nat Med. 2004. – Vol. 10(1). – pp. 55-63
108. Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, Heck R, Jiang W, Zhou L, Feng T, King D, Cheng H, Breyer B, Peabody T, Simon MA, Montag AG, He TC. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. //Int J Cancer. 2002. – Vol.102(4). – pp. 338-342.
109. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. //N Engl J Med. 2004. – Vol. 351(7). – pp. 657-667
110. Luo X, Chen J, Song WX, Tang N, Luo J, Deng ZL, Sharff KA, He G, Bi Y, He BC, Bennett E, Huang J, Kang Q, Jiang W, Su Y, Zhu GH, Yin H, He Y, Wang Y, Souris JS, Chen L, Zuo GW, Montag AG, Reid RR, Haydon RC, Luu HH, He TC. Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects. //Lab Invest. Dec. 2008. - Vol. 88(12). – pp. 1264-1277. doi: 10.1038/labinvest.2008.98.
111. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma Development and stem cell differentiation. //Clin Orthop Relat. Rres. 2008. – Vol. 466(9). – pp. 2114-21130. doi: 10.1007/s11999-008-0335-z
112. Sims NA, Chia LY. Regulation of sclerostin expression by paracrine and endocrine factors. //Clin Rev Bone Miner Metab 2012. – Vol.10. – pp. 98-107.
113. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces

- expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. //Endocrinology. 2005. – Vol. 146(11). – pp. 4577-83.
114. Gooi JH, Pompolo S, Karsdal MA, Kulkarni NH, Kalajzic I, McAhren SH, Han B, Onyia JE, Ho PW, Gillespie MT, Walsh NC, Chia LY, Quinn JM, Martin TJ, Sims NA. Calcitonin impairs the anabolic effect of PTH in young rats and stimulates expression of sclerostin by osteocytes. //Bone. 2010. – Vol. 46(6). – pp. 1486-97. doi: 10.1016/j.bone.2010.02.018
 115. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. //J Biol Chem. 2008. – Vol. 283(9). – pp. 5866-75
 116. Белая Ж.Е. Ранняя диагностика эндогенного гиперкортицизма. Канонический Wnt сигнальный путь и изменение костного метаболизма при глюкокортикоидном остеопорозе. //Автореф. дис. докт. мед. наук: 14.01.02 / Белая Жанна Евгеньевна. – М., 2013. – 50 с.
 117. Silverman SL. Sclerostin. //J Osteoporos. 2010. - pp. 941-419. doi: 10.4061/2010/941419
 118. Modder UI, Clowes JA, Hoey K, Peterson JM, McCready L, Oursler MJ, Riggs BL, Khosla S. Regulation of circulating sclerostin levels by sex steroids in women and in men. //J Bone Miner Res. 2011. – Vol. 26(1) – pp. 27-34. doi: 10.1002/jbmr.128
 119. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. //PLoS One. 2011. – Vol. 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0025900.
 120. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster JY, Zanchetta JR, Wasserman SM, Katz L, Maddox J, Yang YC, Libanati C, Bone HG Romosozumab in postmenopausal

- women with low bone mineral density. //N Engl J Med. 2014. – Vol. 370(5). – pp. 412-20. doi: 10.1056/NEJMoa1305224.
121. Recker R, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, Chiang AY, Hu L, Krege JH, Sowa H, Mitlak BH, Myers SL. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosozumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. //J Bone Miner Res. 2015. – Vol. 30(2). – pp. 216-24. doi: 10.1002/jbmr.2351
 122. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, Zerbini CA, Milmont CE, Chen L, Maddox J, Meisner PD, Libanati C, Grauer A. Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. //N Engl J Med. 2016. – Vol. 375(16). – pp. 1532-1543.
 123. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, Maddox J, Fan M, Meisner PD, Grauer A. Romosozumab or alendronate for fracture prevention in women with osteoporosis. //N Engl J Med. 2017. – Vol. 377(15) – pp. 1417-1427. doi: 10.1056/NEJMoa1708322.
 124. Kanis JA, Johansson H, Oden A, et al. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. //J Bone Miner Res. 2004. – Vol. 19(6). – pp. 893-9. DOI: 10.1359/JBMR.040134
 125. Belaya ZE, Hans D, Rozhinskaya LY, et al. The risk factors for fractures and trabecular bone score value in patients with endogenous Cushing's syndrome. //Arch Osteoporos. 2015. - doi: 10.1007/s11657-015-0244-1
 126. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. //Osteoporos Int 2007. – Vol. 18. – pp. 1319–1328
 127. Yao W, Cheng Z, Busse C, Pham A, Nakamura MC, Lane NE. Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis: a longitudinal

- study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice. //Arthritis Rheum 2008. – Vol. 58. – pp. 1674–1686
128. Zhang Z, Ren H, Shen G, et al. Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: an updated review. //Biomed Pharmacother. 2016. – Vol.84. – pp. 438-446. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.045
 129. Nieman LK, Biller BMK, Finding JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM (2008) The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. //J. Clin Endocrinol Metab. 2008. – Vol. 93. – pp. 1526-1540
 130. Wang F-S, Ko J-Y, Yeh D-W, Ke H-C, Wu H-L. Modulation of dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation and bone mass loss. // Endocrinology. – 2008. – Vol.149. – pp. 1793-1801
 131. Wang F-S, Lin C-L, Chen Y-J, Wang C-J, Yang KD, Huang Y-T, Sun Y-C, Huang H-C. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass. //J. Endocrinology. – 2005. - Vol.146. – pp. 2415-2423
 132. Ohnaka K , Taniguchi H , Kawate H , Nawata H , Takayanagi R . Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. //Biochem Biophys Res Commun 2004. – Vol. - 318. – pp. 259–264
 133. Hurson CJ , Butler JS , Keating DT , Murray DW , Sadler D M , O'Byrne JM , Doran PP . Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis. //BMC Musculoskelet Disord 2007. – Vol. 8. - p.12
 134. Gifre L , Ruiz-Gaspa S , Monegal A , Nomdedeu B , Filella X , Guanabens N , Peris P . Effect of glucocorticoid treatment on Wnt signalling

- antagonists (sclerostin and Dkk-1) and their relationship with bone turnover. //Bone 2013. – Vol. 57. – pp. 272–276
135. Wang FS , Chuang PC , Lin CL , Chen MW , Ke HJ , Chang YH , Chen YS , Wu SL , Ko JY . MicroRNA-29a protects against glucocorticoid-induced bone loss and fragility in rats by orchestrating bone acquisition and resorption. //Arthritis Rheum 2013. – Vol.65. – pp. 1530–1540
 136. Ko JY , Chuang PC , Chen MW , Ke HC , Wu SL , Chang YH , Chen YS , Wang FS . MicroRNA-29a ameliorates glucocorticoid-induced suppression of osteoblast differentiation by regulating beta-catenin acetylation. //Bone 2013. – Vol. 57. – pp. 468–475
 137. Kang H , Chen H , Huang P , Qi J , Qian N , Deng L , Guo L . Glucocorticoids impair bone formation of bone marrow stromal stem cells by reciprocally regulating microRNA-34a-5p. //Osteoporos Int 2016. – Vol. 27. – pp. 1493–1505 .doi: 10.1007/s00198-015-3381-x.
 138. Hirayama T , Sabokbar A , Athanasou NA . Effect of corticosteroids on human osteoclast formation and activity. //J Endocrinol 2002. – Vol.175. – pp. 155–163
 139. Sivagurunathan S , Muir MM , Brennan TC , Seale JP , Mason RS . Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. //J Bone Miner Res 2005. – Vol. 20. – pp. 390–398
 140. Shi J , Wang L , Zhang H , Jie Q , Li X , Shi Q , Huang Q , Gao B , Han Y , Guo K , Liu J , Yang L , Luo Z . Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy. //Bone 2015. – Vol. 79. – pp. 222–232
 141. Hofbauer LC , Gori F , Riggs BL , Lacey DL , Dunstan CR , Spelsberg TC , Khosla S . Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. //Endocrinology 1999. – Vol.140. – pp. 4382–4389

142. Humphrey EL , Williams JH , Davie MW , Marshall MJ . Effects of dissoci - ated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. //Bone 2006. – Vol. 38. – pp. 652–661
143. Kondo T, Kitazawa R , Yamaguchi A , Kitazawa S . Dexamethasone pro - motes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through mul - tiple levels. //J Cell Biochem 2008. – Vol. 103. – pp. 335–345
144. Sato AY , Cregor M , Delgado-Calle J , Condon KW , Allen MR , Peacock M , Plotkin LI , Bellido T . Protection from Glucocorticoid-Induced Osteo - porosis by Anti-Catabolic Signaling in the Absence of Sost/Sclerostin. //J Bone Miner Res. 2016. doi:10.1002/jbmr.2869
145. Weinstein RS , Chen JR , Powers CC , Stewart SA , Landes RD , Bellido T , Jilka RL , Parfitt AM , Manolagas SC . Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. //J Clin Invest 2002. – Vol.109. – pp. 1041–1048
146. Lian K, Lang TF, Keyak JH, Modin GW, Rehman Q, Do L, Lane NE. Differences in hip quantitative computed tomography (QCT) measurements of bone mineral density and bone strength between glucocorticoid-treated and glucocorticoid-naïve postmenopausal women. // J. Osteoporosis International. – 2005. - Vol. 16. - pp. 642-650
147. Soe K , Delaisse JM . Glucocorticoids maintain human osteoclasts in the active mode of their resorption cycle. //J Bone Miner Res 2010. – Vol. 25. – pp. 2184–2192
148. Tritos NA, Klibanski A. Effects of Growth Hormone on Bone. //Prog Mol Biol Transl Sci. 2016. – Vol. 138. – pp. 193-211. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.10.008
149. Mazziotti G, Chiavistelli S & Giustina A. Pituitary Diseases and Bone. //Endocrinol Metab Clin North Am; 2015. – Vol. 44. – pp. 1718-180
150. Pereira RC, Delany AM & Canalis E. Effects of cortisol and bone morphogenetic protein8 2 on stromal cell differentiation: correlation with

- CCAAT8enhancer binding protein expression. //Bone 2002. - Vol. 30 – pp. 6858-691
151. Samelson EJ, Hannan MT, Zhang Y, et al. Incidence and risk factors for vertebral fracture in women and men: 25-year follow-up results from the population-based Framingham study. //J Bone Miner Res 2006. – Vol. 21. - pp.1207–1214 DOI: 10.1359/jbmr.060513
 152. Tamada D, Kitamura T, Onodera T, et al. Rapid decline in bone turnover markers but not bone mineral density in acromegalic patients after transsphenoidal surgery. //Endocr J 2014. – Vol. 61. – pp. 231–237.
 153. Giustina A, Mazziotti G & Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. //Endocr. Rev. 2008. – Vol. 29 – pp. 535-559
 154. Kaji H, Sugimoto T, Nakaoka D, et al. Bone metabolism and body composition in Japanese patients with active acromegaly. //Clin Endocrinol (Oxf). 2001. – Vol. 55. – pp. 175–181
 155. Ezzat S, Melmed S, Endres D, et al. Biochemical assessment of bone formation and resorption in acromegaly. //J Clin Endocrinol Metab. 1993. – Vol.76. – pp.1452–1457 DOI: 10.1210/jcem.76.6.8501150
 156. Kayath MJ, Vieira JG. Osteopenia occurs in a minority of patients with acromegaly and is predominant in the spine. //Osteoporos Int. 1997. – Vol. 7. – pp.226–230
 157. Потешкин Ю., Пронин В.С., Мельниченко Г.А., и др. Влияние избытка гормона роста и ИРФ-1 на костно-суставную систему при акромегалии. // Актуальная эндокринология. 2015. - №10. - С. 2.
 158. Мельниченко Г.А., Дедов И.И., Белая Ж.Е., и др. Болезнь Иценко—Кушинга: клиника, диагностика, дифференциальная диагностика, методы лечения. // Проблемы эндокринологии. 2015; 61(2):55-77. [Melnichenko GA, Dedov II, Belaya ZhE. Cushing's disease: the clinical features, diagnostics, differential diagnostics, and methods of treatment. //Problems of

- Endocrinology. 2015. – Vol. 61(2). – pp. 55-77. In Russ] doi: 10.14341/probl201561255-77
159. Дедов И.И., Молитвословова Н.Н., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. Федеральные клинические рекомендации по клинике, диагностике, дифференциальной диагностике, и методам лечения акромегалии. // Проблемы эндокринологии. 2013. Т. 59. № 6. С. 4-18.
 160. Genant HK, Wu CY, van Kujik C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantative technique. // J. Bone Miner Res. – 1993. - Vol. 8. - pp. 1137-1148
 161. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. (2003) Identifying differently expressed genes using false discovery rate controlling procedures. //Bioinformatics. 2003. – Vol. 19. – pp. 368-375
 162. Hirakawa A, Sato Y, Sozu T, Hamada C, Yoshimura I. (2008) Estimating the false discovery rate using mixed normal distribution for identifying differentially expressed genes in microarray data analysis. //Cancer Inform. 2008. – Vol. 22 – pp. 140-148
 163. Baron R, Kneissel M. (2013) Wnt signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. //Nat Med. 2013. – P. 179-192
 164. Belaya ZE, Iljin AV, Melnichenko GA, Solodovnikov AG, Rozhinskaya LY, Dzeranova LK, Dedov II. Diagnostic performance of osteocalcin measurements in patients with endogenous Cushing's syndrome. //Bonekey Rep.2016. - P. 155 - 815 doi: 10.1038/bonekey.2016.42. eCollection
 165. Komori T. Glucocorticoid signaling and bone biology. //Horm Metab Res. 2016. – Vol. 48. – pp. 755-763
 166. Драгунова Н.В. Состояние костно-мышечной системы и возможности реабилитации пациентов с эндогенным гиперкортицизмом. // дис. канд. мед. наук: 14.01.02 – М., 2015 – 116 с.
 167. Белая Ж.Е. Ранняя диагностика эндогенного гиперкортицизма. Канонический Wnt сигнальный путь и изменение костного метаболизма

- при глюкокортикоидном остеопорозе. //дис. докт. мед. наук: 14.01.02 – М., 2013 – 293 с.
168. Ji X, Chen X, Yu X. MicroRNAs in osteoclastogenesis and function: potential therapeutic targets for osteoporosis. //International J Molecular Sciences. 2016. – Vol.17 – p. 349
 169. Рожинская Л.Я. Остеопенический синдром при заболеваниях эндокринной системы и постменопаузальный остеопороз: патогенетические аспекты, диагностика и лечение. //дис. докт. мед. наук: 14.01.02 – М., 2002 – 318 с.
 170. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclasts differentiation by suppressing receptor activator of NF-kB signaling pathway. //Journal of Biological Chemistry. 2008. Vol. 283. – pp.11535-11540
 171. Huang W, Yang S, Shao J, Li Y. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. //Front Biosci. 2013. – Vol. 12. – pp. 3068–3092
 172. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, Zhang Y. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. //Nat. Rev Endocrinol. 2012. – Vol. 8. – pp. 212-227
 173. Chen S, Yang L, Jie Q, Lin Y-S, Meng G-L, Fan J-Z, Zhang J-K, Fan J, Luo Z-J, Liu J. MicroRNA-125b suppresses the proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. //Molecular Medicine Reports. 2014. – Vol. 9. – pp. 1820-1826
 174. Li CJ, Cheng P, Liang MK, Chen YS, Lu Q, Wang JY, Xia ZY, Zhou HD, Cao X, Xie H, Liao EY, Luo XH. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. //J Clin Invest. 2015. Vol. 125. – pp. 1509-1522
 175. Mizuno Y1, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanasaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y,

- Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by downregulation of cell proliferation. //Biochem Biophys Res Commun. 2008. – Vol. 368(2). – pp. 267-272
176. Zhang WB, Zhong WJ, Wang L. A signal-amplification circuit between miR-218 and Wnt/ β -catenin signal promotes human adipose tissue-derived stem cells osteogenic differentiation. //Bone. 2014. – Vol. 58. – pp. 59-66
 177. Shi C, Huang P, Kang H, Hu B, Qi J, Jiang M, Zhou H, Guo L, Deng L. Glucocorticoid inhibits cell proliferation in differentiating osteoblasts by microRNA-199a targeting of Wnt signaling. //J. Mol. Endocrinol. 2015. – Vol. 54. – pp. 325-337
 178. Lin EA, Kong L, Bai XH, Luan Y, Liu CJ. miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive microRNA regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. //J. Biol Chem. 2009. – Vol. 284. – pp. 11326-11335
 179. De-Ugarte L, Yoskovitz G, Balcells S, Güerri-Fernández R, Martínez-Díaz S, Mellibovsky L, Urreizti R, Nogués X, Grinberg D, García-Giralt N, Díez-Pérez A. MiRNA profiling of whole trabecular bone: identification of osteoporosis-related changes in MiRNAs in human hip bones. //BMC Med Genomics. 2015. – Vol. 8. – p. 75. doi: 10.1186/s12920-015-0149-2.
 180. Jin Y, Chen X, Gao ZY, Liu K, Hou Y, Zheng J. The role of miR-320a and IL-1 β in human chondrocyte degradation. //Bone Joint Res. 2017. – Vol. 6. – pp. 196-203
 181. Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, Yagi K, Yatsuka-Kanesaki Y, Suda T, Fukuda T, Katagiri T, Kondoh Y, Amemiya T, Tashiro H, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. //FEBS Lett. 2009. – Vol. 20583. – pp. 2263-2268
 182. Mizoguchi F, Murakami Y, Saito T, Miyasaka N, Kohsaka H. miR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA. //Arthritis Res Ther. 2013. – Vol. 15. – p.102

183. Wang B, Yu P, Li T, Bian Y, Weng X. MicroRNA expression in bone marrow mesenchymal stem cells from mice with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. //Molecular Medicine Reports. 2015. – Vol. 12. – pp. 7447-7454
184. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. //Nat Rev Clin Oncol. 2011 Jun 7. – Vol. 8(8). – pp. 467-77. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.76.
185. Heilmeier U, Hackl M, Skalicky S. Serum microRNAs Are Indicative of Skeletal Fractures in Postmenopausal Women with and without Type 2 Diabetes and Influence Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Adipose-Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro. //J. Bone Miner. Res. 2016. doi:10.1002/jbmr.2897
186. Fujie A, Funayama A, Miyauchi Y, et al. Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition. //Biochem Biophys Res Commun. 2015 Feb 13. – Vol. 457(3). – pp. 451-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.012.
187. Jizhou Yang Shaojie Wang Fengxian Wang Downregulation of miR-10b promotes osteoblast differentiation through targeting Bcl6. //Int J Mol Med. 2017 Jun. – Vol. 39(6). – pp. 1605-1612. doi: 10.3892/ijmm.2017.2955.
188. Yang M, Pan Y, Zhou Y. miR-96 promotes osteogenic differentiation by suppressing HBEGF-EGFR signaling in osteoblastic cells. //FEBS Lett. 2014. – Vol. 588(24). – pp. 4761-8. doi: 10.1016/j.febslet.2014.11.008
189. Huang S1, Wang S, Bian C, Yang Z, Zhou H, Zeng Y, Li H, Han Q, Zhao RC. Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. //Stem Cells Dev. 2012 Sep 1. – Vol. 21(13). – pp. 2531-40. doi: 10.1089/scd.2012.0014.

190. You L, Pan L, Chen L, Gu W, Chen J. miR—27a is essential for the shift from osteogenic differentiation to adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis. //Cell Physiol Biochem 2016. – Vol. 39(1). – pp. 253-265 DOI: 10.1159/000445621
191. Gu C, Xu Y, Zhang S, Guan H, Song S, Wang X, Wang Y, Li Y, Zhao G. miR—27a attenuates adipogenesis and promotes osteogenesis in steroid-induced rat BMSCs by targeting PPAR and GREM1. //Scientific Reports 2016. – Vol. 6 – e38491 DOI: 10.1038/srep38491
192. Guo D, Li Q, lv Q, Wei Q, Cao S, Gu J. miR—27a targets sFRP1 in hFOB1 cells to regulate proliferation, apoptosis and differentiation. //PLOS ONE 2014. – Vol. 9. - e91354 DOI: 10.1371/journal.pone.0091354
193. Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. //J Bone Miner Res 1994. – Vol. 9. – pp. 39-44 DOI: 10.1002/jbmr.5650090106
194. Dou C, Zhang C, Kang F, et al. MiR-7b directly targets DC-STAMP causing suppression of NFATc1 and c-Fos signaling during osteoclast fusion and differentiation. //Biochim Biophys Acta. 2014. – Vol.1839(11). – pp.1084-96. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.08.002.
195. Yagi M1, Miyamoto T, Sawatani Y, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. //J Exp Med. 2005. – Vol. 202(3). – pp. 345-51. DOI:10.1084/jem.20050645
196. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, Plachel F, Feichtinger X, Heimel P, Fahrleitner-Pammer A, Grillari J, Redl H, Resch H, Hackl M. Circulating microRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. //J Clin Endocrinol Metab. 2016. – Vol. 101(11). – pp. 4125-4134. DOI: 10.1210/jc.2016-2365
197. Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Солодовников А.Г., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Дедов И.И. Сывороточные концентрации

- белков регуляторов остеобластогенеза и остеокластогенеза у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом. //Остеопороз и остеопатии. 2012. № 2. С. 3-8.
198. Constantinou T, Baumann F, Lacher MD, et al. SFRP-4 abrogates Wnt-3a-induced β -catenin and Akt/PKB signalling and reverses a Wnt-3a-imposed inhibition of in vitro mammary differentiation. //J Mol Signal. 2008. – Vol. 3(10).doi: 10.1186/1750-2187-3-10.
 199. Rozhinskaya Grebennikova T.A., Belaya Zh.E., Rozhinskaya L.Ya., Melnichenko G.A.The canonical Wnt/ β -catenin pathway: From the history of its discovery to clinical application. //Ter Arkh 2016. – Vol. 88. – pp. 74-81 doi: 10.17116/terarkh201688674-81.
 200. Zeadin M.G., Butcher M.K., Shaughnessy S.G., Werstuck G.H. Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3 β . //Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. – Vol. 425. – pp. 924–930
 201. Hofbauer LC, Hamann C, Ebelling P. Approach to the patient with secondary osteoporosis. //Eur J Endocrinol. 2010 Jun. – Vol. 162(6). – pp. 1009-20. doi: 10.1530/EJE-10-0015.
 202. Fogelman et al. (eds.), Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. //Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012. –Vol.45(5).-pp.347-72. DOI 10.1007/978-3-642-02400-92
 203. Camacho PM, Petak SM, Binkley N, Clarke BL, Harris ST, Hurley DL, Kleerekoper M, Lewiecki EM, Miller PD, Narula HS, Pessah-Pollack R, Tangpricha V, Wimalawansa SJ, Watts NB. American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. //Endocr Pract.-2016- Vol. 22 (Suppl 4)- pp.1-42 doi: 10.4158/EP161435.GL.

204. Weiner JA, Jontes JD Protocadherins, not prototypical: a complex tale of their interactions, expression, and functions. //Frontiers in Molecular Neuroscience 2013-Vol. 6 -article 4. DOI: 10.3389/fnmol.2013.00004
205. Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. Development 2009. – Vol. 136. – pp. 1093-1104 DOI: 10.1242/dev.029926
206. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. J. Cell Biochem 2009. –Vol. 108(1). – pp. 216-224 DOI: 10.1002/jcb.22243
207. Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F, Gabriel C, Dovjak P, Pietschmann P, Grillari-Voglauer R, Grillari J, Hackl M. Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. Bone 2015. – Vol.79. – pp. 43-51 DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.027
208. Chen J, Li K, Pang Q, Yang C, Zhang H, Wu F, Cao H, Liu H, Wan Y, Xia W, Wang J, Dai Z, Li Y. Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis. Scientific Reports 2016. – Vol. 6. – e.36347 DOI: 10.1038/srep36347
209. Delic S, Lottman N, Stelzl A, Liesenberg F, Wolter M, Gotze S, et.al. miR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP-1 dependent Wnt-signaling activation. Neuro Oncol 2014. – Vol. 16. – pp. 179-190 DOI: 10.1093/neuonc/not164
210. Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, Pappa KI, Antsakis A, Anagnou NP, et.al. Sox2 suppression by miR—21 governs human mesenchymal stem cells properties. Stem Cells Transl Med 2014. – Vol. 3. – pp. 54-68 DOI: 10.5966/sctm.2013-0081

211. Xie Q, Wang Z, Bi X, Zhou H, Wang Y, Gu P, Fan X. Effects of miR-31 on the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014. – Vol. 446 (1). - pp. 98-104 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.058
212. Deng Y, Wu S, Zhou H, Wang Y, Hu Y, Gu P, Fan X. Effects of a miR-31, Runx2, and Satb2 regulatory loop on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013. – Vol. 22. – pp.2278-2286 DOI: 10.1089/scd.2012.0686
213. Sang Y, Zang W, Yan Y, Liu Y, Fu Q, Wang K, Chen Y, Qi N. Study of differential effects of TGF-beta3/BMP2 on chondrogenesis in MSC cells by gene microarray data analysis. *Mol Cell Biochem* 2014. – Vol. 385. – pp. 191-198 DOI: 10.1007/s11010-013-1827-z
214. Xia Z, Ma P, Wu N, Su X, Chen J, Jiang C, Liu S, Chen W, Ma B, Yang X, Ma Y, Weng X, Qiu G, Huang S, Wu Z. Altered function in cartilage derived mesenchymal stem cell leads to OA-related cartilage erosion. *Am J Transl Res* 2016. – Vol. 8(2). – pp. 433-446
215. Kopanska M, Szala D, Czech J, Gablo N, Gargas K, Trzeciak M, Zawlik I, Snela S. MiRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis. *J. Orthopedic Surgery and Research* 2017. – Vol. 12. – p. 51 DOI: 10.1186/s13018-017-0542-y
216. Song J, Kim D, Chun C-H, Jin E-J. MicroRNA-9 regulates survival of chondroblasts and cartilage integrity by targeting protogenin. *Cell Commun Signal* 2013. – Vol. 11. – pp. 11-66 DOI: 10.1186/1478-811X-11-66
217. Gu R, Liu N, Luo S, Huang W, Zha Z, Yang J. MicroRNA-9 regulates the development of knee osteoarthritis through the NF-kappab1 pathway in chondrocytes. *Medicine* 2016.-Vol.95. - e4315 DOI: 10.1097/MD.00000000000004315
218. Zhao H, Zhang J, Shao H, Liu J, Jin M, Chen J, Huang Y. Transforming Growth Factor β 1/Smad4 Signaling Affects Osteoclast Differentiation via

- Regulation of miR-155 Expression. *Mol Cells*. 2017. – Vol. 40(3). – pp. 211-221. doi: 10.14348/molcells.2017.2303.
219. Yang Y, Shen Z, Sun W, Gao S, Li Y, Guo Y. The role of miR-122-5p in negatively regulating T-box brain 1 expression on the differentiation of mouse bone mesenchymal stem cells. *Neuroreport*. 2017 May 3. – Vol. 28(7). – pp.367-374. doi: 10.1097/WNR.0000000000000752
 220. Fu HL, Pan HX, Zhao B, et al. MicroRNA-100 inhibits bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation by targeting Smad1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016. – Vol. 20(18). – pp. 3911-3919
 221. Li S, Hu C, Li J, Liu L, Jing W, Tang W, Tian W, Long J. Effect of miR-26a-5p on the Wnt/Ca(2+) Pathway and Osteogenic Differentiation of Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Calcif Tissue Int*. 2016 Aug. – Vol. 99(2) – pp. 174-86. doi: 10.1007/s00223-016-0137-3
 222. Guo Y, Wang Y, Liu Y, Liu Y, Zeng Q, Zhao Y, Zhang X, Zhang X. MicroRNA-218, microRNA-191*, microRNA-3070a and microRNA-33 are responsive to mechanical strain exerted on osteoblastic cells. *Mol Med Rep*. 2015. – Vol.12(2) – pp. 3033-8. doi: 10.3892/mmr.2015.3705.
 223. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009 Feb. – Vol. 19(2). – pp.73-8. doi: 10.1016/j.annepidem.2007.12.001.
 224. P Papaioannou G, Mirzamohammadi F, Kobayashi T. MicroRNAs involved in bone formation. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Dec. – Vol. 71(24).- Pp.4747-61. doi: 10.1007/s00018-014-1700-6.
 225. Roforth MM, Fujita K, McGregor UI, Kirmani S, McCready LK, Peterson JM, Drake MT, Monroe DG, Khosla S. Effects of age on bone mRNA levels of sclerostin and other genes relevant to bone metabolism in humans. *Bone*. 2014 Feb. – Vol.59. – pp.1-6. doi: 10.1016/j.bone.2013.10.019.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Информация об использованных реактивах для измерения экспрессии матричных РНК и микроРНК (справочное)

Таблица А.1 -Список исследованных мРНК и каталожные номера использованных реактивов

мРНК	Идентификатор гена, каталожный номер реактива Thermo Fisher Scientific
<i>ACP5</i>	54, Hs00356261_m1
<i>ALPL</i>	249, Hs01029144_m1
<i>BGLAP</i>	632, Hs01587814_g1
<i>BMP2</i>	650, Hs00154192_m1
<i>BMP7</i>	655, Hs00233476_m1
<i>CA2</i>	760, Hs01070108_m1
<i>CD40</i>	958, Hs01002913_g1
<i>CLCN7</i>	1186, Hs01126462_m1
<i>COL1A1</i>	1277, Hs00164004_m1
<i>COL1A2</i>	1278, Hs00164099_m1
<i>DKK1</i>	22943, Hs00183740_m1
<i>FGFR1</i>	2260, Hs00915142_m1
<i>FGFR2</i>	2263, Hs01552926_m1
<i>GHRH</i>	2691, Hs00184139_m1
<i>IGF1</i>	3479, Hs01547656_m1
<i>IGFBP2</i>	3485, Hs01040719_m1
<i>IL15</i>	3600, Hs01003716_m1
<i>IL6</i>	3569, Hs00985639_m1
<i>IL6R</i>	3570, Hs01075666_m1

Продолжение таблицы А.1

мРНК	Идентификатор гена, каталожный номер реактива Thermo Fisher Scientific
<i>ITGA1</i>	3672, Hs00235006_m1
<i>ITGB3</i>	3690, Hs01001469_m1
<i>LEP</i>	3952, Hs00174877_m1
<i>LRP1</i>	4035, Hs00233856_m1
<i>LRP5</i>	4041, Hs00182031_m1
<i>LRP6</i>	4040, Hs00233945_m1
<i>LTA</i>	4049, Hs04188773_g1
<i>MAB21L2</i>	10586, Hs01040900_s1
<i>MMP2</i>	4313, Hs01548727_m1
<i>PCDHA6</i>	56142, Hs00258927_s1
<i>RUNX2</i>	860, Hs01047973_m1
<i>SFRP1</i>	6422, Hs00610060_m1
<i>SFRP4</i>	6424, Hs00180066_m1
<i>SOST</i>	50964, Hs00228830_m1
<i>SPP1</i>	6696, Hs00959010_m1
<i>STAT1</i>	6772, Hs01013996_m1
<i>TGFB1</i>	7040, Hs00998133_m1
<i>TIMP2</i>	7077, Hs00234278_m1
<i>TNFRSF11A</i>	8792, Hs00921372_m1
<i>TNFRSF11B</i>	4982, Hs00900358_m1
<i>TNFSF11</i>	8600, Hs00243522_m1
<i>TWIST1</i>	7291, Hs01675818_s1
<i>VEGFA</i>	7422, Hs00900055_m1
<i>WNT10B</i>	7480, Hs00559664_m1
<i>WNT3A</i>	89780, Hs00263977_m1

Таблица А.2 - Список исследованных мкРНК и каталожные номера использованных реактивов

мкРНК	Каталожный номер реактива Thermo Fisher Scientific
мкРНК-29a-3p	478587_mir
мкРНК-29b-3p	478369_mir
мкРНК-29c-3p	479229_mir
мкРНК-133a-3p	478511_mir
мкРНК-199a-5p	478231_mir
мкРНК-204-5p	478491_mir
мкРНК-191-5p	477952_mir
мкРНК-218-5p	477977_mir
мкРНК-21-5p	477975_mir
мкРНК-210-5p	478765_mir
мкРНК-135a-5p	478581_mir
мкРНК-155-5p	477927_mir
мкРНК-122-5p	477855_mir
мкРНК-125b-5p	477885_mir
мкРНК-9-5p	478214_mir
мкРНК-31-5p	478015_mir
мкРНК-34a-5p	478048_mir
мкРНК-7b-5p	478580_mir
мкРНК-10b-5p	478494_mir
мкРНК-22-3p	477985_mir
мкРНК-328-3p	478028_mir
мкРНК-100-5p	478224_mir
мкРНК-148a-3p	477814_mir
мкРНК-550a-5p	479032_mir

Продолжение таблицы А.2

мкРНК	Каталожный номер реактива Thermo Fisher Scientific
мкРНК-550b-2-5p	479033_mir
мкРНК-199a-5p	478231_mir
мкРНК-320a	478594_mir
мкРНК-26a-5p	477995_mir
мкРНК-27a-5p	477998_mir
мкРНК-96-5p	478215_mir
мкРНК-188-3p	477942_mir
мкРНК-203a-5p	478756_mir
мкРНК-211	478766_mir
мкРНК-133a-5p	478706_mir
мкРНК-39-3p	478293_mir