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

На правах рукописи

ЛУЦЕНКО Александр Сергеевич

ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С СОМАТОТРОПИНОМАМИ

3.1.19. – ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук Ж.Е. Белая

МОСКВА
2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 8

1.1 Общие сведения об акромегалии 8

1.2 Гистологические и иммуногистохимические особенности соматотропином 15

1.3 Персонализированный подход к ведению пациентов с акромегалией 16

1.4 Общая характеристика микроРНК 18

1.5 МикроРНК и гипофиз 21

1.6 Циркулирующие микроРНК у пациентов с акромегалией 28

1.7 Заключение по обзору литературы 29

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 31

2.1 Дизайн исследования 31

2.2 Условия проведения 31

2.3 Критерии соответствия 31

2.4 Лабораторные исследования 32

2.5 Инструментальные исследования 33

2.6 Гистологические и иммуногистохимические исследования 33

2.7 Генетические исследования 35

2.8 Этическая экспертиза 37

2.9 Статистический анализ 38

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 42

3.1 Клиническая характеристика пациентов и здоровых добровольцев, включенных в исследование экспрессии микроРНК методом NGS 42

3.2 Анализ экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с акромегалией методом NGS 42

3.3 Валидизация различий в экспрессии микроРНК плазмы на расширенной выборке методом RT-qPCR 45

3.4 Гистологические и иммуногистохимические характеристики соматотропином 55
3.5 Наблюдение включенных пациентов 58
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 71
4.1 Экспрессия циркулирующих микроРНК при акромегалии 71
4.2 Гистологические и иммуногистохимические характеристики соматотропином 75
4.3 Результаты нейрохирургического лечения акромегалии и предиктивные возможности базального СТГ до операции 75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 78
ВЫВОДЫ 79
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 81
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 83

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Акромегалия является тяжелым эндокринным заболеванием, характеризующимся множественными осложнениями и повышенной смертностью от сердечно-сосудистых, респираторных и онкологических заболеваний [140]. Избыточная продукция гормон роста опухолью гипофиза и связанный с ней избыток инсулиноподобного фактора роста-1 вызывают множественные симптомы и осложнения, которые реализуются через изменения в экспрессии генов тканей-мишеней. В частности, анализ мРНК и микроРНК в костной ткани пациентов с акромегалией продемонстрировал значительные изменения эпигенетической регуляции костного ремоделирования [11]. МикроРНК представляют собой отдельный класс молекул РНК, играющих ключевую роль в постранскрипционной регуляции экспрессии генов. Эти молекулы могут останавливать или усиливать трансляцию мРНК и, таким образом, регулируют до 60% белок-кодирующих генов [8]. Описаны различия экспрессии микроРНК в СТГ-продуцирующих аденомах гипофиза: в сравнении с неопухолевой тканью гипофиза, в зависимости от размера аденом, различия экспрессии в группах резистентных и чувствительных к терапии аналогами соматостатина пролонгированного действия [84]. Особенностью микроРНК является их способность высвобождаться за пределы клетки и присутствовать в крови и других биологических жидкостях в составе микровезикул, апоптотических телец, липопротеинов высокой плотности и белковых комплексах [112]. Высказано предположение, что активная секреция микроРНК обеспечивает межклеточную коммуникацию и микроРНК могут участвовать в межорганных и внутриорганных перекрестных взаимодействиях, которые традиционно опосредуются гормонами [119]. В ответ на избыточную продукцию СТГ и ИФР-1 можно ожидать изменения в уровнях циркулирующих микроРНК, связанных с акромегалией, и эти микроРНК могут быть потенциальными биомаркерами для оценки активности заболевания, осложнений и эффективности различных видов лечения. Существует несколько широко

используемых подходов для оценки циркулирующих микроРНК, основанных на амплификации, гибридизации и секвенировании [52]. В настоящее время неизвестен характер изменений циркулирующих микроРНК в ответ на избыточную продукцию гормонов и роль этих молекул в патогенезе и клиническом течении акромегалии. Использование высокоточных методов измерения, валидация и перекрестная проверка микроРНК являются основой использования микроРНК в качестве биомаркеров. Валидизация существующих и поиск новых биомаркеров активности и осложнений акромегалии, а также предикторов эффективности лечения остается актуальной темой современных исследований.

Цель исследования

Выявление и валидизация различий в уровнях циркулирующих микроРНК у пациентов с активной стадией акромегалии с оценкой их связи с клиническими, биохимическими и иммуногистохимическими характеристиками пациентов, а также поиск предикторов в определении долгосрочной ремиссии акромегалии.

Задачи исследования

1. Определить спектр циркулирующих микроРНК специфических для акромегалии методом высокопроизводительного секвенирования.
2. Валидизировать различия в уровнях циркулирующих микроРНК, полученные при помощи высокопроизводительного секвенирования, на расширенной выборке пациентов с акромегалией методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.
3. Оценить диагностические возможности применения микроРНК в периферической крови в качестве маркеров акромегалии.
4. Сопоставить гистологические, иммуногистохимические характеристики соматотропином с уровнями циркулирующих микроРНК у пациентов с акромегалией.
5. Провести проспективное наблюдение включенных пациентов и оценить отдалённые исходы нейрохирургического лечения.

Научная новизна

- Впервые в мире проведен анализ циркулирующих микроРНК у пациентов с акромегалией методом высокопроизводительного секвенирования с успешной валидизацией методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией.
- Впервые сопоставлены показатели экспрессии циркулирующих микроРНК с клиническими и лабораторными параметрами пациентов с акромегалией и иммуногистохимическими характеристиками соматотропином.

Основные положения, выносимые на защиту

- Изменение уровней циркулирующих микроРНК периферической крови при акромегалии коррелирует с уровнем ИФР-1 и не зависит от иммуногистохимических характеристик соматотропином.
- Циркулирующие микроРНК обнаруживаются в периферической крови и могут использоваться в качестве вспомогательных биомаркеров в диагностике активной акромегалии
- Базальный уровень СТГ до оперативного лечения может использоваться как потенциальный предиктор краткосрочной и долгосрочной ремиссии акромегалии

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 07.10.2021 на расширенном заседании межотделенческой научной конференции ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России.

Основные результаты диссертационной работы доложены в качестве устных докладов на 18-м Конгрессе Европейской нейроэндокринологической ассоциации (ENEA, Вроцлав, 2018), XXVI Национальном конгрессе эндокринологов «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение» (Москва, 2019), в виде постерного доклада на 22 Европейском эндокринологическом Конгрессе (ECE, онлайн-формат, 2020).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе в центральных, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России медицинских журналах – 3; журналах первого квартиля SCOPUS – 1, тезисы, опубликованные за рубежом – 2, тезисы, опубликованные в сборниках российских конференций – 1.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 97 страницах, состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Библиография включает 145 источников литературы (8 отечественных и 137 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 26 таблицами и 16 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения об акромегалии

Акромегалия – тяжелое нейроэндокринное заболевание, обусловленное избыточной продукцией соматотропного гормона (СТГ) и инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) у лиц с законченным физиологическим ростом и характеризующееся диспропорциональным ростом костей и мягких тканей, а также осложнениями со стороны сердечно-сосудистой и легочной систем и различных видов метаболизма. В подавляющем большинстве случаев причиной заболевания является СТГ-секретирующая аденома гипофиза [140]. Более 90-95% случаев акромегалии носят спорадический характер. Патогенез спорадических случаев заболевания остаётся неизученным, описаны изменения в экспрессии ростового фактора или его рецептора, нарушения клеточного цикла и сигнальных путей, изменения в экспрессии генов клеточного цикла и потеря экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста [29]. Акромегалия также может иметь наследственный характер – в составе синдромов с множественными поражениями эндокринных желез (синдромы множественных эндокринных неоплазий 1 и 4 типа, Карни-комплекс), либо в изолированном варианте (изолированные семейные аденомы гипофиза, FIPA). Мутация в гене *AIP* обнаруживается в 15-20% случаев FIPA, в большинстве случаев мутацию обнаружить не удается[111]. Х-сцепленный акрогигантмизм (XLAG) – синдром, обусловленный микродупликациями в хромосоме Xq26.3, содержащей ген *GPR101,* экспрессия которого значительно повышена в аденомах гипофиза [9].

Акромегалия одинаково часто встречается у мужчин и у женщин, возраст на момент постановки диагноза составляет 40,5-47,0 лет. В зависимости от исследуемой популяции, распространённость заболевания может составлять от 28 до 137 случаев на 1 млн человек, ежегодная заболеваемость – от 2 до 10 случаев на 1 млн человек [78]. Несмотря на характерность изменений внешности при акромегалии, их медленное прогрессирование приводит к тому, что заболевание не замечается лечащими врачами и родственниками пациента. В связи с этим, от появления симптомов до установления диагноза может проходить 4,5-5,0 лет, в

отдельных случаях – более 10 лет [78]. На момент постановки диагноза около 80% соматотропином являются макроаденомами, недостаточность одной или нескольких тропных функций гипофиза встречается у трети пациентов [20]. Гиперпролактинемия выявляется приблизительно у трети пациентов и является признаком либо сдавления ножки гипофиза, либо сочетанной секреторной активностью аденомы [124]. Клинические проявления акромегалии обусловлены локальным воздействием образования гипофиза на окружающие структуры и избытком СТГ и ИФР-1 и могут иметь различную выраженность от пациента к пациенту. К проявлениям со стороны локального воздействия опухоли относятся головная боль, офтальмологические и неврологические нарушения и гипопитуитаризм [22]. Хроническая гиперпродукция СТГ и ИФР-1 приводит к изменениям внешности и осложнениям со стороны различных органов и систем, а также к повышенному риску злокачественных новообразований [28, 101, 142]. Осложнения акромегалии представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Осложнения акромегалии, обусловленные гиперпродукцией СТГ и ИФР-1

Параметр	**Проявления**
Сердечно-сосудистая система	Бивентрикулярная гипертрофия миокарда, диастолическая дисфункция, артериальная гипертензия, патология клапанов, нарушения ритма, эндотелиальная дисфункция [102]
Дыхательная система	Синдром обструктивного апноэ сна, дыхательная недостаточность [28]
Нервная система	Головные боли, синдром запястного канала [47, 126]
Скелетно-мышечная система	Артроз, остеоартрит, компрессионные переломы тел позвонков [1]
Эндокринная система	Эутиреоидный многоузловой и диффузный зоб, гиперкальциурия, нарушения менструального цикла [1, 32]

Углеводный обмен	Инсулинорезистентность, нарушенная гликемия натощак, нарушение толерантности к глюкозе, сахарный диабет [40]
Липидный обмен	Гипертриглицеридемия, снижение уровня холестерина ЛПВП [26]

Персистенция активной стадии акромегалии приводит к снижению ожидаемой продолжительности жизни. В структуре причин смерти при акромегалии наибольшие доли приходятся на сердечно-сосудистые (60%), респираторные (25%) заболевания и злокачественные новообразования (15%). В настоящее время смертность при акромегалии остаётся повышенной по сравнению с общей популяцией. Согласно метаанализу 16 исследований, стандартизованный показатель смертности находится в пределах от 1,16 до 3,31, средневзвешенный показатель – 1,72 (95% ДИ, 1,62; 1,83) [33]. В метаанализе Holdaway IM и соавт., посвященному гормональным показателям и смертности при наблюдении после лечения, достижение уровня СТГ менее 2,5 нг/л позволяло снизить стандартизованный показатель смертности до 1,1 (95% ДИ, 0,9; 1,4). При этом, при уровне более 2,5 нг/л наблюдалось значимое повышение показателя (1,9, 95% ДИ, 1,5; 2,4) [54]. Таким образом, снижение уровня СТГ менее 2,5 нг/л после лечения является важной целью, позволяющей приблизить стандартизованный показатель смертности к популяционным значениям. Однако, достижение данного показателя не должно происходить за счёт осложнений лечения в виде СТГ-дефицита и гипопитуитаризма, так как данные состояния сами по себе связаны с повышением смертности. Кроме того, СТГ не используется для оценки лечения у пациентов, получающих пэгвисомант [115].

Согласно Российским и Европейским клиническим рекомендациям, первой линией лабораторной диагностики акромегалии является определение уровня ИФР-1 сыворотки крови [65, 140]. По сравнению с определением СТГ, измерение уровня ИФР-1 является более простым методом диагностики в связи с тем, что необходим только один образец крови, который возможно взять в любое время дня. ИФР-1 также рекомендуется определять у пациентов без характерных для

акромегалии клинических проявлений, но имеющих сочетание синдрома ночного апноэ, сахарного диабета 2 типа, суставного синдрома, туннельного синдрома запястья, потливости и артериальной гипертензии, а также с выявленным образованием гипофиза для уточнения гормональной активности [65]. Уровень ИФР-1 в физиологических условиях снижается с возрастом, в связи с чем для данного показателя используются возраст-специфические референсные диапазоны [27].

В качестве вспомогательного метода используется определение уровня СТГ в ходе перорального глюкозотолерантного теста (ПГТТ). При акромегалии СТГ в ходе пробы не снижается менее 1,0 нг/мл (либо 0,4 нг/мл при использовании сверхчувствительных методов определения) [65].

МР-характеристики соматотропином в настоящее время рассматриваются как маркеры течения заболевания и предикторы ответа на медикаментозное лечение. В исследовании МР-характеристик среди 297 пациентов с акромегалией отмечено, гипоинтенсивный сигнал на Т2-взвешенных изображениях (Т2-ВИ), встречался в 52,9% случаев. В данных случаях аденомы были меньше и реже имели инвазивный рост. При этом, уровни СТГ были выше по сравнению с аденомами с гиперинтенсивным сигналом на Т2-ВИ [103].

Методом выбора в лечении акромегалии является хирургическое удаление аденомы гипофиза – микрохирургическая и эндоскопическая трансназальная транссфеноидальная аденомэктомия (ТНАЭ) [65, 140]. При экспертном уровне нейрохирурга ТНАЭ позволяет достичь ремиссии у 75% пациентов с микроаденомами, однако, частота ремиссии у пациентов с инвазивно растущими макроаденомами значительно ниже: 44,5% при супраселлярных аденомах с наличием и 33% с отсутствием хиазмального синдрома, при латеро- и инфраселлярных аденомах – 41,5%. Следовательно, даже при высокой квалификации хирурга, приблизительно у 50% пациентов ТНАЭ оказывается неэффективной [29]. Однако, даже при неэффективности нейрохирургического вмешательства, гистологическое и иммуногистохимическое исследование

удалённой опухоли позволяет оценить морфологическое строение и рецепторный профиль и определить оптимальное направление дальнейшего ведения [144].

Chen, C. J. и соавт. провели систематический обзор с целью сравнить исходы микрохирургической и эндоскопической ТНАЭ: анализ включал суммарно 52 исследования, 4375 пациентов. Сравнительная характеристика методов представлена в Таблице 2.

Таблица 2. Сравнительная характеристика микрохирургической и эндоскопическоской ТНАЭ в лечении акромегалии

	Микрохирургический (n=3144)	**Эндоскопический (n=940)**
Послеоперационная ремиссия		
Микроаденомы	77,6%	82,2%
Макроаденомы	46,9%	60,0%
Долгосрочная послеоперационная ремиссия		
Микроаденомы	76,9%	73,5%
Макроаденомы	40,2%	61,5%
Осложнения		
Ликворея	3,0%	2,3%
Гипопитуитаризм	6,7%	6,4%
Транзиторный несахарный диабет	9,0%	7,8%
Постоянный несахарный диабет	2,0%	1,7%

Авторы систематического обзора делают вывод, что оба подхода являются применимыми для лечения акромегалии и демонстрируют схожие показатели ремиссии. При этом, опыт хирурга и владение техникой оказывает значимое влияние на исходы в обоих случаях [23].

Медикаментозная терапия занимает важное место в лечении акромегалии в качестве как первичного лечения, так и в составе комбинированной терапии.

Основные группы препаратов, применяемых для лечения акромегалии, представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Основные препараты для лечения акромегалии

Препараты	**Характеристика**
Аналоги соматостатина	
Октреотид, ланреотид	Препараты первого поколения. Применяются в качестве первой линии медикаментозной терапии акромегалии. Считаются равноценными в отношении клинической эффективности, нормализации уровня ИФР-1 и уменьшения объема опухоли. Преимущественно действуют на соматостатиновые рецепторы 2 подтипа [65, 120]
Пасиреотид	Препарат второго поколения, преимущественно действующий на соматостатиновые рецепторы 5 подтипа. В исследованиях III фазы показал большую эффективность в достижении контроля заболевания и уменьшения объема опухоли по сравнению с октреотидом и ланреотидом. Побочные эффекты в виде нарушений углеводного обмена наблюдаются у 60-70% пациентов [42, 114].
Агонисты дофаминовых рецепторов	
Каберголин	Низкая стоимость относительно других препаратов для лечения акромегалии и возможность применять перорально. Рекомендуется использовать у пациентов с мягким течением заболевания и небольшим

	повышением ИФР-1 [75]. Акромегалия не является зарегистрированным показанием в РФ.
Антагонисты рецепторов СТГ	
Пэгвисомант	Ингибирует связывание СТГ с его рецептором и блокирует периферическую продукцию ИФР-1. Позволяет улучшить показатели гликемии при СД на фоне акромегалии, независимо от снижения ИФР-1 [65].

Препаратами выбора в медикаментозном лечении акромегалии являются аналоги соматостатина первого поколения – октреотид и ланреотид [65]. Агонисты дофаминовых рецепторов в основном применяются в качестве монотерапии у пациентов с небольшим повышением ИФР-1 или в комбинации с аналогами соматостатина при частичной резистентности к последним [29]. Каберголин, согласно метаанализу 2011 года, в качестве монотерапии эффективен у одной трети больных. При неэффективности аналогов соматостатина, дополнительное назначение каберголина позволяет достичь ремиссии приблизительно в 50% случаев, независимо от наличия гиперпролактинемии [113]. Пасиреотид – аналог соматостатина второго поколения – применяется в случае невозможности выполнения или неэффективности хирургического вмешательства, а также при резистентности к аналогам соматостатина первого поколения [87]. Пэгвисомант – антагонист рецепторов СТГ – показан при отсутствии ремиссии после оперативного лечения и/или резистентности к аналогам соматостатина. Данный препарат применяется как в качестве монотерапии, так и в комбинации с аналогами соматостатина [45].

В качестве метода третьей линии, при неэффективности или невозможности проведения оперативного лечения и медикаментозной терапии, используется лучевая терапия. Согласно одноцентровому исследованию среди 102 пациентов, получивших лечение гамма-ножом, у 57% отмечена ремиссия (медиана срока наступления ремиссии – 19 месяцев). Гипопитуитаризм в исходе лучевой терапии

отмечался у 20% пациентов (медиана срока от момента лечения – 29,5 месяцев) [49]. В другом исследовании отмечена сходная частота ремиссии для гамма-ножа (52%), сравнимая с результатами лечения фракционированной радиотерапией (48%) [69].

1.2 Гистологические и иммуногистохимические особенности соматотропином

Согласно гистологической классификации ВОЗ, соматотропиномой является аденома гипофиза, преимущественно секретирующая СТГ и возникающая из клеток аденогипофиза линии Pit-1. Морфологически соматотропиномы подразделяются на четыре основных варианта: плотногранулированные соматотропиномы (ПГС), редкогранулированные соматотропиномы (РГС), маммосоматотропиномы (МС) и смешанные сомато- лактотрофные аденомы (ССЛ) [81].

ПГС встречаются приблизительно у 30-50% пациентов с акромегалией, преимущественно у пациентов старше 50 лет, и характеризуются медленным ростом [3]. Данный морфологический вариант ассоциирован с высокими уровнями СТГ и ИФР-1 и яркими клиническими проявлениями акромегалии [18, 41, 68]. Интенсивность сигнала на Т2-ВИ МР-томограмм – маркер гранулированности соматотропином: ПГС имеют низкую интенсивность на Т2-ВИ, в отличие от РГС [51, 103]. У пациентов с ПГС отмечается высокая чувствительность к терапии аналогами соматостатина – по различным данным, около 65-90% случаев [14, 35, 68].

РГС обнаруживаются в 15-35% случаев и наиболее распространены у пациентов с акромегалией младше 50 лет. РГС характеризуются более быстрым и агрессивным ростом и имеют больший размер на момент постановки диагноза, по сравнению с ПГС [18, 68, 91]. Индекс пролиферации Ki-67 в большинстве случаев превышает 3% [88]. Для РГС характерна гиперинтенсивность на Т2-ВИ, в некоторых исследованиях отмечена более высокая частота инвазии в кавернозный синус по сравнению с ПГС [77, 95], однако, в других исследованиях этого не наблюдалось [18, 68]. РГС проявляют резистентность к лечению аналогами

соматостатина первого поколения [68], что объясняется низкой экспрессией рецепторов соматостатина 2 подтипа (SSTR2) [35]. При этом, в одном исследовании отмечена более высокая чувствительность РГС к аналогам соматостатина второго поколения по сравнению с ПГС, что может быть обусловлено более высокой экспрессией SSTR5 в РГС [58, 86].

МС представлены однородной популяцией клеток линии Pit1, экспрессирующие и СТГ, и пролактин. Гистологически и иммуногистохимически МС схожи с ПГС, но в дополнение к вышеописанным характеристикам также экспрессируют рецепторы эстрогена альфа (ERα) и пролактин. За исключением гиперпролактинемии, клинические и биологические особенности МС также повторяют ПГС [55]. Из 94 пациентов с акромегалией с различными морфологическими вариантами соматотропином, при МС наблюдался наименьший размер образования, минимальная частота инвазии в область кавернозного синуса и наиболее часто удавалось провести полное удаление аденомы [83].

ССЛ представлены двумя отдельными клеточными популяциями соматотрофов и лактотрофов. Каждая из популяций может быть как плотно-, так и редкогранулированной, что определяет клинические и биологические особенности конкретного образования. В целом, ССЛ характеризуются наибольшим размером на момент постановки диагноза и самым низким шансом радикального удаления образования по сравнению с МС, ПГС и РГС [83].

1.3 Персонализированный подход к ведению пациентов с акромегалией

Значительная доля пациентов не достигает ремиссии после хирургического вмешательства, даже в нейрохирургических центрах экспертного уровня, и пациентам требуется повторная операция, либо медикаментозное лечение. Терапия аналогами соматостатина описывается как метод «проб и ошибок», так как оценка эффективности занимает длительное время, а 20-25% пациентов оказываются нечувствительными к лечению [46]. Персонализированный подход основывается на разделении пациентов на подгруппы в зависимости от течения заболевания и ответа на лечение [70].

Для случаев неэффективного хирургического лечения предлагается панель биомаркеров, позволяющих определить оптимальный препарат для конкретного пациента (Рисунок 1).

Рисунок 1. Возможный алгоритм персонализированного лечения акромегалии. Адаптировано по [64].

Недостатком вышеуказанных биомаркеров является невозможность их применения при первичном медикаментозном лечении и необходимость проведения ИГХ, зачастую недоступной для рутинного применения за пределами центров экспертного уровня.

В течение последнего времени проводится поиск новых биомаркеров для диагностики, дифференциальной диагностики и определения течения акромегалии. Среди потенциальных кандидатов выделяются микроРНК. МикроРНК демонстрируют потенциал в определении течения различных заболеваний и чувствительности к медикаментозному лечению. Различия в экспрессии микроРНК

обнаруживались как в тканях, так и в циркуляции в стабильных концентрациях, что делает их перспективными биомаркерами для изучения в контексте акромегалии.

1.4 Общая характеристика микроРНК

МикроРНК являются малыми некодирующими молекулами РНК длиной 19–25 нуклеотидов [43]. Впервые они были описаны у нематод *Caenorhabditis elegans* в 1997 г. В 2007 году микроРНК впервые обнаружены в крови [89]. К настоящему времени известно более 2000 представителей этого класса молекул. МикроРНК принимают участие в регуляции экспрессии ряда генов на посттранскрипционном уровне, а также в других биологических процессах [4].

МикроРНК кодируются последовательностями в межгенных и интронных областях генома [73]. Транскрипция межгенных последовательностей производится РНК-полимеразой III, а интронных —промотором гена, в котором они находятся (РНК-полимеразой II) или собственным промотером - РНК-полимеразой III [125].

Биосинтез начинается с транскрипции в ядре и образования первичной микроРНК (*pri*-микроРНК). Первичная микроРНК представлена шпилечной структурой длиной от двухсот до нескольких тысяч нуклеотидов [43]. Далее рибонуклеаза III (фермент *Drosha*) разрезает двухцепочечную молекулу *pri*-микроРНК с образованием предшественников микроРНК (*pre*-микроРНК). *Pre*-микроРНК связывается с транспортным белком экспортином 5 и переносится в цитоплазму [21].

В цитоплазме *pre*-микроРНК подвергается процессингу другой рибонуклеазой III — *Dicer*. В результате процессинга образуется дуплекс микроРНК — микроРНК*, который связывается с белком семейства Argonaute, Ago2. Из двух цепей РНК только одна (ведущая) остается связанной с Ago2, тогда как другая («пассажирская») диссоциирует от комплекса и деградирует. Выбор ведущей цепи определяется структурой дуплекса: бóльшую вероятность остаться в комплексе с Ago2 имеет цепь, несущая неспаренный участок на своем 5’-конце. Комплекс Ago2 с единичной цепью РНК и с белком GW182 обозначается как

микроРНК-индуцируемый комплекс (miRNA-induced silencing complex, miRISC) [138].

Согласно опубликованным исследованиям, до 60% белок-кодирующих генов могут регулироваться микроРНК. Регуляция осуществляется по механизму сайленсинга — подавления экспрессии генов-мишеней без изменения последовательности нуклеотидов. Каждая конкретная микроРНК имеет множество генов-мишеней, и несколько РНК могут перекрестно регулировать один ген [59].

Регуляция экспрессии основана на связывании miRISC с комплементарными участками 3’- или 5’-нетранслируемых регионов мРНК (3’UTR, 5’UTR) и осуществляется тремя путями — репрессия трансляции, дааденилирование мРНК (при наличии частичной комплементарности seed-региона микроРНК и мРНК) и разрезание мРНК (при полной комплементарности). Все три механизма приводят к снижению трансляции белка-мишени [10, 21].

Поскольку микроРНК в большинстве случаев вызывает деградацию целевой матричной РНК или ингибирование трансляции белка, как правило, наблюдается обратная зависимость между уровнем экспрессии микроРНК и ее мишенями на уровне РНК и белков [131].

Помимо регуляции внутри клетки микроРНК могут поступать за ее пределы и осуществлять свои функции в других клетках. Они обнаруживаются в различных биологических жидкостях у человека, включая кровь, мочу, слюну, спинномозговую жидкость [130].

Вне клетки микроРНК находятся в крови в составе мембранных везикул, в свзяи с транспортными белками, а также внутри макромолекулярных комплексов [6, 119].

В настоящее время назначение экзосом и микровезикул изучено не полностью. По данным имеющихся исследований, экзосомы играют важную роль в межклеточном взаимодействии в рамках реакций иммунитета [117] и в биологии опухолей [74, 99].

Внеклеточные микроРНК относительно устойчивы к ферментному расщеплению, замораживанию и разморозке, колебаниям pH, что расширяет возможности их применения в качестве биомаркеров [72, 89].

Важным этапом изучения циркулирующих микроРНК является выбор методов определения. Экспрессию большого количества микроРНК возможно измерить при помощи микроРНК-микрочипов и высокопроизводительного секвенирования. Уровни индивидуальных микроРНК наиболее часто измеряются методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR) [104].

Анализ с использованием микрочипов – один из первых методов, используемых для параллельного анализа больших количеств микроРНК. Определение молекул микроРНК происходит путем гибридизации меченой микроРНК с последующим обнаружением и нанесением на микрочип. МикроРНК-микрочипы широкодоступны и как правило дешевле других методов оценки экспрессии. Данный метод подходит для сравнительного анализа микроРНК между двумя группами, но не подходит для измерения абсолютных значений экспрессии. В связи с ограниченной специфичностью метода, выявленные изменения валидизируются вторым методом RT-qPCR [110].

Высокопроизводительное секвенирование или секвенирование нового поколения (next-generation sequencing, NGS) подразумевает подготовку библиотек комплементарной ДНК (кДНК), полученной в ходе обратной транскрипции, и последующее параллельное секвенирование миллионов индивидуальных кДНК. Биоинформатический анализ прочтений позволяет определить известные и новые микроРНК. Из всех доступных методов оценки экспрессии, NGS является самым дорогим и требует сложного биоинформатического анализа. Как и микрочипы, NGS позволяет оценить относительную экспрессию микроРНК и данные требуют валидизации другим методом оценки экспрессии [56].

Принцип RT-qPCR заключается в обратной транскрипции микроРНК в кДНК с последующей количественной ПЦР с мониторингом продукта реакции в реальном времени. Этот метод считается более простым относительно

вышеперечисленных, позволяет оценивать абсолютные концентрации изучаемых микроРНК и обладает наиболее высокой чувствительностью и специфичностью [110].

1.5 МикроРНК и гипофиз

Согласно различным исследованиям, проведённым на клеточных линиях, микроРНК участвуют в дифференцировке клеток и продукции гормонов. В исследовании на мышиных моделях удаление DICER (ключевого фермента биосинтеза микроРНК) в гонадотрофах приводит к снижению синтеза микроРНК, воздействующих на субъединицы гонадотропинов, и нарушению гомеостаза последних и снижению фертильности [128].

PROP1 (Homeobox protein prophet of PIT1) является ключевым транскрипционным фактором дифференцировки и функционирования соматотрофов, тиреотрофов, гонадотрофов и лактотрофов [15, 44]. У детей с множественными недостаточностями тропных функций гипофиза отмечено повышение уровней miR-511 и miR-593 сыворотки крови. PROP1 является прямой мишенью данных микроРНК, что позволяет предположить их роль в регуляции его экспрессии [57].

В настоящее время активно изучаются вопросы изменений экспрессии микроРНК в аденомах гипофиза, их взаимосвязи с гистотипом опухоли, характеристиками (размер, инвазия) и чувствительностью к медикаментозной терапии. Также продемонстрирована связь между экспрессией микроРНК и генами, участвующими в патогенезе аденом гипофиза [5, 132, 141].

1.6 Экспрессия микроРНК в соматотропиномах

Известно, что экспрессия некоторых микроРНК в соматотропиномах изменена по сравнению с нормальной тканью гипофиза. Основные исследования по экспрессии микроРНК в соматотропиномах представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Различная экспрессия микроРНК в соматотропиномах

Образцы, n	**МикроРНК**	**Экспрессия**	**Метод измерения**	**Источник**
10	miR-16-1, miR-15a	снижена	Northern blotting	[16]
21	miR-136, miR-15b, miR-184, miR-194, miR-200c, miR-297, miR-29b-1, miR-32, miR-340, miR-365, miR-378, miR-486-5p, miR-491-3p, miR-519d, miR-525-5p, miR-551a, miR-574-5p, miR-657, miR-662, miR-768-3p, miR-885-5p, miR-890, miR-96	повышена	микрочип, RT-qPCR	[84]
	miR-125b, miR-145, miR-17, miR-185, miR-503, miR-192, miR-193a-3p, miR-193a-5p, miR-200b, miR-302c, miR-30a, miR-622, miR-30b, miR-31, miR-381, miR-490-5p, miR-510, miR-542-3p, miR-552, miR-553, miR-612, miR-617, miR-625, miR-637, miR-654-3p, miR-769-5p, miR-801, miR-126, miR-99b	снижена		
15	miR-93, miR-155	повышена	микрочип, RT-qPCR	[19]
7	miR-370, miR-376c, miR-134, miR-154, miR-299-5p, miR-323-3p, miR-369-5p,	повышена	RT-qPCR	[24]

	miR-377, miR-329, miR-410, miR-431, miR-432			
9	miR-15, miR-16, miR-26a, miR-196a2, Let-7a	снижена	RT-qPCR	[96]
12	miR-34b, miR-326, miR-374b, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, miR-603, miR-633	снижена	микрочип, RT-qPCR	[31]
7	miR-26b, miR-26a, miR-212, miR-107, miR-103	повышена	TaqMan microRNA, RT-qPCR	[97]
	miR-125b, miR-141, miR-144, miR-164, miR-145, miR-143, miR-15b, miR-16, let-7b, let-7a3, miR-128	снижена		
15	miR-23b и miR-130b	снижена	RT-qPCR	[79]

A. Bottoni и соавт. первыми опубликовали данные по различиям в экспрессии микроРНК в аденомах гипофиза - выявлено снижение экспрессии miR-15a и miR-16-1 в аденомах по сравнению с нормальной тканью гипофиза [16].

В 2010 году Butz и соавт. изучали экспрессию киназы Wee1 в аденомах гипофиза и определяли микроРНК, которые регулирующие её экспрессию. В исследование было включено 57 образцов: 27 неактивных аденом, 15 соматотропином (с/без пролактинсекретирующей активности) и 15 образцов нормальной ткани гипофиза в качестве контроля. Экспрессия Wee1 оценивалась с помощью иммуногистохимии и RT-qPCR. Идентификация микроРНК, целями которых является 3’ нетранслируемый регион Wee1 проводилась на микроРНК-микрочипе с последующей верификацией методом qRT-PCR. Далее проводилась трансфексия микроРНК в культуру HeLa-клеток с последующим анализом экспрессии Wee1 и пролиферации клеток. Экспрессия Wee1 была снижена в гормонально-неактивных и СТГ-продуцирующих аденомах, однако, повышения экспрессии мРНК Wee1 не наблюдалось. Выявлены пять микроРНК, экспрессия

которых значительно повышена в образцах неактивных аденом гипофиза, из которых две, miR-155 и miR-93 также повышенно экспрессировались в образцах СТГ-продуцирующих аденом. Трансфексия данных микроРНК в HeLa клетки ингибировала экспрессию Wee1 и пролиферацию клеток [19].

D'Angelo и соавт. получили данные по экспрессии микроРНК с помощью miRNA CHIP: экспрессия восемнадцати микроРНК была снижена в соматотропиномах. Девять микроРНК (miR-34b, miR326, miR-374b, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, miR-603, miR-633, miR-320) было отобрано для валидизации методом RT-qPCR – данные, полученные на микрочипе, были валидизированы для восьми микроРНК, экспрессия которых также была значимо снижена в образцах соматотропином [31].

В 2013 г. T. Palumbo и соавт. исследовали профиль микроРНК в соматотропиномах, которые развиваются на фоне гиперплазии маммосоматотрофов. При помощи микрочипа (TaqMan microRNA) выявлено повышение экспрессии пяти микроРНК (miR-26b, miR-26a, miR-212, miR-107, miR-103) и снижение экспрессии 12 микроРНК (miR-125b, miR-141, miR-144, miR-164, miR-145, miR-143, miR-15b, miR-16, miR-186, let-7b, let-7a3, miR-128). При валидизации методом RT-qPCR определно, что наиболее высокая экспрессия характерна для miR-26b (в 6 раз) и miR-212 (в 4 раза); наиболее сниженная — для let-7a3 (в 6 раз), miR-128 (в 7,5 раз). Биоинформатический анализ установил, что целями miR-26b являются *PTGS2*, *PTEN* и *HMGA1*, когда как цели miR-128 – *MAPK14*, *PLK2* и *BMI1*. Дальнейшие эксперименты установили, что miR-26b и miR-128 прямо регулируют *PTEN* и *BMI1* соответственно, между данными генами и микроРНК обнаружена обратная корреляция. Также определена роль данных микроРНК в регуляции сигнального пути PTEN-AKT [97].

V. Leone и соавт. изучили экспрессию miR-23b и miR-130b в аденомах гипофиза с различной гормональной активностью, в том числе – в соматотропиномах (n=15), методом RT-qPCR. Экспрессия данных микроРНК была снижена в соматотропиномах по сравнению с нормальной тканью гипофиза. Экспериментально подтверждена обратная взаимосвязь между сниженной

экспрессией miR-23b и повышенной экспрессией HMGA2, а miR130b снижает уровень белка CCNA2 в экспериментах *in vitro* [79].

При анализе имеющихся данных можно заметить наличие согласующихся и противоречивых данных. Согласующиеся данные касаются сниженной экспрессии miR-16 [96, 97], miR-145 [84, 97] и miR-125b [84, 97], противоречивые данные — miR-432 (повышена в работе Cheunsuchon P. и соавт. [24], снижена в исследовании D'Angelo D и соавт. [31]), miR-26a (снижена по данным Palmieri D. и соавт. [96], повышена в работе Palumbo T. и соавт. [97]), miR-15b (повышена в исследовании Mao Z.G. и соавт. [84], снижена по данным Palumbo T. и соавт. [97]). Следует отметить, что сравнение с данными T. Palumbo и соавт. условно, поскольку в этом исследовании изучались соматотропиномы, возникающие на фоне гиперплазии маммосоматотрофов [97], что может указывать на специфический профиль экспрессии микроРНК при данном типе образований.

Согласно литературным данным, микроРНК связаны с размерами соматотропином. В исследовании A. Bottoni и соавт. [16] уровень экспрессии miR-15a и miR-16-1 обратно коррелировал с размером опухоли. В исследовании Z.-G. Mao и соавт. [84] продемонстрировано различие в экспрессии 9 микроРНК в макроаденомах в сравнении с микроаденомами: экспрессия miR-184, miR-524-5p, miR-629 и miR-766 повышена, а экспрессия miR-124, miR-222, miR-32, miR-744 и miR-765 снижена. В данном исследовании не было получено корреляции miR-15a и miR-16-1 (выявлено снижение экспрессии miR-15a в макроаденомах, но p =0,21), которую ранее описывали A. Bottoni и соавторы.

В 2007 г. A. Bottoni и соавт. [17] сравнили образцы 33 аденом гипофиза (из них 7 соматотропином) с 6 образцами нормальной ткани гипофиза, используя микроРНК-микрочип. Изменения экспрессии 29 микроРНК позволяли спрогнозировать гистотип аденомы, однако из 7 соматотропином были правильно определены только 2.

В исследовании G. Trivellin и соавт. [118] при помощи чипа TaqMan Low-Density (TLDA) выявлено 5 микроРНК, экспрессирующихся только в образцах соматотропином (miR-1, miR-760, miR-196b, miR-188-5p, miR-146b-3p), и

3 микроРНК, экспрессирующихся только в СТГ-, пролактинсекретирующих образцах (miR-205, miR-132, miR-523) [118].

В исследовании Z.-G. Mao и соавт. [84] также были изучены различия в экспрессии микроРНК в зависимости от ответа на лечение ланреотидом. В группе пациентов, получавших ланреотид в течение 4 месяцев до операции, отмечено повышение экспрессии восьми микроРНК (miR-183, miR-193a-5p, miR-222, miR-516b, miR-524-5p, miR-601, miR-629, miR-99b), и снижение экспрессия пяти (miR-124, miR-32, miR-574-5p, miR-744, miR-96) по сравнению с образцами соматотропином от пациентов, не получавших ланреотид. При сравнении пациентов с различной чувствительностью к терапии ланреотидом, определено, что у чувствительных пациентов повышена экспрессия miR-125b, miR-886-5p и снижена экспрессия miR-125a-5p, miR-198, miR-503, miR-524-5p, miR-630 [84].

В 2015 г. X. Fan и соавт. [37], обнаружено, что экспрессия miR-155, miR-185, miR-297, miR-519d, miR-766, и miR-934 повышена у пациентов, резистентных к ланреотиду. На клеточных линиях подтверждено, что мишенью miR-185 является SSTR2. Таким образом, предполагается, что ответ на лечение ланреотидом может быть связан не только с экспрессией SSTR2, но и с экспрессией miR-185 [37]. В исследовании J. Denes и соавт. [34] продемонстрировано снижение экспрессии miR-34a в соматотропиномах пациентов, чувствительных к аналогам соматостатина. При этом, уровень экспрессии miR-34a обратно коррелировал с ответом на лечение октреотидом пролонгированного действия. Экспериментально подтверждено, что целью miR-34 является AIP [34].

В 2009 г. Z.R. Qian и соавт. [105] изучили взаимосвязь повышенной экспрессии HMGA2 и сниженной экспрессии let-7 в 98 образцах аденом гипофиза (из них 28 соматотропином). В отличие от других гистотипов, в соматотропиномах не выявлено снижения экспрессии let-7. Повышенная экспрессия HMGA2 значительно чаще отмечалась в аденомах IV категории по Hardy и была ассоциирована с повышенной экспрессией Ki-67. Отмечена обратная зависимость экспрессии let-7 и HMGA2 [105].

В работе Ch. Yu и соавт. [136] исследована экспрессия и клиническая значимость miR-26a и гена *PLAG1* (Pleomorphic Adenoma Gene 1) в инвазивных аденомах гипофиза (различных гистотипов, включая соматотропиномы). Экспрессия miR-26 была значительно повышена в аденомах в целом по сравнению с нормальной тканью гипофиза. В образцах инвазивных аденом экспрессия miR-26a была повышена, а мРНК *PLAG1* снижена. Выявлена обратная корреляция между экспрессией miR-26a и мРНК *PLAG1* [136].

AIP – ген-супрессор опухолей, наследственные мутации которого выявляются при семейных изолированных аденомах гипофиза (Familial Isolated Pituitary Adenoma, FIPA) [123]. Несмотря на то, что соматических мутаций AIP не описано [106], приблизительно половина спорадических соматотропином имеет низкую экспрессию AIP; они так же, как и опухоли с экспрессией мутантного AIP, по большей части инвазивны и имеют низкую чувствительность к лечению аналогами соматостатина [63]. В исследовании Trivellin et al., опубликованном в 2012 году, изучена роль miR-107 в патогенезе спорадических аденом гипофиза и её взаимодействие с супрессорным геном, кодирующим белок AIP. Исследование проведено в двух группах, двумя методами: в первой группе исследовано 14 образцов аденом (6 гормонально-неактивных, 3 СТГ-продуцирующих, пять СТГ-, ПРЛ-секретирующих) в сравнении с 5 образцами нормальной ткани гипофиза, на предмет глобальной экспрессии микроРНК, с использованием чипа TaqMan Low-Density (TLDA); во второй группе исследовано 39 образцов аденом (24 гормонально-неактивных, 11 СТГ-продуцирующих, 4 СТГ-, ПРЛ-секретирующих), на предмет экспрессии miR-107, методом RT-qPCR, в двух независимых экспериментах. При помощи TLDA выявлено 5 микроРНК, экспрессирующихся только в образцах соматотропином, и 3 микроРНК, экспрессирующихся только в СТГ-, ПРЛ-секретирующих образцах, повышение экспрессии miR-107 выявлено в образцах гормонально-неактивных аденом, но не обнаружено в СТГ-продуцирующих и в СТГ-, ПРЛ-секретирующих образцах. Однако, при проведении исследований методом RT-qPCR, выявлено повышение экспрессии в образцах вышеуказанных типов, в двух экспериментах. Также было подтверждено, что

целью miR-107 является AIP. По результатам экспериментов in vitro, авторы предположили, что miR-107 может связываться с 3’-нетранслируемым регионом мРНК AIP и ингибировать синтез белка [118].

1.7 Циркулирующие микроРНК у пациентов с акромегалией

Исследования по циркулирующим микроРНК при акромегалии суммированы в Таблице 5.

Таблица 5. Исследования по циркулирующим микроРНК при акромегалии

Количество пациентов с акромегалией	**Биоматериал**	**МикроРНК**	**Экспрессия при акромегалии**	**Метод измерения**	**Источник**
11	плазма	miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185	снижена	RT-qPCR	[66]
22	плазма	miR-100-5p, miR-550a-5p, miR-7b-5p, miR-96-5p	повышена	RT-qPCR	[139]
27	сыворотка	miR-103a-3p miR-191-5p	повышена	RT-qPCR	[121]
		miR-660-5p	снижена		
6	сыворотка (экзосомы)	miR-320a miR-423-5p	снижена	NGS	[137]
7	плазма	miR-376a-3p, miR-150-5p miR-144-5p	снижена	NGS	[93]

Изменения в экспрессии циркулирующих микроРНК при акромегалии впервые описаны в исследовании B. Kelly и соавт.: в данной работе изучались профили экспрессии циркулирующих микроРНК в плазме крови у пациентов, получающих рекомбинантный гормон роста и не получающих такого лечения, в том числе у пациентов с акромегалией. Экспрессия miR-2861, miR-663, miR-3152 и

miR-3185 была снижена в контрольных образцах, включая пациентов с соматотропиномами [66].

В исследовании Гребенниковой Т.А. и соавт., целью которого было изучение экспрессии микроРНК, регулирующих процессы костного ремоделирования, в плазме крови у пациентов с акромегалией, выявлено статистически значимое повышение экспрессии четырех микроРНК у пациентов с акромегалией по сравнению со здоровыми добровольцами: miR-100-5p, miR-550a-5p, miR-7b-5p и miR-96-5p [139].

В исследовании Valassi E и соавт. определялись микроРНК сыворотки крови у пациентов с ремиссией акромегалии по сравнению со здоровыми добровольцами с целью сопоставления с биохимическими и структурными показателями костного обмена. Авторы обнаружили повышение экспрессии miR-103a-3p и miR-191-5p и снижение miR-660-5p у пациентов с акромегалией [121].

Zhao и соавт. сравнили профили экспрессии экзосомальных микроРНК сыворотки у пациентов с акромегалией по сравнению со здоровыми добровольцами. Отмечено статистически значимое снижение уровней miR-320a и miR-423-5p у пациентов с соматотропиномами [137].

Nemeth и соавт. изучили профили экспрессии экзосомальных микроРНК плазмы у 45 пациентов с аденомами гипофиза до и после оперативного лечения, среди которых - семь соматотропином. Используя NGS, авторы выявили изменения в экспрессии изомеров miR-181b-5p и miR-382-3p при акромегалии по сравнению со здоровыми добровольцами. Кроме того, уровни miR-376a-3p, miR-150-5p и miR-144-5p статистически значимо различались в образцах после операции, по сравнению с дооперационными. При попытке валидизировать различия в экспрессии miR-150-5p методом RT-qPCR, статистически значимых различий не получено [93].

1.8 Заключение по обзору литературы

Несмотря на широкие возможности лечения акромегалии, процент пациентов, достигающих ремиссии после хирургического лечения остаётся невысоким, что требует поиска дооперационных предикторов эффективности,

которые позволили бы применять персонализированный подход и подбор других методов лечения для пациентов, у которых оперативное лечение будет заведомо неэффективным.

Экспрессия микроРНК различается в аденомах гипофиза с различной гормональной активностью, в том числе – в СТГ-секретирующих. При этом, различия также определены при сравнении пациентов с микро- и макроаденомами, а также при различной чувствительности к медикаментозному лечению. Имеются ограниченные данные по изменённой экспрессии микроРНК плазмы и сыворотки при акромегалии, в которых RT-qPCR использовался как единственный метод определения уровней микроРНК и последние определялись исходя из гипотетической роли в патогенетических процессах заболевания. Опубликованные данные позволили предположить, что измерение микроРНК плазмы с помощью высокопроизводительного секвенирования с последующей валидизацией методом RT-qPCR позволит получить однозначный ответ о наличии циркулирующих микроРНК-кандидатов для дальнейшего исследования при акромегалии. При выявлении подобных микроРНК необходимо сопоставить их с клиническими, лабораторными и инструментальными показателями пациентов, что позволит оценить потенциал их практического применения при акромегалии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

В соответствии с поставленными целями и задачами, в первой части нашей работы проведено одноцентровое исследование случай-контроль, во второй части - проспективное неконтролируемое наблюдательное исследование.

2.2 Условия проведения

Набор пациентов проводился на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России (НМИЦ эндокринологии, Москва, РФ), в отделении нейроэндокринологии и остеопатий (зав. отделением – д.м.н. Ж.Е. Белая). Набор здоровых добровольцев проводился из числа сотрудников ФГБУ «НМИЦ эндокринологии».

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

Оперативное лечение проводилось в нейрохирургическом отделении ФГБУ "НМИЦ эндокринологии" (руководитель – д.м.н. А.Ю. Григорьев)

Гормональные исследования проводились в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (зав. лабораторией – к.м.н. Л.В. Никанкина).

МРТ проводилась в отделении лучевой диагностики ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (руководитель – д.м.н., проф. А.В. Воронцов).

Морфологическое исследование проведено в отделе фундаментальной патоморфологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (зав. отделением – д.м.н., проф. А. Ю. Абросимов).

2.3 Критерии соответствия

Пациенты с акромегалией

Критерии включения: пациенты обоих полов, в возрасте 18 лет и старше, с активной стадией акромегалии (код МКБ-10 E22.0), подтвержденной характерными клиническими проявлениями, повышением ИФР-1 (согласно

возрастному референсному диапазону) и отсутствием подавления секреции СТГ менее 1,0 нг/мл в ходе перорального глюкозотолератного теста (ПГТТ).

Критерии исключения: прием аналогов соматостатина в анамнезе или на момент включения в исследование; лучевая терапия в анамнезе; акромегалия вследствие генетических синдромов, период беременности и лактации, психические заболевания, онкологические заболевания, наличие острых заболеваний и декомпенсации сопутствующих заболеваний на момент включения.

Способ формирования выборки пациентов с акромегалией – сплошной. Период набора: декабрь 2016 – ноябрь 2018 гг.

Здоровые добровольцы

Критерии включения: субъекты обоих полов, в возрасте 18 лет и старше, отсутствие клинических проявлений эндокринных заболеваний.

Критерии исключения: период беременности и лактации, психические заболевания, онкологические заболевания, наличие острых заболеваний и декомпенсации хронических заболеваний на момент включения.

Способ формирования выборки здоровых добровольцев – произвольный. Период набора – сентябрь 2018 – февраль 2019 гг.

Критерии оценки исходов

Критерием ремиссии акромегалии в раннем послеоперационном периоде считалось подавление уровня СТГ в ходе ПГТТ менее 1,0 нг/мл (строгий критерий ремиссии – менее 0.4 нг/мл). Критерий долгосрочной послеоперационной ремиссии – нормализация уровня ИФР-1 согласно возраст-специфическому референсному диапазону.

2.4 Лабораторные исследования

Забор крови из периферической вены выполнялся утром натощак в промежуток 8:00–10:00. Образцы центрифугировались при температуре 5°C и скорости вращения 3000 оборотов/мин в течение 20 минут (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов (A-4-81, Ф-4-81-MTP/Flex,

FA-45-30-11 и F-45-48-PCR)). Образцы сыворотки и плазмы немедленно замораживались и хранились при температуре -80°С.

ИФР-1 (возраст-специфические референсные диапазоны: 18-20 лет: 127- 584 нг/мл; 21-25 лет: 116-358 нг/мл; 26-30 лет: 117-329 нг/мл; 31-35 лет: 115-307 нг/мл; 36-40 лет: 109-284 нг/мл; 41-45 лет: 101-267 нг/мл; 46-50 лет: 94-252 нг/мл; 51-55 лет: 87-238 нг/мл; 56-60 лет: 81-225 нг/мл и 61-65 лет: 75-212 нг/мл) и СТГ (референсный диапазон: 0,6-6,9 нг/мл) измеряли иммунохемилюминесцентным методом на аппарате Liaison. Измерение уровня пролактина проводилось иммунохемилюменисцентным методом на автоматизированной системе Vitros 3600 (референсный диапазон: 69-340 мЕд/л).

2.5 Инструментальные исследования

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

Магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга проводилась на магнитно-резонансном томографе Magnetom Harmony 1.0T фирмы Siemens (Германия) с введением гадолиниевого контрастного препарата по показаниям. Объем опухоли (V) был рассчитан способом, предложенным G. Di-Chiro и K.B. Nelson для измерения объема гипофиза: V=0,5xLxWxT, где L- высота аденомы, W- ширина, T- переднезадний размер (толщина), выраженные в мм [25].

2.6 Гистологические и иммуногистохимические исследования

Морфологический анализ образцов соматотропином выполнен в сотрудничестве с к.м.н. Лапшиной А.М. и включал гистологический и иммуногистохимический (ИГХ) методы исследования. В исследование были включены образцы ткани с наличием опухоли, объем которых был достаточен для гистологического и иммуногистохимического исследований. Замороженные срезы не использовались. Приготовление гистологических препаратов проводилось по стандартной методике с использованием гистопроцессора (Leica asp200) с проведением дегидратации полученных фрагментов ткани опухоли в абсолютном спирте в течение 12 часов, затем ткань заливалась в парафиновые блоки, после чего

из парафиновых блоков производились срезы толщиной не более 5 мкм. Далее срезы депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином и проводили иммуногистохимические реакции с антителами к СТГ (разведение 1:400, Dako, поликлональные кроличьи), пролактину (разведение, 1:600, Dako, поликлональные кроличьи), низкомолекулярному цитокератину (разведение 1:100, моноклональные мышиные, клон CAM 5.2 Cell Marque), рецепторам соматостатина 2 подипа (разведение, 1:100, Epitomics, моноклональные кроличьи, клон EP 149), рецепторам соматостатина 5 подипа (разведение, 1:100, abcam, моноклональные кроличьи, клон UMB-5), с демаскирующей обработкой буфером с высоким pH. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) выполнено с помощью автоматизированного аппарата (иммуностейнер Leica Bond Max) по стандартному протоколу.

В соответствии с морфологической классификацией ВОЗ от 2017 года [94], в исследованных образцах ткани опухоли гипофиза были разделены на плотногранулированные соматотропиномы (ПГС), редкогранулированные соматотропиномы (РГС), маммосоматотропиномы (МС), смешанные сомато- и лактотрофные аденомы (ССЛ). ПГС представлены оксифильными клетками (при окраске гематоксилином и эозином), с интенсивным окрашиванием цитоплазмы большинства опухолевых клеток с антителами к СТГ и CAM 5.2 (при ИГХ), РГС – опухоли гипофиза из оксифильных и хромофобных клеток (при окраске гематоксилином и эозином), с очаговой или слабо выраженной иммуноэкспрессией СТГ цитоплазмы опухолевых клеток и наличием фиброзных телец в более 75% клеток опухоли. МС состоят из одной популяции клеток, способных экспрессировать СТГ и пролактин. ССЛ состоят из двух популяций клеток, каждая из которых имеет позитивное окрашивание на СТГ или пролактин.

Оценка экспрессии рецепторов соматостатина 2 и 5 подтипов проводилась по системе immunoreactive score system (IRS) с учетом оценки % окрашенных клеток (с локализацией на мембране), где 0% - 0 баллов, менее 10% клеток - 1 балл, 10-50% - 2 балла, 51-80% - 3 балла, более 80% клеток - 4 балла; и интенсивности окрашивания, где нет реакции - 0 баллов, слабая (реакция видна при большом

увеличении) - 1 балл, умеренная (реакция видна на малом увеличении) - 2 балла, выраженная (значительная реакция видна на малом увеличении) - 3 балла. Количество баллов процента окрашенных клеток умножалось на количество баллов интенсивности окрашивания. Таким образом, в образцах опухолей IRS (% клеток х интенсивность) составлял от 1 до 12 баллов.

В качестве контроля для антител СТГ, CAM 5.2 и пролактину использовали ткань трупного аденогипофиза. Для антител к рецепторам соматостатина в качестве контроля использовали образцы ткани нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы.

2.7 Генетические исследования

Выделение микроРНК из плазмы

Выделение микроРНК проводилось из 200 мкл плазмы с использованием наборов miRNeasy Serum/Plasma Kit («Qiagen», Германия), согласно инструкции производителя, на автоматической станции QIAcube («Qiagen», Германия). Для предотвращения деградации 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).

Количественная оценка транскриптов микроРНК с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS)

Полногеномный анализ экспрессии микроРНК был выполнен на высокопроизводительном секвенаторе NextSeq 500 с помощью TruSeq Small RNA Library Prep Kit («Illumina», США). Биоинформатический анализ полученных данных проводился с помощью программного обеспечения Cutadapt [85] (удаление адаптеров), Bowtie2 [76] (выравнивание прочтений), FastQC (контроль качества), Seqbuster [98] (аннотация последовательностей микроРНК, анализ изомеров микроРНК). Итоговый анализ для получения данных по различиям в экспрессии микроРНК проводился при помощи DESeq2 [82]. Поправка на множественность сравнений осуществлялась методом Бенджамини-Хохберга [12].

Прочтения для каждого образца из экспериментальной фазы исследования высчитаны согласно присвоенным идентификаторам микроРНК. Для подсчета молекул использовалась кластеризация уникальных молекулярных индексов (UMI). Для расчета различий в экспрессии использовались прочтения UMI. Прочтения нормализованы на общее количество прочтений в каждом образце и представлены как количество прочтений на 10000 (нормализованное количество прочтений). Для кластерного анализа использована иерархическая кластеризация с применением метода Евклидова расстояния – включены микроРНК с числом прочтений более 10.

Количественная оценка транскриптов микроРНК с помощью RT-qPCR

Анализ экспрессии микроРНК производили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Исследование проведено на оборудовании StepOnePlus (Applied Biosystems, США) с наборами TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, США) и TaqMan Advanced miRNA (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкциям производителей. Общий объем ПЦР реакции составлял 20 мкл. Условия амплификации фрагментов ДНК: 95С/20 сек – 1 цикл; 95С/1 сек, 95С/20 сек – 40 циклов. Данные экспрессии нормализованы с использованием геометрической средней референсной микроРНК (cel-miR-39-3p). Для получения значений пороговых циклов (cycle threshold, Ct) использовано программное обеспечение SDS (версия 2.3, Applied Biosystems, США). Значение Ct <35 выбрано в качестве порогового для определения экспрессии микроРНК. Для сравнительной оценки циркулирующих микроРНК использован метод дельта-Ct, выполненный в пакете ddCT версии 1.30.0.

2.8 Наблюдение

Сбор катамнестической информации по включенным пациентам осуществлялся путем телефонных переговоров и личного контакта.

Процесс формирования выборки для оценки исходов нейрохирургического лечения представлен на рисунке 2.

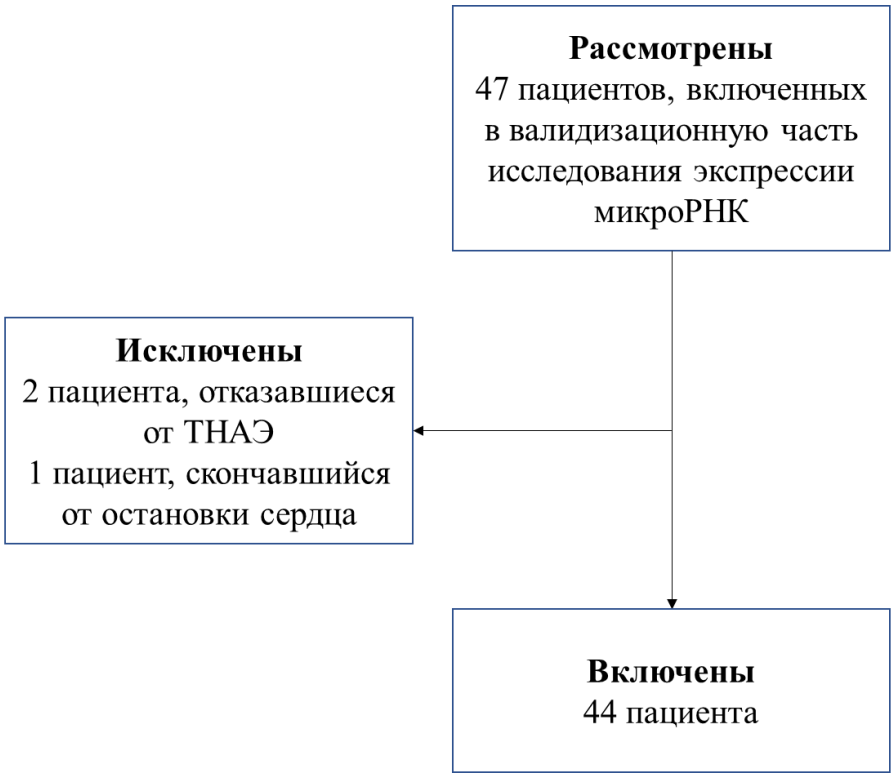


Рисунок 2. Формирование выборки для послеоперационного наблюдения из валидизационной части исследования экспрессии микроРНК

Примечания: ТНАЭ – трансназальная транссфеноидальная аденомэктомия

Критерием рецидива являлось превышение верхней границы возраст-специфического диапазона уровня ИФР-1. Отсутствие рецидива оценивалось как ремиссия.

2.9 Этическая экспертиза

Локальным Этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, согласно протоколу, постановлено, что планируемая научная работа соответствует этическим стандартам добросовестной клинической практики и может быть проведена на базе отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (протокол заседания №20 от 14 декабря 2016 года).

Добровольное информированное согласие было подписано всеми пациентами и здоровыми добровольцами, включенными в исследование.

2.10 Статистический анализ

Статистический анализ выполнялся в сотрудничестве с к.м.н. Солодовниковым А.Г.

Основные количественные характеристики пациентов представлены в виде среднего (M) или медианы (Me) и 95% доверительного интервала (95% ДИ) или межквартильного размаха (25–75 процентиль – Q25-Q75) в зависимости от характера распределения и выбранного метода анализа. Соотношения качественных признаков представлены в виде долей (%).

Сравнение между количественными параметрами пациентов и группой контроля проводили с использованием непарных двухсторонних t-тестов или критерия Манна-Уитни. Точный критерий Фишера был использован для сравнения двух независимых групп для качественных параметров. Статистически значимым признавался уровень ошибки первого рода менее 5% ($p < 0,05$). Для коррекции проблемы множественных сравнений применялась поправка Бонферрони (кроме сравнений в уровнях экспрессии микроРНК, для которых применялся метод Бенджамини-Хохберга, встроенный в соответствующие вычислительные алгоритмы). После применения поправки значения p в диапазоне между расчитанным и 0,05 интерпретировались как статистическая тенденция.

Статистический анализ и графический вывод результатов выполнялись с использованием программного обеспечения R версии 3.4.0 (2017-04-21). Количественные данные, полученные из исходного анализа RT-qPCR, были преобразованы с использованием log2 fold changes (FC) в сравнении с контролем (cel-39), чтобы обеспечить прямое сравнение между группами. Затем значения FC2 сравнивались между каждой парой групп с использованием независимого t-критерия выборки с вычислением нескорректированного p-значения (p) и скорректированного значения p для исключения ложного обнаружения различий при множественных сравнениях с использованием метода Бенджамини-Хохберга [53, 108].

Корреляционный анализ проведён с использованием коэффициента ранговой корреляции tay-b Кендалла.

Диагностическая ценность микроРНК, различно экспрессирующихся у пациентов с акромегалией и здоровых добровольцев, оценивалась при помощи ROC-анализа.

Формирование панели микроРНК для определения больных и здоровых добровольцев выполнена при помощи метода логистической регрессии. В связи с ограниченным размером выборки в исследовании, многофакторный анализ не проводился. Для оценки качества математических моделей применялся критерий Хосмера-Лемешова, для работоспособности – ROC-анализ с расчетом чувствительности, специфичности, ПЦПР и ПЦОР и их 95% ДИ по методу Клоппера-Пирсона.

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

- Истинно положительный (ИП) результат: при использовании исследуемого показателя, правильность диагноза подтверждена стандартным методом диагностики;
- Истинно отрицательный (ИО) результат: отсутствие заболевания подтверждено как исследуемым методом, так и стандартным методом диагностики;
- Ложноположительный (ЛП) результат: при помощи исследуемого метода выявлено заболевание, но результат не подтвержден стандартным методом;
- Ложноотрицательный (ЛО) результат: заболевание не выявлено исследуемым методом, но выявлено при использовании стандартного метода;

Затем, по специальным формулам производилось вычисление основных показателей эффективности диагностического метода: диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), общей точности (ОТ), прогностической ценности положительного результата (ПЦПР) и

прогностической ценности отрицательного результата (ПЦОР). ПЦПР – вероятность наличия заболевания при положительном (патологическом) результате теста. ПЦОР – вероятность отсутствия заболевания при отрицательном (нормальном) результате теста.

Для оценки информативности методов используют параметры:

● ДЧ – процент ИП пациентов среди всех пациентов с патологией

● ДС – процент ИО пациентов среди всех здоровых пациентов

● ОТ – доля верных предсказаний относительно всего количества наблюдений

● ПЦПР – доля ИП пациентов с положительным результатом диагностического теста

● ПЦОР – доля ИО пациентов с отрицательным результатом диагностического теста

Для расчёта соответствующих параметров, определенных выше, необходимо представить выборку в виде таблицы сопряженности (Таблица 6).

Таблица 6. Таблица сопряженности для расчета параметров информативности исследуемых методов

Результат исследования	Диагноз или стадия заболевания подтверждена стандартным методом		Сумма
	Подтверждено	Не подтверждено	
Выявлено (положительный)	a	b	a+b
Не выявлено (отрицательный)	c	d	c+d

Сумма	a+c	b+d	a+b+c+d=n

a – ИП, b – ЛП, c – ИО, d – ЛО;

Для расчета чувствительности использовалась следующая формула: ДЧ = a/(a+c)·100%

Для расчета специфичности использовалась следующая формула: ДС = d/(b+d)·100%

Для расчета точности модели применялась формула: ОТ = (a+d)/n *100%

Положительная прогностическая ценность вычислялась по следующей формуле:

ПЦПР = a/(a+b)·100%

Отрицательная прогностическая ценность вычислялась по формуле: ПЦОР = d/(c+d)·100%

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Для исследования экспрессии микроРНК плазмы методом NGS включено 12 пациентов с акромегалией и 12 здоровых добровольцев. Общая характеристика и биохимические показатели пациентов представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Основные характеристики и биохимические показатели пациентов и лиц контрольной группы, включенных в анализ экспрессии микроРНК плазмы крови методом NGS

Параметры	**Акромегалия**	**Здоровые добровольцы**	**p***
Количество пациентов	12	12	-
Пол, м(%):ж(%)	4(33,3%):8(67,7%)	4(33,3%):8(67,7%)	1,000
Возраст, лет	31,00 [24,50;43,25]	39,00 [28,50;42,00]	0,363
ИМТ, кг/м^2	26,65 [25,55;33,38]	26,76 [21,28;30,67]	0,307
ИФР-1, нг/мл	599,55 [537,28;844,83]	225,95 [172,23;258,53]	<0,001
СТГ базальный, нг/мл	11,57 [3,19;42,75]	-	-

Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей. Сравнение количественных признаков между группами проведено при помощи критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использован критерий χ2 Пирсона.

* Пороговый P_0=0,012 (после применения поправки Бонферрони)

Согласно данным Всероссийского регистра акромегалии, средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составляет 48,8 лет, соотношение мужчин и женщин – 1:2,58 [145]. В отечественной литературе отсутствует описание базальных уровней ИФР-1 и СТГ в рамках эпидемиологических исследований, что затрудняет оценку репрезентативности данных параметров в представленной выборке. В данном исследовании возраст включённых пациентов был несколько ниже, при этом, соотношение было приближено к литературным данным, в связи с чем данную выборку можно считать ограниченно репрезентативной.

3.2 Анализ экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с акромегалией методом NGS

В ходе биоинформатического анализа данных секвенирования получены результаты по экспрессии более 300 микроРНК в плазме крови, из них – 33 с числом прочтений более 10. Три микроРНК, экспрессия которых снижена в плазме крови у пациентов с акромегалией по сравнению со здоровыми добровольцами ($p < 0,05$): miR-4446-3p, miR-215-5p и miR-342-5p (Таблица 8).

Таблица 8. Изменения в экспрессии микроРНК плазмы крови у пациентов с акромегалией по данным NGS

микроРНК	Изменение	p	p*
miR-4446-3p	**-1,751**	**0,001**	**0,373**
miR-215-5p	**-3,041**	**0,005**	**0,800**
miR-342-5p	**-1,875**	**0,014**	**0,990**
miR-4433b-5p	-1,318	0,052	0,990
miR-146a-5p	-0,930	0,054	0,990
miR-636	2,099	0,057	0,990
miR-744-5p	-0,923	0,073	0,990
miR-210-3p	0,988	0,076	0,990
miR-146b-5p	-0,985	0,091	0,990
miR-381-3p	-2,728	0,096	0,990
miR-6087	1,704	0,137	0,990

miR-20a-5p	1,027	0,170	0,990
miR-222-3p	-0,903	0,193	0,990
miR-409-3p	-1,113	0,198	0,990
miR-6852-5p	-1,469	0,207	0,990
miR-431-5p	-1,848	0,239	0,990
miR-125b-2-3p	-1,219	0,246	0,990
miR-181a-3p	-1,149	0,276	0,990
miR-5189-5p	-1,154	0,298	0,990
miR-4508	1,507	0,300	0,990
miR-204-5p	-1,114	0,306	0,990
miR-6777-3p	1,175	0,321	0,990
miR-134-5p	-1,933	0,325	0,990
miR-18a-3p	1,031	0,336	0,990
miR-199a-5p	-1,703	0,342	0,990
miR-320d	1,682	0,344	0,990
miR-224-5p	1,510	0,355	0,990
miR-32-5p	-1,437	0,360	0,990
miR-122-5p	-0,950	0,378	0,990
miR-483-3p	1,163	0,388	0,990
miR-125b-5p	-1,202	0,402	0,990
miR-502-3p	1,218	0,430	0,990
miR-654-3p	-0,976	0,478	0,990

Примечания: * - значение p с поправкой на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга

Результаты кластерного анализа представлены на Рисунке 3. Учитывая отсутствие статистической значимости после поправки на множественность сравнений, в ходе кластерного анализа четкого разделения пациентов с акромегалией и здоровых добровольцев на кластеры не выявлено.

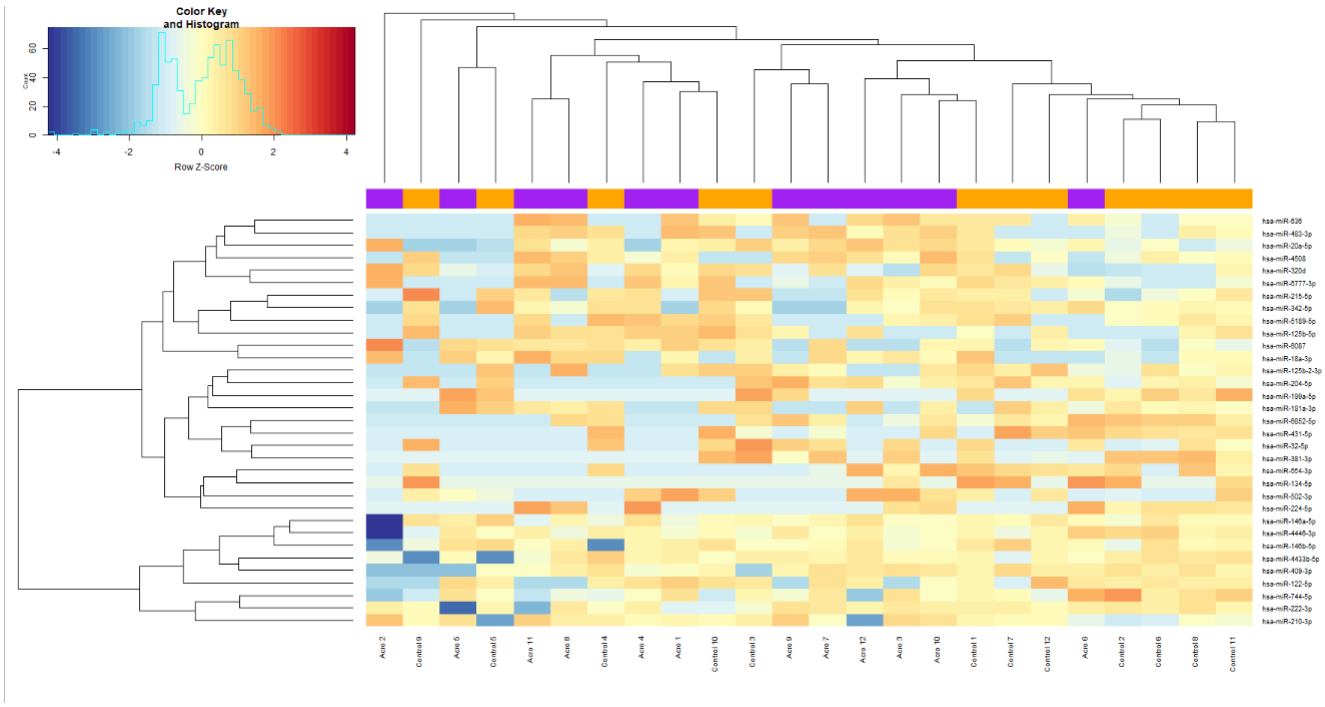


Рисунок 3. Кластерный анализ экспрессии циркулирующих микроРНК у пациентов с акромегалией и здоровыми добровольцами. *Кластерный анализ представлен в виде тепловой карты. Цвета обозначают высокую (оранжевый) и низкую (синий) экспрессию микроРНК плазмы. Принадлежность к группе обозначена фиолетовым (акромегалия) и оранжевым (здоровые добровольцы) цветами*

3.3 Валидизация различий в экспрессии микроРНК плазмы на расширенной выборке методом RT-qPCR

Для валидизации изменений, полученных в ходе NGS, отобраны пять микроРНК-кандидатов (miR-4446-3p, miR-215-5p, miR-342-5p, miR-210-3p, miR-146a-5p). Две микроРНК выбраны по данным литературы. Экспрессия miR-185 повышена в ткани соматотропином у пациентов резистентных к аналогам соматостатина первого поколения, при этом подтвержденной мишенью данной микроРНК в экспериментах на клеточной линии GH3 является SSTR2 [37]. Экспрессия MiR-34a в соматотропиномах обратно коррелирует с уровнем AIP, в экспериментах in vitro подавляет синтез AIP [34].

В валидизирующую часть исследования включено 47 пациентов с акромегалией и 28 здоровых добровольцев. В данную выборку включены по 11 человек из групп акромегалии и здорового контроля из анализа экспрессии

методом NGS (по 1 человеку из каждой выборки не было включено в связи с недостаточным количеством биоматериала). Основные характеристики групп представлены в таблице 9.

Таблица 9. Основные характеристики и биохимические показатели пациентов и лиц контрольной группы, включенных в анализ экспрессии микроРНК плазмы крови методом RT-qPCR

Параметры	**Акромегалия**	**Здоровые добровольцы**	**p***
Количество пациентов	47	28	-
Пол, м(%):ж(%)	14 (29,79%):33 (70,21%)	9 (32,14%):19 (67,86%)	1,000
Возраст, лет	47,00 [34,00;55,00]	42,50 [34,75;56,00]	0,752
ИМТ, кг/м^2	28,30 [25,85;33,85]	26,75 [22,71;30,02]	0,042
ИФР-1, нг/мл	689,50 [507,30;881,25]	157,25 [107,40;224,02]	**<0,001**
СТГ базальный, нг/мл	9,61 [4,79;17,2]	-	-
Пролактин, мЕд/л	298,8 [187;466,2]	-	-

Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей. Сравнение количественных признаков между группами проведено при помощи критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использован критерий χ2 Пирсона.

* Пороговый P_0=0,012 (после применения поправки Бонферрони)

Пациенты с акромегалией не отличались от группы сравнения по возрасту и полу. ИМТ у пациентов с акромегалией был несколько выше, не достигая статистической значимости после поправки на множественность сравнений. Возраст и распределение по полу соответствуют данным Всероссийского регистра акромегалии [145], что демонстрирует репрезентативность представленной выборки.

Показатели экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с акромегалией в сравнении со здоровым контролем представлены в Таблице 10. Получены статистически значимые различия в экспрессии miR-4446-3p 0,471 (95% ДИ: 0,387; 0,556) у пациентов с акромегалией от 1,024 (95% ДИ: 0,868; 1,179) у здоровых добровольцев, p <0,001, значение p с поправкой <0,001, miR-215-5p 0,360 (95% ДИ: 0,262; 0,458) у пациентов с акромегалией от 0,994 (95% ДИ: 0,760; 1,229) у здоровых добровольцев p <0,001, значение p с поправкой <0,001. Экспрессия микроРНК не различалась по полу.

Таблица 10. Экспрессия микроРНК плазмы крови у пациентов с акромегалией и у лиц из группы здорового контроля, измеренная методом RT-qPCR

микроРНК	**Акромегалия**	**Здоровые добровольцы**	**Log2FC**	**p**	**p***
miR-4446-3p	0.471 (0.2876)	1.024 (0.4020)	-1,119	**<0,001**	**<0,001**
miR-215-5p	0.360 (0.3345)	0.994 (0.6050)	-1,465	**<0,001**	**<0,001**
miR-146a-5p	1.204 (0.6339)	1.586 (0.8080)	-0,397	**0,027**	0,062
miR-210-3p	1.628 (0.6387)	1.396 (0.4245)	0,221	0,094	0,165
miR-185-5p	1.150 (0.5173)	1.373 (0.8702)	-0,255	0,167	0,195
miR-342-5p	1.250 (0.3968)	1.120 (0.3620)	0,158	0,165	0,195
miR-34a-5p	1.287 (0.5310)	1.320 (0.4881)	-0,036	0,790	0,790

Примечания: Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде абсолютной экспрессии (2^{-dCt}). Данные по экспрессии представлены в виде

средней и стандартного отклонения. Log2FC – бинарные логарифмы значений кратности изменений, рассчитанных как отношения геометрических средних значений 2^{-dCT}. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни.

* Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга.

Графическое представление выявленных различий представлено на Рисунке 4.

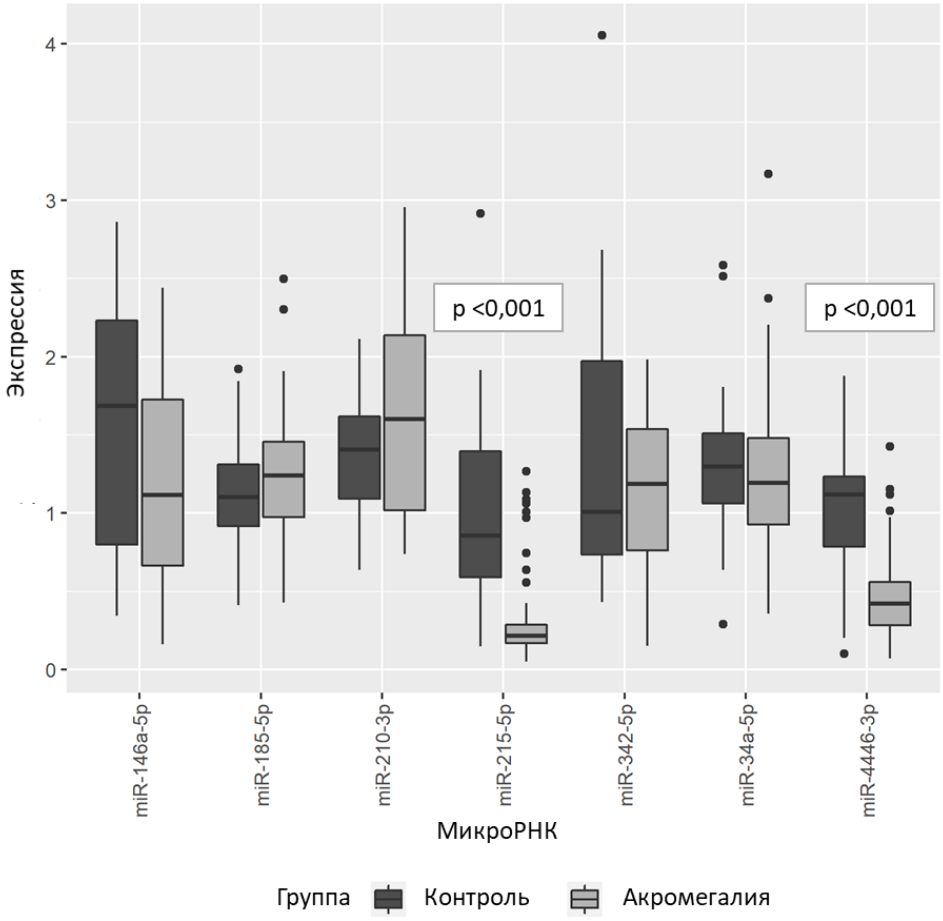
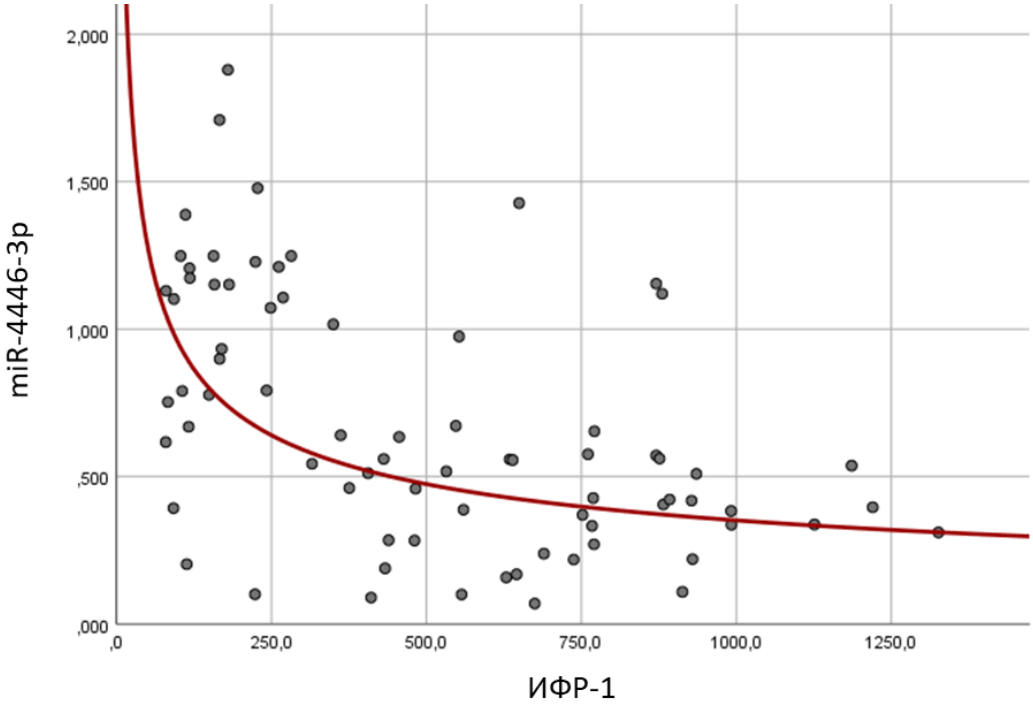


Рисунок 4. Экспрессия семи микроРНК в плазме крови у пациентов с акромегалией (n=47) в сравнении с группой сравнения (n=28). *Данные по уровням микроРНК для каждой группы представлены в виде абсолютной экспрессии (2^{-dCt}). Данные представлены в виде медианы, стандартного отклонения и 95% доверительного интервала. Сравнительный анализ выполнен с использованием критерия Манна-Уитни.*

В ходе корреляционного анализ выявлены обратные корреляции между miR-4446-3p и ИФР-1 (τ = -0,34, p <0,001), miR-215-5p и ИФР-1 (τ = -0,30, p <0,001)

(Рисунок 5), прямые корреляции между miR-4446-3p и miR-215-5p (τ =0,25, p <0,01), miR-342-5p и miR-34a-5p (τ =0,16, p <0,05). Не выявлено корреляций между микроРНК и СТГ или объемом опухоли.



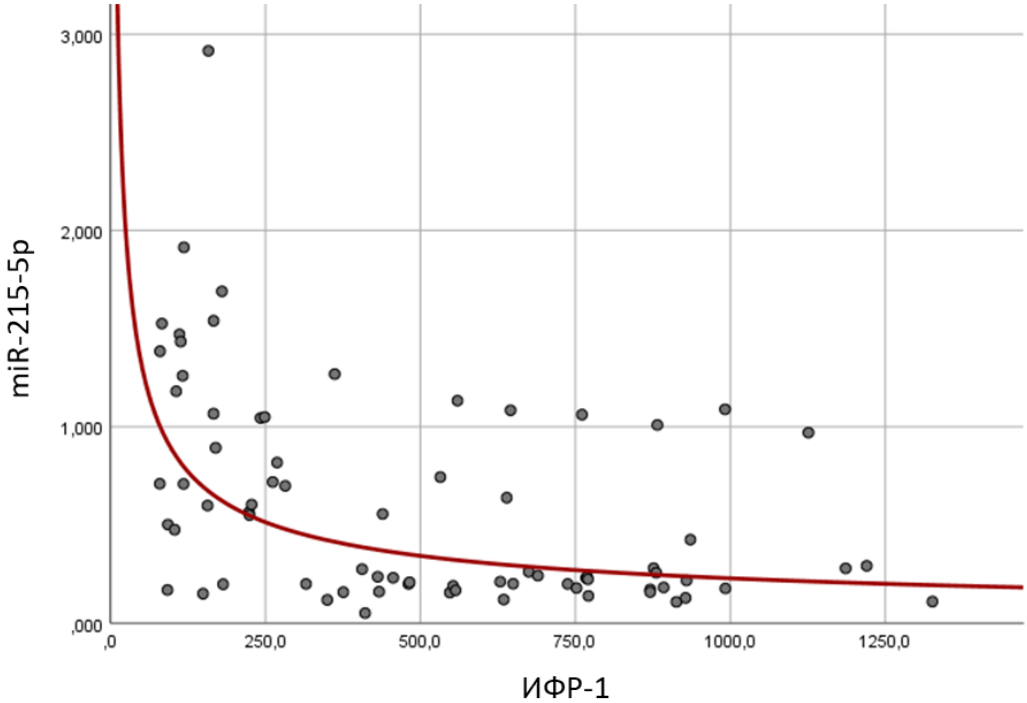
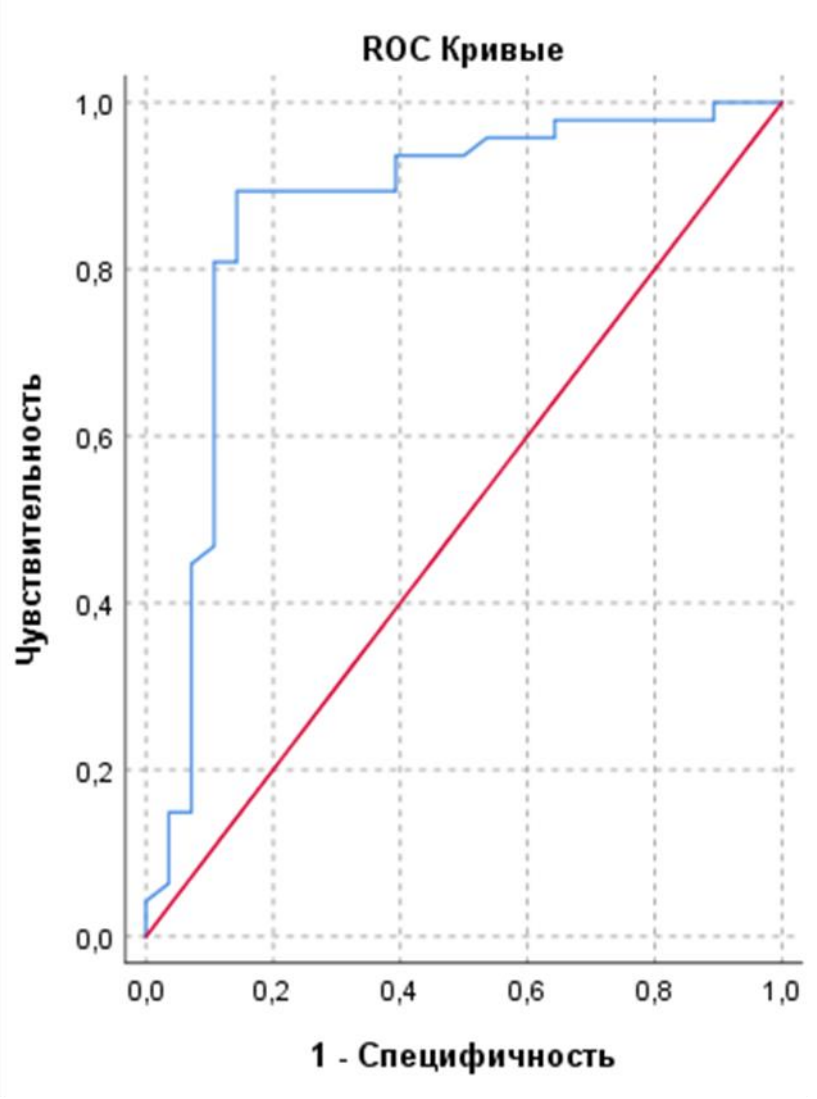


Рисунок 5. Диаграммы рассеяния для miR-4446-3p и ИФР-1, miR-215-5p и ИФР-1. Логарифмическая модель подгонки кривых, функция подгонки: Y = b0 +

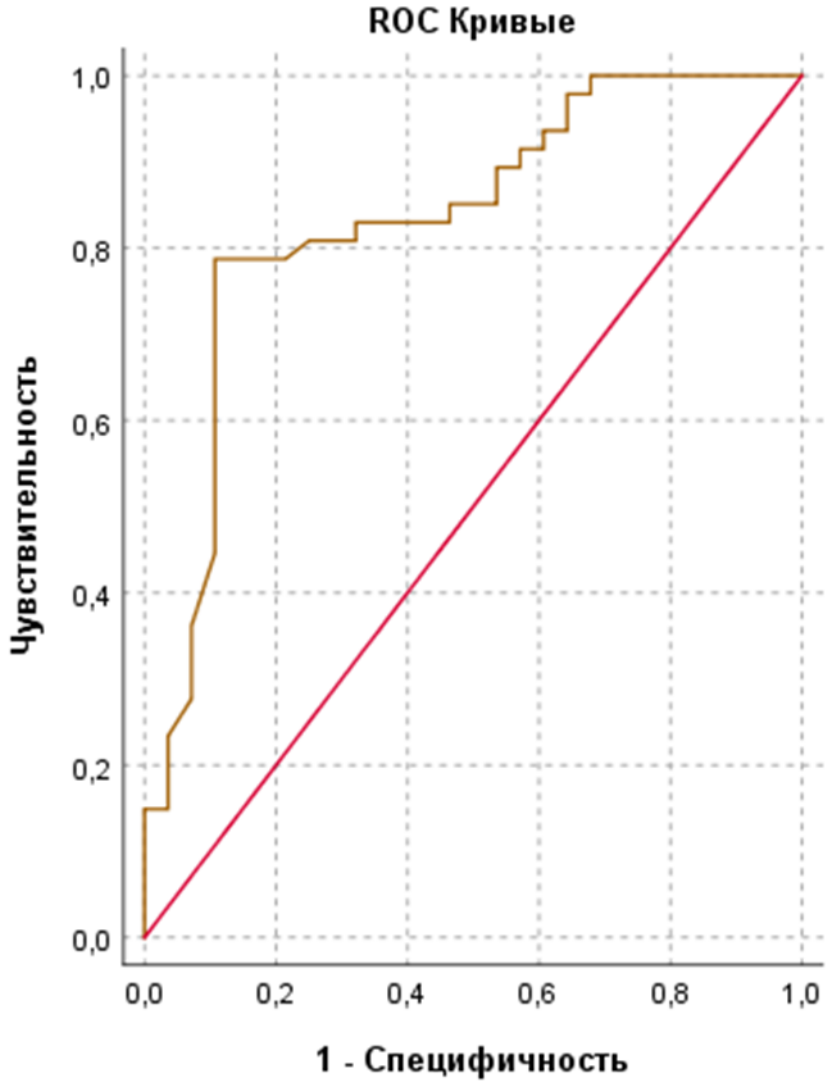
(b1 * ln(t)). Y – ИФР-1, t – miR-4446-3p (miR-215-5p). Модель статистически значима p <0,001 (Хи-квадрат).

Для оценки диагностической ценности miR-4446-3p и miR-215-5p проведён ROC-анализ, результаты представлены на рисунках 6 и 7, соответственно.



Признак	Площадь под кривой (95% ДИ)	N	Станд. ошибка	P
miR-4446-3p	0,862 (0,723; 0,936)	75	0,0512	<0,001

Рисунок 6. ROC-анализ miR-4446-3p в качестве диагностического маркера акромегалии



Признак	Площадь под кривой (95% ДИ)	N	Станд. ошибка	P
miR-215-2p	0,830 (0,698; 0,907)	75	0,0514	<0,001

Рисунок 7. ROC-анализ miR-215-5p в качестве диагностического маркера акромегалии

Площадь под кривой для miR-4446-3p и miR-215-5p составила: 0,862 (95% ДИ, 0,722; 0,936, p <0,001) и 0,829 (95% ДИ, 0,698; 0,907, p <0,001), соответственно. Согласно критерию Юдена, выбраны отрезные значения: 0,667 для miR-4446-3p, 0,430 для miR-215-5p. Данные для расчета параметров информативности по количеству случаев представлены в таблицах 11, 12.

Таблица 11. Таблица сопряженности для анализа диагностической эффективности miR-4446-3p

miR-4446-3p	Диагноз подтверждён при клинико-лабораторном обследовании		Сумма
	Акромегалия	Нет акромегалии	
Выявлено	42	5	47
Не выявлено	5	23	28
Сумма	47	28	75

Таблица 12. Таблица сопряженности для анализа диагностической эффективности miR-215-5p

miR-215-5p	Диагноз подтверждён при клинико-лабораторном обследовании		Сумма
	Акромегалия	Нет акромегалии	
Выявлено	39	9	48
Не выявлено	8	19	27
Сумма	47	28	75

Для оценки диагностической ценности панели miR-4446-3p и miR-215-5p применен метод логистической регрессии с построением математической модели. Логистическая регрессионная модель вероятности наличия акромегалии представлена в таблице 13.

Таблица 13. Параметры логистической регрессионной модели для расчета вероятности наличия акромегалии

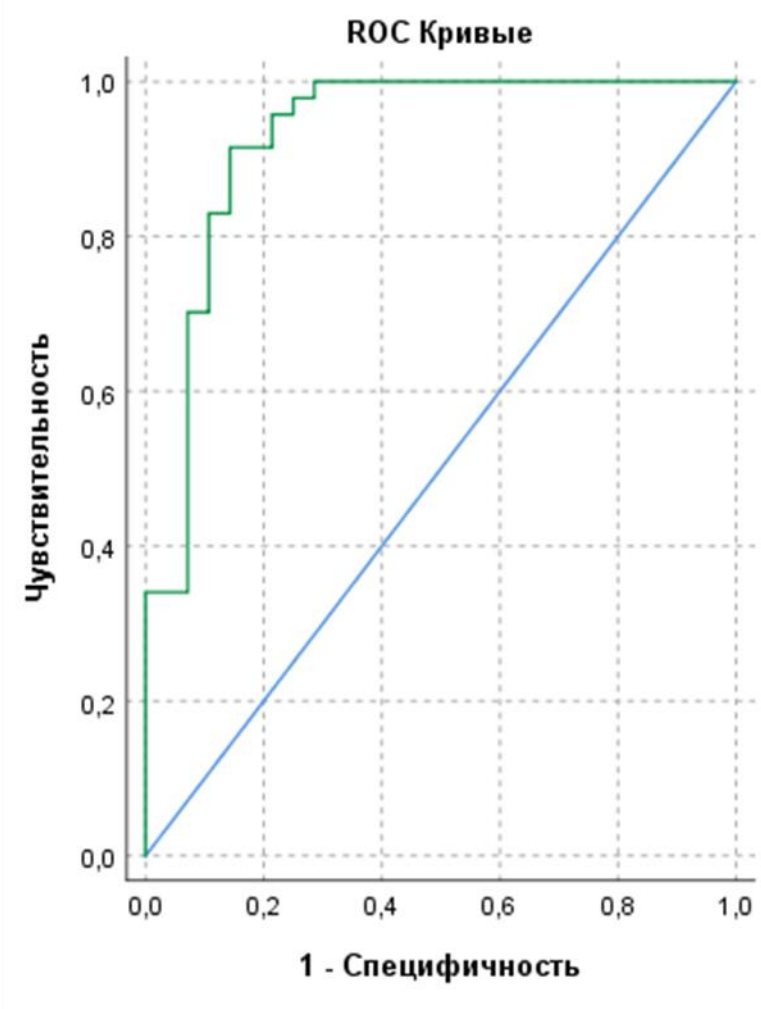
Исследуемая переменная	Коэффициент регрессии β	Стандартная ошибка	Критерий Вальда χ^2	p
miR-4446-3p	-4,231	1,083	15,268	<0,001
miR-215-5p	-3,201	0,926	11,950	0,001
Константа	5,589	1,224	20,865	<0,001

Вероятность наличия акромегалии может быть расчитана по формуле:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(5{,}589 - 4{,}231 * A - 3{,}201 * B)}}$$

где: p – вероятность 1 исхода (есть акромегалия), A – уровень экспрессии miR-4446-3p, B – уровень экспрессии miR-215-5p.

Для поиска оптимальной отрезной точки панели в определении пациентов с акромегалией и здоровых добровольцев проведён ROC-анализ. Площадь под кривой составила 0,928 (95% ДИ, 0,859; 0,996, p <0,001) (Рисунок 8).



Признак	Площадь под кривой (95% ДИ)	N	Станд. ошибка	P
miR-4446-3p + miR-215-5p	0,928 (0,859; 0,996)	75	0,035	<0,001

Рисунок 8. ROC-анализ для комбинации miR-4446-3p и miR-215-5p в определении пациентов с акромегалией и здоровых добровольцев.

Согласно критерию Юдена выбрано отрезное значение 0,542. Данные для расчета параметров информативности по количеству случаев представлены в таблице 14.

Таблица 14. Таблица сопряженности для анализа диагностической эффективности панели miR-4446-3p и miR-215-5p

miR-4446-3p+miR-215-5p	Диагноз подтверждён при клинико-лабораторном обследовании	Сумма

	Акромегалия	Нет акромегалии	
Выявлено	43	4	47
Не выявлено	4	24	28
Сумма	47	28	75

Таким образом, отрезная точка 0,542 для панели miR-4446-3p+miR-215-5p соответствует чувствительности 91,5% (95% ДИ, 83,1%; 96,3%) и специфичности 85,7% (95% ДИ, 71,7%; 93,8%).

Обобщенные данные по диагностической информативности исследованных микроРНК представлены в таблице 15.

Таблица 15. Характеристики диагностической информативности miR-4446-3p, miR-215-5p и панели miR-4446-3p+miR-215-5p

	ДЧ (95% ДИ)	**ДС (95% ДИ)**	**ОТ (95% ДИ)**	**ПЦПР (95% ДИ)**	**ПЦОР (95% ДИ)**
miR-4446-3p	89,4% (76,9%-96,5%)	82,1% (63,1%-93,9%)	86,7% (76,8%-93,4%)	89,4% (79,0%-94,9%)	82,1% (66,4%-91,5%)
miR-215-5p	83,0% (69,2%-92,4%)	67,9% (47,7%-84,1%)	77,3% (66,2%-86,2%)	81,3% (71,4%-88,3%)	70,4% (54,6%-82,4%)
miR-4446-3p +miR-215-5p	91,5% (79,6%-97,6%)	85,7% (67,3%-96,0%)	89,3% (80,1%-95,3%)	91,5% (81,2%-96,4%)	85,7% (69,9%-93,9%)

3.4 Гистологические и иммуногистохимические характеристики соматотропином

Из 47 пациентов, включенных в валидизационную часть исследования, 44 проведена транссфеноидальная аденомэктомия. Послеоперационные образцы ткани двух пациентов не были включены в связи с недостаточным количеством материала.

Таким образом, в иммуногистохимическое исследование включено 42 образца соматотропином. Морфологическое распределение представлено следующим образом: 30 ПГС (71,4%), 10 РГС (23,8%), 1 МС (2,4%), 1 ССЛ (2,4%). На Рисунках 9-13 наглядно представлены морфологические варианты соматотропином и различная экспрессия SSTR2.

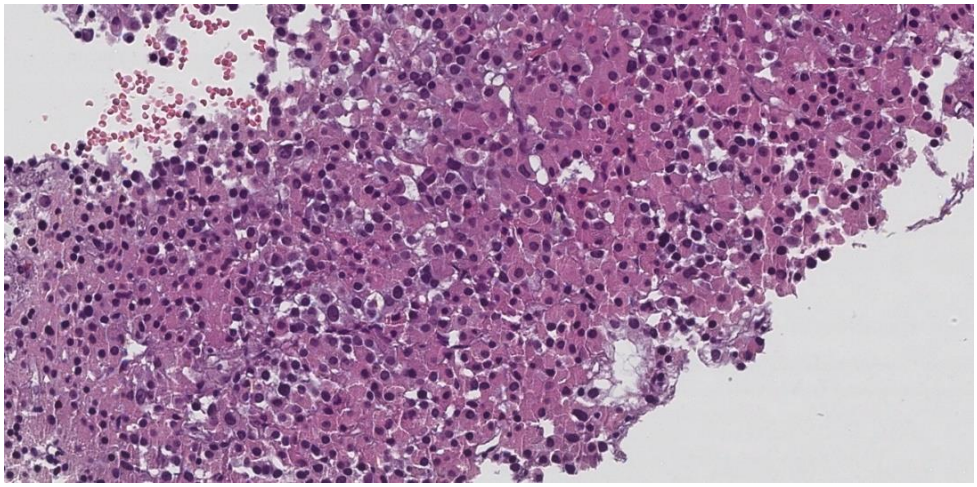


Рисунок 9. Плотногранулированная соматотропинома, окрашивание гематоксилином и эозином, х20

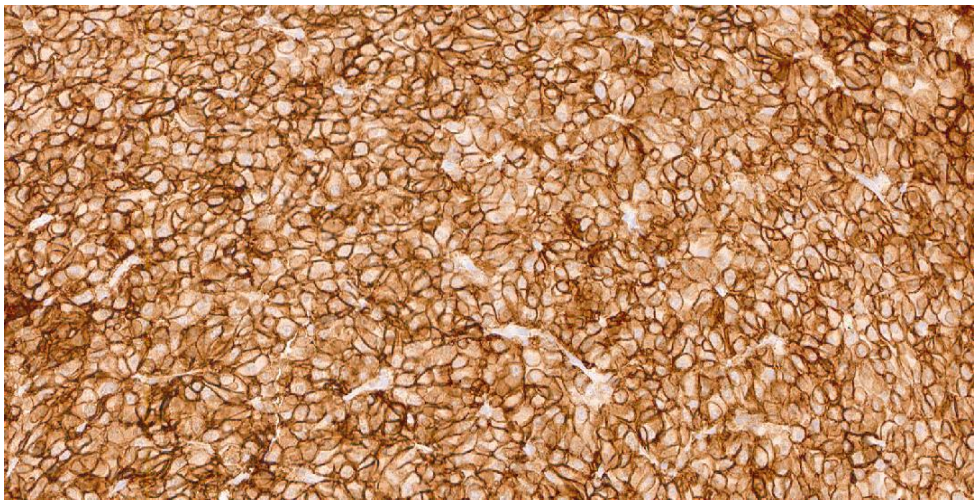


Рисунок 10. Плотногранулированная соматотропинома. Высокая экспрессия SSTR2 (10 баллов), х20

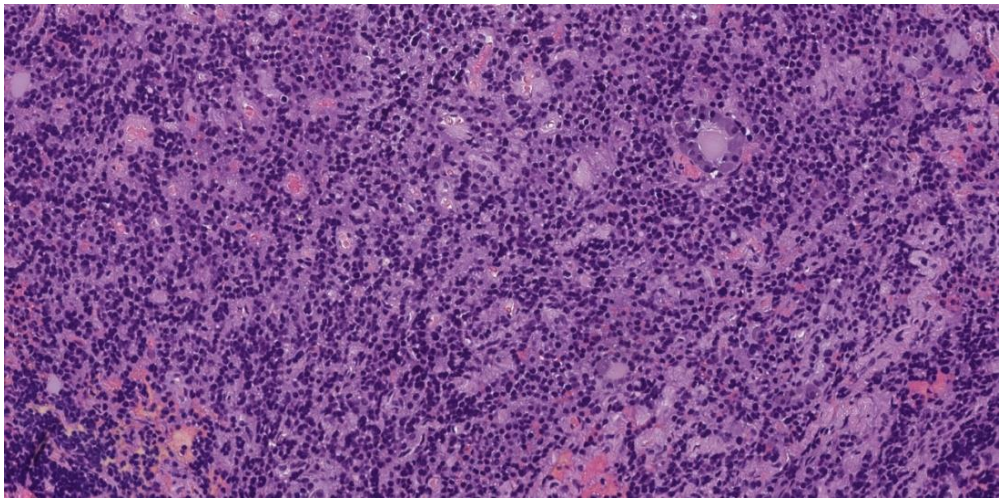


Рисунок 11. Редкогранулированная соматотропинома, окрашивание гематоксилином и эозином, х20

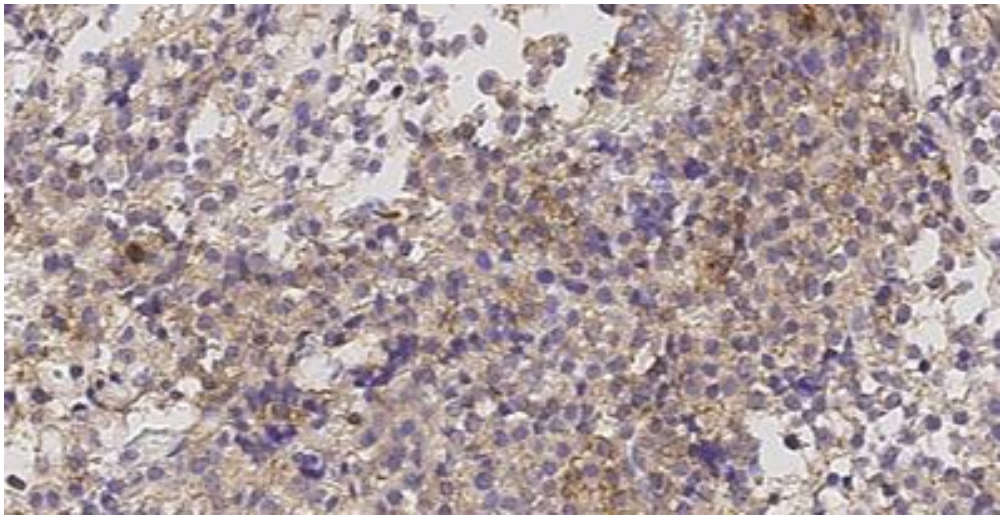


Рисунок 12. Редкогранулированная соматотропинома. Низкая экспрессия SSTR2 (2 балла), х20

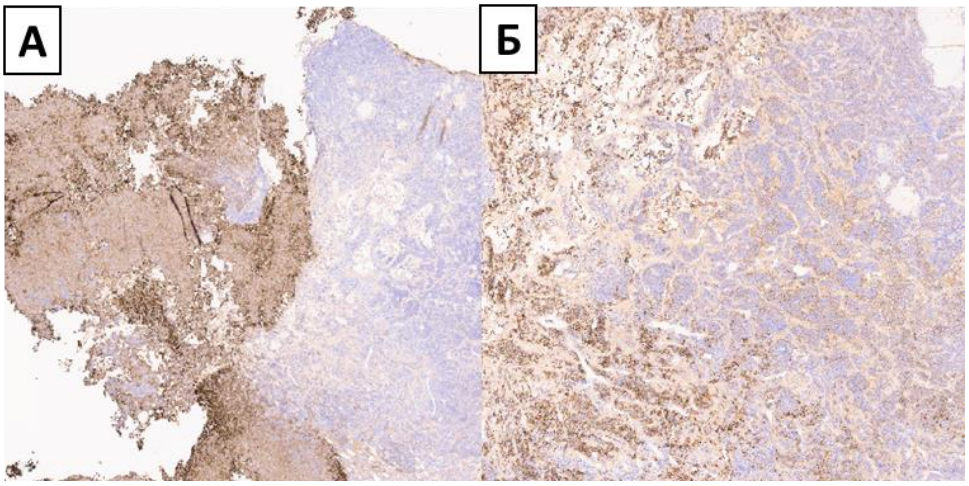


Рисунок 13. Смешанноклеточная соматотропинома, х10. А – экспрессия СТГ, Б – экспрессия пролактина.

Для всех исследованных аденом индекс иммунореактивности SSTR2 составил 6,0 баллов [4,0; 9,0], SSTR5 – 5,5 баллов [2,0; 6,0]. По сравнению с РГС, в образцах ПГС отмечалась более высокая экспрессия SSTR2 (p=0,002), а также более высокое значение SSTR2/SSTR5 (p <0,001) (Таблица 16). На уровне статистической тенденции у пациентов с РГС отмечен больший объем опухоли (p=0,031).

Таблица 16. Сравнительная характеристика пациентов с ПГС и РГС

Параметр	**ПГС (n=30)**	**РГС (n=10)**	**p***
Возраст, годы	50 [38; 56]	39 [23; 53,5]	0,102
Пол, м(%):ж(%)	21(70%):9(30%)	9(90%):1(10%)	0,663
ИФР-1, нг/мл	769,1 [628,8; 892,4]	686 [547,6; 918,7]	0,866
Объем опухоли	780 [360; 1552,8]	2519 [846,8; 5984]	0,031
SSTR2, IRS	8,0 [6,0; 12,0]	3,5 [0,0; 6,0]	**0,002**
SSTR5, IRS	5,0 [2,0; 6,0]	6,0 [3,8; 7,5]	0,107
SSTR2/SSTR5	2,0 [1,0; 6,0]	0,5 [0,0; 1,25]	**<0,001**

Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей. Сравнение количественных признаков между группами проведено при помощи критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использован критерий χ2 Пирсона.

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

В ходе корреляционного анализа выявлена прямая корреляция между базальным СТГ до операции и объемом опухоли (τ = 0,24, p <0,05) и обратная корреляция между соотношением SSTR2/SSTR5 и объемом опухоли (τ = -0,28, p <0,05).

3.5 Наблюдение включенных пациентов

3.4.1. Исходные клинические характеристики и результаты нейрохирургического лечения в раннем послеоперационном периоде

Из 47 включенных пациентов двое отказались от оперативного вмешательства в пользу медикаментозного лечения аналогами соматостатина

пролонгированного действия, один пациент скончался вследствие остановки сердца. Пяти пациентам ранее проводилась ТНАЭ, восемь пациентов на момент включения в исследование получали агонисты дофамина.

Таким образом, оценка результатов хирургического лечения проводилась на выборке из 44 пациентов. Исходные характеристики пациентов и результаты хирургического лечения представлены в таблице 17.

Таблица 17. Исходные характеристики и результаты нейрохирургического лечения пациентов с акромегалией

Параметры	**Значения**
Количество пациентов	44
Пол, м(%):ж(%)	14 (32,8%):30 (68,2%)
Возраст, лет	47,00 [34,00; 55,00]
ИМТ, кг/м^2	28,25 [25,72; 34,50]
ИФР-1, нг/мл	744,75 [548,83; 889,85]
СТГ базальный, нг/мл	9,50 [4,94; 17,07]
Размер аденомы (n, %): Микроаденома Макроаденома	 8, 18,2% 36, 81,8%
Объем опухоли (МРТ), мм^3	832 [419,25; 2532,38]
Ремиссия после нейрохирургического лечения (n, %)	35, 79,5%
Частота ремиссии в зависимости от размера аденомы (n, %): Микроаденома Макроаденома	 7, 87,5% 28, 77,7%

Параметры	**Значения**
Частота развития осложнений после нейрохирургического лечения (n, %):	
Гипопитуитаризм	5, 11,4%
Несахарный диабет	4, 9,1%

Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей.

При сравнении пациентов, достигших краткосрочной ремиссии, с пациентами с сохраняющейся активностью заболевания, выявлены статистически значимые различия уровней базального СТГ (Таблица 18). Статистически значимых различий в уровнях исследованных микроРНК не выявлено.

Таблица 18. Сравнительная характеристика пациентов в зависимости от достижения краткосрочной ремиссии акромегалии после нейрохирургического лечения

Параметр	**Ремиссия (n=35)**	**Нет ремиссии (n=9)**	**p***
Возраст, годы	45 [33; 55]	47 [29; 53]	0,328
Пол, м(%):ж(%)	10(28,6%):25(71,4%)	4(44,4%):5(55,6%)	0,434
ИФР-1, нг/мл	737,60 [532,10; 876,20]	935,60 [649,60; 1186,00]	0,047
Базальный СТГ до операции, нг/мл	8,90 [3,74; 15,20]	36,40 [9,61; 63,30]	**0,001**
Макроаденома(%): Микроаденома(%)	28(80%):7(20%)	8(89%):1(11%)	1,000
Объем опухоли	858,00 [405,00; 1552,80]	1638,00 [360,00; 3450,00]	0,156
ПГС(%):РГС(%)	23(74,2%):8(25,8%)	7(77,8%):2(22,2%)	1,000
SSTR2, IRS	6,0 [4,0; 9,0]	6,0 [2,0; 12,0]	0,469
SSTR5, IRS	6,0 [2,0; 6,0]	6,0 [2,0; 6,0]	0,904
SSTR2/SSTR5	1,3 [0,7; 3,0]	1,0 [0,5; 3,0]	0,987

Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей. Сравнение количественных признаков между группами проведено при помощи критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использован критерий χ2 Пирсона.

* Пороговый P_0=0,005 (после применения поправки Бонферрони)

При оценке ремиссии с использованием строгого критерия (подавление СТГ в ходе ПГТТ менее 0,4 нг/мл), ранняя послеоперационная ремиссия отмечена у 23 пациентов, отсутствие ремиссии – у 21. Выявлена статистическая тенденция к различиям в уровнях базального СТГ до операции, объеме опухоли, экспрессии SSTR2 и miR-215-5p плазмы между группами (Таблица 19).

Таблица 19. Сравнительная характеристика пациентов после нейрохирургического лечения при использовании строгих критериев ремиссии

Параметр	**Ремиссия (n=23)**	**Нет ремиссии (n=21)**	**p***
Возраст, годы	45,0 [30,75; 53,0]	45,5 [33,5; 55,25]	0,961
Пол, м(%):ж(%)	7(30,4%):15(69,6%)	7(33,3%):14(66,7%)	1,000
ИФР-1, нг/мл	717,75 [500,08; 879,28]	761,1 [638,08; 930,88]	0,575
Базальный СТГ до операции, нг/мл	8,99 [4,00; 14,25]	22,35 [6,57; 43,98]	0,014
Макроаденома(%): Микроаденома(%)	17(73,9%):6(26,1%)	19(90,5%):2(9,5%)	0,240
Объем опухоли	763,5 [310,5; 1214,5]	1539,0 [763,75; 3775,5]	0,016
ПГС(%):РГС(%)	16(84,2%):3(15,8%)	14(66,7%):7(33,3%)	0,290
SSTR2, IRS	8,0 [6,0; 11,25]	6,0 [2,0; 9,0]	0,033
SSTR5, IRS	6,0 [2,25; 7,5]	5,5 [2,0; 6,0]	0,245
SSTR2/SSTR5	1,5 [1,0; 3,75]	1,0 [0,5; 3,0]	0,287
miR-215-5p	0,246 [1,875; 0,980]	0,199 [0,157; 0,236]	0,050

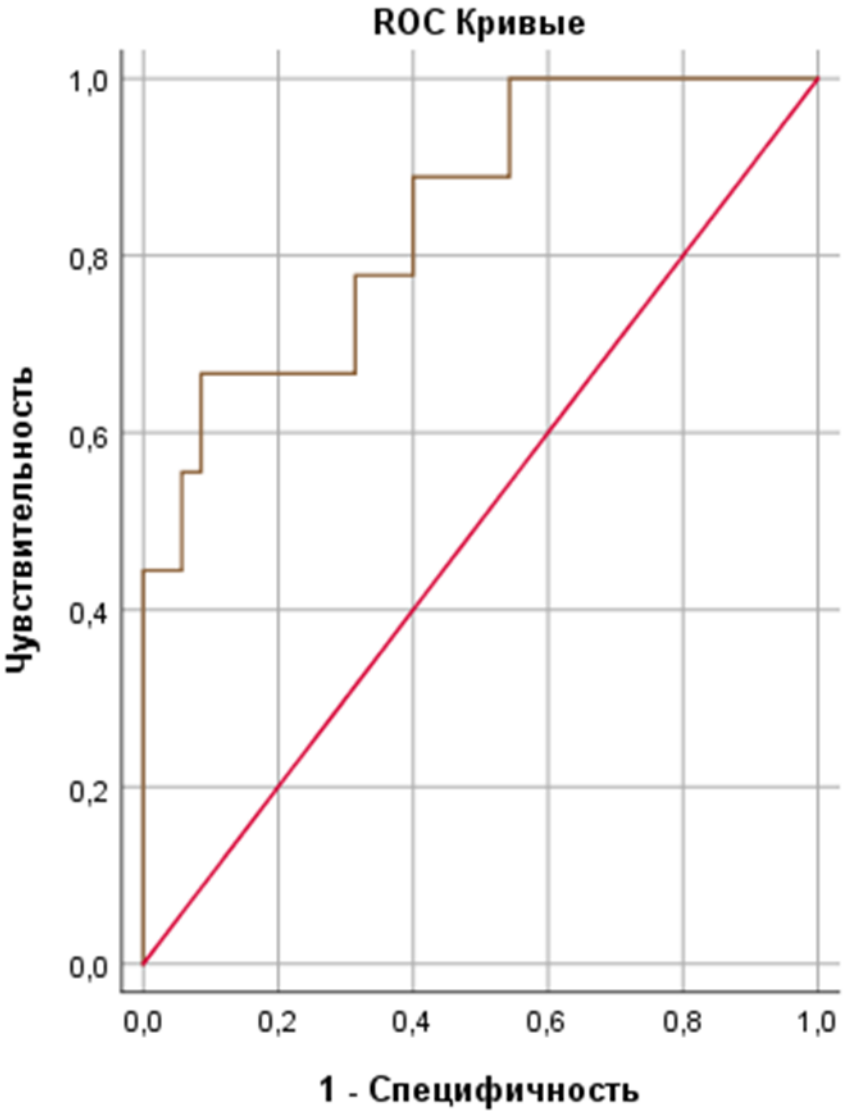
Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей. Сравнение количественных признаков между группами проведено при

помощи критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использован критерий $\chi 2$ Пирсона.

* Пороговый P_0=0,004 (после применения поправки Бонферрони)

Всем пациентам, не достигшим ремиссии в раннем послеоперационном периоде, рекомендована терапия аналогами соматостатина пролонгированного действия.

С целью определения прогностической ценности базального СТГ до операции проведен ROC-анализ (Рисунок 14).



Признак	Площадь под кривой (95% ДИ)	N	Станд. ошибка	P
Базальный СТГ до операции, нг/мл	0,844 (0,701; 0,988)	44	0,073	<0,001

Рисунок 14. ROC-анализ базального СТГ до операции в качестве предиктора ремиссии акромегалии в раннем послеоперационном периоде

Согласно критерию Юдена, выбрано отрезное значение дооперативного уровня СТГ 27,75 нг/мл. Данные для расчета параметров информативности по количеству случаев представлены в таблице 20.

Таблица 20. Таблица сопряженности для анализа прогностической ценности базального СТГ до операции в определении ранней послеоперационной ремиссии

Отрезная точка базального СТГ перед операцией	Стадия согласно подавлению СТГ в ходе ПГТТ в раннем послеоперационном периоде		Сумма
	Отсутствие ремиссии	Ремиссия	
Отсутствие ремиссии	6	3	9
Ремиссия	3	32	35
Сумма	9	35	44

Характеристики информативности представлены в таблице 21. ПЦПР полученной модели неудовлетворительная, так как нижняя граница ДИ пересекает 50%. Однако, ПЦОР является высокой (91%, 95% ДИ: 81%-96%), что позволяет рекомендовать модель только для прогнозирования ремиссии, то есть исключения отсутствия ремиссии с вероятностью от 81% до 96%, что особенно важно при диагностическом скрининге.

Таблица 21. Характеристики прогностической информативности базального СТГ перед операцией в определении ранней послеоперационной ремиссии акромегалии

	ДЧ (95% ДИ)	**ДС (95% ДИ)**	**ОТ (95% ДИ)**	**ПЦПР (95% ДИ)**	**ПЦОР (95% ДИ)**
Базальный СТГ до операции	66,7% (29,9%- 92,5%)	91,4% (76,9%-98,2%)	86,4% (72,7%-94,8%)	66,7% (38,2%-86,6%)	91,4% (80,8%-96,4%)

3.4.2 Отдаленные результаты нейрохирургического лечения

Результаты хирургического лечения и наблюдения представлены на рисунке 15.

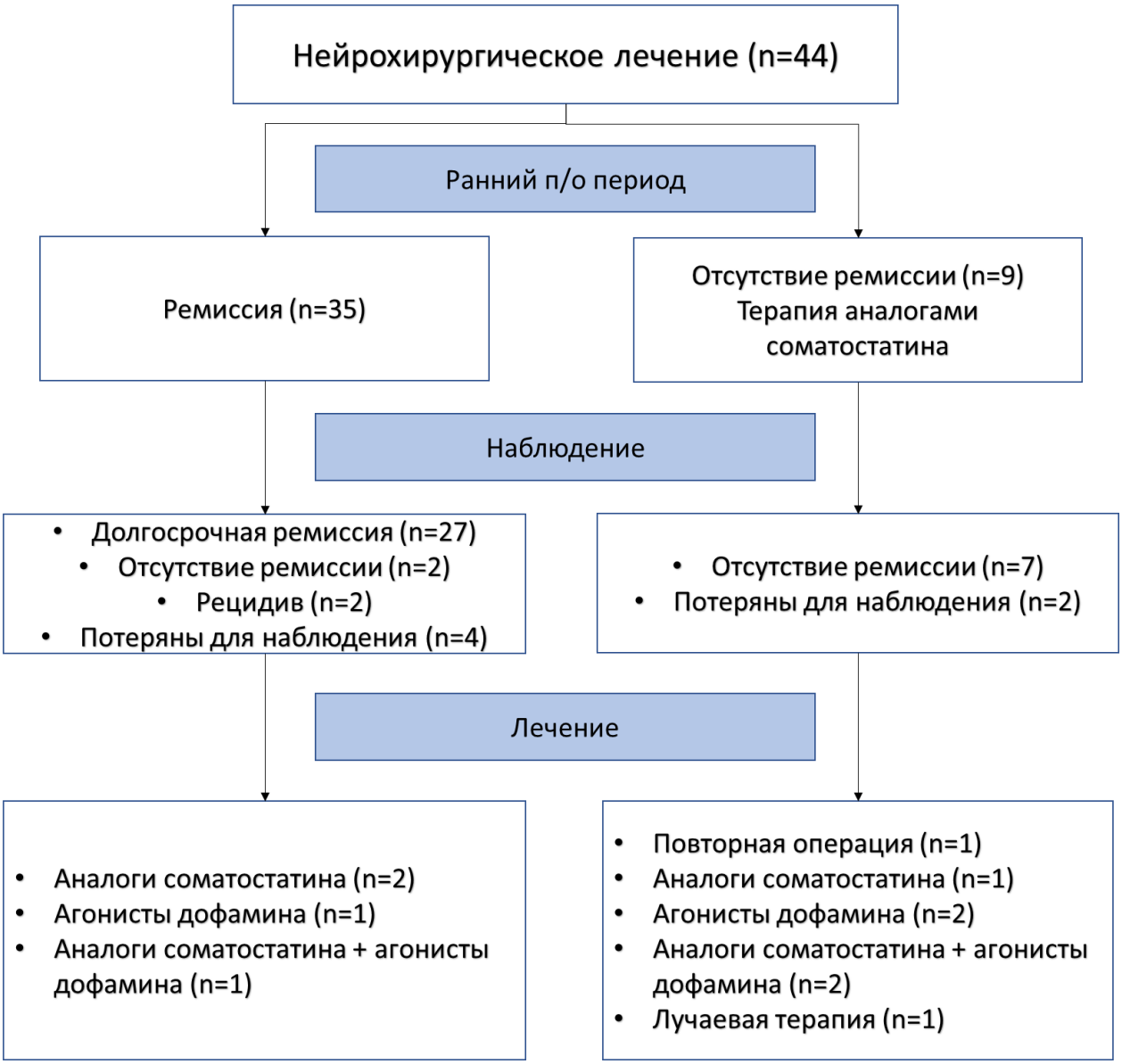


Рисунок 15. Результаты хирургического лечения и наблюдения

Медиана периода наблюдения составила 19 месяцев [12,50;29,00]. При динамическом обследовании у 27 пациентов подтверждена ремиссия заболевания, у двоих выявлен рецидив акромегалии, четверо пациентов были потеряны для наблюдения. У двоих пациентов отмечено повышение уровня ИФР-1 в течение трех месяцев после оперативного вмешательства, при подавлении СТГ в ходе ПГТТ в раннем послеоперационном периоде – состояние расценено как дискордантность лабораторных результатов. Результаты наблюдения пациентов представлены в таблице 22.

Таблица 22. Оценка отдаленных исходов нейрохирургического лечения пациентов с акромегалией.

Параметры	**Значения**
Период наблюдения, месяцы	19,00 [12,50; 29,00] (мин. 6; макс. 47)
Отдаленный исход нейрохирургического лечения (n, %):	
Ремиссия	27, 61,4%
Нет ремиссии*	9, 20,5%
Рецидив	2, 4,5%
Потеряны для наблюдения	6, 13,6%

Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей. Для периода наблюдения в круглых скобках приведены минимальные и максимальные значения.

* Включено два пациента с дискордантностью лабораторных результатов

Из девяти пациентов, которым была назначена медикаментозная терапия после оперативного вмешательства, четыре пациента не смогли получить препарат. У трех пациентов, получавших препарат, медикаментозной ремиссии не отмечено. Двое пациентов были потеряны для наблюдения.

Из семи пациентов с сохраняющейся активностью заболевания одному рекомендовано повторное хирургическое вмешательство, одному – лечение аналогами соматостатина, двум - комбинированная терапия аналогами соматостатина и агонистами дофаминовых рецепторов и один пациент направлен на лучевую терапию.

В двух случаях рецидива заболевания пациентам рекомендована медикаментозная терапия аналогами соматостатина в двух случаях. В обоих случаях дискордантности лабораторных показателей состояние расценено как отсутствие ремиссии, рекомендована комбинация аналогов соматостатина и

агонистов дофаминовых рецепторов в одном случае и монотерапия агонистами дофаминовых рецепторов в одном случае.

Из пяти пациентов с гипопитуитаризмом (без несахарного диабета) в исходе оперативного лечения в одном случае осложнение носило транзиторный характер. За время наблюдения у всех пациентов с послеоперационным несахарным диабетом отмечался регресс данного осложнения.

Таким образом, из 44 прооперированных пациентов, ТНАЭ позволила достичь долгосрочной ремиссии в 27 случаях (61.4%). Сравнительная характеристика пациентов представлена в Таблице 23. Пограничное значение p получено для уровня базального СТГ до операции (p=0,006), также выявлена тенденция к различиям в дооперационных уровнях ИФР-1 (p=0,030).

Таблица 23. Сравнительная характеристика пациентов в зависимости от достижения долгосрочной ремиссии акромегалии

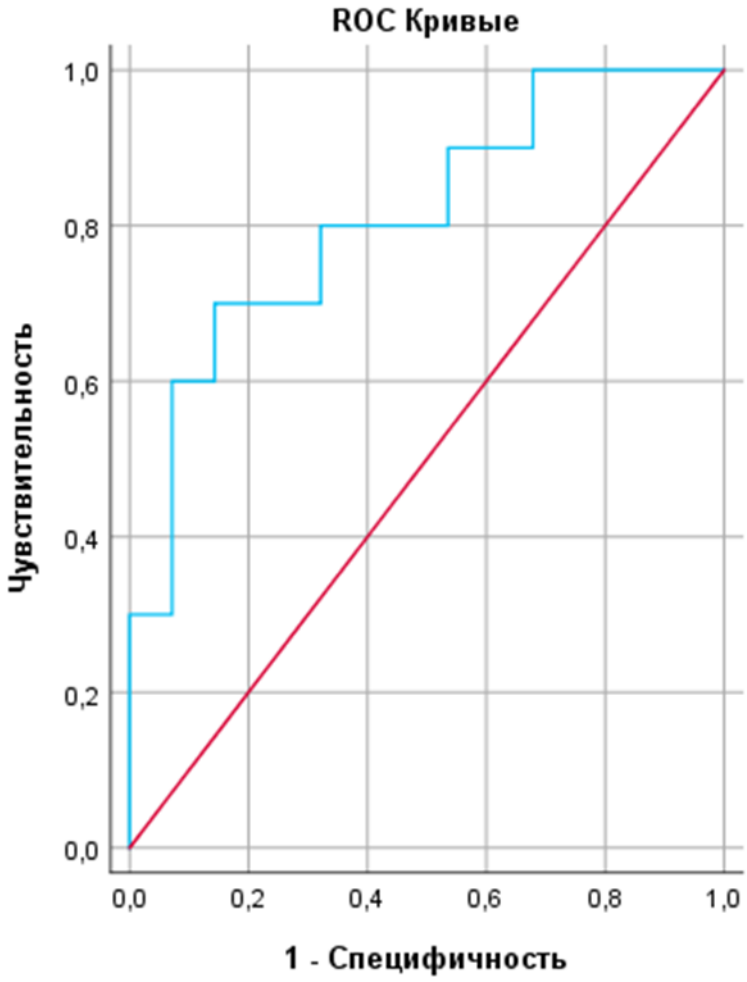
Параметр	**Долгосрочная ремиссия (n=27)**	**Нет ремиссии (n=11)***	**p****
Возраст, годы	45,0 [33,0; 55,0]	47,0 [29,0; 53,0]	0,874
Пол, м(%):ж(%)	7(25,9%):20(74,1%)	5(45,5%):5(54,5%)	0,235
ИФР-1 до операции, нг/мл	674,80 [482,5; 876,2]	771,0 [649,6; 992,0]	0,030
СТГ до операции, нг/мл	8,9 [3,76; 11,9]	28,0 [6,75; 47,2]	0,006
Макроаденома(%): Микроаденома(%)	22(77,7%):6(22,3%)	9(81,8%):2(18,2%)	1,000
Объем опухоли	858,0 [405,0; 1260,0]	1552,8 [360,0; 3213,0]	0,339
ПГС(%):РГС(%)	17(68,0%):8(32,0%)	8(80,0%):2(20,0%)	0,686
SSTR2, IRS	6,0 [4,0; 12,0]	6,0 [4,0; 8,0]	0,565
SSTR5, IRS	5,0 [2,0; 6,0]	6,0 [2,0; 6,0]	0,588
SSTR2/SSTR5	1,5 [0,67; 3,0]	1,0 [0,67; 3,0]	0,637

Примечания: Количественные признаки представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Качественные признаки представлены в виде долей. Сравнение количественных признаков между группами проведено при помощи критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использован критерий $\chi 2$ Пирсона.

* В расчет включено два пациента с рецидивом заболевания и два пациента с дискордантными лабораторными результатами

** Пороговый P_0=0,005 (после применения поправки Бонферрони)

Для определения прогностической ценности СТГ до операции в определении долгосрочной ремиссии акромегалии был проведен ROC-анализ (Рисунок 16).



Признак	Площадь под кривой (95% ДИ)	N	Станд. ошибка	P
Базальный СТГ до операции, нг/мл	0,811 (0,649; 0,973)	38	0,083	<0,001

Рисунок 16. ROC-анализ базального СТГ до операции в качестве потенциального предиктора долгосрочной ремиссии акромегалии

Согласно критерию Юдена, оптимальное отрезное значение составило 15,55 нг/мл. Данные для расчета параметров информативности по количеству случаев представлены в таблице 24.

Таблица 24. Таблица сопряженности для анализа прогностической ценности базального СТГ до операции в определении долгосрочной послеоперационной ремиссии

Отрезная точка базального СТГ перед операцией	Стадия согласно уровню ИФР-1 при динамическом наблюдении		Сумма
	Отсутствие ремиссии	Ремиссия	
Нет ремиссии	7	4	11
Ремиссия	3	24	27
Сумма	10	28	38

Характеристики информативности представлены в таблице 25. Как и в случае модели для определения краткосрочной ремиссии, ПЦПР данной модели неудовлетворительная, так как нижняя граница ДИ пересекает 50%. При этом, ПЦОР является высокой (88%, 95% ДИ: 75%-95%), что также позволяет рассматривать модель только для прогнозирования ремиссии, то есть исключения отсутствия ремиссии с вероятностью от 75% до 95%.

Таблица 25. Характеристики прогностической информативности базального СТГ перед операцией в определении долгосрочной послеоперационной ремиссии акромегалии

	ДЧ (95% ДИ)	**ДС (95% ДИ)**	**ОТ (95% ДИ)**	**ПЦПР (95% ДИ)**	**ПЦОР (95% ДИ)**
Базальный СТГ до операции	70,0% (34,8%- 93,3%)	85,7% (67,3%-96,0%)	81,6% (65,7%-92,3%)	63,6% (39,3%-82,5%)	88,9% (75,4%-95,4%)

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Экспрессия циркулирующих микроРНК при акромегалии

В ходе экспериментальной части исследования впервые проанализирован профиль экспрессии микроРНК плазмы крови у пациентов с акромегалией методом высокопроизводительного секвенирования. Полученные данные позволили отобрать микроРНК для валидизации методом RT-qPCR на расширенной выборке пациентов. У пациентов с акромегалией отмечено статистически значимое снижение уровней miR-4446-3p, и miR-215-5p по сравнению со здоровыми добровольцами.

Настоящее исследование является первой работой по оценке профиля экспрессии микроРНК в периферической крови пациентов с активной акромегалией методом высокопроизводительного секвенирования. Ранее методом RT-qPCR был проведен анализ экспрессии циркулирующих микроРНК, которые предположительно участвуют в регуляции костного метаболизма [50, 122].

При этом данных по изменённой экспрессии miR-4446-3p и miR-215-5p в аденомах гипофиза в предыдущих исследованиях получено не было [39]. Экспрессия miR-4446-3p повышена в сыворотке при раке молочной железы [38]. Кроме того, Kim B.G. и соавт. отметили повышение экспрессии miR-4446-3p в клетках из линии агрессивного низкодифференцированного рака молочной железы – MDA-MB-231 [67]. В исследовании Jun W. и соавт. отмечено снижение экспрессии miR-4446-3p в сыворотке у пациентов с резистентной к лечению эпилепсией по сравнению с пациентами, чувствительными к терапии [129].

Экспрессия miR-215-5p повышена в сыворотке пациентов с остеосаркомой по сравнению со здоровым контролем [90]. По данным Vychytilova-Faltejskova P. и соавт., экспрессия miR-215-5p снижена в тканях опухоли при колоректальном раке, а её экспериментально подтверждёнными мишенями являются различные звенья EGFR – каноничного сигнального пути патогенеза колоректального рака [127]. Снижение экспрессии miR-215-5p при колоректальном раке было также подтверждено в исследовании Yan J, и соавт. [134]. В нашем исследовании экспрессия miR-215-5p в плазме также снижена, что может свидетельствовать о

взаимосвязи вне- и внутриклеточных процессов, учитывая повышенную распространенность новообразований толстой кишки при акромегалии [133].

Прямое действие микроРНК на мишени сложно определить, так как каждая микроРНК может иметь несколько мишеней. Существуют биоинформатические базы данных, в которых содержится информация о предполагаемых взаимодействиях между микроРНК и мРНК-мишенями на основе их комплементарности – TargetScan [92], miRanda [13], DIANA-microT [107], PicTAR [71] и другие. Мы провели поиск взаимодействий выявленных микроРНК при помощи TargetScan. Результаты оцениваются согласно индексу cumulative weighted context++ score, отражающему вклад 14 показателей вероятности связывания – значения в диапазоне от 1 до –3. Чем меньше значение – тем больше вероятность взаимодействия [109].

Результаты поиска в базе TargetScan представлены в Таблице 26.

Таблица 26. Некоторые мишени микроРНК, представленные в базе TargetScan

МикроРНК	**Генов-мишеней**	**Ген-мишень**	**Cumulative weighted context++ score**	**Описание**
miR-4446-3p	4490	*SSTR1*	-0,25	Рецепторы соматостатина 1, 3 и 5 подтипов
		SSTR3	-0,10	
		SSTR5	-0,02	
		NOTCH1	-0,01	Рецепторы сигнального пути NOTCH, участвующего в эмбриональном развитии гипофиза
		NOTCH2	-0,45	
		IGF1	-0,05	Инсулиноподобный фактор роста-1

		IGF1R	-0,15	Рецептор инсулиноподобного фактора роста-1
		IGFBP4	-0,14	ИФР-связывающий белок-4
		IGFBP5	-0,15	ИФР-связывающий белок-5
miR-215-5p	218	*PRKAR1A*	-0,29	Ген регуляторной субъединицы R1A протеинкиназы А – ключевой компонент сигнального пути цАМФ. Мутация в гене ассоциирована с развитием Карни Комплекса

Сигнальный путь NOTCH регулирует процессы эмбриогенеза и поддержания гомеостаза тканей и органов человека, его влияние на внутриклеточные сигнальные пути определяет судьбу клетки [143]. Описаны различия в экспрессии компонентов данного сигнального пути в аденомах гипофиза различных гистотипов [100]. *PRKAR1A* является геном-супрессором опухолевого роста, кодирующим 1-α регуляторную субъединицу цАМФ зависимой протеинкиназы А. Существует взаимосвязь между мутациями в гене *PRKAR1A* и возникновением Карни-комплекса – заболеванием характеризующимся возникновением миксом сердца, кожи и других тканей, а также новообразований гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и других эндокринных органов. Мутация *PRKAR1A* обнаруживается приблизительно у 70% пациентов с Карни-комплексом [80]. Из представленной таблицы видно, что среди мишеней miR-4446-3p, четыре имеют непосредственное отношение к соматотропной оси: IGF1, IGF1R, а также IGFBP4

и IGFBP5 – представители семейства ИФР-связывающих белков. IGFBP осуществляют преимущественно внеклеточную регуляцию активности ИФР – белки данного семейства с высокой аффинностью связываются с ИФР-1 и ИФР-2. В большинстве случаев ИФР-связывающие белки ингибируют действие ИФР, предотвращая их связывание с рецептором, однако, могут и усиливать их действие. IGFBP4 выполняет регулирующую роль в костном метаболизме и пренатальном функционировании соматотропной оси, IGFBP5 участвует в процессах фиброза и ангиогенеза [7]. Наличие корреляции уровня miR-4446-3p с ИФР-1 в нашем исследовании является дополнительным аргументом, позволяющим установить гипотезу о регулирующей роли miR-4446-3p в соматотропной оси.

Учитывая ограничения компьютерных алгоритмов в определении потенциальных генов-мишеней, вышеуказанные взаимодействия необходимо подтверждать экспериментально. По данным литературы, из представленных взаимодействий экспериментально подтверждались miR-215-5p и *PRKAR1A* [62], а также miR-4446-3p и *NOTCH2* [48]. Кроме того, чтобы взаимодействие между микроРНК и мишенью состоялось, необходимо чтобы они находились в одной клетке в одно и то же время, и уровень экспрессии микроРНК в клетке должен быть достаточным для репрессии трансляции [2].

Исходя из анализа данных литературы, одна и та же микроРНК может участвовать в различных физиологических и патологических процессах. Определение одних и тех же микроРНК в качестве биомаркеров различных заболеваний поднимает вопрос специфичности данных изменений. Для решения данного вопроса рассматривается применение микроРНК в виде панелей. В данном случае, в литературе не представлено исследований, определявших панель miR-4446-3p и miR-215-5p. Кроме того, данные об участии miR-4446-3p и miR-215-5p в патогенезе злокачественных новообразований делают их перспективными для дальнейшего изучения, с целью персонализации ведения пациентов с акромегалией в зависимости от осложнений заболевания.

4.2 Гистологические и иммуногистохимические характеристики соматотропином

ПГС и РГС у пациентов с акромегалией встречаются в 30-50% и 15-35% случаев соответственно. В изученной выборке соматотропином доля пациентов с ПГС была несколько выше (71,4%), при этом, доля РГС соответствовала данным литературы (23,8%). РГС имеют тенденцию к более быстрому росту [3], что подтверждается в нашей когорте: объем аденомы на момент включения в исследование был статистически значимо больше у пациентов с РГС.
В исследовании Taboada GF et al в группе пациентов, чувствительных к терапии октреотидом, отмечалось более высокое соотношение SSTR2/SSTR5, чем у резистентных к терапии [116]. В нашем исследовании соотношение SSTR2/SSTR5 и экспрессия SSTR2 были выше в группе ПГС, что согласуется с данными литературы о большой чувствительности данного морфологического варианта к лечению аналогами соматостатина [36].

Нами не получено статистически значимых различий в циркулирующих микроРНК между пациентами с ПГС и РГС, что может свидетельствовать как об отсутствии взаимосвязи между гистотипом и профилем экспрессии микроРНК, так и о недостаточном размере выборки.

4.3 Результаты нейрохирургического лечения акромегалии и предиктивные возможности базального СТГ до операции

По данным исследования на популяции из 3173 пациентов с акромегалией из 10 стран, медиана возраста пациентов на момент постановки диагноза составила 45.2 года. В 71,8% случаев у пациентов встречались макроаденомы, что согласуется с данными МРТ в нашей когорте.

Согласно систематическому обзору исходов и осложнений эндоскопической трансназальной аденомэктомии по поводу акромегалии, общая частота ранней и долгосрочной ремиссии составляет 57,4% и 70,2% соответственно. Для макроаденом данные показатели составляют 40,2% и 61,5%, для микроаденом – 76,9% и 73,5% [23]. Нами получен более высокий процент краткосрочной ремиссии, и сопоставимые показатели по долгосрочной ремиссии. Частота

гипопитуитаризма и транзиторного несахарного диабета в изученной когорте была несколько выше, чем по данным систематического обзора. Данное явление может объясняться более радикальной операционной тактикой в представленной когорте, что и приводит к более высокой частоте как ремиссии, так и вышеуказанных осложнений. Однако, в связи с ограниченным количеством пациентов, данное предположение требует проверки на расширенной выборке.

Различия в дооперационных уровнях СТГ и ИФР-1 между пациентами с различной эффективностью нейрохирургического лечения в нашем исследовании согласуются с мировыми данными [30, 60, 61]. При этом, в отличие от представленных исследований, мы не обнаружили различий в объеме опухоли между группами и предиктивных возможностей данного показателя. Это может объясняться различными методиками расчета данного показателя и небольшим размером выборки.

В исследовании John A. Jane, Jr., и соавт. проанализированы исходы эндоскопической ТНАЭ среди 62 пациентов с акромегалией, с использованием строгого критерия ремиссии (подавление СТГ в ходе ПГТТ менее 0,4 нг/мл). Между пациентами в ремиссии после нейрохирургического вмешательства и пациентами, у которых ТНАЭ была неэффективна, так же, как и в нашем исследовании, отмечались различия в дооперационных уровнях СТГ и ИФР-1, а также в объеме опухоли. Кроме того, дооперационные уровни СТГ и ИФР-1 являлись предикторами ремиссии заболевания [60].

В исследовании Shun Yao, и соавт. проводился ретроспективный анализ 546 случаев акромегалии с целью поиска независимых предикторов ремиссии акромегалии. Значение дооперационного уровня СТГ более 28 нг/мл являлось предиктором отсутствия ремиссии после нейрохирургического лечения, что согласуется с полученной нами отрезной точкой данного показателя для определения долгосрочной ремиссии [135].

У нашего исследования имеются определенные ограничения. Для экспериментальной фазы исследования отобрана небольшая выборка пациентов и здоровых добровольцев, что могло ограничить количество микроРНК-кандидатов

для дальнейшей валидизации. В ходе валидизации получены статистически значимые различия в экспрессии двух микроРНК. Данные по предиктивным возможностям базального СТГ получены на небольшой выборке, для более точного определения оптимальных отрезных значений необходимы дальнейшие исследования на расширенной выборке. Тем не менее, полученные нами данные указывают на перспективность использования базального СТГ для прогнозирования исходов нейрохирургического лечения акромегалии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Персонализация ведения пациентов с эндокринной патологией является важным направлением развития медицины. Персонализированный подход с использованием малоинвазивных биомаркеров при акромегалии позволит эффективнее назначать медикаментозное лечение и снизить финансовые затраты в случаях резистентности к терапии.

В ходе представленной работы впервые установлено, что уровни miR-4446-3p и miR-215-5p плазмы различаются у пациентов с акромегалией по сравнению со здоровым контролем. Наличие ассоциативных связей между miR-4446-3p, miR-215-5p и ИФР-1, в сочетании с результатами бионформатического анализа предполагаемых мишеней, позволяет считать данные микроРНК перспективными для дальнейшего изучения их диагностической ценности и вклада в патогенез заболевания. Нам не удалось выявить взаимосвязь между циркулирующими микроРНК и морфологическими вариантами соматотропином. Возможно, снижение уровня микроРНК в плазме не связано с морфологическими вариантами соматотропином и их рецепторным профилем, а объясняется другими звеньями патогенеза акромегалии.

Доля пациентов, достигших долгосрочной ремиссии после нейрохирургического лечения, в целом соответствует общемировым данным, однако, остаётся недостаточной и подчеркивает необходимость более ранней диагностики и своевременного лечения акромегалии. Базальный СТГ до операции является потенциальным предиктором краткосрочной и долгосрочной эффективности нейрохирургического лечения. Для определения оптимальных отрезных значений необходимо изучить данный показатель на расширенной выборке пациентов с акромегалией.

ВЫВОДЫ

1. При анализе циркулирующих микроРНК методом высокопроизводительного секвенирования отличительной особенностью пациентов с акромегалией по сравнению с здоровым контролем является тенденция к снижению уровней miR-4446-3p, miR-215-5p и miR-342-5p в образцах плазмы крови.
2. Снижение уровней miR-4446-3p и miR-215-5p плазмы валидизированы методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на расширенной выборке. Панель из данных микроРНК позволяют выделить пациентов с акромегалией по сравнению со здоровыми добровольцами с чувствительностью 91,5% (95%ДИ: 83,1%-96,3%), специфичностью 85,7% (95%ДИ 71,7%-93,8%) и общей точностью 89.3% (95%ДИ: 80,1%-95,3%), что определяет возможность дальнейшего использования этих микроРНК как диагностических биомаркеров акромегалии
3. Уровни miR-4446-3p и miR-215-5p плазмы коррелируют с уровнем ИФР-1, что может свидетельствовать о связи данных микроРНК с биохимической активностью акромегалии
4. Корреляций между уровнями miR-4446-3p и miR-215-5p с гистологическими и иммуногистохимическими характеристиками соматотропином не выявлено. Также не обнаружено различий по уровням miR-4446-3p и miR-215-5p у пациентов с различными морфологическими вариантами соматотропином
5. Нейрохирургическое лечение на базе ФГБУ НМИЦ эндокринологии МЗ РФ в качестве первого метода лечения эффективно для достижения ремиссии акромегалии в 79,5% случаев при анализе сразу после нейрохирургического вмешательства с сохранением ремиссии в 61,4% наблюдений в ходе долгосрочного наблюдения (медиана периода наблюдения 19,00 месяцев [Q1;Q3: 12,50; 29,00]). Базальный СТГ является потенциальным предиктором ремиссии акромегалии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Трансназальная транссфеноидальная аденомэктомия в высокоспециализированном учреждении рекомендуется в качества эффективного метода достижения ремиссии у пациентов с акромегалией
2. Уровень базального СТГ до операции с отрезной точкой 15.55 нг/мл может служить прогностическим маркером долгосрочной ремиссии после нейрохирургического вмешательства с общей точностью 81,6% (95% ДИ, 65,7%-92,3%)
3. MiR-4446-3p и miR-215-5p плазмы могут использоваться в разработке панелей в качестве потенциальных диагностических биомаркеров при акромегалии

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ – иммуногистохимия

ИМТ – индекс массы тела

ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

кДНК – комплементарная ДНК

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

М – средняя

МР – магнитно-резонансный

мРНК – матричная РНК

МС – маммосоматотропинома

ПГС – плотногранулированная соматотропинома

ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РГС – редкогранулированная соматотропинома

РНК – рибонуклеиновая кислота

ССЛ – смешанная сомато- лактотрофная аденома

СТГ – соматотропный гормон

Т2-ВИ – Т2-взвешенные изображения

ТНАЭ – трансназальная аденомэктомия

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

AUC – area under curve, площадь под кривой

Me – медиана

NGS – next-generation sequencing, высокопроизводительное секвенирование

Q25 – 25 процентиль

Q75 – 75 процентиль

ROC-анализ – анализ характеристических кривых

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

SSTR2 – somatostatin receptor type 2, рецептор соматостатина 2 подтипа

SSTR5 – somatostatin receptor type 5, рецептор соматостатина 5 подтипа

SSTR2/SSTR5 – соотношение соматостатиновых репеторов 2 и 5 подтипов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abreu A., Tovar A. P., Castellanos R., et al. Challenges in the diagnosis and management of acromegaly: a focus on comorbidities // Pituitary. - 2016. - № 4. - Vol. 19. - P. 448–457.

2. Agarwal V., Bell G. W., Nam J.-W., et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs // eLife. - 2015. - Vol. 4. - P. E05005

3. Akirov A., Asa S. L., Amer L., et al. The Clinicopathological Spectrum of Acromegaly // Journal of Clinical Medicine. - 2019. - № 11. - Vol. 8. - P. 1962.

4. Almeida M. I., Reis R. M., Calin G. A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers // Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. - 2011. - № 1–2. - Vol. 717. - P. 1–8.

5. Angelo D. D. Epigenetic mechanisms leading to overexpression of HMGA proteins in human pituitary adenomas 2015. - № 6. - Vol. 2. - P. 1–6.

6. Arroyo J. D., Chevillet J. R., Kroh E. M., et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2011. - № 12. - Vol. 108. - P. 5003–5008.

7. Bach L. A. 40 YEARS OF IGF1: IGF-binding proteins // Journal of Molecular Endocrinology. - 2018. - № 1. - Vol. 61. - P. T11–T28.

8. Bartel D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function // Cell. - 2004. - № 2. - Vol. 116. - P. 281–297.

9. Beckers A., Lodish M. B., Trivellin G., et al. X-linked acrogigantism syndrome: clinical profile and therapeutic responses // Endocrine-Related Cancer. - 2015. - № 3. - Vol. 22. - P. 353–367.

10. Beilharz T. H., Humphreys D. T., Clancy J. L., et al. MicroRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells // PLoS ONE. - 2009. - № 8. - Vol. 4.

11. Belaya Z., Grebennikova T., Melnichenko G., et al. Effects of active acromegaly on bone mRNA and microRNA expression patterns // European Journal of Endocrinology. - 2018. - № 4. - Vol. 178. - P. 353–364.

12. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing // Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological). - 1995. - № 1. - Vol. 57. - P. 289–300.
13. Betel D., Koppal A., Agius P., et al. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites // Genome Biology. - 2010. - № 8. - Vol. 11. - P. R90.
14. Bhayana S., Booth G. L., Asa S. L., et al. The Implication of Somatotroph Adenoma Phenotype to Somatostatin Analog Responsiveness in Acromegaly // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2005. - № 11. - Vol. 90. - P. 6290–6295.
15. Böttner A., Keller E., Kratzsch J., et al. PROP1 Mutations Cause Progressive Deterioration of Anterior Pituitary Function including Adrenal Insufficiency: A Longitudinal Analysis // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2004. - № 10. - Vol. 89. - P. 5256–5265.
16. Bottoni A., Piccin D., Tagliati F., et al. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas // Journal of Cellular Physiology. - 2005. - № 1. - Vol. 204. - P. 280–285.
17. Bottoni A., Zatelli M. C., Ferracin M., et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: A possible role for microRNA genes in pituitary adenomas // Journal of Cellular Physiology. - 2007. - № 2. - Vol. 210. - P. 370–377.
18. Brzana J., Yedinak C. G., Gultekin S. H., et al. Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience // Pituitary. - 2013. - № 4. - Vol. 16. - P. 490–498.
19. Butz H., Likó I., Czirják S., et al. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. - 2010. - № 10. - Vol. 95. - P. 181–191.
20. Capatina C., Wass J. A. H. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Acromegaly // Journal of Endocrinology. - 2015. - № 2. - Vol. 226. - P. T141–T160.
21. Carthew, Richard W. and Sontheimer E. J. NIH Public Access // Cell. - 2009. - № 4. - Vol. 136. - P. 642–655.

22. Chanson P., Salenave S. Acromegaly // Orphanet Journal of Rare Diseases. - 2008. - № 1. - Vol. 3. - P. 17.
23. Chen C.-J., Ironside N., Pomeraniec I. J., et al. Microsurgical versus endoscopic transsphenoidal resection for acromegaly: a systematic review of outcomes and complications // Acta Neurochirurgica. - 2017. - № 11. - Vol. 159. - P. 2193–2207.
24. Cheunsuchon P., Zhou Y., Zhang X., et al. Silencing of the imprinted DLK1-MEG3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas // American Journal of Pathology. - 2011. - № 4. - Vol. 179. - P. 2120–2130.
25. Chiro G. DI, Nelson K. B. The volume of the sella turcica. // The American journal of roentgenology, radium therapy, and nuclear medicine. - 1962. - - Vol. 87. - P. 989–1008.
26. Ciresi A., Amato M. C., Pivonello R., et al. The Metabolic Profile in Active Acromegaly is Gender-Specific // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2013. - № 1. - Vol. 98. - P. E51–E59.
27. Clemmons D. R. Consensus Statement on the Standardization and Evaluation of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor Assays // Clinical Chemistry. - 2011. - № 4. - Vol. 57. - P. 555–559.
28. Colao A., Ferone D., Marzullo P., et al. Systemic Complications of Acromegaly: Epidemiology, Pathogenesis, and Management // Endocrine Reviews. - 2004. - № 1. - Vol. 25. - P. 102–152.
29. Colao A., Grasso L. F. S., Giustina A., et al. Acromegaly // Nature Reviews Disease Primers. - 2019. - № 1. - Vol. 5. - P. 20.
30. Coopmans E. C., Postma M. R., Wolters T. L. C., et al. Predictors for Remission after Transsphenoidal Surgery in Acromegaly: A Dutch Multicenter Study // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2021. - № 6. - Vol. 106. - P. 1783–1792.
31. D’Angelo D., Palmieri D., Mussnich P., et al. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: Down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1 // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. - 2012. - № 7. - Vol. 97. - P. 1128–1138.

32. Dąbrowska A. M., Tarach J. S., Kurowska M., et al. State of the art paper Thyroid diseases in patients with acromegaly // Archives of Medical Science. - 2014. - - Vol. 4. - P. 837–845.
33. Dekkers O. M., Biermasz N. R., Pereira A. M., et al. Mortality in Acromegaly: A Metaanalysis // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2008. - № 1. - Vol. 93. - P. 61–67.
34. Dénes J., Kasuki L., Trivellin G., et al. Regulation of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) protein expression by MiR-34a in sporadic somatotropinomas // PLoS ONE. - 2015. - № 2. - Vol. 10. - P. 1–17.
35. Ezzat S., Caspar-Bell G. M., Chik C. L., et al. Predictive markers for postsurgical medical management of acromegaly: a systematic review and consensus treatment guideline // Endocrine Practice. - 2019. - № 4. - Vol. 25. - P. 379–393.
36. Ezzat S., Caspar-Bell G. M., Chik C. L., et al. Predictive markers for postsurgical medical management of acromegaly: a systematic review and consensus treatment guideline // Endocrine Practice. - 2019. - № 4. - Vol. 25. - P. 379–393.
37. Fan X., Mao Z., He D., et al. Expression of somatostatin receptor subtype 2 in growth hormone-secreting pituitary adenoma and the regulation of MIR-185 // Journal of Endocrinological Investigation. - 2015. - № 10. - Vol. 38. - P. 1117–1128.
38. Farina N. H., Ramsey J. E., Cuke M. E., et al. Development of a predictive miRNA signature for breast cancer risk among high-risk women // Oncotarget. - 2017. - № 68. - Vol. 8.
39. Feng Y., Mao Z., Wang X., et al. MicroRNAs and Target Genes in Pituitary Adenomas // Hormone and Metabolic Research. - 2018. - № 03. - Vol. 50. - P. 179–192.
40. Ferraù F., Albani A., Ciresi A., et al. Diabetes Secondary to Acromegaly: Physiopathology, Clinical Features and Effects of Treatment // Frontiers in Endocrinology. - 2018. - - Vol. 9.
41. Fougner S. L., Casar-Borota O., Heck A., et al. Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly // Clinical Endocrinology. - 2012. - № 1. - Vol. 76. - P. 96–102.

42. Gadelha M. R., Bronstein M. D., Brue T., et al. Pasireotide versus continued treatment with octreotide or lanreotide in patients with inadequately controlled acromegaly (PAOLA): a randomised, phase 3 trial // The Lancet Diabetes & Endocrinology. - 2014. - № 11. - Vol. 2. - P. 875–884.
43. Gadelha MR, Kasuki L, Denes J, et al. MicroRNAs: Suggested role in pituitary adenoma pathogenesis // J Endocrinol Invest. - 2013. - Vol. 36. - № 10. P. 889–895.
44. Gavrilova A. E., Nagaeva E. V., Shiryaeva T. Y., et al. Clinical and genetic features of patients with multiple anterior pituitary hormone deficiency caused by mutations in the PROP1 gene; the efficacy of recombinant growth hormone therapy // Problems of Endocrinology. - 2017. - № 2. - Vol. 63. - P. 72–81.
45. Giustina A., Ambrosio M. R., Beck Peccoz P., et al. Use of Pegvisomant in acromegaly. An Italian Society of Endocrinology guideline // Journal of Endocrinological Investigation. - 2014. - № 10. - Vol. 37. - P. 1017–1030.
46. Giustina A., Chanson P., Kleinberg D., et al. Expert consensus document: A consensus on the medical treatment of acromegaly // Nature Reviews Endocrinology. - 2014. - № 4. - Vol. 10. - P. 243–248.
47. Giustina A., Gola M., Colao A., et al. The management of the patient with acromegaly and headache: A still open clinical challenge // Journal of Endocrinological Investigation. - 2008. - № 10. - Vol. 31. - P. 919–924.
48. Gottwein E., Corcoran D. L., Mukherjee N., et al. Viral MicroRNA Targetome of KSHV-Infected Primary Effusion Lymphoma Cell Lines // Cell Host & Microbe. - 2011. - № 5. - Vol. 10. - P. 515–526.
49. Graffeo C. S., Donegan D., Erickson D., et al. The Impact of Insulin-Like Growth Factor Index and Biologically Effective Dose on Outcomes After Stereotactic Radiosurgery for Acromegaly: Cohort Study // Neurosurgery. - 2020. - № 3. - Vol. 87. - P. 538–546.
50. Grebennikova T. A., Belaya Z. E., Nikitin A. G., et al. Expression of microRNA related to bone remodeling regulation in plasma in patients with acromegaly // Obesity and metabolism. - 2017. - № 3. - Vol. 14. - P. 32–37.
51. Hagiwara A., Inoue Y., Wakasa K., et al. Comparison of Growth Hormone–

producing and Non–Growth Hormone–producing Pituitary Adenomas: Imaging Characteristics and Pathologic Correlation // Radiology. - 2003. - № 2. - Vol. 228. - P. 533–538.
52. Haider B. A., Baras A. S., McCall M. N., et al. A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease // PLoS ONE. - 2014. - № 2. - Vol. 9.
53. Hirakawa A., Sato Y., Sozu T., et al. Estimating the False Discovery Rate Using Mixed Normal Distribution for Identifying Differentially Expressed Genes in Microarray Data Analysis 2007.
54. Holdaway I. M., Bolland M. J., Gamble G. D. A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly // European Journal of Endocrinology. - 2008. - № 2. - Vol. 159. - P. 89–95.
55. Horvath E., Kovacs K. Pathology of Acromegaly // Neuroendocrinology. - 2006. - № 3–4. - Vol. 83. - P. 161–165.
56. Hu Y., Lan W., Miller D. Next-Generation Sequencing for MicroRNA Expression Profile 2017.C. 169–177.
57. HU Y., WANG Q., WANG Z., et al. Circulating microRNA profiles and the identification of miR-593 and miR-511 which directly target the PROP1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency // International Journal of Molecular Medicine. - 2015. - № 2. - Vol. 35. - P. 358–366.
58. Iacovazzo D., Carlsen E., Lugli F., et al. Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study // European Journal of Endocrinology. - 2016. - № 2. - Vol. 174. - P. 241–250.
59. Ieva A. Di, Butz H., Niamah M., et al. MicroRNAs as biomarkers in pituitary tumors // Neurosurgery. - 2014. - № 2. - Vol. 75. - P. 181–188.
60. Jane J. A., Starke R. M., Elzoghby M. A., et al. Endoscopic Transsphenoidal Surgery for Acromegaly: Remission Using Modern Criteria, Complications, and Predictors of Outcome // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2011. - № 9. - Vol. 96. - P. 2732–2740.
61. Kaltsas G. A., Isidori A. M., Florakis D., et al. Predictors of the Outcome of

Surgical Treatment in Acromegaly and the Value of the Mean Growth Hormone Day Curve in Assessing Postoperative Disease Activity // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2001. - № 4. - Vol. 86. - P. 1645–1652.
62. Kameswaran V., Bramswig N. C., McKenna L. B., et al. Epigenetic Regulation of the DLK1-MEG3 MicroRNA Cluster in Human Type 2 Diabetic Islets // Cell Metabolism. - 2014. - № 1. - Vol. 19. - P. 135–145.
63. Kasuki Jomori de Pinho L., Vieira Neto L., Armondi Wildemberg L. E., et al. Low Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein Expression Is a Better Marker of Invasiveness in Somatotropinomas than Ki-67 and p53 // Neuroendocrinology. - 2011. - № 1. - Vol. 94. - P. 39–48.
64. Kasuki L., Wildemberg L. E., Gadelha M. R. Management of endocrine disease: Personalized medicine in the treatment of acromegaly // European Journal of Endocrinology. - 2018. - № 3. - Vol. 178. - P. R89–R100.
65. Katznelson L., Laws E. R., Melmed S., et al. Acromegaly: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2014. - № 11. - Vol. 99. - P. 3933–3951.
66. Kelly B. N., Haverstick D. M., Lee J. K., et al. Circulating microRNA as a biomarker of human growth hormone administration to patients // Drug Testing and Analysis. - 2014. - № 3. - Vol. 6. - P. 234–238.
67. Kim B. G., Kang S., Han H. H., et al. Transcriptome-wide analysis of compression-induced microRNA expression alteration in breast cancer for mining therapeutic targets // Oncotarget. - 2016. - № 19. - Vol. 7.
68. Kiseljak-Vassiliades K., Carlson N. E., Borges M. T., et al. Growth hormone tumor histological subtypes predict response to surgical and medical therapy // Endocrine. - 2015. - № 1. - Vol. 49. - P. 231–241.
69. Knappe U. J., Petroff D., Quinkler M., et al. Fractionated radiotherapy and radiosurgery in acromegaly: analysis of 352 patients from the German Acromegaly Registry // European Journal of Endocrinology. - 2020. - № 3. - Vol. 182. - P. 275–284.
70. König I. R., Fuchs O., Hansen G., et al. What is precision medicine? // European Respiratory Journal. - 2017. - № 4. - Vol. 50. - P. 1700391.

71. Krek A., Grün D., Poy M. N., et al. Combinatorial microRNA target predictions // Nature Genetics. - 2005. - № 5. - Vol. 37. - P. 495–500.
72. Kroh E. M., Parkin R. K., Mitchell P. S., et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) // Methods. - 2010. - № 4. - Vol. 50. - P. 298–301.
73. Krol J., Loedige I., Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. // Nature reviews. Genetics. - 2010. - № 9. - Vol. 11. - P. 597–610.
74. Kucharzewska P., Christianson H. C., Welch J. E., et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2013. - № 18. - Vol. 110. - P. 7312–7.
75. Kuhn E., Chanson P. Cabergoline in acromegaly // Pituitary. - 2017. - № 1. - Vol. 20. - P. 121–128.
76. Langmead B., Trapnell C., Pop M., et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome // Genome Biology. - 2009. - № 3. - Vol. 10. - P. R25.
77. Larkin S., Reddy R., Karavitaki N., et al. Granulation pattern, but not GSP or GHR mutation, is associated with clinical characteristics in somatostatin-naïve patients with somatotroph adenomas // European Journal of Endocrinology. - 2013. - № 4. - Vol. 168. - P. 491–499.
78. Lavrentaki A., Paluzzi A., Wass J. A. H., et al. Epidemiology of acromegaly: review of population studies // Pituitary. - 2017. - № 1. - Vol. 20. - P. 4–9.
79. Leone V., Langella C., D’Angelo D., et al. MiR-23b and miR-130b expression is downregulated in pituitary adenomas // Molecular and Cellular Endocrinology. - 2014. - № 1–2. - Vol. 390. - P. 1–7.
80. Liu Q., Tong D., Liu G., et al. Carney complex with PRKAR1A gene mutation // Medicine. - 2017. - № 50. - Vol. 96. - P. e8999.
81. Louis D. N., Perry A., Reifenberger G., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary // Acta

Neuropathologica. - 2016. - № 6. - Vol. 131. - P. 803–820.
82. Love M. I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biology. - 2014. - № 12. - Vol. 15. - P. 550.
83. Lv L., Jiang Y., Yin S., et al. Mammosomatotroph and mixed somatotroph-lactotroph adenoma in acromegaly: a retrospective study with long-term follow-up // Endocrine. - 2019. - № 2. - Vol. 66. - P. 310–318.
84. Mao Z.-G., He D.-S., Zhou J., et al. Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. // Diagnostic pathology. - 2010. - № 1. - Vol. 5. - P. 79.
85. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // EMBnet.journal. - 2011. - № 1. - Vol. 17. - P. 10.
86. Mayr B., Buslei R., Theodoropoulou M., et al. Molecular and functional properties of densely and sparsely granulated GH-producing pituitary adenomas // European Journal of Endocrinology. - 2013. - № 4. - Vol. 169. - P. 391–400.
87. Melmed S., Bronstein M. D., Chanson P., et al. A Consensus Statement on acromegaly therapeutic outcomes // Nature Reviews Endocrinology. - 2018. - № 9. - Vol. 14. - P. 552–561.
88. Mete O., Cintosun A., Pressman I., et al. Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors // Modern Pathology. - 2018. - № 6. - Vol. 31. - P. 900–909.
89. Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 2008. - № 30. - Vol. 105. - P. 10513–10518.
90. Monterde-Cruz L., Ramírez-Salazar E. G., Rico-Martínez G., et al. Circulating miR-215-5p and miR-642a-5p as potential biomarker for diagnosis of osteosarcoma in Mexican population // Human Cell. - 2018. - № 4. - Vol. 31. - P. 292–299.
91. Nagata Y., Inoshita N., Fukuhara N., et al. Growth hormone-producing pituitary adenomas in childhood and young adulthood: clinical features and outcomes // Pituitary. - 2018. - № 1. - Vol. 21. - P. 1–9.
92. Nam J.-W., Rissland O. S., Koppstein D., et al. Global Analyses of the Effect of

Different Cellular Contexts on MicroRNA Targeting // Molecular Cell. - 2014. - № 6. - Vol. 53. - P. 1031–1043.
93. Németh K., Darvasi O., Likó I., et al. Comprehensive Analysis of Circulating miRNAs in the Plasma of Patients With Pituitary Adenomas // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2019. - № 9. - Vol. 104. - P. 4151–4168.
94. Nishioka H., Inoshita N. New WHO classification of pituitary adenomas (4th edition): assessment of pituitary transcription factors and the prognostic histological factors // Brain Tumor Pathology. - 2018. - № 2. - Vol. 35. - P. 57–61.
95. Obari A., Sano T., Ohyama K., et al. Clinicopathological Features of Growth Hormone-producing Pituitary Adenomas: Difference among Various Types Defined by Cytokeratin Distribution Pattern Including a Transitional Form // Endocrine Pathology. - 2008. - № 2. - Vol. 19. - P. 82–91.
96. Palmieri D., D'Angelo D., Valentino T., et al. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis // Oncogene. - 2012. - № 34. - Vol. 31. - P. 3857–3865.
97. Palumbo T., Faucz F. R., Azevedo M., et al. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN–AKT pathway // Oncogene. - 2013. - № 13. - Vol. 32. - P. 1651–1659.
98. Pantano L., Estivill X., Martí E. SeqBuster, a bioinformatic tool for the processing and analysis of small RNAs datasets, reveals ubiquitous miRNA modifications in human embryonic cells // Nucleic Acids Research. - 2010. - № 5. - Vol. 38. - P. e34–e34.
99. Peinado H., Lavotshkin S., Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts // Seminars in Cancer Biology. - 2011. - № 2. - Vol. 21. - P. 139–146.
100. Perrone S., Zubeldia-Brenner L., Gazza E., et al. Notch system is differentially expressed and activated in pituitary adenomas of distinct histotype, tumor cell lines and normal pituitaries // Oncotarget. - 2017. - № 34. - Vol. 8.
101. Petrossians P., Daly A. F., Natchev E., et al. Acromegaly at diagnosis in 3173

patients from the Liège Acromegaly Survey (LAS) Database // Endocrine-Related Cancer. - 2017. - № 10. - Vol. 24. - P. 505–518.
102. Pivonello R., Auriemma R. S., Grasso L. F. S., et al. Complications of acromegaly: cardiovascular, respiratory and metabolic comorbidities // Pituitary. - 2017. - № 1. - Vol. 20. - P. 46–62.
103. Potorac I., Petrossians P., Daly A. F., et al. Pituitary MRI characteristics in 297 acromegaly patients based on T2-weighted sequences // Endocrine-Related Cancer. - 2015. - № 2. - Vol. 22. - P. 169–177.
104. Pritchard C. C., Cheng H. H., Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations // Nature Reviews Genetics. - 2012. - № 5. - Vol. 13. - P. 358–369.
105. Qian Z. R., Asa S. L., Siomi H., et al. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. // Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. - 2009. - № 3. - Vol. 22. - P. 431–41.
106. Raitila A., Georgitsi M., Karhu A., et al. No evidence of somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations in sporadic endocrine neoplasia // Endocrine Related Cancer. - 2007. - № 3. - Vol. 14. - P. 901–906.
107. Reczko M., Maragkakis M., Alexiou P., et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences // Bioinformatics. - 2012. - № 6. - Vol. 28. - P. 771–776.
108. Reiner A., Yekutieli D., Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures 2003. - № 3. - Vol. 19. - P. 368–375.
109. Riffo-Campos Á., Riquelme I., Brebi-Mieville P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? // International Journal of Molecular Sciences. - 2016. - № 12. - Vol. 17. - P. 1987.
110. Rooij E. van The Art of MicroRNA Research // Circulation Research. - 2011. - № 2. - Vol. 108. - P. 219–234.
111. Rostomyan L., Daly A. F., Petrossians P., et al. Clinical and genetic characterization of pituitary gigantism: an international collaborative study in 208 patients // Endocrine-Related Cancer. - 2015. - № 5. - Vol. 22. - P. 745–757.
112. Rüegger S., Großhans H. MicroRNA turnover: When, how, and why // Trends in

Biochemical Sciences. - 2012. - № 10. - Vol. 37. - P. 436–446.
113. Sandret L., Maison P., Chanson P. Place of Cabergoline in Acromegaly: A Meta-Analysis // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. - 2011. - № 5. - Vol. 96. - P. 1327–1335.
114. Schmid H. A., Brue T., Colao A., et al. Effect of pasireotide on glucose- and growth hormone-related biomarkers in patients with inadequately controlled acromegaly // Endocrine. - 2016. - № 1. - Vol. 53. - P. 210–219.
115. Sherlock M., Ayuk J., Tomlinson J. W., et al. Mortality in Patients with Pituitary Disease // Endocrine Reviews. - 2010. - № 3. - Vol. 31. - P. 301–342.
116. Taboada G. F., Luque R. M., Neto L. V., et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1–5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR // European Journal of Endocrinology. - 2008. - № 3. - Vol. 158. - P. 295–303.
117. Tomankova T., Petrek M., Gallo J., et al. MicroRNAs: Emerging Regulators of Immune-Mediated Diseases // Scandinavian Journal of Immunology. - 2012. - № 2. - Vol. 75. - P. 129–141.
118. Trivellin G., Butz H., Delhove J., et al. MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in vitro // AJP: Endocrinology and Metabolism. - 2012. - № 6. - Vol. 303. - P. E708–E719.
119. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., et al. Characterization of extracellular circulating microRNA // Nucleic Acids Research. - 2011. - № 16. - Vol. 39. - P. 7223–7233.
120. Tutuncu Y., Berker D., Isik S., et al. Comparison of octreotide LAR and lanreotide autogel as post-operative medical treatment in acromegaly // Pituitary. - 2012. - № 3. - Vol. 15. - P. 398–404.
121. Valassi E., García-Giralt N., Malouf J., et al. Circulating miR-103a-3p and miR-660-5p are associated with bone parameters in patients with controlled acromegaly // Endocrine Connections. - 2019. - № 1. - Vol. 8. - P. 39–49.

122. Valassi E., García-Giralt N., Malouf J., et al. Circulating miR-103a-3p and miR-660-5p are associated with bone parameters in patients with controlled acromegaly // Endocrine Connections. - 2019. - № 1. - Vol. 8. - P. 39–49.
123. Vierimaa O. Pituitary Adenoma Predisposition Caused by Germline Mutations in the AIP Gene // Science. - 2006. - № 5777. - Vol. 312. - P. 1228–1230.
124. Vilar L., Fleseriu M., Bronstein M. D. Challenges and pitfalls in the diagnosis of hyperprolactinemia // Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. - 2014. - № 1. - Vol. 58. - P. 9–22.
125. Voglova K., Bezakova J., Herichova I. Progress in micro RNA focused research in endocrinology // Endocrine Regulations. - 2016. - № 2. - Vol. 50. - P. 83–105.
126. Vouzouneraki K., Esposito D., Mukka S., et al. Carpal tunnel syndrome in acromegaly: a nationwide study // European Journal of Endocrinology. - 2021. - № 2. - Vol. 184. - P. 209–216.
127. Vychytilova-Faltejskova P., Merhautova J., Machackova T., et al. MiR-215-5p is a tumor suppressor in colorectal cancer targeting EGFR ligand epiregulin and its transcriptional inducer HOXB9 // Oncogenesis. - 2017. - № 11. - Vol. 6. - P. 399.
128. Wang H., Graham I., Hastings R., et al. Gonadotrope-specific Deletion of Dicer Results in Severely Suppressed Gonadotropins and Fertility Defects // Journal of Biological Chemistry. - 2015. - № 5. - Vol. 290. - P. 2699–2714.
129. Wang J., Tan L., Tan L., et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy // Scientific Reports. - 2015. - № 1. - Vol. 5. - P. 10201.
130. Weber J. A., Baxter D. H., Zhang S., et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids // Clinical Chemistry. - 2010. - № 11. - Vol. 56. - P. 1733–1741.
131. Wierinckx A., Roche M., Legras-Lachuer C., et al. MicroRNAs in pituitary tumors // Molecular and Cellular Endocrinology. - 2016.
132. Wierinckx A., Roche M., Legras-Lachuer C., et al. MicroRNAs in pituitary tumors // Molecular and Cellular Endocrinology. - 2017.
133. Yamamoto M., Takahashi Y. Colorectal Neoplasm in Acromegaly: Epidemiology and Underlying Mechanisms IntechOpen, 2020.

134. Yan J., Wei R., Li H., et al. miR-452-5p and miR-215-5p expression levels in colorectal cancer tissues and their relationship with clinicopathological features // Oncology Letters. - 2020. - № 3. - Vol. 20. - P. 2955–2961.
135. Yao S., Chen W.-L., Tavakol S., et al. Predictors of postoperative biochemical remission in acromegaly // Journal of Neuro-Oncology. - 2021. - № 2. - Vol. 151. - P. 313–324.
136. Yu C., Li J., Sun F., et al. Expression and Clinical Significance of miR-26a and Pleomorphic Adenoma Gene 1 (PLAG1) in Invasive Pituitary Adenoma 2016. - P. 5101–5108.
137. Zhao S., Li J., Feng J., et al. Identification of Serum miRNA-423-5p Expression Signature in Somatotroph Adenomas // International Journal of Endocrinology. - 2019. - - Vol. 2019. - P. 1–12.
138. Аушев В. Н. МикроРНК: малые молекулы с большим значением // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. - 2015. - Т. 8. - № 1. - С. 1-12.
139. Гребенникова Т. А., Белая Ж. Е., Никитин А. Г., и др. Экспрессия микроРНК, регулирующих костное ремоделирование, в плазме крови у пациентов с акромегалией // Ожирение и метаболизм. - 2017. - Т. 14. - № 3. - С. 32-37.
140. Дедов И. И., Молитвословова Н. Н., Рожинская Л. Я., и др. Федеральные клинические рекомендации по клинике, диагностике, дифференциальной диагностике и методам лечения акромегалии // Проблемы Эндокринологии. - 2013. № 6. - Т. 59. - С. 4-18.
141. Лапшина А.М., Хандаева П.М., Белая Ж.Е., и др. Роль микроРНК в онкогенезе опухолей гипофиза и их практическая значимость // Терапевтический архив. - 2016. - № 8. - Т. 88. - С. 115–120.
142. Мелкозёров К.В., Пржиялковская Е.Г., Тарбаева Н.В., и др. Нарушение ритма и проводимости сердца у больных акромегалией: роль магнитно-резонансной томографии сердца // Терапевтический архив. - 2020. - № 10. - Т. 92. - С. 70–77.
143. Новикова М.В., Рыбко В.А., Хромова Н.В., Фармаковская М.Д., и др. Роль белков Notch в процессах канцерогенеза // Успехи молекулярной онкологии. -

2015. - № 3. - Т. 2. - С. 30–42.
144. Пронин Е.В. Пронин В.С. Вклад аналогов соматостатина в реализацию пациенториентированного подхода к лечению акромегалии // Pharmateca. - 2020. - № 12. - Т. 12. - С. 99–106.
145. Белая, Ж.Е., Голоунина, О. О., Рожинская, Л. Я., и др. Эпидемиология, клинические проявления и эффективность различных методов лечения акромегалии по данным единого российского регистра опухолей гипоталамо-гипофизарной системы // Проблемы эндокринологии. - 2020. - № 1. - Т. 66. - С. 93-103.