

УРУСОВА Лилия Сергеевна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФАКТОРЫ
ПРОГНОЗА АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА**

3.1.19. Эндокринология

3.3.2. Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Работа выполнена в Государственном научном центре Российской Федерации Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный консультант:

Мокрышева Наталья Георгиевна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН

Научный консультант:

Тертычный Александр Семенович - доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Асатурова Александра Вячеславовна, доктор медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бохян Ваган Юрикович, доктор медицинских наук, заведующий хирургическим отделением №5 (эндокринной онкологии) Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Волкова Наталья Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, проректор по научной работе, заведующая кафедрой внутренних болезней №3 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 года, в ___ часов на заседании диссертационного совета 21.1.045.01 в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России или на сайте www.endocrincentr.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Мазурина Наталия Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Аденокортикальный рак (АКР) – редкая злокачественная опухоль коры надпочечников, характеризующаяся, как правило, агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом [Меретуков Д.А. и др., 2017; Мельниченко Г.А. и др., 2014; Nabra M.A. et al., 2021]. Общая 5-летняя выживаемость при этой опухоли составляет по данным большинства публикаций, менее 40% [Мельниченко Г.А., 2015; Fassnacht M. et al., 2018]. Несмотря на существенный прогресс в диагностике АКР, около 2/3 пациентов на момент постановки диагноза имеют метастатическое поражение других органов, чаще всего печени, легких и костей [Fassnacht M. et al., 2018; Tierney J.F. et al., 2019; Wang S. et al., 2017]. Для данной группы пациентов прогноз остается неблагоприятным, их пятилетняя выживаемость составляет менее 15% [Jeong C. et al., 2022; Liang J. et al., 2020; Mascioli F. et al., 2022].

В случае новообразования надпочечника перед патоморфологом стоят три основные задачи: во-первых, требуется провести дифференциальную диагностику между первичным поражением коры надпочечника, метастазами и другими первичными поражениями надпочечника (опухоли мозгового слоя, саркомы); во-вторых, необходимо дифференцировать аденокортикальную аденому и карциному; в-третьих, на основании результатов гистологического исследования важно прогнозировать клиническое течение злокачественного новообразования (ЗНО) [Lam A.K.Y., 2021; Pezzani R., 2019; Tkachuk A.V. et al., 2021].

Одной из наиболее сложных проблем при этом является выраженная гетерогенность АКР. Существует как минимум три морфологических варианта опухоли, даже для классического подтипа АКР характерна высокая степень морфологической гетерогенности как в случае различных опухолей, так и в пределах одного новообразования [Duregon E. et al., 2015; 2017; Stone B.V. et al., 2021]. Клинический исход заболевания также весьма вариабелен и трудно прогнозируем с учетом случаев индолентного и, наоборот, крайне агрессивного течения опухоли, приводящего к летальному исходу в течение менее 1 года [Кривошеев А.В. и др., 2019; Порубаева Э.Э. и др., 2022; Brondani V.B., Fragoso M.C.B.V., 2020]. Кроме того, АКР имеет гетерогенное молекулярное строение, что, вероятно, и определяет вариабельность биологического поведения этой опухоли [Карасева Л.Р., Привалова Л.П., 2019; Порубаева Э.Э. и др., 2022; Gupta N. et al., 2018].

Не менее сложной задачей является эффективное лечение АКР. При локализованной стадии АКР радикальное хирургическое лечение в сочетании с адъювантной адренолитической терапией позволяет предотвратить рецидив заболевания лишь у 25 – 40% пациентов [Fassnacht M., 2018; Paragliola R.M., 2018]. При небольшой опухолевой нагрузке возможно проведение монотерапии митотаном, который обладает адренолитической активностью, а также ингибирует стероидогенез [De Francia S., 2012]. Важно отметить, что препарат имеет узкий терапевтический диапазон, ограниченный, с одной стороны, необходимостью скорейшего достижения терапевтической концентрации в крови (более 14 мг/л), с другой – его переносимостью (менее 20 мг/л) [Мельниченко Г.А., 2015]. При достижении целевой концентрации частота побочных эффектов составляет не менее 80% наблюдений (минимум 1 побочный эффект), интенсивность и амплитуда нежелательных клинических проявлений нарастает по мере кумуляции дозы [Allolio B., 2007]. В случае неоперабельного рака коры надпочечника, распространенного метастатического процесса после резекции первичной опухоли, быстрого прогрессирования заболевания возможности консервативной терапии еще более ограничены. При исходной обширной диссеминации процесса применяется комбинация митотана и химиотерапевтических

препаратов: этопозид, доксорубицин и цисплатина (режим EDP-M). Ее эффективность не превышает 20 - 30% [Fassnacht M, 2012]. Таким образом, ограниченное число и эффективность цитостатических препаратов, низкая чувствительность клеток опухоли к медикаментозной терапии диктуют необходимость изучения новых, более эффективных лекарственных комбинаций, а также поиска молекулярно-биологических мишеней, определяющих чувствительность опухоли к проводимому лечению. Применение митотана приводит к облигатной надпочечниковой недостаточности и сопряжено с развитием токсических эффектов, при этом эффективно не у всех пациентов. В качестве потенциальных предикторов ответа на митотан в пилотных исследованиях предложены уровни экспрессии рибонуклеотидредуктазы M1 (RRM1), цитохрома P450 2W1 (CYP2W1), ацил-КоА-холестеролацилтрансферазы 1 (SOAT1). Повышенная экспрессия CYP2W1 и выключение гена RRM1 ассоциированы в экспериментальных исследованиях с лучшим ответом на митотан [Ronchi CL, 2014; Volante M, 2012]. Идентификация прогностически значимых биомаркеров и потенциальная валидизация RRM1, CYP2W1 и SOAT1 поможет предотвратить нецелесообразное и/или неэффективное применение препарата, избежать развития побочных эффектов у пациентов, не чувствительных к нему.

До настоящего времени вопросы своевременного выявления АКР, дифференциальной диагностики, лечения, прогнозирования риска рецидива опухоли и динамического наблюдения пациентов остаются окончательно не решенными, что обусловило высокую актуальность рассматриваемой проблемы.

Степень разработанности темы исследования. В исследованиях последнего десятилетия продемонстрирована высокая неоднородность морфологической и иммунофенотипической картины АКР, что определяет сложность прогнозирования клинического течения и выбора лечебной тактики [Ruggiero C. et al., 2022; Tian X. et al., 2021]. Не менее значимым вопросом является отсутствие надежных предикторов эффективности различных подходов к фармакотерапии опухоли: адренолитической терапии с использованием митотана, биотерапии с использованием аналогов соматостатина, иммунотерапии [Tella S.H. et al., 2018; Wu K. et al., 2021].

Во многом неизученными остаются иммунологические аспекты АКР [Lloyd R.V. et al., 2017; Nicolson N.G. et al., 2018; Pereira S.S. et al., 2019]. При этом известно, что клетки иммунной системы являются важной частью микроокружения опухоли. Продукция этими клетками провоспалительных факторов способствует поддержанию состояния хронического воспаления, усилению роста и прогрессии опухоли [Hanahan D., Weinberg R.A., 2011; Lu Q. et al., 2023].

Одним из ключевых механизмов иммунорезистентности при онкологических заболеваниях является ингибирование иммунного ответа при связывании рецептора программируемой смерти-1 (PD1) на CD8⁺ Т-лимфоцитах со специфическими PD-L1 и PD-L2. Лиганды рецептора PD1 - PD-L1 и PD-L2 - экспрессируются опухолевыми клетками различного генеза (например, при опухолях яичников, почки, мозга, пищевода, немелкоклеточном раке легких) и ассоциированы с иммунорезистентностью. Также экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках или опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах рассматривается как предиктор неблагоприятного прогноза и биомаркер эффективности иммунотерапии с применением анти-PD1/PD-L1 моноклональных антител. К настоящему времени опубликован ряд исследований, посвященных анализу экспрессии PD-L1 в АКР [Zamarron BF, 2011; Fay AP, 2015; Liu S, 2018], которые свидетельствуют в пользу значимой роли PD-L1 в патогенезе прогрессирования АКР и возможности успешного применения анти-PD1/PD-L1 иммунотерапии при этой нозологии. Рецепторы к соматостатину (SSTR 1–5 подтипов) – это семейство G-белок-сопряженных

рецепторов, посредством которых соматостатин реализует свои биологические эффекты. SSTR присутствуют на поверхности многих опухолевых клеток и являются мишенью для синтетических аналогов соматостатина (АС). Взаимодействуя с определенным подтипом рецепторов, АС не только подавляют избыточную секрецию гормонов, но и оказывают антипролиферативный эффект, тормозят ангиогенез, индуцируют апоптоз клеток опухоли [Rinke A, 2009; Caplin ME, 2014]. В ряде исследований было показано, что клетки рака коры надпочечника экспрессируют рецепторы соматостатина и могут представлять собой мишень для АС, что расширяет терапевтические возможности при распространенном АКР [Mariniello B, 2011; Germano A, 2017; Voronkova IA, 2017; Kolomeytseva AA, 2018]. Ограничением данных работ является проведение исследования на выборках малого объема, в нескольких работах также не определена интенсивность экспрессии, что диктует необходимость дальнейшего изучения данного вопроса.

В последние два десятилетия необходимость детального изучения клеточного состава микроокружения опухоли и клеток, ответственных за иммунный ответ, способствовала интеграции данных, полученных с помощью классических подходов, с результатами применения технологий single-cell [Ohmoto A. et al., 2021; Turco M. et al., 2021]. Это направление исследований охватывает широкий спектр современных экспериментальных и аналитических методов и представляет собой инструмент изучения опухолей, позволяющий охарактеризовать их клеточный и молекулярный состав [Huang L. et al., 2021].

Таким образом, до настоящего времени критерии диагностики, прогностические факторы течения и исхода АКР остаются предметом дискуссии в мировом профессиональном сообществе. Недостаточной является эффективность используемых методов лечения этой опухоли. В связи с этим необходимым представляется проведение углубленного поиска предикторов особенностей течения заболевания и ответа АКР на лечение на основании комплексной оценки морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик опухоли для определения биомаркеров, которые могут быть использованы в клинической практике.

Цель исследования - повышение эффективности лечения аденокортикального рака на основании данных комплексного анализа клинико-анамнестических, морфологических, иммуногистохимических характеристик опухоли и определения потенциальных мишеней таргетной фармакотерапии.

Задачи исследования:

1. Проанализировать клинико-анамнестические данные пациентов с аденокортикальным раком.
2. Охарактеризовать морфологические паттерны различных подтипов аденокортикального рака (классического, онкоцитарного, миксоидного), которые потенциально могут быть идентифицированы как предикторы агрессивного течения заболевания.
3. Выявить наиболее чувствительные и специфичные маркеры гистогенеза аденокортикального рака.
4. Разработать алгоритм оценки злокачественного потенциала аденокортикальных опухолей, основанный на наиболее чувствительных и специфичных критериях, универсальный для всех морфологических подтипов заболевания.
5. Оценить общую и безрецидивную выживаемость у пациентов с различными морфологическими подтипами аденокортикального рака.
6. Выявить значимые факторы, влияющие на общую и безрецидивную выживаемость пациентов с различными морфологическими подтипами аденокортикального рака.

7. Выявить наличие ассоциаций активности ферментов RRM1, цитохромов P4502W1 и SOAT1 и показателей безрецидивной выживаемости у пациентов, которым проводится лечение митотаном, как прогностических факторов эффективности консервативного лечения.
8. Оценить опухолевую иммунную инфильтрацию в различных вариантах аденокортикального рака.
9. Проанализировать результаты single-cell секвенирования АКР с изучением геномов единичных клеток, выполнить сравнение вариаций копий генов (CNV) в различных морфологических вариантах АКР

Научная новизна исследования. Впервые охарактеризованы морфологические паттерны различных подтипов аденокортикального рака.

Продemonстрировано, что у пациентов с классическим подтипом аденокортикального рака статистически значимо чаще, чем при других вариантах опухоли, наблюдаются патологические митозы, некрозы и инвазия в синусоиды.

Впервые охарактеризованы наиболее чувствительные и специфичные маркеры гистогенеза аденокортикального рака, в частности SF-1, Melan A, Inhibin A.

Впервые на основании морфологических и иммуногистохимических характеристик опухолевой ткани разработана классификационная трехэтапная модель дифференциальной диагностики аденокортикального рака и аденокортикальной аденомы.

Впервые определены значимые факторы, влияющие на общую и безрецидивную выживаемость у пациентов с различными морфологическими подтипами аденокортикального рака.

Выявлено наличие ассоциаций активности ферментов RRM1, цитохромов P4502W1 и SOAT1 с показателями безрецидивной выживаемости у пациентов с АКР. Показано, что пониженная экспрессия этих факторов ассоциирована с худшим прогнозом по уровню безрецидивной выживаемости больных АКР.

Получены новые данные об особенностях опухолевой иммунной инфильтрации в различных морфологических вариантах изучаемой опухоли.

Впервые представлены результаты single-cell секвенирования аденокортикального рака с изучением геномов единичных клеток, на основании которых дана характеристика транскриптомного профиля клеток этой опухоли.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выделение морфологических подтипов аденокортикального рака и использование специфичных, чувствительных и прогностически значимых иммуногистохимических маркеров позволит клиницистам и патоморфологам судить о биологических свойствах данной опухоли и клиническом течении заболевания.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что иммуногистохимическая панель маркеров, включающая SF-1, Melan A, Inhibin A, позволяет со 100%-ной чувствительностью подтвердить корковый гистогенез опухоли надпочечника.

Разработана классификационная трехэтапная модель для проведения дифференциальной диагностики аденокортикального рака и аденомы, применение которой позволяет решить проблему субъективности и сложности интерпретации критериев ряда алгоритмов диагностики, используемых в клинической практике. Разработанная модель, в отличие от используемых в настоящее время, позволяет верифицировать все морфологические варианты аденокортикального рака, ее внедрение в клиническую практику будет способствовать совершенствованию и стандартизации дифференциальной диагностики аденокортикальных опухолей.

Выявлены значимые факторы, влияющие на общую и безрецидивную выживаемость пациентов с различными морфологическими подтипами аденокортикального рака, которые следует использовать при выработке тактики лечения больных аденокортикальным раком.

Транскриптомный профиль клеток аденокортикального рака характеризуется выраженной гетерогенностью, наличием множественных полнохромосомных амплификаций/делеций в классическом подтипе АКР, сегментарных - в миксоидном подтипе АКР и отсутствие событий в доминантном клоне онкоцитарного АКР.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установление гистологических характеристик аденокортикального рака, в том числе данных иммуногистохимических исследований, в совокупности с описанием паттернов роста позволяет существенно оптимизировать диагностику этой опухоли.
2. Разработана классификационная трехэтапная модель для дифференциальной диагностики аденокортикального рака и аденомы, точность которой является максимальной - 100%.
3. Факторы, статистически значимо влияющие на безрецидивную выживаемость пациентов с аденокортикальным раком, включают: морфологический подтип опухоли, индекс Ki-67, митотическую активность, наличие атипических митозов. Установлено, что статистически достоверно влияющими факторами на общую выживаемость пациентов с АКР являются: стадия заболевания по классификации ENSAT, митотическая активность, значение индекса Ki-67, морфологический подтип опухоли.
4. Проанализирована экспрессия потенциальных прогностических параметров, определяющих чувствительность опухоли к терапии в зависимости от морфологических вариантов АКР. При анализе безрецидивной выживаемости с учетом экспрессии потенциальных предикторов ответа на терапию митотаном выявлено, что низкая и умеренная экспрессия RRM1, SOAT1 и CYP2W1 в АКР при отсутствии противоопухолевой терапии ассоциирована с лучшей безрецидивной выживаемостью в сравнении с пациентами, получающими лечение. Таким образом, в настоящей работе выявлены тенденции взаимосвязи экспрессии потенциальных прогностических маркеров и безрецидивной выживаемости.
5. В паренхиме и в строме аденокортикального рака обнаружены иммунные клетки всех исследуемых популяций в широких пределах. Количество CD45+ иммуноцитов варьировалось от 23 до 560 клеток/0.25 мм². CD3+ Т-лимфоциты были обильно представлены в паренхиме и строме опухолей классического и онкоцитарного подтипов, тогда как в миксоидном варианте их количество было значительно ниже. CD68+ макрофаги также обнаружены во всех образцах, их количество было выше в опухолях онкоцитарного подтипа по сравнению с классическим.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследования обеспечивается адекватным объемом клинического материала, репрезентативностью проведенного комплексного обследования пациентов с аденокортикальным раком, адекватностью полученных результатов поставленной цели и задачам исследования, использованием современных методов статистической обработки полученных данных.

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 24 октября 2023 года на расширенной межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Основные результаты исследования представлены в виде докладов на российских и международных конференциях и конгрессах: “ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress (TAT)” (Paris, France, 2023), Международном форуме «Инновационная онкология» посвященный 95-летию со дня рождения Н.Н. Трапезникова (Москва, 2023), VI Международном форуме

онкологии и радиотерапии «For Life» (Москва, 2023), конференции «Вычислительная биология и искусственный интеллект для персонализированной медицины – 2023» (Москва, 2023), Всероссийской научно-образовательной онлайн-конференции «Актуальные вопросы современной эндокринологии: от инноваций до реальной клинической практики» (Москва, 2023), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2022), Конкурсе молодых ученых в рамках XXVI Российского онкологического конгресса (Москва, 2022), VIII Петербургском Международном онкологическом форуме «Белые ночи 2022» (Санкт-Петербург, 2022), V Инновационном Петербургском медицинском форуме «Алмазовский медицинский форум» (Санкт-Петербург, 2022), 80-ой Международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2022), «Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития» (Минск, 2022), XVII Международной / XXVI Всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2022), Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием «МЕДИЦИНСКАЯ ВЕСНА – 2022» (Москва, 2022), I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Орфанные болезни: прошлое, настоящее, будущее" (Москва, 2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «МЕДИЦИНСКАЯ ВЕСНА – 2021» (Москва, 2021), VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека» (Челябинск, 2021), “European Congress of Endocrinology (ECE)” (online, 2020), 16th ENS@T Scientific Meeting - (Paris, France 2017), 13th ENS@T Scientific Meeting (Nice, France, 2014). Также исследование было поддержано Советом по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (грант МК-3695.2019.7).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности: Диссертация соответствует отрасли медицинских наук, паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, а также областям исследования согласно пунктам 2, 4, 5, 7 и 1, 3, 4 соответственно.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе выполнения исследования, используются в клинической практике отдела фундаментальной патоморфологии, референс-центре патоморфологических, иммуногистохимических методов ГНЦ ФГБУ НМИЦ Эндокринологии, система стратификации риска опухолей коры надпочечников внедряется в работу региональных патолого-анатомических отделений.

Материалы исследования использованы в учебном процессе - в лекциях для ординаторов, аспирантов на кафедре персонализированной и трансляционной медицины ГНЦ ФГБУ НМИЦ Эндокринологии.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах подготовки диссертационной работы. Автором были сформулированы цель и задачи, исходя из них разработана программа исследований, выполнен поиск и анализ научной литературы по изучаемой проблеме. В ходе реализации исследования диссертант лично проводил гистологические и иммуногистохимические исследования операционного материала, полученного в ходе хирургического лечения 73 пациентов с новообразованиями надпочечников, осуществил статистический анализ полученных материалов, формулировку основных

положений, выносимых на защиту, выводов и практических рекомендаций. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме работы.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 36 печатных работ, в том числе 11 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук, 12 статей опубликованы в рецензируемых научных изданиях, входящих в международную базу данных SCOPUS.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалом и методов исследования, трех глав с описанием полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Общий объем диссертации изложен на 278 страницах, включает 148 рисунков и 48 таблиц. Список литературы включает 332 источника, в том числе 28 русскоязычных и 204 англоязычные публикации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и общие сведения об исследовании. В настоящей работе было проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала 73 пациентов с новообразованиями надпочечников, которым выполнялась адреналэктомия с 2005 по 2020 год в НМИЦ эндокринологии Минздрава России, и консультативного материала из следующих лечебных учреждений г. Москвы и регионов РФ.

Создание Референс-центра патоморфологических, иммуногистохимических и лучевых методов исследования на базе НМИЦ эндокринологии Минздрава России в 2020 году позволило создать регистр пациентов с этим крайне редким заболеванием и собрать уникальную коллекцию клинических и патоморфологических данных пациентов не только из Москвы, но и из других регионов Российской Федерации.

Данное исследование включало 7 этапов (Рисунок 1).

При гистологическом исследовании опухоли верифицировали в соответствии с международной гистологической классификацией опухолей надпочечника (ВОЗ, 2022 г.), международных критериев и международной классификации болезней X пересмотра.

Представленная научно-исследовательская работа основывалась на этических принципах научных исследований с включением людей (Хельсинская декларация) и положений рекомендаций надлежащей клинической практики (GCP - good clinical practice).

Дизайн исследования утвержден комиссией по вопросам этики ГНЦ ФГБУ РФ “НМИЦ Эндокринологии” (протокол № 14 от 25 июля 2023 года).

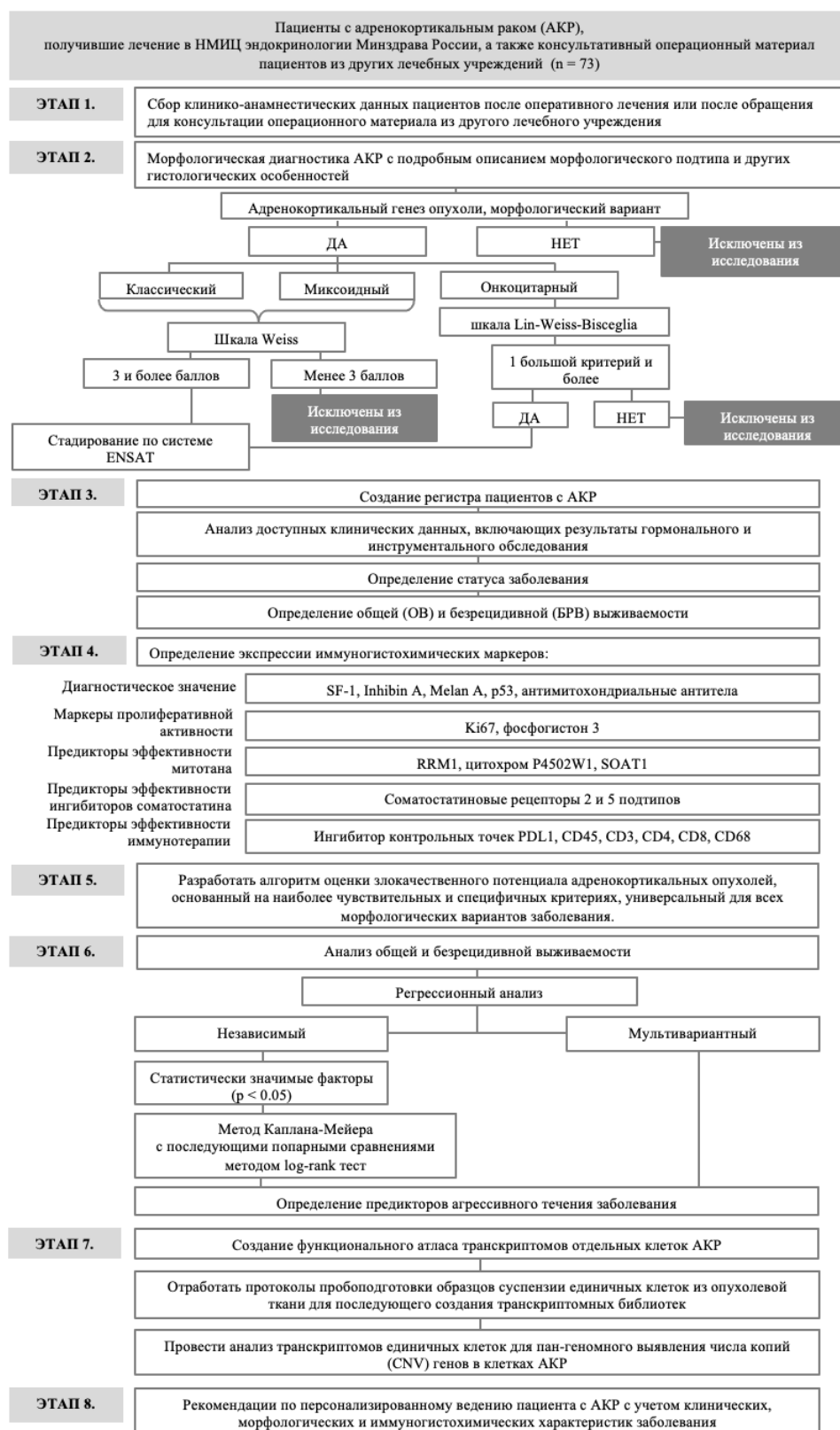


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Перед началом обследования все пациенты дали письменное согласие на использование их данных в настоящей работе.

Критериями включения в исследование явились:

- Возраст от 18 лет и старше

- Подтвержденный морфологический диагноз злокачественного новообразования коры надпочечников (АКР)
- Подписанное информированное согласие пациента на забор и использование биологического материала.

Критериями не включения были:

- Диагноз «Опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом»
- Диагноз «Онкоцитарная опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом»
- Возраст младше 17 лет.

Методы исследования. Для определения типа функциональной активности АКР у обследованных пациентов оценивали уровни кортизола, тестостерона и альдостерона в периферической крови. Для определения в сыворотке периферической крови дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС), общего тестостерона и альдостерона были использованы стандартные наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) NovaTec (Германия), Beckman Coulter (США), DVE00, R & D Systems (США) на анализаторе ELISA. Кортизол определяли с помощью набора ИФА (EIA-1887, Cortisol ELISA) для прямого количественного определения.

Морфологическое исследование образцов адренокортикального рака. Из гистологического материала АКР, полученного в ходе хирургического лечения пациентов в НМИЦ эндокринологии МЗ РФ, а также из готовых гистологических блоков по стандартной методике были изготовлены препараты, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Осуществляли стандартную гистологическую проводку надпочечников с помощью гистопроцессора «Leica ASP6025 S» («Leica Biosystems», Германия), затем осуществляли их заливку в парафин. Парафиновые срезы изготавливали с помощью микротомы «Leica RM 2125 RTS» («Leica Biosystems», Германия) и после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином на аппарате «Leica ST5010 AXL» («Leica Biosystems», Германия).

Изучение гистологических препаратов надпочечников проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа «Leica DM2500» («Leica Microsystems», Германия) и компьютерной морфометрии с помощью программы «Aperio ImageScope» («Leica Microsystems», Германия).

Все опухоли коры надпочечников оценивали в соответствии со следующими патологическими критериями: общий размер и масса опухоли, ядерный полиморфизм, количество митозов в 10 полях зрения при увеличении микроскопа х400, цитоплазма опухолевых клеток (прозрачность 0-25% и 26-100%) и паттерн роста (диффузный и недиффузный), наличие или отсутствие атипичных митозов, некрозов и однозначной капсулярной, венозной, синусоидальной и инвазии органов.

Для определения злокачественного потенциала опухоли использовалась шкала Weiss, а в случае онкоцитарных новообразований надпочечника, характеризующихся зернистой и ярко-эозинофильной цитоплазмой клеток, высоким ядерным полиморфизмом и диффузным характером роста, применялась модифицированная шкала Lin-Weiss-Bisceglia. Все адренокортикальные карциномы в этом исследовании имели 4 или более гистологических критерия по шкале Weiss [Weiss L.M., 1984].

Митотическая активность определялась путем подсчета 50 полей зрения (400х) с помощью микроскопа «Leica DM2500» («Leica Microsystems», Германия). Архитектура определялась, как «диффузная», когда доля клеток без характерного паттерна роста составляла более 33% опухоли.

Иммуногистохимическое исследование проводили на иммуногистостейнере Leica Bond III по стандартным протоколам, рекомендованным производителем. Для ИГХ-анализа были использованы моноклональные антитела к Ki-67 (MIB-1 в разведении 1:150; «Dako», Дания), фосфогистону H3 (PHH3) («Cell Marque», США).

Подсчет пролиферативной активности опухолевых клеток (Ki-67) осуществлялся визуально в 50 полях зрения при увеличении x400 и определялся как процент окрашенных клеточных ядер в участках опухоли с наибольшей активностью (горячие точки). Степень пролиферативной активности по экспрессии Ki-67 оценивали следующим образом: 0-10,0% – низкая; 11-20% – умеренная; 21-100% – высокая.

Определяли уровни экспрессии таких иммуногистохимических маркеров, как SF-1 (N1665 в разведении 1:100; «Cell Marque», США), Inhibin A (AlphaAB-1 в разведении 1:20; «Lab Vision», США), Melan A (A103 в разведении 1:50; «Novocastra», Германия), p53 (DO-7 в разведении 1:100; «Dako», Дания), Антитела к mES-13 (антимитохондриальное антитело; A-113-1 в разведении 1:50; «Biogenex», США), RRM1 (ab135383 в разведении 1:50; «Abcam», Великобритания), цитохром P4502W1 (PA5-14900 в разведении 1:50; «Thermo Fisher Scientific», США), SOAT1 (ab39327 в разведении 1:1000; «Abcam», Великобритания), соматостатиновые рецепторы 2 и 5 подтипов (UMB-1 и UMB-4; «Epitomics», США), ингибитор контрольных точек PDL1 (SP142, в разведении 1:200; «Abcam», Великобритания), CD45 (EP322Y в разведении 1:200; «Abcam», Великобритания), CD3 (ab699 в разведении 1:50; «Abcam», Великобритания), CD4 (ab133616 в разведении 1:1000; «Abcam», Великобритания), CD8 (ab4055 в разведении 1:1000; «Abcam», Великобритания), CD68 (514H12; «Novocastra», Германия).

Для каждого маркера степень экспрессии оценивалась полуколичественным методом с использованием 4 балльной шкалы (число клеток на 100 посчитанных, при подсчете не менее 1000 клеток).

Анализ состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток проводился при помощи алгоритма CIBERSORT [Newman A.M. et al., 2015], примененный к повторной количественной оценке с использованием данных Kallisto и Gencode GTF TCGA. К данным TCGA без реквантификации был применен алгоритм CIBERSORTx [Newman A.M. et al., 2019], при использовании следующих параметров: LM22 signature matrix file, B-mode batch correction, disabled quantile normalization, relative run mode, set to 100 permutations. Был выполнен анализ ConsensusTME [Jimenez-Sanchez A. et al., 2019] с использованием скрипта R из оригинальной статьи (<https://github.com/cansysbio/ConsensusTME>, дата обращения: 20.10.2022). Также использовали данные о наличии опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток, которые находятся в свободном доступе на сайте <https://science.bostongene.com/tumor-portrait/> (дата обращения: 20.10.2022).

Подсчет иммунных клеток проводили в пяти полях зрения размером 0,05 мм² (общая площадь составляла 0,25 мм²) отдельно для стромы и паренхимы опухоли в наиболее репрезентативных полях зрения.

Методы молекулярной визуализации маркеров аденокортикального рака надпочечников. Было проанализировано 13 образцов коры надпочечников, полученных от 7 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом АКР: 10 образцов опухоли (8 первичных опухолей и 2 локорегионарных рецидива), а также 3 образца условно-нормальной окружающей ткани, удаленной при адреналэктомии по поводу АКР. Забор биологического материала проводился непосредственно во время плановых операций.

В лаборатории молекулярной и медицинской генетики готовили клеточные суспензии единичных клеток образцов коры надпочечников человека методом уксусно-метанольной

диссоциации/фиксации (ACME). Набор Single Cell 3'v3.1 (Dual index) и контроллер Chromium (10X Genomics) использовали для создания кДНК-библиотек единичных клеток. Амплификация кДНК-библиотек осуществлялась в соответствии с инструкциями производителя, с использованием реагента AMPureXP вместо SPRIselect. кДНК-библиотеки образцов были отсеквенированы с помощью Illumina Novaseq 6000, read1: 28, i7 index: 10, i5 index: 10, read2: 90. На каждый образец брали 10 000 клеток, подсчет клеток осуществлялся с помощью Countess 3 Automated Cell Counter. Расчет реагентов осуществлялся по таблице Cell Suspension Volume Calculator Table.

Анализ данных секвенирования. Необработанные файлы fastq были созданы с помощью 10x Genomics Cell Ranger 6.1.1, качество секвенирования дополнительно оценивалось с помощью FastQC. Выравнивание и фильтрация прочтений выполнялось с помощью Cell Ranger 6.1.1 с настройками по умолчанию. Все образцы были выровнены на геном человека GRCm38, в среднем 95% прочтений картировались на геном человека.

Данные, сгенерированные Cell Ranger 6.1.1, дополнительно обрабатывались с помощью Seurat, где применялась дополнительная фильтрация перед нормализацией и дальнейшим анализом. Было установлено минимальное количество генов на одну клетку – 500, фильтрация клеток осуществлялась с помощью фильтра pagoda2 genes versus molecule filter (<https://github.com/kharchenkolab/pagoda2>). Затем был установлен порог для фильтрации экспрессии митохондриальных генов на одну клетку – 25%. После этого для каждой клетки была рассчитана оценка дублетов с помощью Scrublet. Клетки с баллами выше 0,20 были отмечены как дубликаты и исключены.

В каждом образце после фильтрации оставалось более 5000 клеток высокого качества. Эти клетки были нормализованы методом Seurat и переданы для дальнейшей фильтрации и анализа.

Для анализа экспрессии генов использовался DecontX. Для стабильного распределения клеточных кластеров был сформирован референсный набор данных из выборок условно-здоровой окружающей ткани надпочечника. Кластеризация была проверена по генетическим маркерам клеток надпочечника. Визуализации клеточных кластеров осуществляли с помощью пакета Seurat. Каждому клеточному кластеру был назначен тип клеток в соответствии с экспрессией маркерного гена, описанного в литературе [Huang L. et al., 2021]. Тесты дифференциальной экспрессии (отрицательная биномиальная реализация Seurat) были проведены для каждого выбранного клеточного кластера. Все митохондриальные, рибосомные и высокоокружающие гены были исключены из тестирования. Также были исключены гены с абсолютным $\log FC < 0,4$ и гены, экспрессирующиеся менее чем в 20% клеток кластера.

Выделяли РНК с использованием реактива ExtractRNA (Евроген) по протоколу производителя, определяли концентрацию РНК. Концентрацию измеряли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм на бесцветном спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, США) с помощью программного обеспечения ND-1000 v 3.5.1. Качество выделенной РНК определяли на фрагментном анализаторе Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, США) с использованием чипов RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, США).

Получение суспензий единичных клеток коры надпочечников. При получении клеточных суспензий коры надпочечников использовали протокол ферментативной диссоциации тканей. В качестве протеаз использовали коллагеназу I и коллагеназу IV, а также диспазу. Для полной диссоциации тканей использовали нейтральную протеазу – диспазу. При использовании этих протеаз получали ткань, хорошо диссоциированную на единичные клетки, и высокую

выживаемость клеток - более 70%, было подготовлено 7 образцов с помощью ферментативной диссоциации.

Секвенирование транскриптомных библиотек проводилось на платформе Illumina NovaSeq 6000 с использованием рекомендованных производителем (10x Genomics) настроек. Средняя длина транскриптомных библиотек была 450 нуклеотидов. Применялись двойные чтения, рид 1 включал 28 нуклеотидов UMI (универсального молекулярного идентификатора), 10-нуклеотидные индексы Dual Index Kit T Set A (PN-1000213) и 91-нуклеотидную вставку. Глубина секвенирования составляла от 30000 пар ридов на клетку.

После биоинформатической фильтрации клеток был проанализирован уровень экспрессии генов в 81 567 клеток адренокортикального рака и в 19 154 клетках условно-здоровой ткани коры надпочечников. Данное количество клеток являлось репрезентативным и может использоваться для последующих исследований.

Методы лечения. В соответствии с клиническими рекомендациями всем пациентам с АКР I–III стадии по ENSAT и при возможности R0-резекции в кратчайшие сроки после проведения полноценной диагностики и стадирования опухолевого процесса было проведено хирургическое лечение в объеме адреналэктомии в пределах здоровых тканей, без нарушения целостности капсулы опухоли. Всем пациентам после выполнения R0-резекции по поводу АКР при Ki67 более 10% проводилось адъювантное лечение митотаном (орто-пара-DDD). Лечение начиналось с небольших доз с постепенной эскалацией, под контролем состояния пациента, переносимости лечения, концентрации митотана в плазме крови по схеме: старт терапии с дозы 1 г/сут с постепенной эскалацией дозы на 0.5-1 г/сут каждые 3 – 7 дней до суммарной дозы в 4 г/сут. Дальнейшая коррекция дозы митотана проводилась в соответствии с его концентрацией в крови (необходимо определение через 4 недели от момента выхода на дозу 4 или 6 г/сут) и переносимостью. С учетом отсутствия достоверных данных у пациентов с низким/промежуточным риском рецидива/прогрессирования (I-II стадии по ENSAT, R0-резекционный статус и $Ki67 \leq 10\%$) решение о необходимости адъювантной терапии митотаном принималось в индивидуальном порядке.

Методы статистического анализа полученных данных. Заранее определенной первичной конечной точкой исследования была безрецидивная выживаемость (БРВ), которая определялась как временной интервал между датой начальной операции и датой выявления рентгенологических признаков рецидива заболевания, смерти по любой причине или дата последнего осмотра. В качестве вторичной конечной точки использовали общую выживаемость (ОВ), которую рассчитывали от даты первой операции до смерти от любой причины или последнего контрольного визита. Величины БРВ и ОВ с течением времени после первоначальной операции оценивались с использованием метода Каплана-Мейера. Значимость демографических параметров и клинических характеристик для прогноза БРВ и ОВ определяли с помощью одномерных и многомерных регрессионных моделей Кокса. Была проанализирована связь выживаемости со следующими факторами: морфологический вариант, размер образования, гормональная активность, стадия по классификации ENSAT, индекс Ki-67, митотическая активность, параметры шкалы Weiss.

Для первичной обработки данных использован пакет прикладных программ MS Excel 2000. Первичная обработка данных включала: отбор, стандартизацию данных для проведения анализа, анализ однородности выборок, оценку типа распределения.

Статистическая обработка данных производилась с использованием программного обеспечения «IBM SPSS Statistics версия 26.0». Распределение полученных данных на нормальность оценивалось с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для определения

формы распределения характеристик использовались способ построения гистограмм и частотного анализа. Данные, не подчинявшиеся закону нормального распределения, были представлены с помощью медианы (Me) и интерквартильного размаха (25 и 75 перцентили). Оценка статистической значимости различий между двумя независимыми группами по количественным признакам проводилась с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни, по категориальным признакам - с помощью критерия Фишера и критерия Хи-квадрат.

В качестве количественной меры эффекта при сравнении относительных показателей использовали показатель отношения шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ).

Для корреляционного анализа показателей использовали метод ранговой корреляции Спирмена. Показатели кумулятивной выживаемости и сроки возникновения рецидива болезни были представлены графически с использованием метода Каплан-Мейера. Определение статистической значимости различий уровней выживаемости в отдельных группах больных осуществляли с помощью логарифмического рангового теста.

Для анализа выживаемости использовался регрессионный анализ. Выполнен независимый и мультивариантный регрессионный анализ. Мультивариантный регрессионный анализ проводился методом отношения правдоподобия. Различия признаны статистически значимыми при $p < 0,05$.

При разработке математической модели для определения злокачественного потенциала опухолей коры надпочечника статистический анализ проводился на языке программирования Python 3.1 в среде Google Colab. Для выявления критических значений предикторов использовали ROC-анализ. Отрезная точка выбиралась согласно критерию Юдена.

Для построения многомерной модели использовали библиотеку scikit-learn 1.0.2 для языка Python. Выполнялся логистический регрессионный анализ с использованием l1-регуляризации, которая является эффективным методом выделения наиболее значимых признаков в модели. Уравнение модели:

$$p = 1 / (1 + e^{-z})$$

$$Z = 0 + 1X_1 + 2X_2 + \dots + iX_i$$

Z – зависимый бинарный признак,

X_1, \dots, X_i – независимые признаки,

0, ..., i – коэффициенты.

Функция потерь для логистической регрессионной модели:

$$Loss_Function = logloss + \lambda_1 ||\beta||_1, \text{ где}$$

logloss – функция logloss;

β – веса параметров;

λ_1 – коэффициент L1-регуляризации;

$||\beta||_1$ – l1-норма весов;

l1-норма: $||\beta||_1 = \sum_{i=1}^n |\beta_i|$

Для валидации полученной модели использовали разделение исходной выборки на обучающую и тестовую в соотношении 9:1 соответственно. Используемые операционные характеристики: диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР), прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР).

Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика вариантов аденокортикального рака. Пациенты, включенные в исследование, находились под наблюдением от 4 до 205 мес. (медиана составляла 34,2 мес.). При анализе распределения пациентов по полу было установлено преобладание женщин (69,9%, n=51) (Рисунок 2).

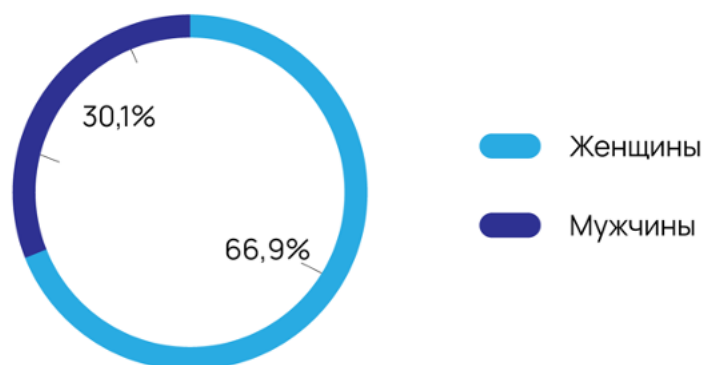


Рисунок 2 – Распределение обследованных больных (n=73) по полу

Средний возраст у обследованных больных (n=73) составлял $46,8 \pm 1,7$ лет. Было установлено преобладание пациентов в возрасте 51-60 лет – 31,5%, при этом соотношение количества больных старше и младше 50 лет было примерно одинаковым (50,7% и 49,3%, соответственно) (Рисунок 3).

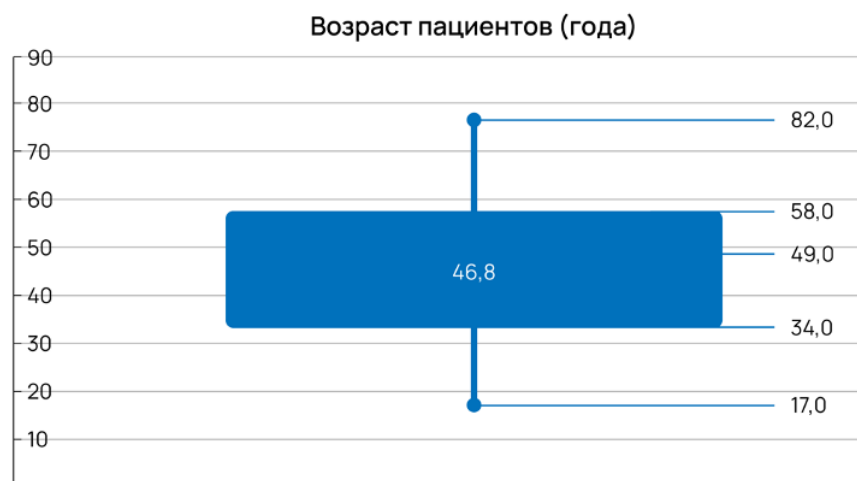


Рисунок 3 – Распределение обследованных больных по возрасту (n=73)

Гормональные нарушения были диагностированы у 26 обследованных пациентов (35,6%). Чаще всего (28,8%, n=21) у пациентов нашей когорты был диагностирован гиперкортицизм, смешанная функциональная активность АКР была выявлена у 3 чел. (4,1%) и по 1 больному имели гиперандрогению (1,4%) и гиперальдостеронизм (1,4%).

На основании результатов гистологического исследования АКР проводили стадирование опухоли по системе ENSAT.

Наибольшее число обследованных (32 чел., 43,8%) имели II стадию АКР по системе ENSAT. У 26 больных (35,6%) была диагностирована III стадия. Первая стадия была установлена у 12,3% обследованных (n=9) и четвертая у 8,2% (n=6).

Размер новообразования надпочечников у обследованных пациентов (n=73) варьировал от 3,5 до 25 см и в среднем составлял $9,37 \pm 0,53$ см.

У большинства пациентов (67,1%, n=49) был выявлен классический морфологический вариант АКР, онкоцитарный - у каждого пятого пациента (20,5%) и у 9 больных (12,3%) документирован миксоидный тип опухоли (Рисунок 4).

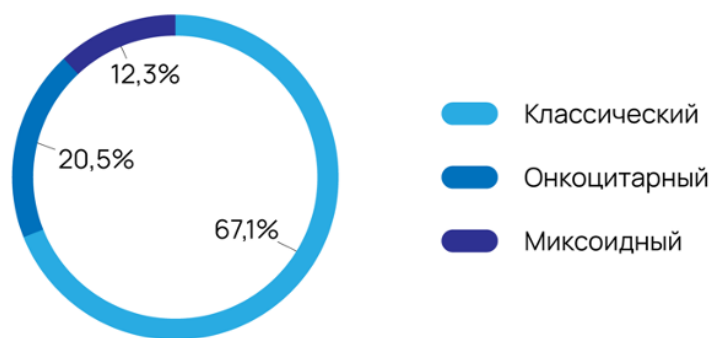


Рисунок 4 – Морфологический подтип опухоли у обследованных больных

Количество баллов по шкале Weiss в когорте обследованных составляло от 4 до 9 (в среднем – $6,1 \pm 0,4$ баллов) (Рисунок 5).

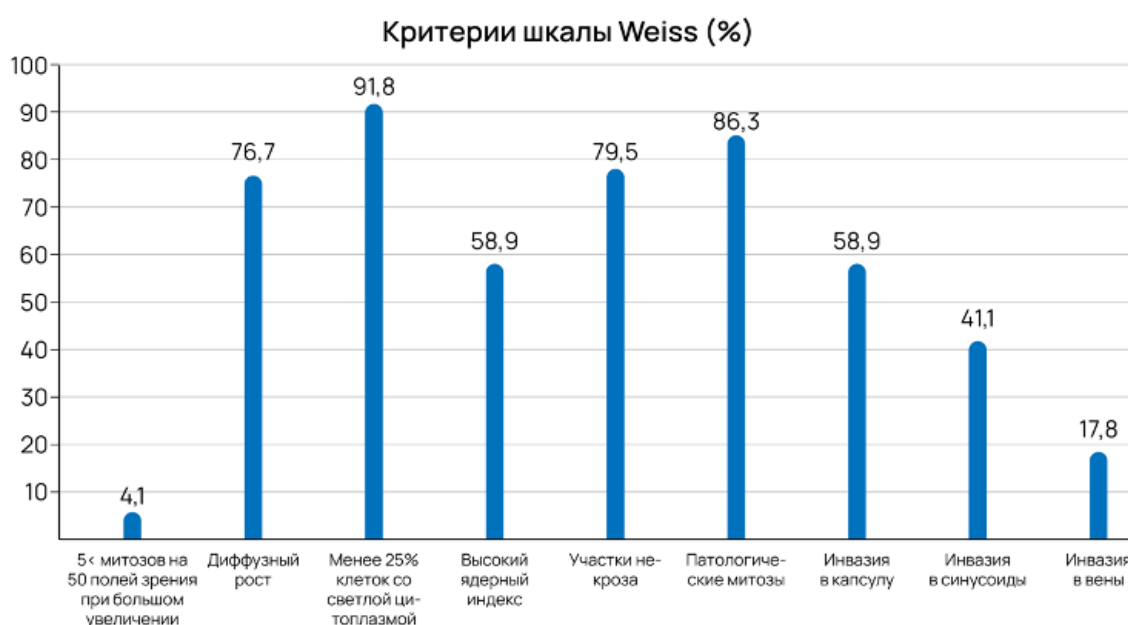


Рисунок 5 – Частота критериев шкалы Weiss у обследованных больных (n=73)

При проведении иммуногистохимического анализа было установлено, что медиана индекса клеточной пролиферации Ki-67 у обследованных нашей когорты составила 17%, величина данного показателя варьировала от 0 до 60%. Маркер клеточной пролиферации PNH3 у обследованных пациентов в среднем составлял $17,5 \pm 11,4$, его уровень варьировал от 1 до 50,0.

В исследуемой выборке преобладал классический подтип АКР, который встречался в 67,1% случаев (n=49). В классическом гистологическом подтипе АКР было описано несколько паттернов роста: диффузный, характеризующийся солидными полями с практически полным отсутствием стромы, трабекулярный - в виде различных по ширине тяжей, разделенных тонкими соединительнотканными перегородками, альвеолярный - в виде крупных гнезд, псевдожелезистый - формирующий структуры, напоминающие железы с просветом в центре, карциноидоподобный - напоминающий по строению карциноид, рост в виде цепочек, напоминающий строение дольковой карциномы молочной железы (Рисунок 6).

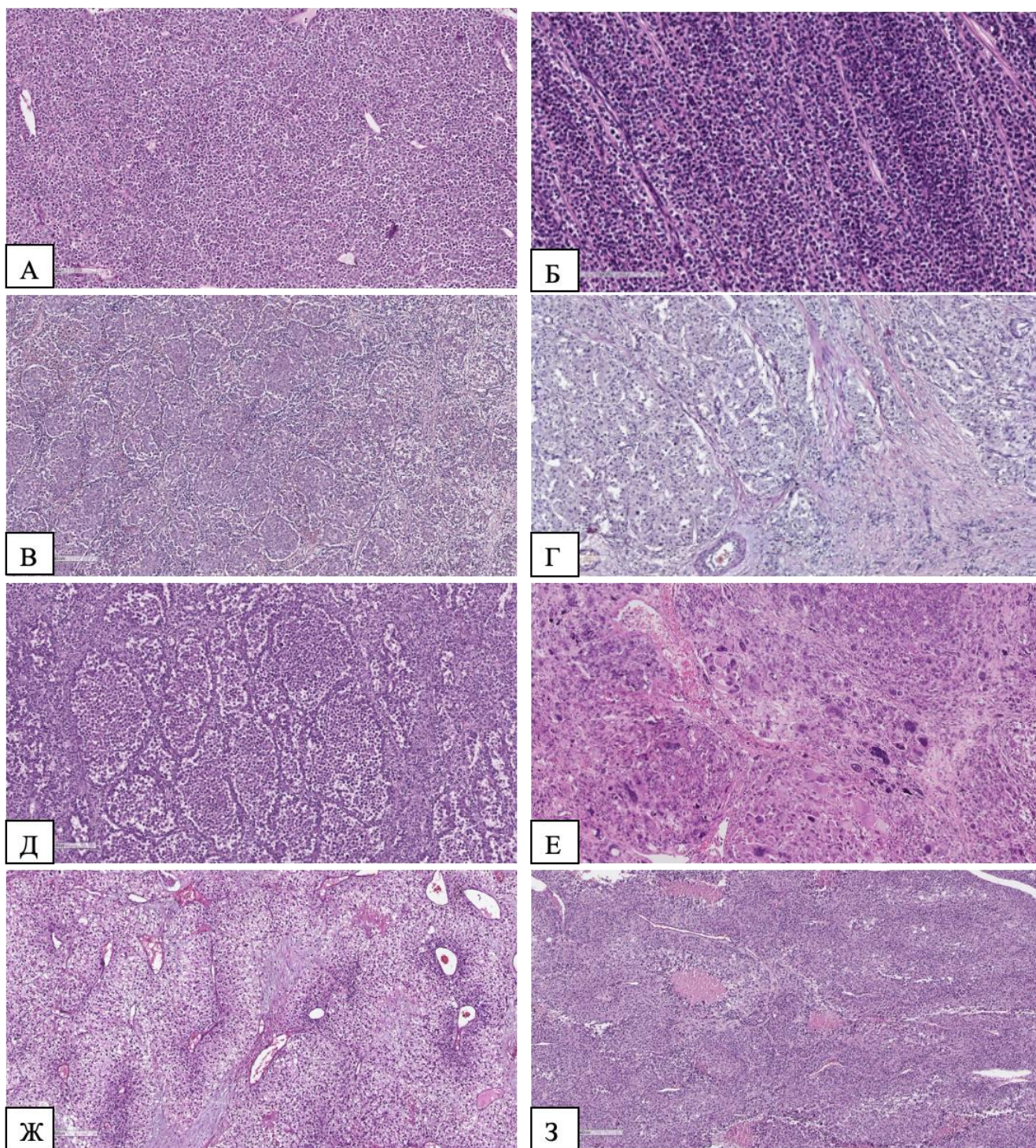


Рисунок 6 –Паттерны классического варианта АКР и его морфологические характеристики. Увеличение x100. Окраска: гематоксилин и эозин. А. Диффузный паттерн: характеризуется солидными полями с практически полным отсутствием стромы. Б. Трабекулярный паттерн: в виде различных по ширине тяжей, разделенных тонкими соединительнотканнми перегородками. В. Альвеолярный паттерн: в виде крупных гнезд. Г. Псевдожелезистый паттерн: формирующий структуры, напоминающие железы с просветом в центре. Д. Карциноидоподобный паттерн: напоминающий по строению карциноид. Е. Клетки опухоли крупные, выраженно полиморфные, местами многоядерные гигантские. Ж. Клетки опухоли со светлой цитоплазмой. З. В опухоли присутствуют очаги некрозов, по типу камедо-некрозов

Размеры опухолевых клеток варьировали от средних, относительно мономорфных эозинофильных, напоминающих клетки пучковой и сетчатой зоны коры надпочечника, до крупных, выраженно полиморфных и многоядерных гигантских. Характерно наличие толстой фиброзной капсулы, в которой нередко обнаруживались признаки инвазивного опухолевого роста. На границе опухоли и капсулы наблюдалась инвазия в кровеносные сосуды. В пределах классического морфологического варианта достаточно часто обнаруживались участки гетерогенного строения с различным сочетанием паттернов роста и цитологических особенностей: наличие в пределах одного образования участков из крупных полиморфных клеток солидного строения, а также мономорфных клеток малого или среднего размера, формирующих альвеолярные структуры.

Следующим по распространенности являлся онкоцитарный подтип АКР, на долю которого приходилось 20,5% случаев (n=15). Для данного подтипа АКР было выявлено три основных паттерна: диффузный, трабекулярный и псевдожелезистый (Рисунок 7).

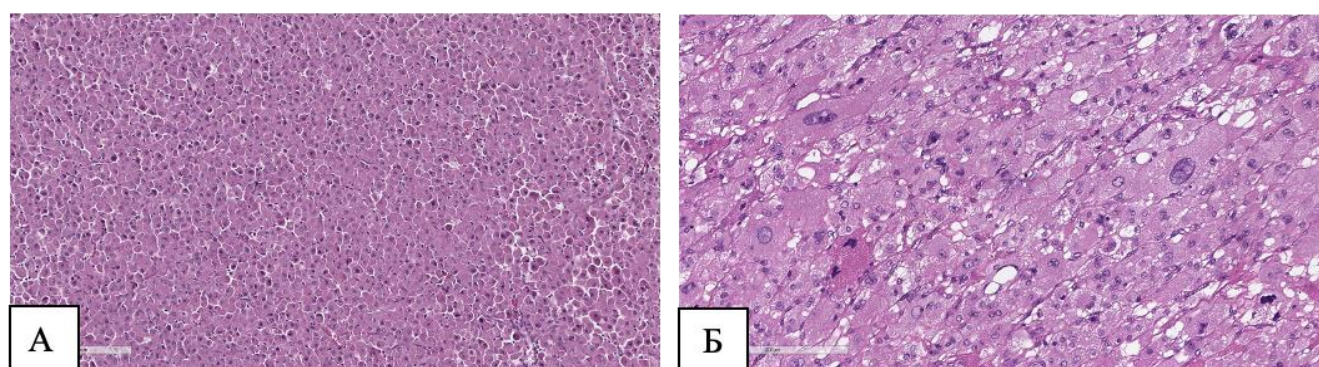


Рисунок 7 – Паттерны онкоцитарного варианта АКР. Увеличение x100. Окраска: гематоксилин и эозин. А. Диффузный паттерн: солидные поля опухолевых клеток с практически полным отсутствием стромы. Б. Трабекулярный паттерн: в виде различных по ширине тяжей, разделенных тонкими соединительнотканными перегородками

Миксоидный подтип АКР был диагностирован в 12,3% случаев (n=9), для него Р были характерны паттерны: трабекулярный, псевдожелезистый, рост в виде цепочек в миксоидной строме, криброзный (Рисунок 8).

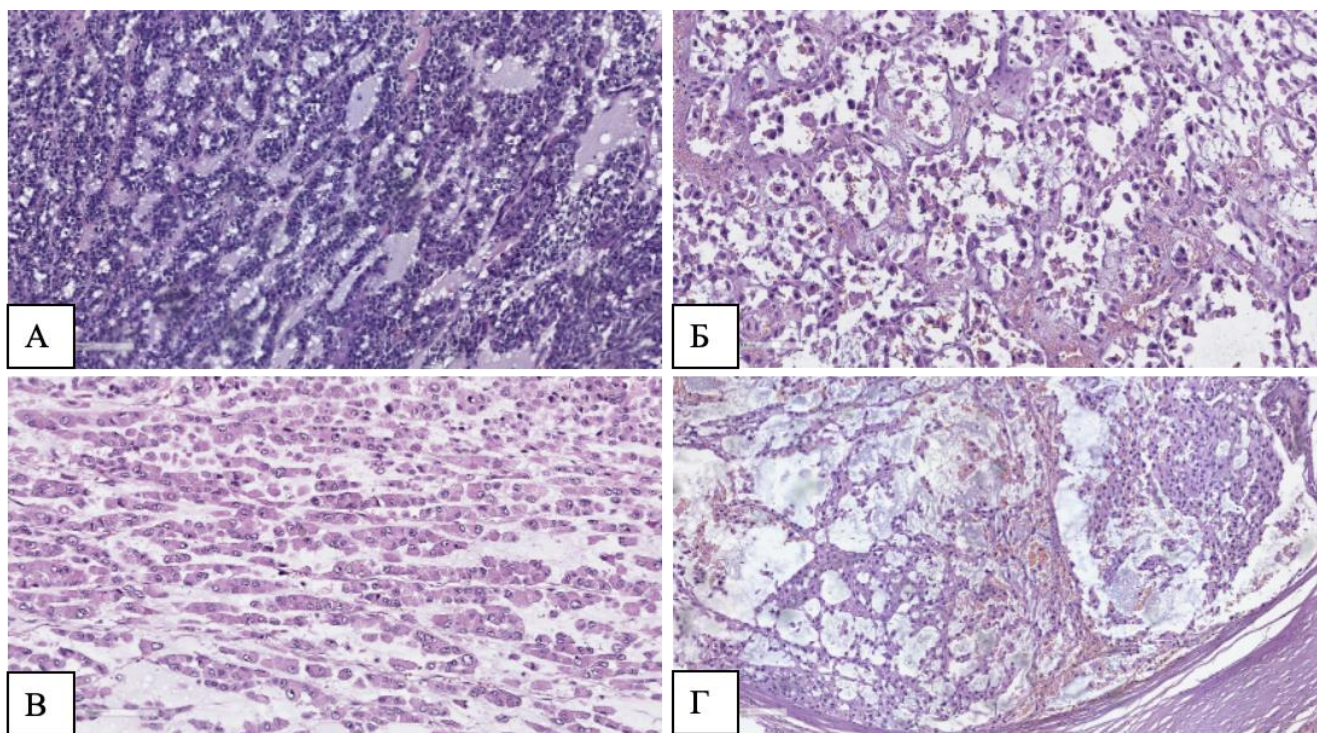


Рисунок 8 – Паттерны миксоидного варианта АКР. Увеличение $\times 100$. Окраска: гематоксилин и эозин. А. Трабекулярный паттерн: опухолевые клетки собраны в различные по ширине тяжи в миксоидной строме. Б. Псевдожелезистый паттерн: формирующий структуры, напоминающие железы с просветом в центре. В. Паттерн с формированием цепочек: рост опухолевых клеток в виде цепочек в миксоидной строме. Г. Криброзный паттерн: с формированием округлых, резко очерченных просветов

В миксоидных опухолях встречались относительно мономорфные клетки небольшого и среднего размера с легкой и умеренной ядерной атипией и скудной светлой эозинофильной цитоплазмой. В миксоидном варианте также обнаруживались немиксоидные области, представленные эозинофильными или светлыми клетками с диффузным, трабекулярным или гнездным типом роста.

Результаты анализа злокачественного потенциала АКР у обследованных пациентов ($n=73$) свидетельствуют, что средняя величина значения шкалы Weiss составила $6,1 \pm 0,4$ баллов (от 4 до 9 баллов). Инвазия АКР в вены была выявлена у 17,8% обследованных ($n=13$), достоверных различий по частоте инвазии опухоли в вены в зависимости от ее морфологического типа обнаружено не было (Chi-square $p=0,08$).

Инвазия опухоли в синусоиды установлена у 50,0% пациентов с классическим вариантом АКР, что было достоверно (Chi-square $p=0,03$) чаще, чем при онкоцитарном варианте заболевания (20,0%). У обследованных с миксоидным вариантом АКР значение данного показателя составило 33,3%.

Инвазия АКР в капсулу была выявлена у 58,9% обследованных ($n=43$), участки некроза обнаруживались в 79,5% случаев ($n=58$), у 89,8% пациентов с классическим подтипом АКР, что было достоверно ($p=0,0073$) чаще по сравнению с соответствующими значениями показателя при онкоцитарном (60,0%) и миксоидном подтипах (55,6%).

Критерий «высокий ядерный индекс» в когорте обследованных обнаружен в 58,9% случаев. Достоверных отличий в зависимости от морфологического типа АКР не выявлено ($p=0,064$).

Диффузный рост исследуемой опухоли был выявлен у 76,7% обследованных (n=56): у 85,7% пациентов с классическим типом АКР и у 93,3% обследованных с онкоцитарным типом. При миксоидном типе данный критерий выявлен не был.

У 63 пациентов (86,3%) установлено наличие патологических митозов: в 93,9% случаев классического типа АКР и в 88,9% миксоидного типа, статистически значимо ($p < 0,0001$) чаще по сравнению с соответствующими значениями в группе пациентов с онкоцитарным подтипом АКР (60,0%).

Иммуногистохимические особенности различных морфологических вариантов аденокортикального рака. Для каждого гистологического подтипа заболевания оценивался профиль экспрессии иммуногистохимических маркеров. Иммуногистохимическая панель включала следующие маркеры: SF-1, Inhibin A, Melan A, антимитохондриальные антитела (АМА), Ki-67, p53 (Рисунок 9).

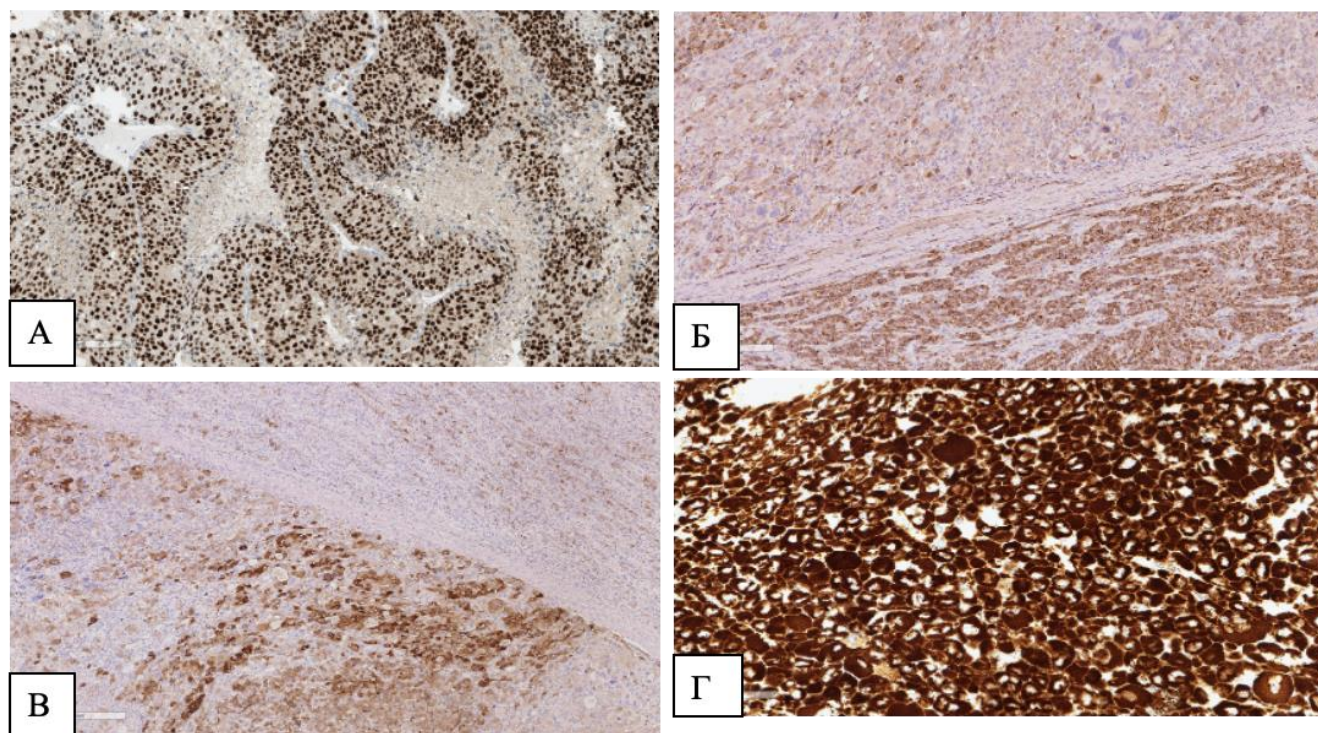


Рисунок 9 – Иммуногистохимическое окрашивание АКР с антителами к SF-1, Melan A, Inhibin A, антимитохондриальными антителами. Увеличение $\times 100$. А. Классический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к SF-1, позитивная ядерная реакция в опухолевых клетках. Б. Классический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Melan A, гетерогенная позитивная реакция. В. Классический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Inhibin A, выраженная гетерогенная позитивная реакция. Г. Онкоцитарный вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антимитохондриальными антителами, выраженная диффузная цитоплазматическая реакция.

SF-1, Inhibin A, Melan A использовались для подтверждения аденокортикального генеза различных морфологических вариантов АКР. SF-1 (Ad4-связывающий протеин, Ad4BP) является ядерным транскрипционным фактором, играющим ключевую роль в нормальном развитии эндокринной и репродуктивной систем человека и регулирующим экспрессию генов, связанных со стероидогенезом, в связи с чем считается главным регулятором синтеза стероидных гормонов. Иммунореактивность данного маркера наблюдалась во всех исследуемых случаях АКР независимо от гистологического подтипа.

Иммунореактивность Melan A также была выявлена в корковом слое надпочечников и других стероидогенных тканях. Inhibin A является гормоном белковой природы, который присутствует в различных тканях, продуцирующих стероидные гормоны, в том числе демонстрирует стойкую экспрессию в нормальной ткани надпочечников при их гиперплазии и аденокортикальных новообразованиях, но его специфическая роль недостаточно изучена.

Выраженность экспрессии Melan A в классическом варианте АКР варьировала от слабой до выраженной с равномерным распределением количества случаев, в то время как в онкоцитарном варианте преобладала умеренная, а в миксоидном – слабая иммунореактивность данного маркера. Статистически значимых различий уровня экспрессии данного маркера в зависимости от морфологического варианта АКР не выявлено.

Для классического и онкоцитарного вариантов была характерна средняя и слабая выраженность экспрессии Inhibin A, а в случае миксоидного подтипа практически во всех проанализированных случаях была выявлена слабая интенсивность экспрессии данного маркера. Снижение экспрессии Inhibin A в миксоидном варианте находилось на границе статистической значимости.

Диагностическая чувствительность SF1 составила 100% (75/75). Диагностическая чувствительность Melan A в выявлении аденокортикального гистогенеза опухолей составила 89,3% (67/75), Inhibin A – 86,7% (65/75), тогда как совместное применение данных маркеров показало чувствительность на уровне 100%.

Индекс Ki-67, оцениваемый по результатам иммуногистохимического исследования, позволяет выделить опухолевые клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла на всём его протяжении (G1-, S-, G2- и M-фазы). Установлено, что медиана пролиферативной активности в классическом варианте АКР составляла 20%, в онкоцитарном варианте – 10%, в миксоидном варианте – 15%. Обнаружены статистически значимые различия индекса пролиферативной активности Ki-67 в зависимости от исследуемых морфологических вариантов АКР (Kruskal-Wallis $p=0,008$, классический vs онкоцитарный $p=0,0055$).

Экспрессия p53 наблюдалась в 18,6% случаев ($n=14$). Кроме того, достоверных различий уровня экспрессии данного маркера в зависимости от исследуемых морфологических вариантов АКР не выявлено.

Новая гистологическая система стратификации риска аденокортикальных опухолей. На данном этапе исследования было отобрано 143 случая опухолей надпочечников. Все образцы ткани верифицировали в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей надпочечника (ВОЗ, 2022).

В исследуемой выборке образцы от 143 пациентов были разделены на обучающую ($n=128$) и тестовую ($n=15$) выборки. Были проанализированы признаки с точки зрения их информативности в отношении диагностики АКР. На *первом этапе* был выделен признак: размер опухоли >10 см и/или масса опухоли >200 г. При соответствии опухоли этим критериям, в 100% случаев гистологический диагноз соответствовал АКР.

На *втором этапе* были проанализированы пациенты с отрицательным значением данного критерия, то есть с размером опухоли ≤ 10 см и массой опухоли ≤ 200 г. Был выполнен ROC-анализ показателя Ki-67 (Рисунок 10).

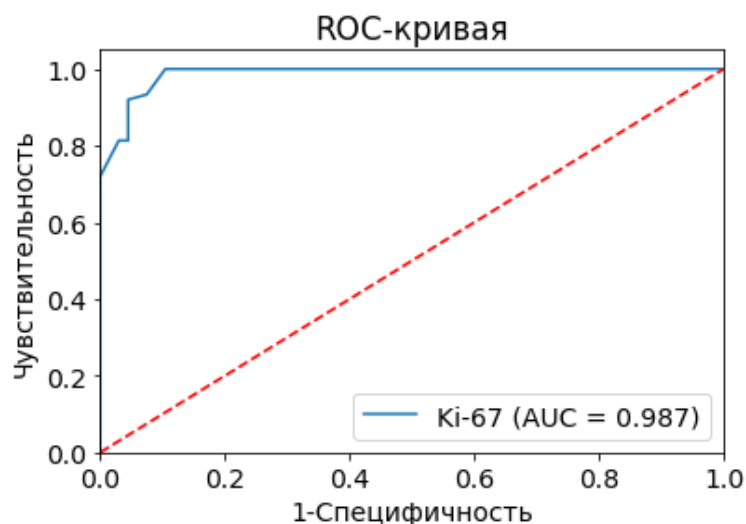


Рисунок 10 – ROC-анализ уровня Ki-67 в отношении диагностики АКР

AUC=0,987 (95% ДИ: 0,969-1,000), что соответствует высокой диагностической эффективности данного показателя.

Заключительным этапом являлось построение математической модели с целью дифференциальной диагностики АКР и АКА / ОНЗП у пациентов со значением Ki-67 в интервале от 5 до 10 включительно. Использовали логистический регрессионный анализ с l1-регуляризацией. Отклик – гистологический диагноз. Была получена регрессионная модель:

$$Z = -0,018 \cdot X_{\text{размер}} + 0,278 \cdot X_{\text{митозы}} - 0,261 \cdot X_{\text{ядерный полиморфизм}} + 0,297 \cdot X_{\text{патологические митозы}} + 0,816 \cdot X_{\text{инвазия в капсулу}} + 0,565 \cdot X_{\text{некрозы}}$$

$$p = 1 / (1 + e^{-z})$$

Таким образом, в диагностике АКР используются 8 параметров: размер опухоли, масса опухоли, Ki-67, митозы, ядерный полиморфизм, патологические митозы, инвазия в капсулу, некрозы.

Диагностика осуществляется в 3 этапа:

1. Размер >10 см и/или масса >200 г → Диагноз: АКР

2. Ki-67 <5% → Диагноз: АКА

Ki-67 ≥11% → Диагноз: АКР

3. Ki-67 = 5-10%

$$Z = -0,018 \cdot X_{\text{размер}} + 0,278 \cdot X_{\text{митозы}} - 0,261 \cdot X_{\text{ядерный полиморфизм}} + 0,297 \cdot X_{\text{патологические митозы}} + 0,816 \cdot X_{\text{инвазия в капсулу}} + 0,565 \cdot X_{\text{некрозы}}$$

$$p = 1 / (1 + e^{-z})$$

$p \geq 0,5 \rightarrow$ Диагноз: АКР

$p < 0,5 \rightarrow$ Диагноз: АКА.

Операционные характеристики тестовой выборки: ДЧ = 100%, ДС = 100%, ПЦПР = 100%, ПЦОР = 100%.

На основании результатов проведенного исследования нами разработан алгоритм диагностики на основе гистологической системы стратификации риска АКР (Рисунок 11).

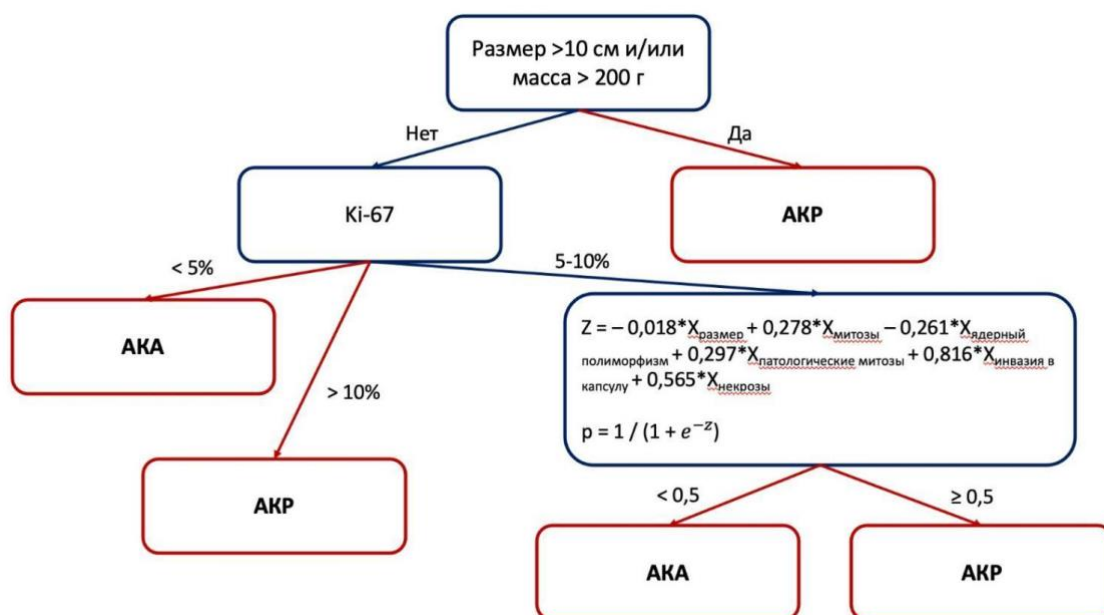


Рисунок 11 – Алгоритм дифференциальной диагностики АКР и АКА на основе гистологической системы стратификации риска

На первом этапе осуществляется оценка размеров и массы опухоли: превышение величин этих показателей 10 см и/или 200 г соответственно указывает на диагноз АКР. На втором этапе диагностики оценивается индекс пролиферативной активности Ki-67, уровень которого менее 5% указывает на диагноз АКА, при значении Ki-67 более 11% – АКР. На третьем этапе в случае величина показателя Ki-67 от 5 до 10% производится расчет по формуле, по результатам которого величина показателя $p \geq 0,5$ устанавливается диагноз АКР, при $p < 0,5$ – АКА.

Факторы прогноза аденокортикального рака. Анализ предикторов агрессивного и неблагоприятного течения.

Проанализирована связь выживаемости со следующими факторами: морфологический вариант, размер образования, гормональная активность, стадия по классификации ENSAT, индекс Ki-67, митотическая активность, параметры шкалы Weiss.

Результаты регрессионного анализа свидетельствуют, что факторами, статистически значимо влияющими на безрецидивную выживаемость (БРВ) обследованных пациентов с АКР являются: морфологический вариант опухоли, митотическая активность (значение маркера РНН3), индекс Ki-67, наличие атипических митозов (Рисунок 12).

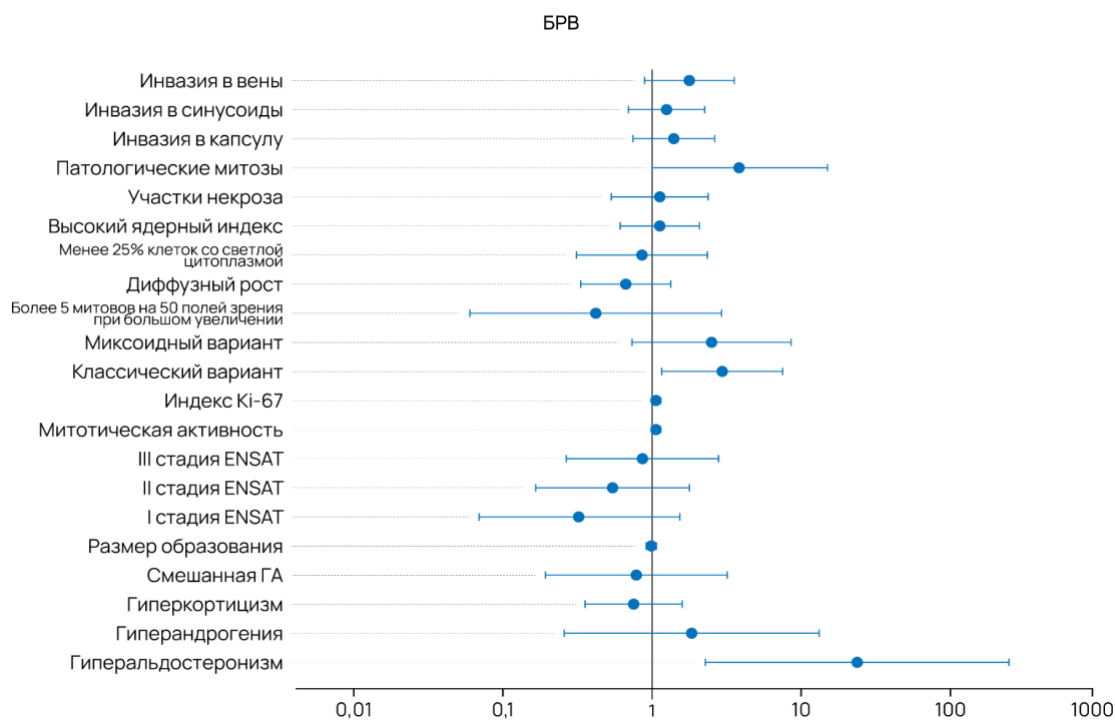


Рисунок 12 – HR с 95% ДИ предикторов безрецидивной выживаемости у обследованных пациентов с аденокортикальным раком

Результаты регрессионного анализа, представленные на Рисунке 13, свидетельствуют, что факторами, статистически значимо влияющими на общую выживаемость (ОВ) обследованных пациентов с АКР, являются: стадия заболевания по классификации ENSAT, митотическая активность, индекс Ki-67, морфологический вариант опухоли.

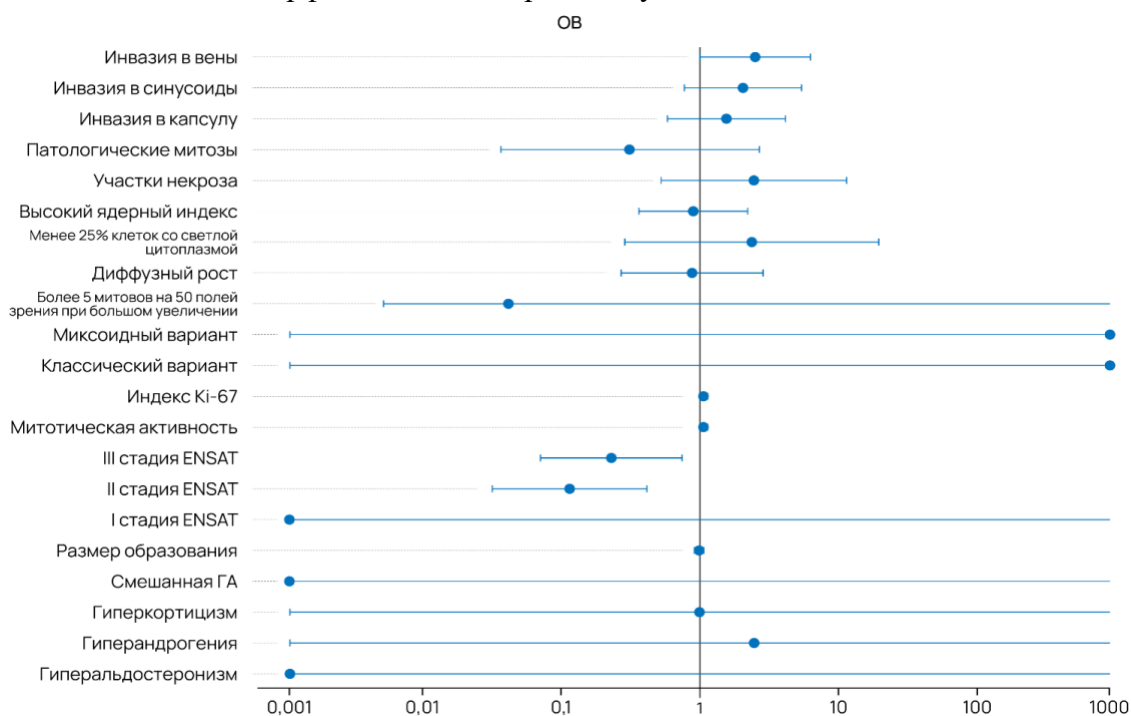


Рисунок 13 – HR с 95% ДИ предикторов общей выживаемости у обследованных пациентов с аденокортикальным раком

Влияние клинико-морфологических и клинико-иммунофенотипических параметров на уровне общей и безрецидивной выживаемости. 5-летняя БРВ была максимальной у пациентов с онкоцитарным типом АКР и составляла 66,8%, у больных с классическим вариантом данный показатель составил 33,3%, с миксоидным – 29,9%. У всех пациентов с классическим морфологическим вариантом через 10,8 лет наблюдался рецидив заболевания. У 36,0% обследованных с миксоидным вариантом ремиссия сохранялась 10,4 года. У половины больных с онкоцитарным вариантом не было диагностировано рецидива заболевания на протяжении 17,5 лет (Рисунок 14).

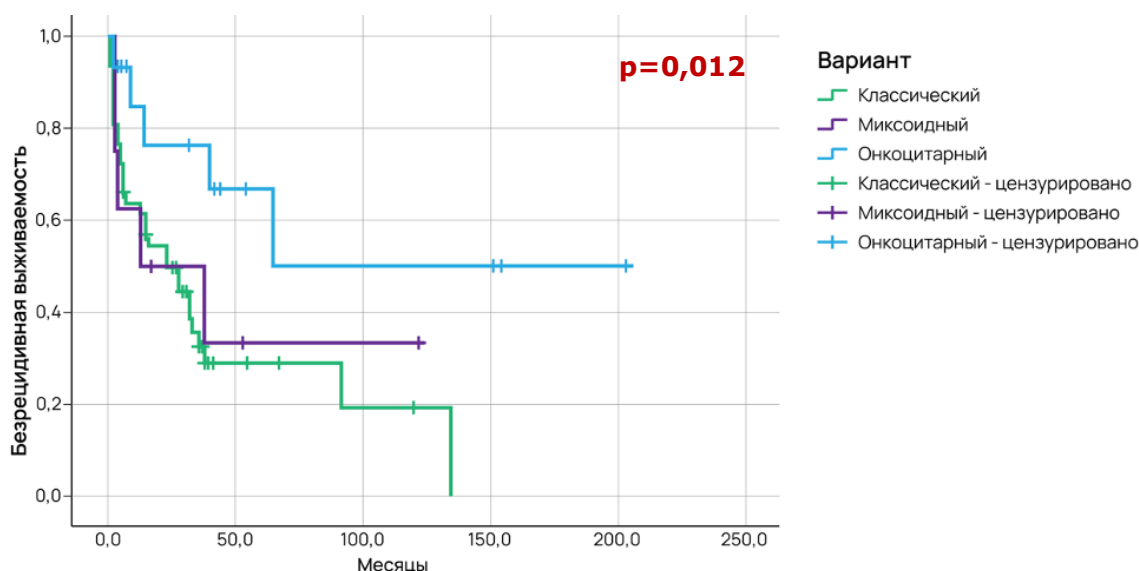


Рисунок 14 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от морфологического варианта АКР

Установлено, что медиана БРВ обследованных пациентов составила 32,0 мес., у пациентов с классическим вариантом АКР – 23,0 мес., с миксоидным – 13,0 мес.

На Рисунке 15 представлены результаты анализа ОВ в зависимости от морфологического варианта АКР методом Каплан-Майера.

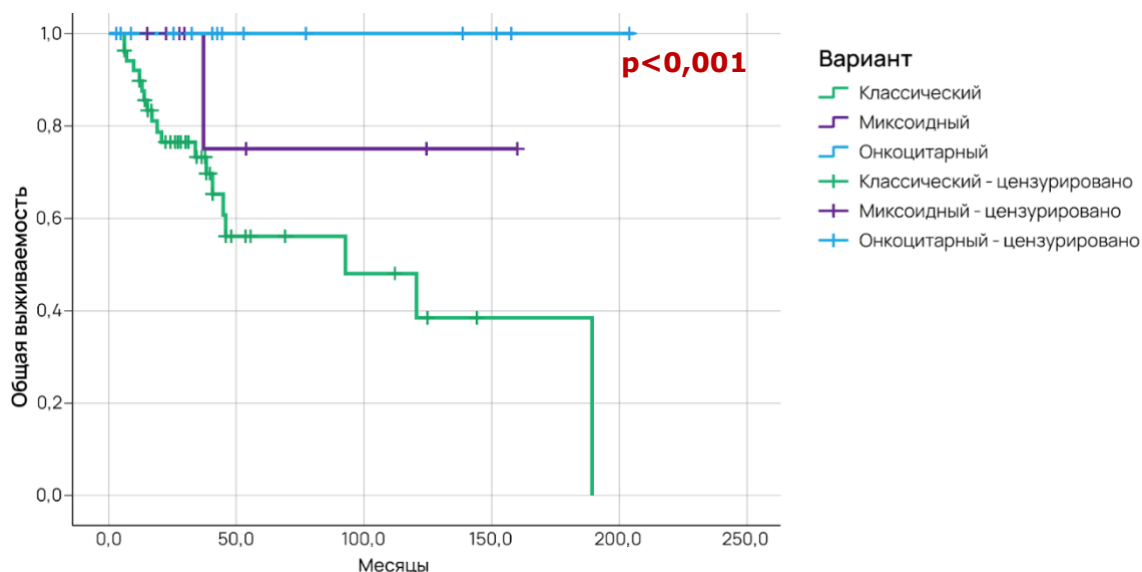


Рисунок 15 – Общая выживаемость в зависимости от морфологического варианта АКР

Выявлено, что 5-летняя ОВ у обследованных с онкоцитарным подтипом достигла 100% и сохранялась на таком уровне в течение 17,5 лет наблюдения, у больных с классическим подтипом составила 55,9%, с миксоидным – 75,0% и оставалась такой на протяжении 13,5 лет. Через 15,6 лет наблюдения у всех пациентов с классическим морфологическим вариантом АКР зафиксирован летальный исход.

Из всех параметров шкалы Weiss единственным критерием, ассоциированным с прогнозом пациента, являлось наличие патологических митозов. На Рисунке 16 представлены результаты анализа БРВ в зависимости от наличия патологических митозов методом Каплан-Майера.

Установлено, что 5-летняя БРВ у пациентов при наличии патологических митозов в опухоли составила 32,0%, тогда как при отсутствии – достигала 60,0%. При выявлении данного параметра шкалы Weiss медиана БРВ составляла 23,0 мес., при этом не достигалась в случае его отсутствия. Таким образом, наличие патологических митозов было ассоциировано с уменьшением БРВ.

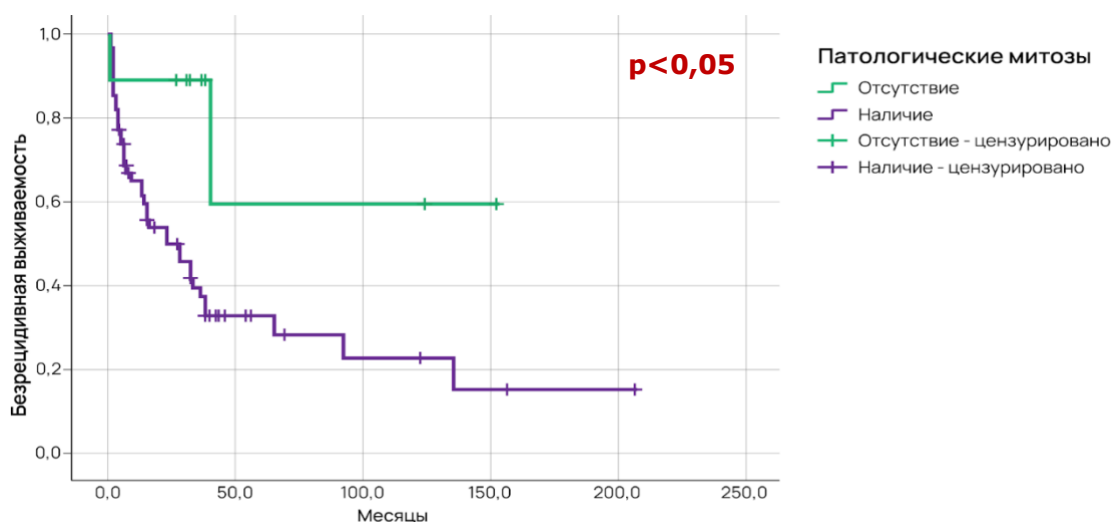


Рисунок 16 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от наличия патологических митозов

В исследуемой когорте у 67 пациентов (91,8%) выявлено менее 25% клеток со светлой цитоплазмой в образце опухоли, более 5 митозов на 50 полей зрения при большом увеличении было диагностировано в 4,1% случаев (n=3).

Значения маркера клеточной пролиферации фосфогистона H3 (РHH3) у обследованных пациентов в среднем составляли $17,5 \pm 11,4$ их уровни варьировали от 1 до 50,0. В исследуемой когорте медиана БРВ при значениях РHH3 0-10 составляла 65,0 мес., 10-20 – 32,0 мес., более 20 – 6,0 мес.

Выявлено, что 5-летняя БРВ у пациентов со значениями РHH3 0-10 составила 61,0%, 10-20 – 42,0%. Максимальный период ремиссии АКР (17,5 лет) был выявлен у 39,0% группы пациентов со значениями РHH3 0-10. У всех пациентов со значениями данного показателя 10-20 через 10,8 лет наблюдения зафиксирован рецидив. У всех пациентов с уровнем РHH3 более 20 рецидив АКР наблюдался в течение 3-х лет. В исследуемой когорте медиана ОВ при значениях РHH3 0-10 составляла 190 мес. (15,8 лет), более 20 – 21,0 мес. В соответствии с результатами анализа выживаемости 5-летняя ОВ у пациентов со значениями РHH3 0-10 составляла 100%, 10-20 – 70,0 %, более 20 – 21,0%. Через 17,5 лет наблюдения в группе пациентов со значениями РHH3 0-10 значение ОВ было на уровне 50%.

По результатам ИГХ-исследования медиана индекса пролиферативной активности Ki-67 в исследуемой когорте пациентов составила 17% (от 0 до 60%). Результаты оценки медианы БРВ у пациентов при различных значениях Ki-67 представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Медиана (мес.) БРВ у пациентов при различных значениях Ki-67

Ки-67 (%)	Me
0-10	135,0
12-25	16,0
30-60	23,0

5-летняя БРВ у пациентов при уровне Ki-67 0-10% составила 59,0%, при 12-25% – 28,0%, при 30-60% – 32,0%. Максимальный период ремиссии АКР (17,5 лет) был выявлен у 19,0% группы пациентов со значениями Ki-67 30-60%. У 39,0% больных с уровнями Ki-67 0-10% ремиссия сохранялась на протяжении 12,6 лет.

В когорте обследованных медиана ОВ при Ki-67 12-25% составляла 46,0 мес. (3,8 года), 30-60% – 93,0 мес. (7,8 лет). 5-летняя ОВ у пациентов с Ki-67 0-10% составила 95,0% и сохранялась на этом уровне в течение 13,5 лет наблюдения, с 12-25% – 48,0%, 30-60% – 52,0%. На протяжении 17,5 лет катамнеза у 19,0% пациентов с уровнем Ki-67 30-60% летальных исходов зафиксировано не было.

Гормональные нарушения были диагностированы у 26 обследованных пациентов (35,6%). Результаты оценки медианы БРВ у пациентов при наличии и отсутствии гормональной активности представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Медиана (мес.) БРВ у пациентов при наличии и отсутствии гормональной активности

Гормональная активность	Me
Гиперкортицизм	38,0
Гиперандрогения	23,0
Гиперальдостеронизм	1,0
Смешанная	65,0
Отсутствует	32,0

Установлено, что 5-летняя выживаемость пациентов с гиперкортицизмом составила 45,0% и сохранялась на таком уровне на протяжении 17 лет наблюдения, в случае смешанной ГА 5-летняя БРВ находилась на уровне 65,0%, при отсутствии ГА – 39,0%. У пациента с гиперальдостеронизмом ремиссия достигнута не была. У больного с гиперандрогенией рецидив АКР возник через 2 года наблюдения. Через 5,5 лет наблюдения у всех пациентов со смешанной ГА был зафиксирован рецидив заболевания. У 18,0% пациентов в группе функционально неактивных опухолей ремиссия сохранялась на протяжении 13,3 лет наблюдения.

На основании результатов гистологического исследования АКР было проведено стадирование опухоли по системе ENSAT: I стадия была диагностирована у 9 (12,3%), II – у 32 (43,8%), III – у 26 (35,6%) и IV – у 6 пациентов (8,2%). Показатели 5-летней БРВ и ОВ для пациентов с различными стадиями АКР по системе ENSAT представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Значения (%) 5-летней БРВ и ОВ у пациентов с различными стадиями АКР по системе ENSAT

Стадии АКР по системе ENSAT	Количество пациентов (чел.)	БРВ	ОВ
I	9	62,2	100
II	32	40,3	80,4
III	26	32,8	63,6
IV	6	0	0

В группе пациентов с I стадией АКР по системе ENSAT на протяжении 12,5 лет наблюдения не было смертельных исходов. В группе пациентов со II стадией в течение 17,5 лет катамнеза отсутствие смертельного исхода наблюдалось в 36,0% случаев, у пациентов с III стадией через 13 лет наблюдения значение этого показателя составило 49,0%. У всех пациентов с IV стадией заболевания летальный исход наблюдался в течении 4 лет.

Предикторы эффективности медикаментозной терапии при АКР.

На данном этапе работы был проведен анализ на основании данных 62 пациентов с АКР: 40 (64,5%) женщин и 22 (36,5%) мужчины, в возрасте от 17 до 82 лет, с медианой возраста для мужчин 36,5 лет и 51,5 лет для женщин. В послеоперационном периоде 29 пациентам, которые были отнесены к группе высокого риска рецидива/прогрессирования АКР в соответствии со значением индекса Ki-67 равным 10% и более по результатам иммуногистохимического исследования, была инициирована терапия митотаном.

33 пациента, вошедшие в группу низкого/промежуточного риска рецидива/прогрессирования АКР в соответствии со значением индекса Ki-67 менее 10% по результатам иммуногистохимического исследования, находились на динамическом наблюдении без сопутствующего лекарственного лечения.

Клинические и морфологические характеристики пациентов представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Клинические и морфологические характеристики двух групп пациентов с АКР, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении

	Терапия митотаном N=29	Динамическое наблюдение N=33
Клинические характеристики		
Возраст (медиана (мин-макс)), годы	45 (17-74)	48 (21-82)
Размер образования (медиана (мин-макс)), см	8,5 (3,5-25,0)	8,0 (4,0-25,0)
Стадия (n(%))		
I	3 (10,3%)	6 (18,2%)
II	10 (34,5%)	18 (54,5%)
III	13 (44,8%)	9 (27,3%)
IV	3 (10,3%)	0 (0%)
Функциональная активность (n(%))		
Гиперкортицизм	11 (37,9%)	8 (24,2%)
Гиперандрогения	0 (0%)	0 (0%)
Гиперальдостеронизм	1 (3,4%)	0 (0%)
Смешанная	2 (6,9%)	1 (3,0%)
Период наблюдения (медиана (мин-макс)), мес	32 (5-190)	37 (4-159)
Гистопатологические характеристики		
Weiss (медиана (мин-макс))	6 (5-9)	6 (4-9)
Параметры шкалы Weiss (n(%))		
Инвазия в вены	7 (24,1%)	5 (15,2%)
Инвазия в синусоиды	12 (41,4%)	14 (42,4%)
Инвазия в капсулу	19 (65,5%)	19 (57,6%)
Патологические митозы	27 (93,1%)	26 (78,8%)
Участки некроза	26 (89,7%)	23 (69,7%)
Высокий ядерный индекс	16 (55,2%)	20 (60,6%)
Менее 25% клеток со светлой цитоплазмой	27 (93,1%)	29 (87,9%)
Диффузный рост	24 (82,8%)	24 (72,7%)
Более 5 митозов на 50 полей зрения при большом увеличении	0 (0%)	3 (9,1%)
Иммуногистохимические характеристики		
Индекс Ki-67% (медиана (мин-макс))	25 (7-60)	10 (5-40)
Морфологический вариант (n(%))		
Классический	24 (82,8%)	20 (60,6%)
Миксоидный	3 (10,3%)	4 (12,1%)
Онкоцитарный	2 (6,9%)	9 (27,3%)
Ответ на лечение (n(%)) отсутствия рецидивов за время наблюдения		
	8 (27,6%)	18 (54,5%)

Значение безрецидивной выживаемости пациентов, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении. На Рисунке 17 представлены результаты анализа БРВ пациентов с АКТ, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W1 и RRM1 методом Каплан-Майера.

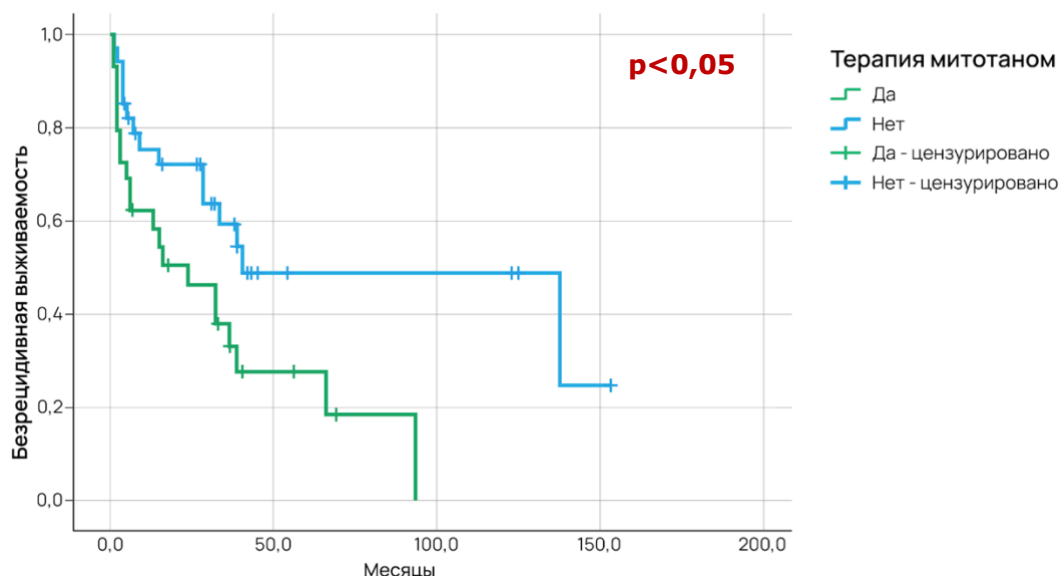


Рисунок 17 – Безрецидивная выживаемость пациентов с адренокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W2 и RRM1

Установлено, что 5-летняя БРВ в группе пациентов, получающих терапию данным противоопухолевым препаратом, составляла 27,6%, в контрольной группе – 48,8%.

Результаты оценки медианы БРВ пациентов с АКТ, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W2 и RRM1 представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Медиана (мес.) БРВ пациентов с адренокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W2 и RRM1

	Ме
Терапия митотаном	23,0
Динамическое наблюдение	40,0
Все пациенты	33,0

Установлено, что в когорте обследованных медиана БРВ пациентов, получающих митотан, составила 23,0 мес., для пациентов, находящихся на динамическом наблюдении – 40,0 мес.

На следующем этапе исследования в анализ БРВ были включены уровни экспрессии иммуногистохимических маркеров SOAT1, CYP2W1 и RRM1. Обнаружено, что низкая экспрессия RRM1 в опухоли и отсутствие терапии митотаном в анамнезе ассоциировались с

лучшей БРВ (Рисунок 18) в сравнении с пациентами, принимающими митотан, при данном уровне экспрессии маркера.

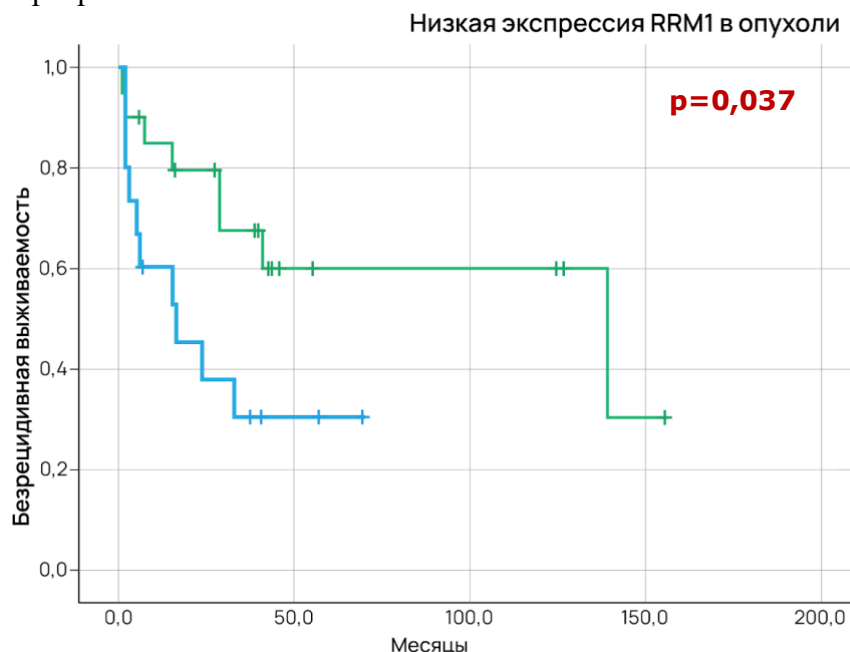


Рисунок 18 – Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, при низком уровне экспрессии RRM1

В случаях умеренной и высокой экспрессии RRM1 статистически значимых различий БРВ в обеих группах пациентов не выявлено.

В соответствии с результатами анализа БРВ выявлено, что при низком уровне экспрессии RRM1 5-летняя выживаемость пациентов, принимающих медикаментозную терапию данным препаратом, находилась на уровне 30,0%, при этом у пациентов контрольной группы составляла 59,7%. При умеренной и высокой иммунореактивности RRM1 данные показатели составили 23,4% и 19,5%, соответственно.

Результаты оценки медианы БРВ пациентов с АКР, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, с учетом уровня экспрессии RRM1 представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Медиана (мес.) БРВ пациентов с аденокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, с учетом уровней экспрессии RRM1

Уровень экспрессии RRM1	Me		
	Терапия митотаном	Динамическое наблюдение	Все пациенты
Низкий	16,0	135,0	40,0
Умеренный и высокий	32,0	33,0	33,0

В случае низкой и умеренной экспрессии SOAT1 БРВ в когорте обследованных, не принимающих противоопухолевую терапию, величина БРВ была статистически значимо выше, чем у пациентов, получающих митотан.

Установлено, что 5-летняя выживаемость пациентов, получающих митотан, при данном профиле экспрессии SOAT1 находилась на уровне 28,6%, в контрольной группе составляла 62,5%. В случае высокой экспрессии SOAT1 данный показатель находился на уровне 29,4% и 22,2%, соответственно.

Результаты анализа медианы БРВ в группах пациентов с АКР, принимающих митотан и находящихся на динамическом наблюдении, с учетом уровня экспрессии SOAT1 представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Медиана (мес.) БРВ пациентов с аденокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, с учетом уровней экспрессии SOAT1

Уровень экспрессии SOAT1	Me		
	Терапия митотаном	Динамическое наблюдение	Все пациенты
Низкий и умеренный	32,0	135,0	40,0
Высокий	15,0	28,0	15,0

Результаты анализа CYP2W1 аналогичны: у пациентов с низкой и умеренной иммунореактивностью, которые не получали митотан, наблюдался более высокий уровень БРВ по сравнению с пациентами, находящимися на лечении.

5-летняя выживаемость пациентов, получающих медикаментозную терапию, при низком и умеренном профиле экспрессии CYP2W1, находилась на уровне 14,1%, в контрольной группе составляла 64,9%. В случае высокой экспрессии данного маркера CYP2W1 находился на уровне 51,9% и 28,2%, соответственно.

Результаты анализа медианы БРВ пациентов с АКР, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, с учетом уровня экспрессии CYP2W1 представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Медиана (мес.) БРВ пациентов с аденокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, с учетом уровней экспрессии CYP2W1

Уровень экспрессии CYP2W1	Me		
	Терапия митотаном	Динамическое наблюдение	Все пациенты
Низкий и умеренный	15,0	135,0	36,0
Высокий	65,0	15,0	16,0

Установлено, что при низком и умеренном уровне экспрессии CYP2W1 медиана БРВ пациентов, получающих митотан, составила $15,0 \pm 15,3$ мес., находящихся на динамическом наблюдении – $135,0 \pm 69,9$ мес. В случае высокого уровня экспрессии данного маркера медианы БРВ составили $65,0 \pm 29,6$ мес. и $15,0 \pm 6,5$ мес., соответственно.

Предикторы эффективности биотерапии с использованием аналогов соматостатина и иммунотерапии. На данном этапе был проведен анализ данных 78 пациентов с АКР. Классический морфологический подтип был диагностирован в 65,4% случаев (n=51), онкоцитарный в 23,1% случаев (n=18) и миксоидный – в 11,5% (n=9) случаев.

На Рисунке 19 представлена экспрессия PD-L1 в зависимости от морфологических вариантов.

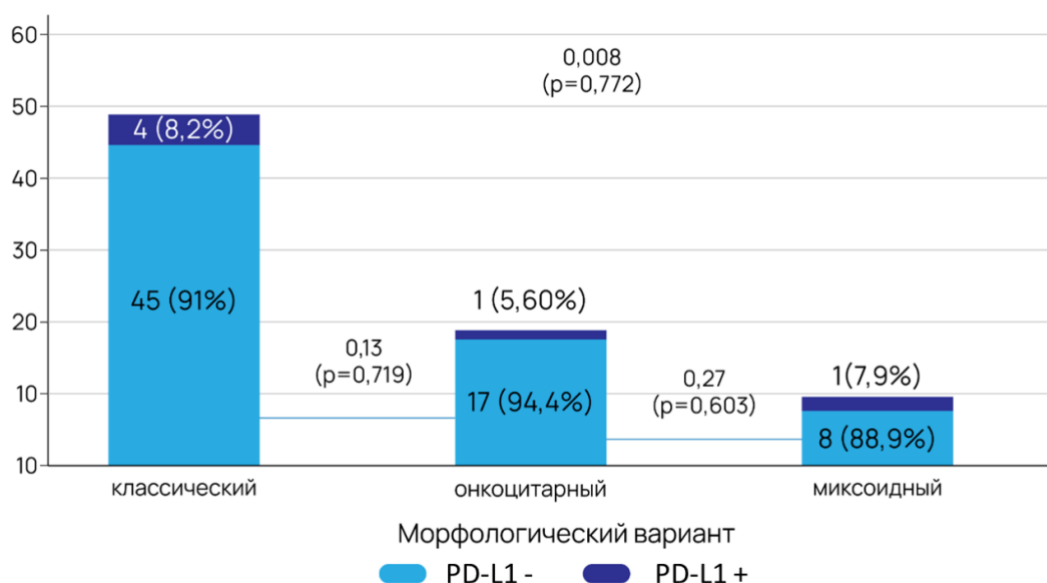


Рисунок 19 – Экспрессия PD-L1 в зависимости от морфологических вариантов АКР

У пациентов с классическим вариантом экспрессия PD-L1 отмечалась в 8,2% случаев (n=4), с онкоцитарным – в 5,6% случаев (n=1), с миксоидным – в одном случае (7,9%). Статистически значимых различий этих показателей отмечено не было.

На Рисунке 20 представлена экспрессия соматостатинового рецептора RSST 2 в зависимости от морфологических вариантов опухоли.

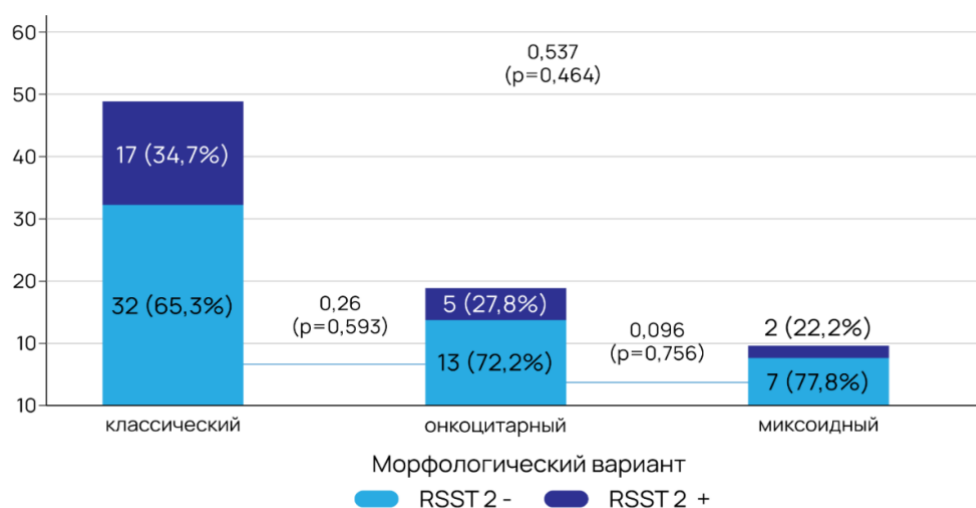


Рисунок 20 – Экспрессия соматостатинового рецептора RSST 2 в зависимости от морфологических вариантов АКР

Экспрессия RSST 2 выявлена в 34,7% случаев (n=17) классического варианта, в 27,8% (n=5) случаев онкоцитарного, в 22,2% (n=2) случаев миксоидного варианта АКР. Все различия оказались статистически незначимыми.

На Рисунке 21 представлена экспрессия соматостатинового рецептора RSST 5 в зависимости от морфологических вариантов опухоли.

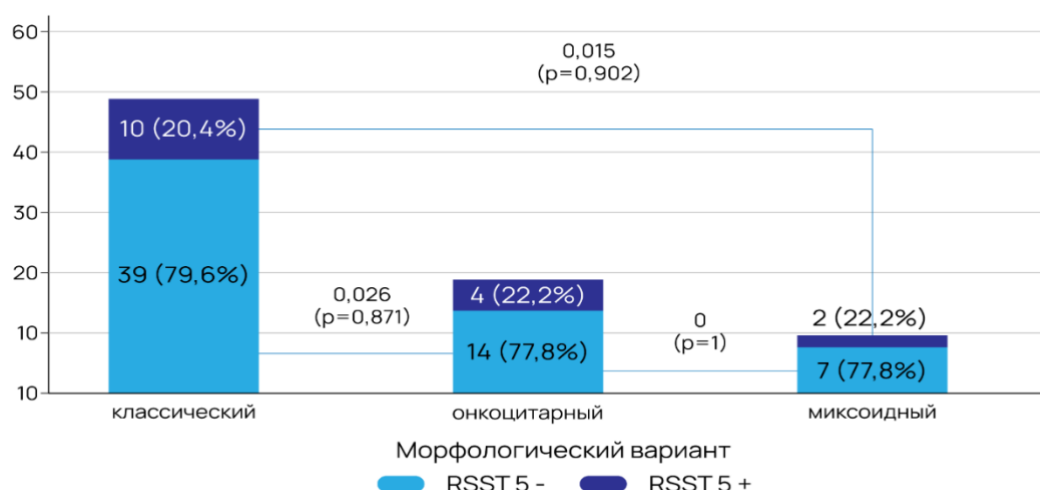


Рисунок 21 – Экспрессия соматостатинового рецептора RSST 5 в зависимости от морфологических вариантов АКР

Экспрессия RSST 5 отмечалась в 20,4% случаев классического варианта (n=10), в 22,2% онкоцитарного (n=4), в 22,2% миксоидного АКР (n=2). Все различия статистически незначимы.

Таким образом, выявленные различия частот встречаемости экспрессии PD-L1 и соматостатиновых рецепторов 2 и 5 типов у пациентов с разными морфологическими вариантами АКР не достигали статистической значимости.

Оценка влияния экспрессии соматостатиновых рецепторов и PD-L1 на общую и безрецидивную выживаемость. В Таблицах 9 и 10 представлены результаты оценки взаимосвязи экспрессии PD-L1 и уровней ОБ и БРВ пациентов с АКР.

Таблица 9 – Результаты оценки регрессии Кокса для показателей общей выживаемости и экспрессии PD-L1

Фактор	W	Exp (B)	p
PD-L1	12,091	6,039	0,001

Таблица 10 – Результаты оценки регрессии Кокса для показателей безрецидивной выживаемости и экспрессии PD-L1

Фактор	W	Exp (B)	p
PD-L1	3,866	2,565	0,049

Примечание: W – статистика Вальда, Exp (B) – бета-коэффициент регрессии, p – статистическая значимость различий (критерий χ^2)

Обе регрессионные модели статистически значимы по критерию хи-квадрат, коэффициенты значимы по критерию Вальда. Таким образом, экспрессия PD-L1 в 6 раз повышает риск летального исхода и в 2,6 – риски рецидива.

Взаимосвязь степени иммунной инфильтрации с различными морфологическими подтипами аденокортикального рака. Для проверки гипотезы о потенциальных различиях интенсивности иммунной инфильтрации между классическим и онкоцитарным вариантами АКР было проведено иммуногистохимическое исследование маркеров различных типов иммунных

клеток в когорте пациентов НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ. Проанализированы характеристики CD45+ пан-лейкоцитарной инфильтрации, а также инфильтрации CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетками и наличие CD68+ макрофагов. В Таблице 11 представлены результаты анализа различных подтипов иммунных клеток в паренхиме и строме опухоли обсуждаемого заболевания.

Выявлено, что CD3+ Т-лимфоциты обильно представлены в паренхиме и строме классического и онкоцитарного вариантов АКР по сравнению с миксоидным вариантом. CD68+ макрофаги также были обнаружены во всех образцах, однако их количество было выше в опухолях онкоцитарного варианта по сравнению с классическим.

Изученные образцы опухолевой ткани разделили на две группы на основании соотношения количества CD3+ Т-лимфоцитов к CD68+ моноцитам/макрофагам в паренхиме опухоли. При сравнении выживаемости пациентов данных подгрупп обнаружена тенденция к лучшей выживаемости пациентов со значением этого соотношения >1 , однако выявленные различия не достигали статистической значимости.

Таблица 11 – Наличие различных подтипов иммунных клеток в паренхиме и строме опухоли аденокортикального рака

		Количество клеток на 0.25 мм ²		
		Все случаи	Классический вариант АКР	Онкоцитарный вариант АКР
Паренхима	CD45+	176 (диапазон 23-560)	153 (диапазон 23-459)	223 (диапазон 27-560)
	CD3+	41 (диапазон 7-144)	34 (диапазон 7-135)	50 (диапазон 11-144)
	CD4+	13 (диапазон 0-81)	8 (диапазон 0-33)	21 (диапазон 2-81)
	CD8+	21 (диапазон 2-93)	17 (диапазон 2-93)	28 (диапазон 5-89)
	CD68+	47 (диапазон 2-207)	27 (диапазон 2-106)	75 (диапазон 2-207)
Строма	CD45+	225 (диапазон 50-570)	250 (диапазон 116-570)	221 (диапазон 115-317)
	CD3+	125 (диапазон 9-238)	153 (диапазон 69-232)	113 (диапазон 9-238)
	CD4+	47 (диапазон 1-157)	46 (диапазон 1-73)	58 (диапазон 4-157)
	CD8+	54 (диапазон 1-222)	71 (диапазон 23-222)	39 (диапазон 9-80)
	CD68+	58 (диапазон 2-232)	61 (диапазон 2-168)	64 (диапазон 3-232)

Результаты данного анализа также подтверждают, что онкоцитарный вариант значительно сильнее инфильтрирован иммунными клетками по сравнению с классическим подтипом АКР.

Транскриптомный профиль аденокортикального рака. В 13 образцах коры надпочечников, полученных от 7 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом АКР, была проведена кластеризация единичных клеток в соответствии с их транскриптомным профилем с последующей гистогенетической аннотацией выявленных клеточных кластеров.

Во всех проанализированных образцах доминирующей популяцией оказались клетки аденокортикальным типом дифференцировки. Количество перицитов было ниже в образцах опухолевой ткани АКР, что свидетельствовало об агрессивном характере развития опухоли АКР и об ограничении роста нормальных клеток кровеносных сосудов. Эндотелий, гладкомышечные клетки стенки крупных сосудов, VSMC, макрофаги и лимфоидные клетки Т/НК-ряда также были

представлены во всех исследованных опухолевых и условно здоровых тканях надпочечников. В то же время в опухолевых тканях АКР ожидаемо не выявлялись нейроэктодермальные клетки, составляющие мозговое вещество нормального надпочечника (хромаффинные клетки и прекурсоры Шванновских клеток SCP) (Рисунок 22).

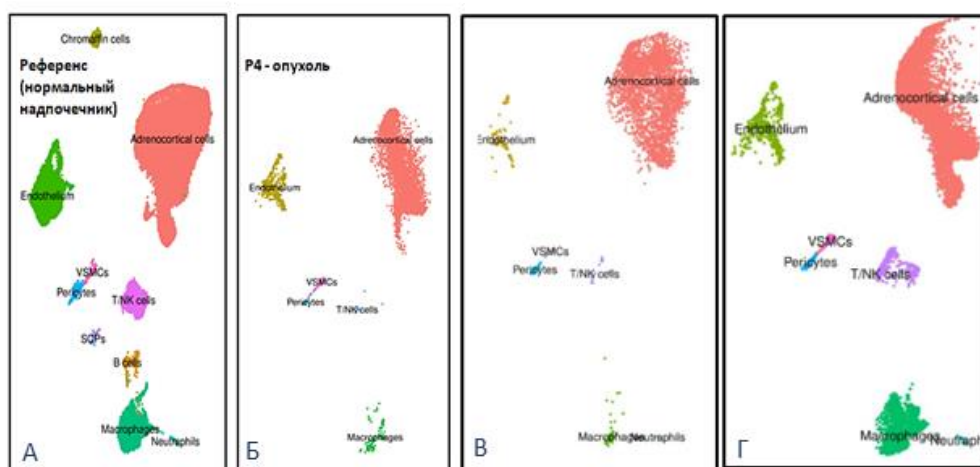


Рисунок 22 – Картирование клеточных типов на референс (А) для репрезентативных проб классического (Б), миксоидного (В), онкоцитарного подтипов АКР

По результатам проведенного анализа полученные транскриптомные профили единичных клеток условно здоровых и опухолевых тканей пациентов с АКР являются репрезентативными с точки зрения клеточного состава и соотношения основных клеточных популяций, а транскрипционные профили нормальных и опухолевых клеток надпочечника значительно отличаются друг от друга.

Наряду с точечными мутациями и изменениями экспрессии генов вариации количества копий участков генома (CNV), содержащих протоонкогены или опухолевые супрессоры, является одним из важнейших способов активации первых и инактивации вторых.

По результатам изучения bulk-профилей было установлено, что АКР является опухолью с высокой частотой как сегментарных/фокальных CNV, связанных с делецией или амплификацией одного или нескольких генов, так и обширных делеций/амплификаций, затрагивающих генетический материал целого плеча или всей хромосомы (Рисунок 23).

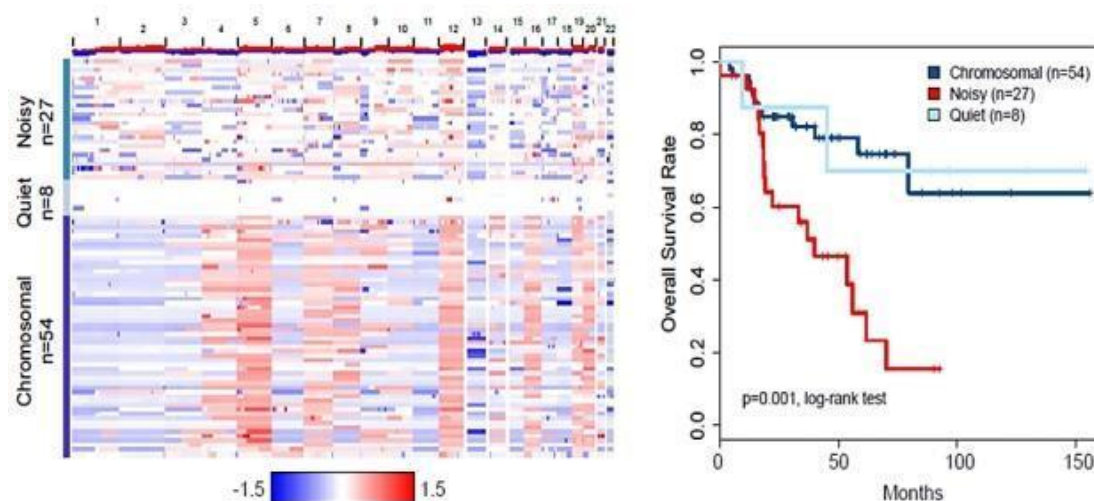


Рисунок 23 – CNV-подтипы АКР по данным bulk-CNV-профилирования The Cancer Genome Atlas (TCGA) [Zheng S. et al., 2016]

Для определения локализации злокачественных CNV- событий в клетках коры надпочечников результаты Numbat единичных клеток были кластеризованы отдельно друг от друга в UMAP-координатах (Рисунок 24). Все клетки АКР содержали различные CNV, а также условно здоровые адренокортикальные клетки коры надпочечников имели CNV, что может служить маркером прогнозирования злокачественности: возникновения рецидива, отдаленных метастазов, поскольку CNV возникают во всех клетках коры надпочечников.

На Рисунке 24 представлены pseudo-bulk профили CNV единичных клеток 7 пациентов с АКР. Во всех изученных образцах опухоли были выявлены множественные CNV-события, при этом 5 из 7 опухолей (пациенты №1,2,4,5,6 с классическим подтипом АКР) демонстрируют множественные протяженные полнохромосомные CNV на уровне амплификаций/делеций, что является отличительной особенностью наиболее частого «chromosomal» CNV-типа АКР.

Опухоль пациента №7 с миксоидным подтипом АКР, напротив, не демонстрировала полнохромосомных CNV, демонстрируя при этом множественные сегментарные альтерации, что является характерным для второго по численности CNV-класса АКР «noisy». Данная опухоль значительно отличалась от всех остальных с точки зрения гормональной активности, демонстрируя сравнительно редкую для АКР гиперпродукцию альдостерона, в то время как все остальные опухоли были кортизол-продуцирующими или нефункционирующими.

Опухоль пациента №3 с онкоцитарным подтипом АКР, в доминантном клоне клеток, не демонстрировала CNV-событий.

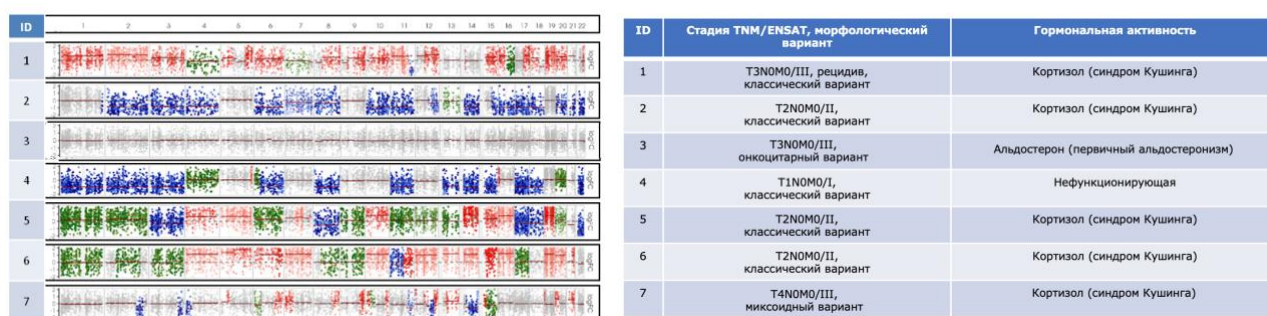


Рисунок 24 – Pseudo-bulk - профили CNV доминантных клонов 7 пациентов с АКР по результатам анализа транскриптомных характеристик единичных клеток с использованием алгоритма Numbat. Красным цветом отмечены дупликации, синим - делеции, зеленым - копияно-нейтральные перестройки

ВЫВОДЫ

1. Средний возраст пациентов с аденокортикальным раком составил $46,8 \pm 1,7$ лет, более чем у трети из них выявлялись гормональные нарушения (35,6%), чаще всего гиперкортицизм. Отмечено следующее распределение по стадиям заболевания: I стадия выявлялась в 12,3% случаев, II стадия - 43,8%, III стадия - 35,6%, IV - в 8,2% случаев.

2. Классический морфологический подтип аденокортикального рака выявлен в 67,1% случаев, онкоцитарный подтип - в 20,5%, миксоидный подтип опухоли - в 12,3% случаев. У пациентов с классическим подтипом инвазия опухоли в синусоиды наблюдалась статистически значимо чаще, чем при онкоцитарном типе опухоли ($p=0,03$). У пациентов с классическим подтипом аденокортикального рака чаще, чем при других вариантах опухоли, выявлялись патологические митозы ($p<0,0001$) и некрозы ($p=0,0073$).

3. Иммуногистохимическая панель маркеров, включающая SF-1, Melan A, Inhibin A, позволяет со 100%-ной чувствительностью подтвердить корковый гистогенез опухоли надпочечника ($p<0,014$). Онкоцитарный подтип характеризуется диффузным иммуногистохимическим окрашиванием эозинофильной гранулярной цитоплазмы с антимитохондриальными антителами ($p<0,0001$). Уровень экспрессии маркера пролиферативной активности Ki-67 существенно различается в зависимости от исследуемых морфологических вариантов аденокортикального рака: медиана данного параметра при классическом варианте опухоли составляет 20%, при онкоцитарном – 10%, при миксоидном варианте – 15%, при этом выявлены статистически значимые отличия пролиферативной активности между классическим и онкоцитарным подтипами ($p=0,0056$).

4. Разработана классификационная трехэтапная модель для дифференциального диагноза аденокортикального рака и аденомы, на первых двух этапах которой используются отрезные точки следующих показателей: масса опухоли, максимальный размер опухоли и значение индекса Ki-67. На третьем этапе используется логистическая регрессионная модель на основании H-регуляризации. Точность предложенного способа диагностики составляет 100% (95%-ный доверительный интервал: 96-100%).

5. Медиана безрецидивной выживаемости больных аденокортикальным раком составляла 32,0 мес., при классическом подтипе опухоли – 23,0 мес., при миксоидном – 13,0 мес., при онкоцитарном – 43,0 мес. Выявлено, что онкоцитарный подтип характеризуется лучшей безрецидивной выживаемостью по сравнению с классическим подтипом ($p=0,012$). 5-летняя общая выживаемость пациентов с АКР с онкоцитарным подтипом составила 100%, у больных с классическим и миксоидными типами опухоли соответственно 55,9% и 75,0%. Онкоцитарный вариант характеризуется лучшей общей выживаемостью по сравнению с классическим подтипом ($p=0,005$).

6. Факторы, статистически значимо влияющие на безрецидивную выживаемость пациентов с аденокортикальным раком, включают: морфологический подтип опухоли ($p=0,02$), индекс Ki-67 ($p=0,005$), митотическую активность ($p<0,001$), наличие атипических митозов ($p<0,05$). Значимыми факторами, влияющими на общую выживаемость пациентов с аденокортикальным раком, являются: стадия заболевания по классификации ENSAT ($p<0,001$), митотическая активность ($p<0,001$), значение индекса Ki-67 ($p<0,001$), морфологический вариант опухоли: классический и миксоидный подтипы достоверно увеличивают риск смерти по сравнению с онкоцитарным подтипом ($p<0,001$).

7. Классический подтип аденокортикального рака характеризуется относительно равномерным распределением уровней иммунореактивности, оцененной по экспрессии молекул

SOAT1, CYP2W1 и RRM1. Онкоцитарный вариант опухоли отличается преимущественно низкой иммунореактивностью по показателям экспрессии SOAT1, высокой иммунореактивностью по CYP2W1 и низкой иммунореактивностью по RRM1. Миксоидный вариант характеризуется выраженной иммунореактивностью по SOAT1 и CYP2W1 наряду с низкой экспрессией RRM1. Понижение экспрессии SOAT1, CYP2W1, RRM1 ассоциировано с лучшей безрецидивной выживаемостью больных аденокарциномой надпочечника, не получающих терапию митотаном ($p=0,02$, $p=0,001$, $p=0,037$, соответственно).

8. Количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме и строме аденокарциномы является относительно низким (176 и 225 клеток/мм², соответственно), значения этих показателей в паренхиме онкоцитарного подтипа превышают таковые в ткани классического подтипа аденокарциномы. CD3+ Т-лимфоциты обильно представлены в паренхиме и строме опухолей классического и онкоцитарного подтипов, тогда как в миксоидном подтипе их количество значительно ниже. Количество CD68+ макрофагов повышено в опухолях онкоцитарного подтипа по сравнению с классическим подтипом аденокарциномы.

9. При анализе вариаций копий генов (CNV) клетки классического подтипа аденокарциномы характеризовались наличием множественных полнохромосомных амплификаций/делеций, в клетках миксоидного подтипа выявлялись преимущественно сегментарные перестройки. При исследовании числа копий генов наименьшее количество перестроек было обнаружено в онкоцитарном подтипе аденокарциномы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При разработке индивидуальной программы лечения пациентов с аденокарциномой надпочечника следует учитывать факторы, влияющие на общую выживаемость пациентов с аденокарциномой надпочечника (стадия заболевания по классификации ENSAT, митотическая активность, значение индекса Ki-67, морфологический подтип опухоли) и на безрецидивную выживаемость (морфологический подтип опухоли, индекс Ki-67, митотическую активность, наличие атипических митозов).

2. Для уточнения гистологического диагноза аденокарциномы надпочечника (коркового гистогенеза опухоли) рекомендуется использовать результаты иммуногистохимического исследования: минимальная панель маркеров должна включать: SF1, Melan A, Inhibin A.

3. При иммуногистохимическом исследовании следует учитывать, что миксоидный подтип аденокарциномы надпочечника отличается снижением экспрессии Inhibin A, онкоцитарный подтип характеризуется диффузным иммуногистохимическим окрашиванием эозинофильной гранулярной цитоплазмы с антимитохондриальными антителами.

3. При проведении дифференциальной диагностики аденокарциномы надпочечника и аденомы целесообразно применять разработанную трехэтапную модель, учитывающую показатели: массу опухоли, максимальный размер опухоли и значение индекса Ki-67.

4. Для прогнозирования клинического течения заболевания рекомендуется проведение иммуногистохимического исследования с антителами к SOAT1, CYP2W1, RRM1.

5. Для прогнозирования клинического течения и ответа на иммунотерапию рекомендуется выполнение иммуногистохимического исследования с антителами PDL1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. The new histological system for the diagnosis of adrenocortical cancer / **L. Urusova**, E. Porubayeva, N. Pachuashvili, A. Elfimova, D. Beltsevich, N. Mokrysheva // *Frontiers in Endocrinology*. – 2023. doi.org/10.3389/fendo.2023.1218686
2. Interplay between Immune Cell Infiltration and Tumor Histological Subtype: A Case of Adrenocortical Cancer / Bogolyubova A.V., Pachuashvili N.V., Tkachuk A.V., Mokrysheva N.G., **Urusova L.S.** // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14. – № 21. – P. 5303. – <https://doi.org/10.3390/cancers14215303>
3. Аденокортикальный рак: современные представления о морфологической диагностике и классификации / **Урусова Л.С.**, Клецкая И.С., Порубаева Э.Э., Бельцевич Д.Г. // *Архив патологии*. – 2023. – Т. 85, № 4. – С. 26–32. – <https://doi.org/10.17116/patol20238504126> [BAK, Scopus]
4. Морфологические предикторы эффективности терапии митотаном при аденокортикальном раке / А. В. Ткачук, Д. Г. Бельцевич, Э. Э. Порубаева, **Л. С. Урусова** // *Проблемы эндокринологии*. – 2022. – Т. 68, № 6. – С. 76–88. – <https://doi.org/10.14341/probl13172>. [BAK, Scopus]
5. Метастатическое поражение надпочечников. Опыт НМИЦ Эндокринологии / Н.В. Пачуашвили, А.А. Рослякова, Э.Э. Порубаева, Д.Г. Бельцевич, А.Н. Гадзыра, Н.А. Дрогалов, А.А. Лазарева, Л.С. Урусова // *Проблемы Эндокринологии*. – 2023;69(4):11–20. <https://doi.org/10.14341/probl13195> [BAK, Scopus]
6. Мультифакторная оценка прогностических особенностей аденокортикального рака / Э. Э. Порубаева, Н. В. Пачуашвили, **Л. С. Урусова** // *Архив патологии*. – 2022. – Т. 84. – № 5. – С. 20–27. – <https://doi.org/10.17116/patol20228405120> [BAK, Scopus]
7. Аденокортикальный рак: морфологические варианты, иммуногистохимическая характеристика / Ткачук А.В., Тертычный А.С., Бельцевич Д.Г., Рослякова А.А., Белоусов П.В., **Селиванова Л.С.** // *Архив патологии*. – 2021. – Т. 83. – № 2. – С. 10–18. – <https://doi.org/10.17116/patol20218302110> [BAK, Scopus]
8. Результаты иммуногистохимического исследования антител к CYP11B2 при первичном гиперальдостеронизме / Романова Н.Ю., **Селиванова Л.С.**, Платонова Н.М., Бельцевич Д.Г., Трошина Е.А. // *Ожирение и метаболизм*. – 2021. – Т. 18. – № 3. – С. 245–253. – <https://doi.org/10.14341/omet12741> [BAK, Scopus]
9. Синдром Иценко-Кушинга вследствие двусторонней онкоцитарной аденокортикальной опухоли / Ким Е.И., Мамедова Е.О., Селиванова Л.С., Бурякина С.А., Горбунова Н.П., Латкина Н.В., Кузнецов Н.С., Белая Ж.Е. Ким Е.И., Мамедова Е.О., **Селиванова Л.С.**, Бурякина С.А., Горбунова Н.П., Латкина Н.В., Кузнецов Н.С., Белая Ж.Е. // *Проблемы эндокринологии*. – 2020. – Т. 66. – № 3. – С. 47–55. – <https://doi.org/10.14341/probl12496> [BAK, Scopus]
10. Современные критерии диагностики аденокортикального рака / **Селиванова Л.С.**, Рослякова А.А., Коваленко Ю.А., Боголюбова А.В., Тертычный А.С., Бельцевич Д.Г., Абросимов А.Ю., Мельниченко Г.А. // *Архив патологии*. – 2019. – Т. 81. – № 3. – С. 66–73. – <https://doi.org/10.17116/patol20198103166> [BAK, Scopus]
11. Молекулярно-генетические маркеры и критерии прогноза аденокортикального рака / **Селиванова Л.С.**, Рослякова А.А., Боголюбова А.В., Тертычный А.С., Бельцевич Д.Г., Абросимов А.Ю., Мельниченко Г.А. // *Архив патологии*. – 2019. – Т. 81. – № 5. – С. 92–96. – <https://doi.org/10.17116/patol20198105192> [BAK, Scopus]
12. Онкоцитарная аденокортикальная опухоль надпочечника / **Селиванова Л.С.**, Абдулхабирова Ф.М., Воронкова И.А., Кузнецов Н.С., Трошина Е.А., Райхман А.О., Бирг Т.М., Тертычный А.С. // *Архив патологии*. – 2015. – Т. 77. – № 1. – С. 55–59. – <https://doi.org/10.17116/patol201577155> [BAK, Scopus]
13. Клинический случай аденокортикального рака при синдроме Беквита-Видемана / Н. С. Кузнецов, Н. В. Латкина, Н. Ю. Калинин, **Селиванова Л.С.**, Райхман А.О. // *Эндокринная хирургия*. – 2014. – Т. 8. – № 2. – С. 20–26. – <https://doi.org/10.14341/serg2014220-25> [BAK]
14. Prognostic impact of the tumor immune microenvironment in adrenocortical cancer / N. Pachuashvili, **L. Urusova** // *Abstract Book of the ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress (TAT) 6-8 March 2023 Volume 8 Issue 1 Supplement 2* // <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.101009>
15. Molecular predictors of response to the therapy with mitotane in adrenocortical cancer / E. Porubayeva, **L. Urusova** // *Abstract Book of the ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress (TAT) 6-8 March 2023 Volume 8 Issue 1 Supplement 2* // <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.100949>
16. Somatostatin receptors 2A and 5 expression in adrenocortical cancer / Anna Roslyakova, **Lilia Selivanova**, Arina Tarasova, Dmitry Beltsevich // *Abstract Book of the 22nd European Congress of Endocrinology (ECE) 5-9 September 2020 Volume 70* // <https://doi.org/10.1530/endoabs.70.AEP41>
17. Поиски новых мишеней для терапии аденокортикального рака / Пачуашвили Н.В., Боголюбова-Кузнецова А.В., **Урусова Л.С.**, Порубаева Э.Э., Ткачук А.В. // *Материалы IV Съезда патологоанатомов республики Беларусь с международным участием «Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития»*. – Сборник тезисов. – 2022 – С.258
18. Мультифакторная оценка прогностических особенностей аденокортикального рака / Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., **Урусова Л.С.**, Ткачук А.В. // *Материалы IV Съезда патологоанатомов республики Беларусь с международным участием «Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт,*

- пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития». – Сборник тезисов. – 2022. – С.280
19. Прогностические маркеры различных морфологических вариантов аденокортикального рака / Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., **Л.С. Селиванова** // Материалы X научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку». – Сборник тезисов. – 2021. – С.21
 20. Иммуногистохимическая характеристика и прогностическое значение субпопуляций опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, макрофагов и PD-L1 статус в различных морфологических вариантах аденокортикального рака / Пачуашвили Н.В., Порубаева Э.Э., **Л.С. Селиванова** // Материалы X научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку». – Сборник тезисов. – 2021. – С.32
 21. Иммуногистохимическая характеристика морфологических вариантов аденокортикального рака / Селиванова Л.С. // Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» – 2021. – С.214
 22. Иммунное микроокружение опухоли как перспектива таргетной терапии аденокортикального рака / Пачуашвили Н.В., Порубаева Э.Э., **Урусова Л.С.** // Материалы V Инновационного Петербургского медицинского форума «Алмазовский медицинский форум» – 2022. – С.276
 23. Прогностическое значение клинико-патологических маркеров аденокортикального рака / Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., **Урусова Л.С.** // Материалы V Инновационного Петербургского медицинского форума «Алмазовский медицинский форум» – 2022. – С.285
 24. Прогностическое значение клинико-патологических маркеров аденокортикального рака / Э.Э. Порубаева, Н.В. Пачуашвили, А.В. Ткачук, **Л.С. Урусова** // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68. – № S3. – С. 120.
 25. Иммуногистохимическая экспрессия маркеров RRM1, CYP2W1, SOAT1 как фактор, определяющий чувствительность аденокортикального рака к терапии митотаном / А.В. Ткачук, Д.Г. Бельцевич, Э.Э. Порубаева, **Л.С. Урусова** // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68. – № S3. – С. 129-130.
 26. Поиск новых мишеней для терапии аденокортикального рака / Пачуашвили Н.В., Порубаева Э.Э., **Урусова Л.С.** // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68. – № S3. – С. 158-159.
 27. Поиск новых мишеней для терапии аденокортикального рака / Пачуашвили Н.В., Порубаева Э.Э., **Селиванова Л.С.** // Материалы XVII Международной (XXVI Всероссийская) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Сборник тезисов. – 2022. – С.134
 28. Мультифакторная оценка прогностических особенностей аденокортикального рака / Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., **Урусова Л.С.** // Материалы XVII Международной (XXVI Всероссийская) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Сборник тезисов. – 2022. – С. 137
 29. Иммуногистохимическая характеристика и прогностическое значение иммунного микроокружения при аденокортикальном раке / Пачуашвили Н.В., Порубаева Э.Э., Урусова Л.С. // Материалы XXVI Российского онкологического конгресса. – 2022. – С.227
 30. Прогностическое значение клинических, иммуногистохимических, морфологических маркеров аденокортикального рака / Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., **Урусова Л.С.** // Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Орфанные заболевания: прошлое, настоящее, будущее» – 2022. – С.60
 31. Живая трехмерная модель аденокортикального рака для персонализированной медицины и тестирования новых препаратов и методов терапии / А. Н. Бастрин, Д. А. Петрова, Б. Я. Алексеев, А.А. Рослякова, Д.Г. Бельцевич, П.А. Никифорович, Н.С. Кузнецов, Е.В. Бондаренко, С.А. Сергиенко, Г.Д. Ефремов, **Л.С. Урусова** // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17. – № 3. – С. 24-25.
 32. Порубаева, Э. Э. Прогностические маркеры различных морфологических вариантов аденокортикального рака / Э.Э. Порубаева, **Л.С. Селиванова** // Злокачественные опухоли. – 2021. – Т. 11. – № 3S1. – С. 80-81.
 33. Э.Э. Порубаева, **Л.С. Селиванова**. Прогностические маркеры различных морфологических вариантов аденокортикального рака. Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека». Челябинск, Россия. 19-20 ноября 2021.
 34. Иммунное микроокружение как прогностический фактор при аденокортикальном раке / Пачуашвили Н.В., **Урусова Л.С.** // Материалы научно-практической конференции «Абрикосовские чтения» – 2023. – С. 92
 35. Новая система стратификации риска аденокортикального рака / Пачуашвили Н.В., Порубаева Э.Э., **Урусова Л.С.** // Материалы международного форума «Инновационная онкология» – 2023. – С. 63
 36. Новая система стратификации риска аденокортикального рака / Н.В. Пачуашвили, Э.Э. Порубаева, **Л.С. Урусова** // Материалы конференции «Вычислительная биология и искусственный интеллект» – 2023. – С. 83

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКА - адренокортикальная аденома
АКР - адренокортикальный рак
БРВ - безрецидивная выживаемость
ДС - диагностическая специфичность
ДИ - доверительный интервал
ДМСО - диметилсульфоксид
ДЧ - диагностическая чувствительность
ЗНО - злокачественное новообразование
ИГХ - иммуногистохимическое (исследование)
ИФА - иммуноферментный анализ
ОВ - общая выживаемость
ОШ - отношение шансов
ПЦОР - прогностическая ценность отрицательного результата
ПЦПР - прогностическая ценность положительного результата
АСМЕ - метод уксусно-метанольной диссоциации/фиксации
Ad4BP - связывающий протеин
CNV – вариации числа копий
Ig - иммуноглобулин
РННЗ - фосфогистон H3
RRM1 - рибонуклеотидредуктаза M1
SF-1 - стероидогенный фактор 1
SOAT1 - фермент стерол-О-ацилтрансфераза-1

Алгоритм диагностики опухолей коры надпочечников

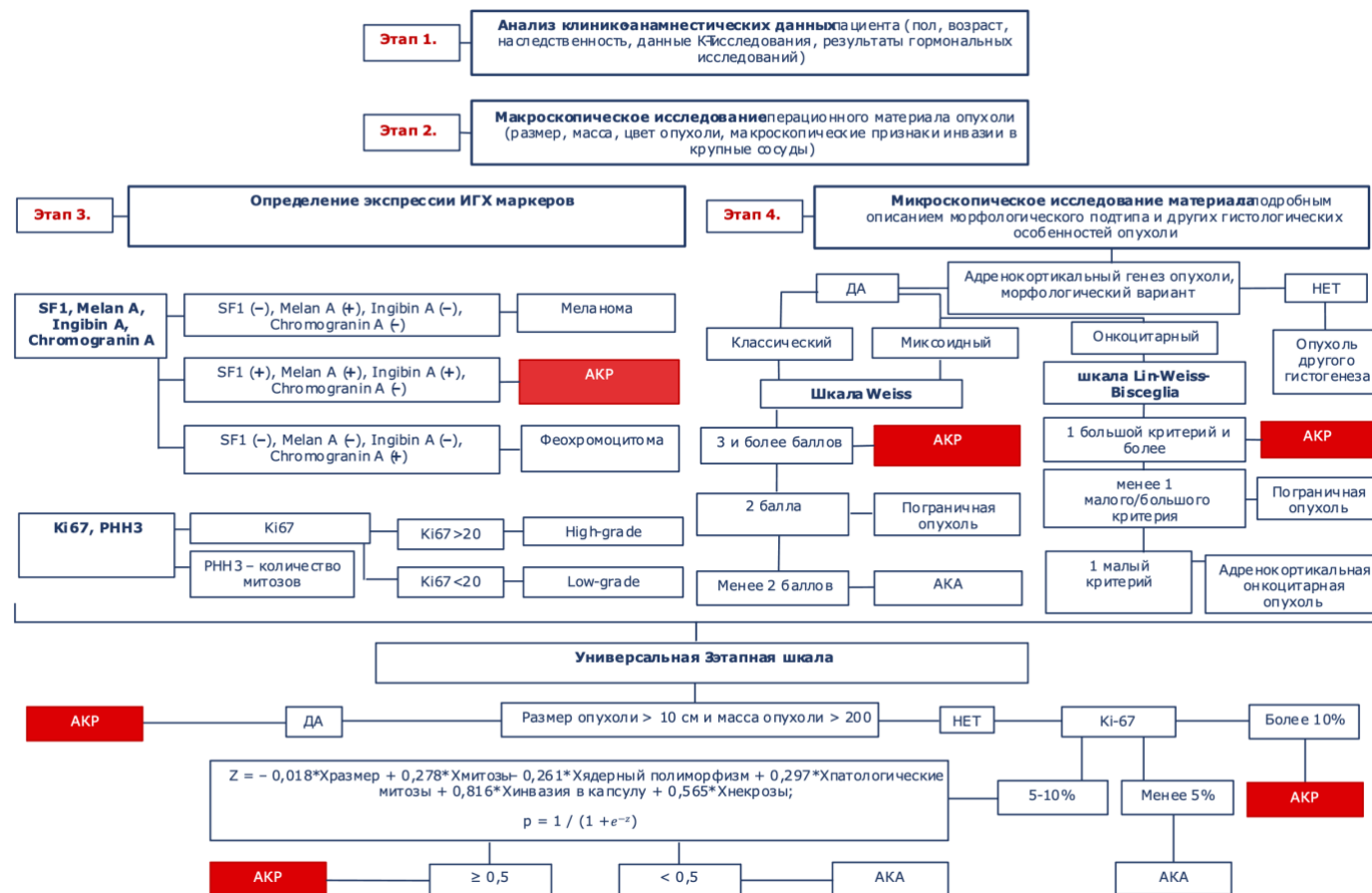


Схема 1. Алгоритм морфологической диагностики опухолей коры надпочечников