

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

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Урусова Лилия Сергеевна

**Морфологические, иммуногистохимические, молекулярно-генетические
диагностические характеристики и факторы прогноза
аденокортикального рака**

3.1.19. Эндокринология

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Мокрышева Наталья Георгиевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор
Тертычный Александр Семенович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. АДРЕНОКОРТИКАЛЬНЫЙ РАК: СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИКАХ И ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	17
1.1 Эпидемиология аденокортикального рака.....	17
1.2 Клинические проявления и диагностика аденокортикального рака.....	20
1.2.1 Инструментальная диагностика.....	21
1.2.2 Стадирование аденокортикального рака.....	22
1.2.3 Лабораторная диагностика.....	24
1.2.4 Морфологическая диагностика аденокортикального рака.....	25
1.2.4.1 Макроскопическая картина.....	25
1.2.4.2 Микроскопическая картина.....	26
1.3 Дифференциальная диагностика и иммуногистохимическая характеристика аденокортикального рака.....	34
1.4 Молекулярно-генетические характеристики аденокортикального рака.....	44
1.5 Прогностические критерии аденокортикального рака.....	50
1.6 Предикторы ответа на терапию аденокортикального рака.....	59
1.6.1 Предикторы ответа аденолитической терапии митотаном.....	59
1.6.2 Предикторы ответа на иммунотерапию.....	67
1.6.3 Single-cell анализ в иммунотерапии опухолей.....	71
1.6.4 Предикторы ответа на лечение аналогами соматостатиновых рецепторов.....	77
1.6.5 Другие перспективные стратегии терапии аденокортикального рака.....	78
Заключение по главе 1.....	80
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	84

2.1 Дизайн и общие сведения об исследовании.....	84
2.2 Материалы исследования.....	90
2.3. Методы исследования.....	99
2.3.1. Клинико-лабораторные методы.....	99
2.3.2. Морфологическое исследование образцов адренокортикального рака.....	100
2.3.3. Иммуногистохимические методы.....	104
2.3.4. Методы анализа иммунного инфильтрата	106
2.3.5 Методы молекулярной визуализации маркеров адренокортикального рака надпочечников.....	109
2.4 Методы лечения.....	123
2.5 Методы статистического анализа полученных данных.....	125
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАНТОВ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА.....	129
3.1 Гистологические особенности различных морфологических вариантов адренокортикального рака.....	129
3.2. Иммуногистохимические особенности различных морфологических вариантов адренокортикального рака.....	141
3.3 Транскриптомный профиль адренокортикального рака.....	151
3.4 Новая гистологическая система стратификации риска адренокортикальных опухолей.....	158
ГЛАВА 4. ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА.....	170
4.1. Общая и безрецидивная выживаемость пациентов с различными морфологическими вариантами адренокортикального рака.....	170
4.2. Влияние клинико-морфологических и клинико-иммунофенотипических параметров на уровни общей и безрецидивной выживаемости.....	173
4.3. Анализ предикторов агрессивного и неблагоприятного течения адренокортикального рака.....	190

ГЛАВА 5. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ	
ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ПРИ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОМ	
РАКЕ.....	204
5.1. Предикторы эффективности адренолитической терапии митотаном при	
аденокортикальном раке.....	204
5.1.1. Характеристика изучаемой популяции.....	204
5.1.2. Анализ экспрессии SOAT1, CYP2W1 и RRM1 в различных	
морфологических вариантах аденокортикального рака.....	206
5.1.3. Значение безрецидивной выживаемости у пациентов, получающих	
терапию митотаном и находящихся на динамическом	
наблюдении.....	211
5.2. Предикторы эффективности биотерапии с использованием аналогов	
соматостатина и иммунотерапии.....	223
5.2.1. Анализ экспрессии соматостатиновых рецепторов 2 и 5 типов и PD-L1	
в зависимости от морфологических вариантов.....	223
5.2.2. Оценка влияния экспрессии соматостатиновых рецепторов и PD-L1 на	
общую и безрецидивную выживаемость.....	227
5.3. Предикторы эффективности иммунотерапии.....	230
5.3.1. Характеристика изучаемых популяций.....	230
5.3.2. Значения выживаемости при различных морфологических подтипах	
аденокортикального рака.....	233
5.3.3. Взаимосвязь степени иммунной инфильтрации с различными	
морфологическими подтипами аденокортикального рака.....	236
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	256
ВЫВОДЫ.....	268
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	271
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	272
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	274

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Адренокортикальный 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], в то же время описаны случаи более благоприятного течения с поздним метастазированием и медленным прогрессированием заболевания [Armignacco R. et al., 2018; Crona J., Beuschlein F., 2019; Hasebe M. et al., 2022].

На сегодняшний день, 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; La Femina J., Brennan M.F., 2012; 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 дифференциальный диагноз между первичным поражением коры надпочечника, метастазами и другими первичными поражениями надпочечника (опухоли мозгового слоя, саркомы); во-вторых, необходимо дифференцировать адренокортикальную 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 V.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].

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].

На сегодняшний день 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. В то же время реализуются различные сценарии противоопухолевой иммунной защиты (продукция антител, контактный клеточный и комплемент-зависимый цитолиз и др.), приводящие к ограничению роста злокачественного новообразования [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 гибели - 1 (PD1) на CD8⁺ Т-лимфоцитах со специфическими PD-L1 и PD-L2 [Jeong C. et al., 2022; Raj N. et al., 2020]. Лиганды рецептора PDL (PD-L1 и PD-L2) экспрессируются опухолевыми клетками различного генеза (например, при опухолях яичника, почки, мозга, пищевода, при немелкоклеточном раке легких) и ассоциированы с иммунорезистентностью. Также экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках или опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах рассматривается как предиктор неблагоприятного прогноза опухоли и биомаркер эффективности иммунотерапии с применением анти-PD1/PD-L1 моноклональных антител [Lam A.K.Y., 2021]. К настоящему времени опубликован ряд исследований, посвященных анализу экспрессии PD-L1 в АКР [Fay A.P., 2015; Liu S., 2018], результаты которых свидетельствуют в пользу значимой роли PD-L1 в патогенезе прогрессирования АКР и возможности успешного применения анти-PD1/PD-L1 иммунотерапии при этой нозологии.

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 охватывают широкий спектр современных аналогических методов и

представляет собой инструмент изучения опухолей, позволяющий охарактеризовать их клеточный и молекулярный состав [Huang L. et al., 2021]. Single-cell и пространственные технологии позволяют изучать типы клеток - потенциальных мишеней иммунотерапии, с их помощью на основе мультиомных подходов могут быть выявлены молекулярные и клеточные маркеры ответа на терапию [Davis-Marcisak E.F. et al., 2021; Guan Y. et al., 2022]. Сочетание различных уровней исследования позволяет осуществлять отбор пациентов для персонализированной терапии, что, в свою очередь способствует совершенствованию дизайнов клинических исследований и поиску новых мишеней для иммунотерапии [Sun N. et al., 2019; Tella S.H. et al., 2018].

В случае неоперабельного рака коры надпочечника, распространённого метастатического процесса после резекции первичной опухоли, быстрого прогрессирования заболевания возможности консервативной терапии существенно ограничены. При исходной обширной диссеминации процесса применяется комбинация митотана и химиотерапевтических препаратов: этопозид, доксорубицина и цисплатина (режим EDP-M), эффективность такого подхода не превышает 20 - 30% [Жуликов Я.А. и др., 2021; Fassnacht M., 2012]. Во второй линии химиотерапии может применяться комбинация фторпиримидинов и гемцитабина на фоне приема митотана, однако объективный эффект, по данным исследования II фазы, наблюдается только у 7 % пациентов, стабилизация заболевания - у 39,3% больных [Sperone P. et al., 2010]. Ограниченное количество и недостаточная эффективность цитостатических препаратов, низкая чувствительность клеток опухоли к медикаментозной терапии - все эти факторы диктуют необходимость применения новых более эффективных лекарственных средств, а также поиска молекулярно-биологических мишеней, определяющих чувствительность опухоли к проводимому лечению [Пачуашвили Н.В. и др., 2022; Ahmed A.A. et al., 2020; Ardolino L. et al., 2020].

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 вариантов аденокортикального рака, которые потенциально могут быть идентифицированы как предикторы агрессивного течения заболевания. Продемонстрировано, что у пациентов с классическим типом аденокортикального рака статистически значимо чаще, чем при других вариантах опухоли, наблюдаются патологические митозы и некрозы.

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

Впервые определены значимые факторы, влияющие на общую и безрецидивную выживаемость у пациентов с различными морфологическими вариантами аденокортикального рака. Выявлено наличие ассоциаций активности ферментов RRM1, цитохромов P4502W1 и SOAT1 с показателями общей и безрецидивной выживаемости у пациентов. Показано, что экспрессии этих факторов ассоциирована с худшим прогнозом по уровню безрецидивной выживаемости больных аденокортикальным раком.

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.

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

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. Аденокортикальный рак неоднороден по микроскопическому строению, он представлен классическим, онкоцитарным, миксоидным подтипами. 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. Низкая экспрессия RRM1, SOAT1 и CYP2W1 у пациентов с различными вариантами АКР ассоциирована с лучшей безрецидивной выживаемостью.

5. Аденокортикальный рак- опухоль с относительно низкой иммунной инфильтрацией. Количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме и строме аденокортикальной карциномы (176 и 225 клеток/мм², соответственно), значения этих показателей в паренхиме онкоцитарного подтипа превышают таковые в ткани классического подтипа аденокортикального рака. 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 аденокортикального рака.

6. Клетки классического подтипа аденокортикального рака 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 аденокортикального рака.

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 состоялась на расширенном межкафедральном заседании сотрудников кафедр “Эндокринологии”, “Диабетологии и диетологии” и “Детской эндокринологии-диабетологии”, Института высшего и дополнительного профессионального образования ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России Института высшего и дополнительного профессионального образования ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России и Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ

ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 13 от 24 октября 2023 года. 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 паспортам специальностей: диссертация соответствует отрасли медицинских наук, паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия и 3.1.19. Эндокринология, 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.

Личное участие автора в получении научных результатов

Личный вклад соискателя 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 материалов 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.

ГЛАВА 1. АДРЕНОКОРТИКАЛЬНЫЙ РАК: СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИКАХ И ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛИ

1.1. Эпидемиология адренокортикального рака

Адренокортикальный рак относится к редким онкологическим заболеваниям, но вместе с тем представляет собой наиболее часто встречающуюся первичную злокачественную опухоль надпочечника [Chandrasekar T. et al., 2019; Gagnon N. et al., 2020]. Также АКР является вторым после анапластической карциномы щитовидной железы наиболее распространенным злокачественным новообразованием эндокринных органов, для которого характерна максимальная летальность [Fassnacht M. et al., 2020]. Ежегодная заболеваемость АКР составляет 0,5-2 случая на 1 млн населения.

Общепризнанно, что совершенствование методов диагностики способствовало повышению выявляемости онкологических заболеваний. Одним из наиболее распространенных эндокринологических диагнозов является инциденталом надпочечников. Практически половина случаев классического, миксоидного или онкоцитарного вариантов АКР являются гормонально неактивными образованиями и могут быть диагностированы в качестве инциденталомы [Lam A.K.Y., 2021; Sinai Khandeparkar S.G. et al., 2022]. Вместе с тем в соответствии с результатами популяционного исследования 2020 г. в Японии на долю АКР приходится только 1,4% инциденталом надпочечников [Ichijo T. et al., 2020]. Максимальная заболеваемость этой опухолью наблюдается в южных регионах Бразилии, что объясняется высокой распространенностью герминальной мутации *TP53 R337H* [Bondy S. et al., 2020].

АКР может манифестировать в любом возрасте [Berruti A. et al., 2012]. На момент постановки диагноза средний возраст пациента составляет 50-60 лет, однако заболевание также встречается у детей. Женщины болеют чаще, соотношение частоты АКР у женщин и мужчин составляет 2,5:1 [International Agency., 2022]. В то же время для онкоцитарного и миксоидного вариантов подобная закономерность не установлена, при них соотношение женщины/мужчины приблизительно одинаково [Lam A.K.Y., 2021]. Обычно АКК является диагностической находкой при исследовании, выполняемом по поводу образования надпочечника другой предполагаемой этиологии.

Несмотря на относительно низкую заболеваемость АКР, социальная значимость этой опухоли обусловлена неблагоприятным прогнозом ее течения. Общая пятилетняя выживаемость зависит от стадии заболевания и составляет 66 - 82% на стадии I, 58 - 63% на стадии II, 24 - 50% на стадии III и 0 - 17% на стадии IV [Fassnacht M., Allolio B., 2009].

Согласно Международной гистологической классификации (классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 5-е издание, 2022 г.), АКР кодируется как 8370/3 (Таблица 1.1) [Fisher S.B. et al., 2020; International Agency., 2022].

Таблица 1.1 – Классификация ВОЗ опухолей коры надпочечников, 2022 г.

Эктопическая ткань надпочечника (адренокортикальные остатки)	
Кисты надпочечника	
Миелолипома	ICD-O code 8870/0
Адренокортикальные опухоли	
Врождённая гиперплазия коры надпочечников	
Адренокортикальная нодулярная болезнь	
Адренокортикальный рак	ICD-O code 8370/3
Адренокортикальная аденома	ICD-O code 8370/0
Опухоли стромы полового тяжа и прочие опухоли	
Опухоли стромы полового тяжа	ICD-O code 8590/1

Аденоматоидная опухоль	ICD-O code 9054/0
Меланома	ICD-O code 8720/3

Примечание: Морфологические коды приведены в соответствии с Международной классификацией онкологических заболеваний (ICD-O): /0 – доброкачественная опухоль, /1 – опухоль с неуточненным, пограничным или неопределенным злокачественным потенциалом, /2 – carcinoma in situ или интраэпителиальная неоплазия высокой степени злокачественности (grade 3), /3 – злокачественная опухоль

Классификация, обновленная в 2022 г., включает наиболее современные рекомендации по диагностике и прогнозированию течения опухолей коры надпочечников [Cheng Y. et al., 2022; International Agency., 2022].

Предиктивное значение морфологических вариантов АКР остается малоизученным, однако, согласно имеющимся данным, онкоцитарный вариант ассоциируется с лучшим прогнозом заболевания [Lam A.K.Y., 2021; Poorman C.E. et al., 2018]. Саркоматоидный вариант характеризуется наиболее агрессивным клиническим поведением: в большинстве описанных случаев возникновение рецидива происходило в течение четырех месяцев после хирургического лечения [Тёмный А.С. и др., 2021; Schimmack S., Strobel O., 2019]. У пациентов с саркоматоидным и миксоидным вариантами АКР отмечается более высокая частота возникновения отдаленных метастазов, чем при других морфологических вариантах опухоли [Нуднов Н.В. и др., 2018; Mascioli F. et al., 2022; Owen D.H. et al., 2019]. Миксоидный вариант характеризуется несколько худшей выживаемостью, чем классический. По данным Lam A.K.Y. (2021), медиана выживаемости составляет 17-35 месяцев для классического, 60 для онкоцитарного, 29 для миксоидного и 7 для саркоматоидного вариантов АКР [Lam A.K.Y., 2021].

1.2. Клинические проявления и диагностика аденокортикального рака

Клинические проявления АКР включают симптомы избыточной гормональной секреции (наблюдаются у 30-35% взрослых пациентов) и неспецифические симптомы, связанные с ростом опухоли: боль в поясничной и абдоминальной областях, ощущение переполнения желудка (наблюдаются у 30-35% пациентов) [Fassnacht M., Allolio B., 2009]. В остальных 30-35 % случаях заболевание обнаруживается случайно при проведении визуализирующих исследований: мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ)/ магнитно-резонансной томографии (МРТ)/ ультразвукового исследования (УЗИ) [Русаков В.Ф. и др., 2022; Garay-Lechuga D. et al., 2022].

Гормональная продукция представляет собой избыточную секрецию глюкокортикоидов (признаками которой являются гиперкортицизм, синдром Иценко-Кушинга), половых гормонов (вирилизация, маскулинизация), реже - минералкортикоидов (первичный гиперальдостеронизм), а также может иметь смешанный характер [Jasim S., Habra M.A., 2019].

Самым частым гормональным проявлением АКР (у 80% пациентов) является гиперкортицизм. Отмечено, что степень риска АКР коррелирует со скоростью развития синдрома Кушинга [Kim E.I. et al., 2020].

Второй по частоте встречаемости эндокринопатией, ассоциированной с АКР, является избыточная секреция половых гормонов. Гиперандрогения у женщин может приводить к развитию гирсутизма, вирилизации и нарушению менструального цикла. У мужчин избыток андрогенов часто остается незамеченным ввиду скудности симптомов. Гиперпродукция эстрогенов при АКР встречается редко, вызывает у мужчин развитие гинекомастии и атрофии яичек. Избыточная секреция половых гормонов при обнаружении опухоли надпочечника особенно подозрительна в отношении АКР [Jeong C. et al., 2022].

Наиболее редкий вариант эндокринопатии при АКР связан с проявлениями первичного гиперальдостеронизма, который манифестирует выраженной артериальной гипертензией и гипокалиемией.

В большинстве случаев АКР имеет относительно большие размеры, в среднем – более 10 см в диаметре; опухоль может увеличиваться до 25 см и более. Наблюдающиеся неспецифические симптомы (дискомфорт, боли, чувство переполнения желудка), как правило, обусловлены компрессией прилежащих органов при большом размере АКР [International Agency., 2022].

1.2.1. Инструментальная диагностика

Первоначальная оценка злокачественности опухоли осуществляется на основании данных МСКТ/МРТ с контрастным усилением. Для АКР наиболее характерны следующие характеристики, выявляемые при МСКТ: размер более 4 см, бугристые контуры, некрозы, кровоизлияния, выраженная гетерогенность опухолевой ткани, нативная плотность более 10 единиц по шкале Хаунсфилда, задержка ретгенконтрастного препарата («wash-out» менее 50%), гетерогенность в фазу вымывания [Hodgson A. et al., 2019; Petersenn S. et al., 2015]. На МРТ наблюдается гетерогенное снижение сигнала [Plias I. et al., 2007].

Доброкачественные адренокортикальные аденомы (АКА) с кровоизлияниями, низким содержанием жира и повышенной васкуляризацией могут иметь аналогичную МСКТ/МРТ семиотику [International Agency., 2022].

Позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) с 18-фтордезоксиглюкозой (ПЭТ-18FDG) позволяет определить метаболическую активность образования надпочечника [Lee D. et al., 2022]. Если величина определяемого при ПЭТ-18FDG накопительного критерия SUV (standartised

uptake value) превышает 3, то чувствительность в отношении злокачественного поражения приближается к 100%, специфичность не более 80% [Абоян И.А. и др., 2019; Долгушин М.Б. и др., 2018]. При повышении SUV более 8 специфичность также стремится к 100%. Показаниями к проведению ПЭТ-18FDG являются: наличие высокоплотного образования надпочечника малого размера (например, до 4 см), подозрительного в отношении АКР или метастазов рака иной локализации, необходимость стадирования (оценка распространенности) очевидного злокачественного поражения [Мельниченко Г.А. и др., 2014; Boland G.W.L. et al., 2011].

Пункционная биопсия при опухоли надпочечника выполняется исключительно при подозрении на его метастатическое поражение [Suman P. et al., 2017]. В дифференциальной диагностике АКР и АКА пункционная биопсия характеризуется низкой чувствительностью, низкой специфичностью и высокой вероятностью осложнений, прежде всего, диссеминации опухолевых клеток и индуцирования метастатического процесса [Мельниченко Г.А. и др., 2014; Naffouje S.A. et al., 2021].

1.2.2. Стадирование адренокортикального рака

Клиническое стадирование АКР осуществляется на предоперационном этапе на основании результатов визуализации. После проведения хирургического лечения для надлежащего стадирования АКР необходимо гистологическое подтверждение злокачественного новообразования (ЗНО) [Тёмный А.С. и др., 2021; Ginsburg K.B. et al., 2021; 2022]. Как и при других ЗНО, стадирование АКР основано на классификации TNM, в соответствии с которой оцениваются локальное распространение первичной опухоли, поражение лимфатических узлов и наличие отдаленных метастазов [Абоян И.А. и др., 2019].

В 2004 г. Европейской рабочей группой по изучению опухолей надпочечников (ENSAT) было показано, что наличие отдаленных метастазов ассоциировано с худшей выживаемостью по сравнению с выживаемостью пациентов с другими распространенными стадиями ЗНО без отдаленных метастазов, в связи с чем классификация UICC была модифицирована [Grubbs E., Lee J.E., 2009].

Эксперты ВОЗ рекомендуют проводить стадирование АКР по системе ENSAT [International Agency., 2022]. Согласно системе ENSAT, стадия I характеризуется наличием опухоли диаметром до 5 см в пределах надпочечника; стадия II – наличием опухоли диаметром более 5 см в пределах надпочечника; стадия III – вовлечением прилежащих тканей, наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (ЛУ) или вовлечением регионарных вен; стадия IV – наличием отдаленных метастазов [Brierley J.D. et al., 2017; Grubbs E., Lee J.E., 2009].

Для уточнения прогноза распространенного АКР была предложена модифицированная классификация ENSAT (mENSAT), в которой содержатся новые определения для стадии III (инвазия в окружающие ткани / органы или почечную / полую вену) и выделены стадии IVa, IVb, IVc (два, три или более трех органов, пораженных метастазами, включая инвазию лимфатических узлов, соответственно) [Libé R. et al., 2015; Libé R., 2019]. Среди всех предложенных классификаций стадирование АКР по системе ENSAT лучше всего ассоциируется с выживаемостью при этой опухоли [Jouinot A., Bertherat J., 2018].

Группировка критериев TNM для определения стадии АКР по UICC и ENSAT представлена в Таблице 1.2 [Ahmed A.A. et al., 2020]. Критерии установления стадии АКР идентичны как для UICC, так и для ENSAT [Abdel-Rahman O., 2022].

Таблица 1.2 – Стадирование АКР по TNM AJCC/UICC 8-го пересмотра и ENSAT

Стадия по AJCC/UICC 8-го пересмотра и ENSAT	Критерии стадирования TNM по AJCC/UICC 8			ENSAT
Стадия 1	T1	N0	M0	Как в UICC TNM 8
Стадия 2	T2	N0	M0	Как в UICC TNM 8
Стадия 3	T1/T2	N1	M0	Опухоль с метастазами в лимфоузлы - распространением инфильтрации за пределы надпочечника; - опухолевым тромбозом НПВ или почечной вены
	T3/T4	N0/N1	M0	
Стадия 4	T1-4	N1-4	M1	Любая опухоль с отдаленными метастазами

1.2.3. Лабораторная диагностика

Лабораторная диагностика АКР включает в себя исследование стероидных гормонов, потенциально секретируемых опухолью. Важно идентифицировать гормональную активность образования или ее отсутствие до проведения хирургического лечения. Это необходимо для своевременного выявления гиперкортицизма и инициации заместительной терапии надпочечниковой недостаточности в послеоперационном периоде, а также исключения феохромоцитомы.

1.2.4. Морфологическая диагностика аденокортикального рака

1.2.4.1. Макроскопическая картина

Большинство образований крупные, солитарные, достигают размеров более 25 см и массы более 2 кг. На разрезе опухоль обычно имеет желтовато-коричневый цвет и пестрый вид с наличием множества узелков, что отражает гистологическую гетерогенность [International Agency., 2022]. Нередко обнаруживаются участки некроза и кровоизлияния (Рисунок 1.1) [Pearlstein S.S. et al., 2021].



Рисунок 1.1 – Аденокортикальный рак

Выраженная пигментация может отмечаться при АКА, которые называют черными аденомами, однако были описаны исключительные случаи пигментированных АКР, ассоциированных с синдромом Кушинга, наличием множественных метастазов и склонностью опухоли к рецидивированию [Geller J.L. et al., 2006].

Эксперты ВОЗ рекомендуют проводить тщательное изучение всех макроскопически различных участков опухоли и ее капсулы [International Agency., 2022].

1.2.4.2 Микроскопическая картина

Диагноз карциномы коры надпочечников основывается на обнаружении инвазивного роста (например, инвазии в сосуды, капсулу, местной макроскопической инвазии), повышенной пролиферативной активности и сочетании цитологических и архитектурных особенностей. Классические патоморфологические критерии диагностики АКР у взрослых не изменились и будут описаны ниже, однако в новой классификации ВОЗ 2022 г. подчеркивается диагностическое и прогностическое значение оценки сосудистой инвазии в этих опухолях [International Agency., 2022]. Сосудистую инвазию оценивают на пересечении опухоли и капсулы надпочечника или за пределами капсулы надпочечника. Макроскопическая или клинически выявленная инвазия крупных сосудов является признаком поздних стадий АКР.

Микроскопическая ангиоинвазия наблюдается в случае, когда опухолевые клетки проникают через стенку сосуда и образуют комплекс тромб/фибрин-опухоль или внутрисосудистые опухолевые клетки с примесью тромбоцитарного тромба/фибрина [Клецкая И.С. и др., 2018; Nosé V. et al., 2022] (Рисунок 1.2).

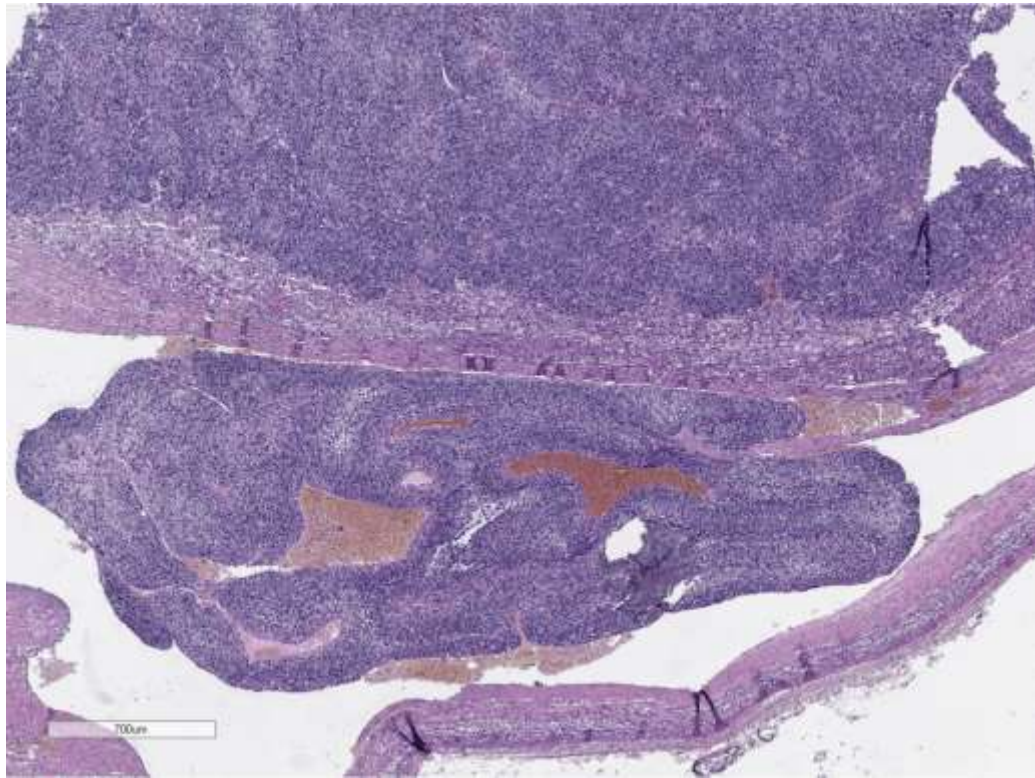


Рисунок 1.2 – Адренокортикальный рак, микроскопическая инвазия

Для АКА характерен рост опухолевой ткани в виде компактных гнезд или тяжей. При АКР наблюдается солидный характер роста опухолевой ткани, а также рост в виде широких трабекул или в виде крупных гнезд. Иные структурные особенности (формирование желез), как правило, отсутствуют. В опухоли могут присутствовать прослойки фиброзной ткани. Нередко встречаются очаги некроза (Рисунки 1.3, 1.4).

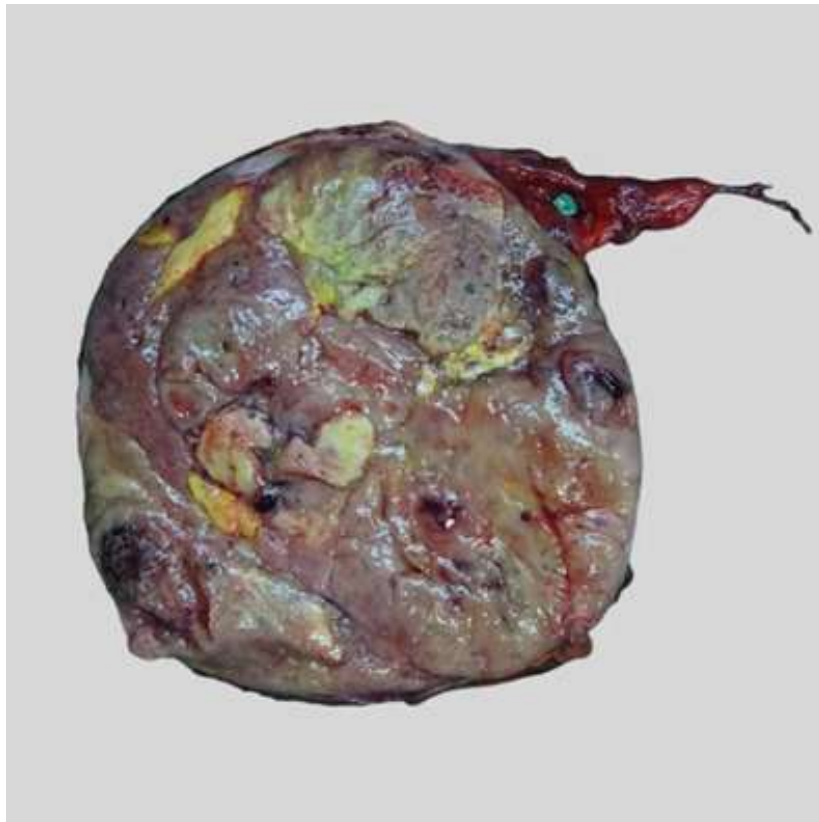


Рисунок 1.3 – Адренокортикальный рак, некроз опухоли

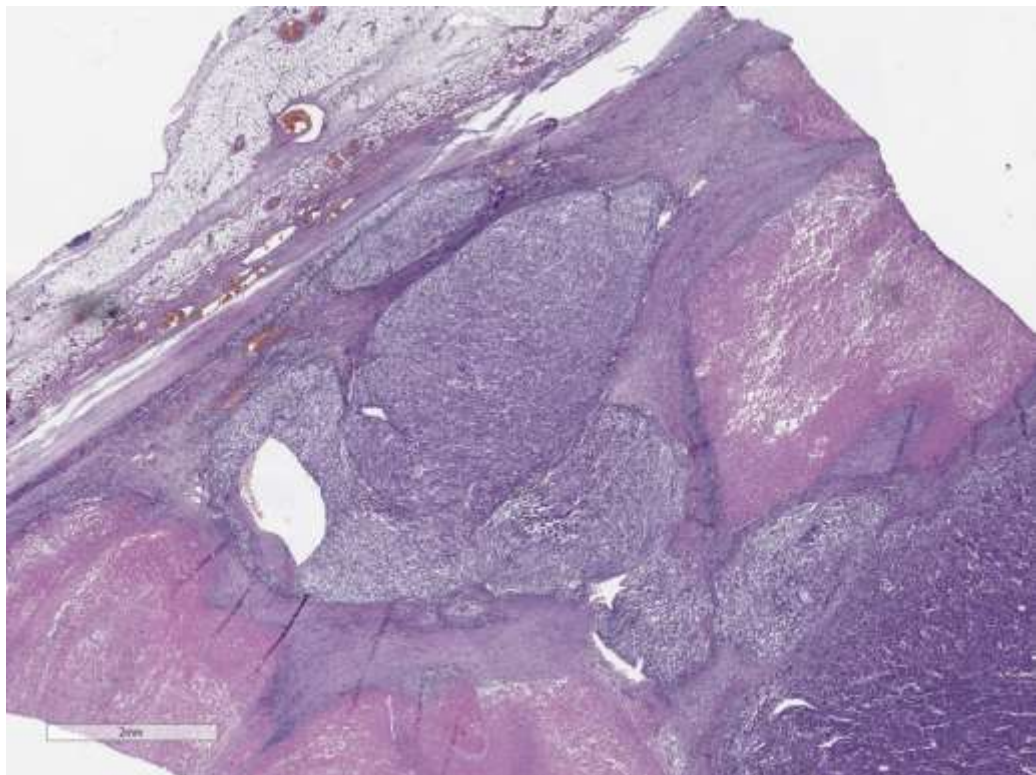


Рисунок 1.4 – Адrenокортикальный рак, некроз опухоли

Дегенеративные изменения, наблюдаемые после кровоизлияний, не являются признаком злокачественности, их следует отличать от участков некроза опухолевой ткани.

Обязательным признаком АКР является наличие фиброзной капсулы. Инвазия опухоли в капсулу и кровеносные сосуды нередко наблюдается на границе образования и капсулы.

Наличие митозов является облигатным признаком АКР. По результатам ряда исследований было показано, что клеточная пролиферация играет ключевую роль в патогенезе данных опухолей. В соответствии с этим во всех клиничко-патологических алгоритмах, разработанных для оценки опухолей коры надпочечников, учитывается митотическая активность [International Agency..., 2022] (Рисунок 1.5).

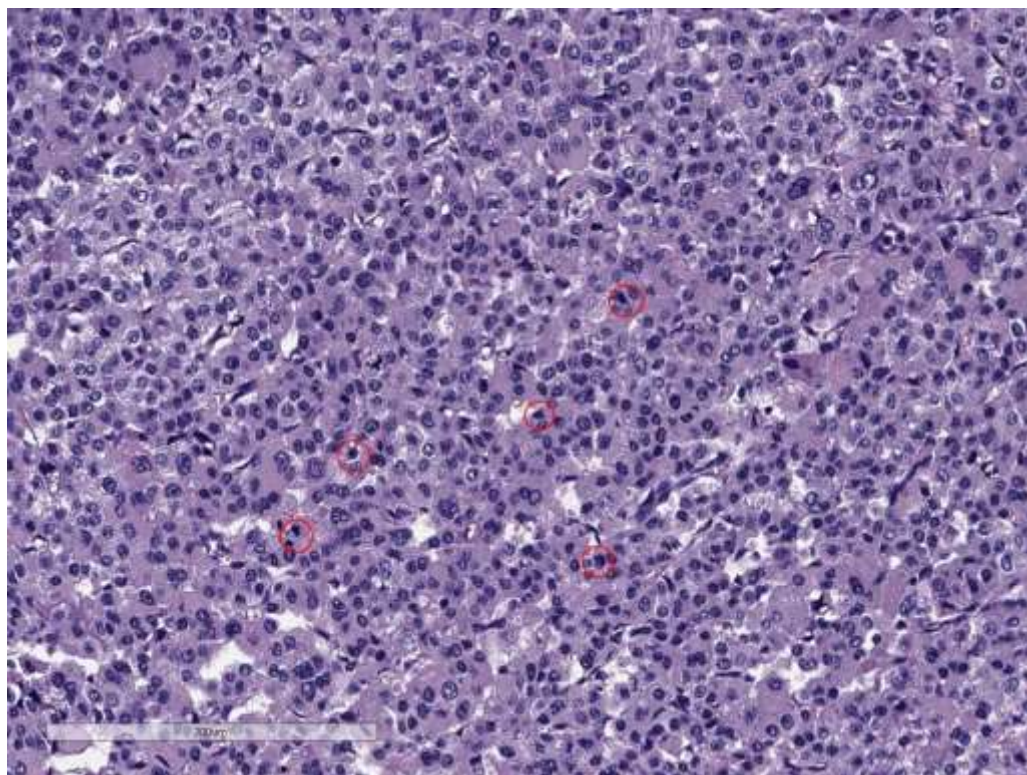


Рисунок 1.5 – Адrenокортикальный рак, повышенная митотическая активность. Обведены митотические фигуры

Высокая митотическая активность определяется как >5 митозов на 10 мм^2 (50 полей зрения при увеличении микроскопа $\times 400$); количество митозов подсчитывается в участках с наибольшей плотностью, так как в АКР может наблюдаться пролиферативная гетерогенность [Nosé V. et al., 2022].

Важным критерием являются также атипичные фигуры митоза, которые указывают на аномальное содержание хромосом (анеуплоидию) (Рисунок 1.6).

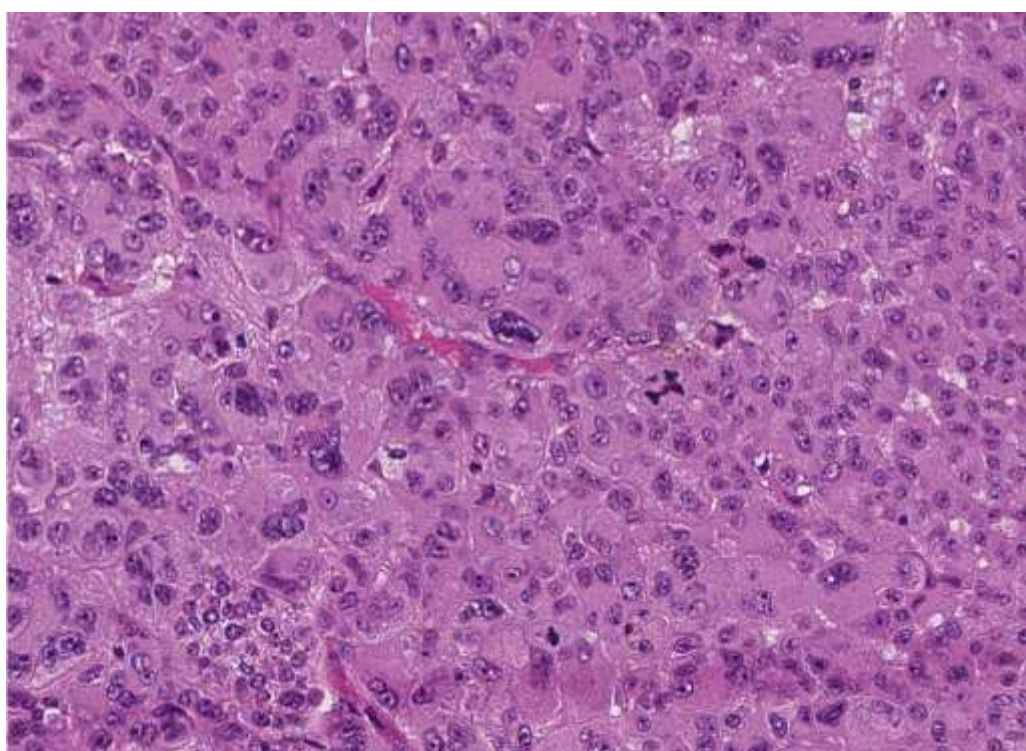


Рисунок 1.6 – Адренокортикальный рак, атипичные митотические фигуры

На основании характерных цитоморфологических особенностей АКР подразделяется на четыре гистологических подтипа: классический, онкоцитарный, миксоидный, саркоматоидный (в порядке уменьшения частоты встречаемости) [International Agency..., 2022].

Важно отметить, что в рамках классического гистологического варианта АКР могут быть идентифицированы различные морфологические

особенности опухоли: преобладание крупных полиморфных клеток, мономорфных клеток малого или среднего размера («карциноидподобных») или рабдоидных клеток, формирующих альвеолярные структуры. Более того, АКР часто демонстрирует различные сочетания типов роста или цитологических особенностей [Duregon E. et al., 2015; Kanjilal B. et al., 2018] (Рисунок 1.7).

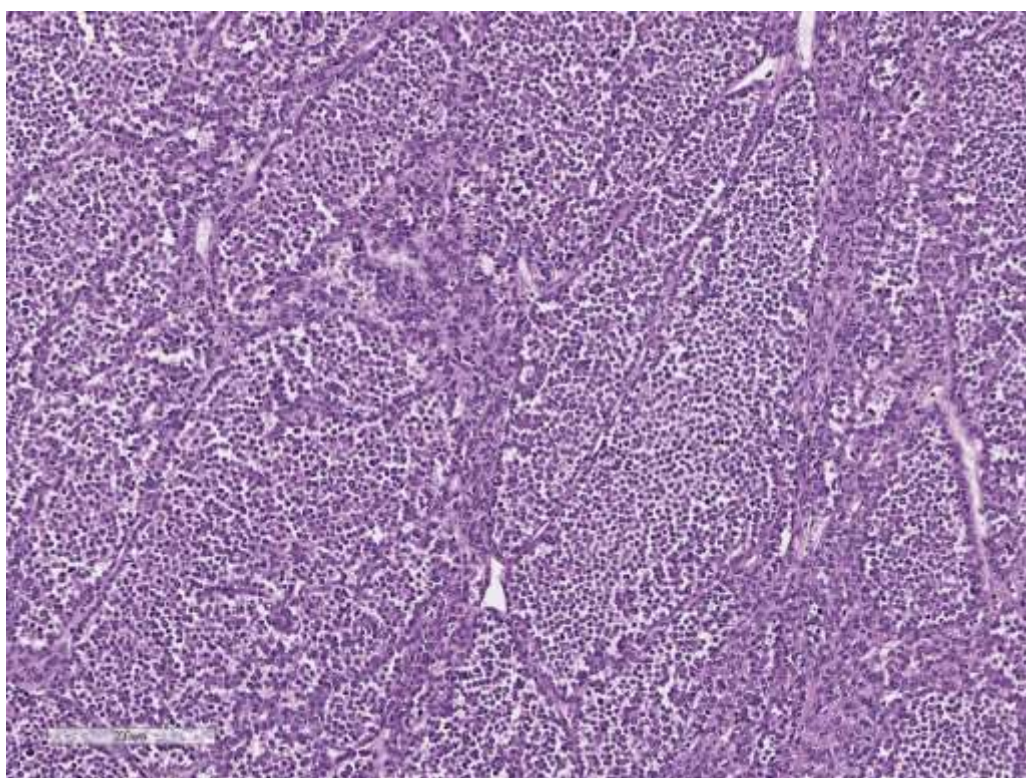


Рисунок 1.7 – Адренокортикальный рак, классический вариант

Онкоцитарные АКР встречаются наиболее часто, их частота среди специфических морфологических вариантов составляет около 18% [Duregon E. et al., 2015]. Эти опухоли характеризуются наличием крупных полиморфных клеток с гранулярной и обильной ярко-эозинофильной цитоплазмой, пикнотичными ядрами (Рисунок 1.8).

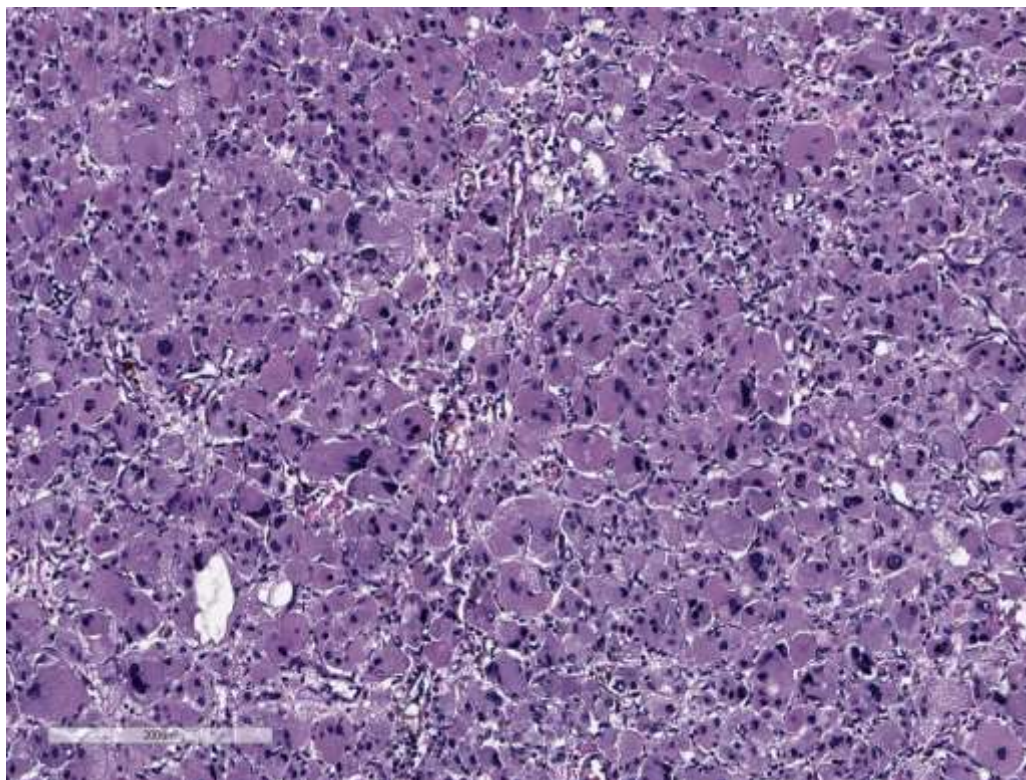


Рисунок 1.8 – Адренокортикальный рак, онкоцитарный вариант

Вид гранулярной цитоплазмы обусловлен скоплениями митохондрий, которые могут занимать до 60% цитоплазмы. Увеличение содержания митохондрий сопровождается постепенным сжатием, иногда исчезновением других цитоплазматических органелл.

Онкоциты образуют солидные, трабекулярные или железистые структуры, в опухолевой ткани эти клетки могут преобладать или составлять меньшую часть клеточной популяции. Следует учитывать, что онкоцитарные клетки должны составлять более 90% площади опухоли для того, чтобы ее можно было рассматривать как полностью («pure») онкоцитарное новообразование коры надпочечников [International Agency., 2022]. В противном случае необходимо применять критерии, используемые для диагностики классического варианта АКР.

Миксоидный вариант АКР, характеризующийся наличием внеклеточных депозитов миксоидного вещества, встречается в 10% случаев этой опухоли, хотя наличие миксоидных участков (менее 20% площади опухоли) возможно и при классическом подтипе АКР [International Agency., 2022]. Миксоидные

опухоли также отличаются наличием мелких или средних по размеру мономорфных клеток со слабо или умеренно выраженной ядерной атипией, небольшим количеством бледно-эозинофильной цитоплазмы и трабекулярным, псевдожелезистым или криброзным типом роста [Jeremie G. et al., 2021].

При данном варианте АКР такие параметры системы Weiss L.M. et al. (1989), описание, которое будет представлено ниже, как диффузный рост и ядерная атипия, обычно отсутствуют, а обнаружение участков инвазии может быть затруднено ввиду наличия большого количества миксоидного вещества, что фактически может привести к недооценке злокачественного потенциала опухоли [Duregon E. et al., 2015]. Следовательно, в случае выявления образования надпочечника с преобладанием миксоидной стромы рекомендуется более настороженно оценивать злокачественный потенциал даже в случае доброкачественной на первый взгляд опухоли.

Саркоматоидный вариант АКР характеризуется потерей кортикальной дифференцировки или выглядеть мозаичным с наличием типичных дифференцированных участков [International Agency., 2022]. Данный гистологический вариант встречается редко и является крайне агрессивным, в связи с чем его верификация возможна при наличии 10% саркоматозного компонента [Duregon E. et al., 2015]. При мономорфном строении данная опухоль может быть неотличима от истинных сарком надпочечника и ретроперитонеальных сарком со вторичным поражением адренокортикальной ткани.

Таким образом, накопленный за последние несколько десятилетий биологами, клиницистами и патоморфологами большой объем сведений о клиническом течении и исходах, морфологической характеристике и молекулярных особенностях патогенеза АКР свидетельствует о том, что определение гистологического варианта опухоли имеет крайне важное значение ввиду морфологической неоднородности данной опухоли.

В настоящее время АКР рассматривается как гетерогенная группа заболеваний с различными демографическими характеристиками, клинической манифестацией, патоморфологическими и геномными особенностями, биологическим поведением и прогнозом для пациента. Тем не менее, к настоящему времени не определены четкие морфологические критерии для выделения вышеописанных вариантов АКР.

1.3. Дифференциальная диагностика и иммуногистохимическая характеристика аденокортикального рака

Спектр заболеваний, которые необходимо дифференцировать с АКР, включает АКА, феохромоцитому, почечно-клеточный рак (первичный и метастатический), гепатоцеллюлярную карциному (первичную и метастатическую), саркому, метастазы меланомы и опухолей иной локализации [International Agency..., 2022].

Существенные отличия в тактике ведения пациентов обуславливают важность дифференциальной диагностики метастатического процесса и первичных опухолей надпочечников. Новообразования надпочечников, выявленные у пациентов с предшествующими или синхронными экстраадrenalовыми ЗНО, часто ошибочно расцениваются как метастатические поражения, что может приводить к назначению неадекватного лечения опухоли в клинической практике [Ardicli B. et al., 2021; Lam A.K., 2021].

Надпочечник является четвертой по распространенности локализацией метастазирования с частотой 9–27%. Наиболее распространенными первичными опухолями, метастазирующими в надпочечники, являются первичные опухоли легких (39%), молочной железы (35%), меланома (1–8,6%), опухоли желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, почек

(1,2–10%) [Mao J.J. et al., 2020; Shumarova S. et al., 2017]. Время между обнаружением первичной опухоли и возникновением метастазов в надпочечнике зависит от локализации первичного очага и может значительно варьировать, в среднем составляя около 2,5 лет. Нередко изолированные метастазы в надпочечники возникают до выявления первичного злокачественного новообразования. Установлено, что случайно выявленное заболевание наиболее характерно для рака легкого (РЛ) (46,9%) по сравнению с остальными подтипами (31,9% при опухолях мочеполовой системы, 25,3% при опухолях желудочно-кишечного тракта, 29,0% при других).

Различают солитарные и множественные метастазы, 41% из них являются двусторонними. Солитарные метастазы наблюдаются редко, в основном на момент диагностики встречаются множественные метастатические очаги. Двустороннее поражение надпочечников регистрируется у 20–49% пациентов с метастазами в надпочечники, риск развития контралатерального поражения при односторонних метастазах неизвестен [Mao J.J. et al., 2020].

Для дифференциальной диагностики адренокортикальной опухоли и опухоли иного гистогенеза проводится иммуногистохимическое исследование. Новообразования коры надпочечников экспрессируют маркеры, специфичные для стероидпродуцирующих клеток: SF-1 и ингибин-альфа – а также маркеры, экспрессируемые опухолями других типов: мелан-А, кальретинин, синаптофизин. SF-1 имеет наибольшую чувствительность (98%) и специфичность (100%), для других маркеров характерен гетерогенный тип реактивности, иммунореактивность отмечается только в части случаев [Baechle J.J. et al., 2021; Lu Q. et al., 2023].

Иммуногистохимическое исследование стандартно проводится с применением антител к протеинам melan A, ингибину, кальретинину и синаптофизину. Это позволяет дифференцировать поражение коркового и мозгового вещества надпочечников. Кроме того, возможно применение специфических иммуногистохимических маркеров для дифференциальной

диагностики метастазов в надпочечники. К ним относятся, в частности, цитокератины, и специфические маркеры для стероид-продуцирующих клеток. Стероидогенный фактор 1 (SF-1), продуцируемый клетками надпочечников, является важным прогностическим индикатором, уровень которого коррелирует с неблагоприятным исходом [Duregon E. et al., 2013].

Иммуногистохимическая реактивность миксоидного и онкоцитарного вариантов аналогична классическому варианту АКР. Однако в случае миксоидного варианта нейрофиламенты экспрессируются чаще и интенсивнее, чем при классическом АКР.

Саркоматозные участки саркоматоидного АКР обычно не экспрессируют специфические адренокортикальные маркеры, такие как SF-1 и мелан-А. Изучение иммуногистохимического профиля этого варианта АКР показывает, что саркоматозные участки экспрессируют маркеры, связанные с эпителиально-мезенхимальной трансформацией (ЭМТ), такие как нестин, ZEB-1 и матриксные металлопротеиназы (MMP)-2/-9 [Papathomas T.G. et al., 2016]. Для онкоцитарного АКР характерна более низкая экспрессия SF-1 по сравнению с классическим АКР [Duregon E. et al., 2015].

Идентификацию онкоцитарной дифференцировки опухоли позволяют осуществить данные иммуногистохимического исследования с антимитохондриальными антителами, в результате которого выявляется наличие сильного диффузного окрашивания эозинофильной гранулярной цитоплазмы [Wong D.D. et al., 2011].

Эпителиальные маркеры (цитокератин, ЕМА, СЕА) обычно отсутствуют.

При проведении дифференциального диагноза с феохромоцитомой целесообразно использование хромогранина А, который экспрессируется исключительно клетками мозгового слоя надпочечников, тогда как синаптофизин часто экспрессируется и адренокортикальными клетками.

Для дифференциальной диагностики АКР и АКА, то есть определения злокачественного потенциала опухоли, прежде всего используют диагностические алгоритмы, основанные на данных световой микроскопии.

В 1989 г. Weiss L.M. разработал систему балльной оценки злокачественного потенциала опухоли (Weiss-шкала) (Таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Система балльной оценки злокачественного потенциала опухолей коры надпочечника Weiss

Критерий шкалы Weiss	Описание
Высокий ядерный индекс (основан на критериях Fuhrman – grade III или IV)	Увеличенные, овальные или сегментированные ядра с крупнозернистым, гиперхромным хроматином и легко различимыми ядрышками
Количество митозов более 5 на 50 полей зрения при большом увеличении	Оценка в 10 полях при большом увеличении, в зоне наибольшей митотической активности в каждом из 5 стекол, что в общей сложности составляет 50 полей зрения
Патологические митозы	Атипичное распределение хромосом или избыточное количество митотических веретен деления с мультиполярной морфологической структурой
Менее 25% клеток со светлой цитоплазмой	Светлые клетки, богатые липидами, с вакуолизированной цитоплазмой, напоминающие клетки пучковой зоны надпочечника

Диффузный характер роста более 1/3 опухолевой ткани	Неструктурированные пласты клеток, занимающие более 1/3 опухолевой ткани
Участки некроза опухоли	Сливающиеся участки некроза. Изолированный некроз отдельных клеток выявляется редко
Венозная инвазия	Опухоль в виде слепков сосудов или полиповидных выступов в просвете сосуда, покрытых слоем эндотелиальных клеток. Необходимо отличать последние от свободно «плавающих» опухолевых клеток, которые могут быть артефактами
Инвазия опухоли в синусоиды	Сосуды, выстланные эндотелием, без гладкомышечной стенки
Инвазия в капсулу	Опухоль врастает или пенетрирует капсулу при наличии ассоциированной стромальной реакции

Каждый из 9 критериев оценивается в 1 балл. При сумме 3 балла и более по Weiss-шкале подтверждается высокий злокачественный потенциал опухоли и ставится диагноз АКР.

При использовании критериев Weiss митотическую активность оптимально оценивать при большом увеличении, по меньшей мере в 10 различных полях зрения, в пределах участка с максимальным количеством митозов в каждом из 5 стекол. Минимальное количество оцениваемых полей зрения составляет 50. Для более точного подсчета митозов в опухолях с низкой митотической активностью рекомендуется проведение иммуногистохимического исследования с антителами к фосфогистону [International Agency..., 2022].

Система балльной оценки злокачественного потенциала опухоли Weiss продолжает использоваться для классификации классического варианта АКР у взрослых, однако ее надежность ставится под сомнение в пограничных случаях, когда выявляются два критерия злокачественности из 9, при этом вероятность наличия АКР весьма высока. Как отмечают эксперты ВОЗ, при неопределенном злокачественном потенциале (2 балла по шкале Weiss), а также для оценки специфических гистологических вариантов АКР, могут быть полезны другие диагностические системы [International Agency..., 2022]. Например, учитывая, что онкоцитарные новообразования состоят из клеток с эозинофильной цитоплазмой, высоким ядерным полиморфизмом и почти всегда с диффузным характером роста, применение критериев Weiss для онкоцитарных адренокортикальных опухолей может привести к ошибочному диагнозу адренокортикального рака. В связи с этим Bisceglia M. et al. (2004) предложили модифицировать критерии Weiss для оценки злокачественного потенциала онкоцитарной опухоли коры надпочечника, система Lin-Weiss-Bisceglia представлена в Таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Система балльной оценки злокачественного потенциала онкоцитарной опухоли коры надпочечника Lin-Weiss-Bisceglia

Определяющие критерии для включения опухоли в группу онкоцитарных	<ul style="list-style-type: none"> • Преобладание клеток с эозинофильной гранулярной цитоплазмой • Высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение • Диффузный характер роста
Большие критерии	<ul style="list-style-type: none"> • Митотическая активность более 5 митозов в 50 полях зрения • Атипичные митозы • Венозная инвазия

Малые критерии	<ul style="list-style-type: none"> • Размер более 10 см и/или масса более 200 г • Некроз • Инвазия синусоидов • Инвазия капсулы
----------------	---

Онкоцитарный АКР диагностируется при наличии как минимум одного «большого критерия», онкоцитарная АКА с пограничным злокачественным потенциалом – при наличии как минимум одного «малого критерия». При отсутствии всех больших и малых критериев онкоцитарная опухоль считается доброкачественной. Данная классификация позволяет точно оценивать злокачественный потенциал этого подтипа опухолей, который характеризуется более благоприятным прогнозом по сравнению с классическим морфологическим подтипом АКР [Wong D.D. et al., 2011].

Также предложена модифицированная система Weiss, основанная на 5 из 9 критериев (количество митозов, наличие клеток со светлой цитоплазмой, патологических митозов, участков некроза опухоли и признаков инвазии в капсулу), которые являются самыми доступными для идентификации. В этой системе критериям митотической активности и клеткам со светлой цитоплазмой присваивается удвоенное количество баллов; критерием злокачественности также является значение суммы баллов 3. Показано, что результаты использования данного алгоритма коррелируют с данными, получаемыми при помощи оригинальной системы Weiss [Aubert S. et al., 2002; Grisanti S. et al., 2021; Gaitanidis A. et al., 2019].

При диагностике классических, онкоцитарных и миксоидных новообразований коры надпочечников также могут быть использованы ретикулиновый алгоритм [Duregon E. et al., 2013] и система Helsinki, описанная ниже [Pennanen M. et al., 2015]. Окрашивание ткани надпочечника на ретикулин позволяет визуализировать нарушения нормального строения

ретикулиновой сети при АКР. Ряд авторов включил данный метод в диагностический алгоритм, наряду с оценкой некрозов, митотической активности и сосудистой инвазии (Таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Алгоритм оценки злокачественного потенциала опухоли при окраске на ретикулиновые волокна

Для АКР характерно нарушение организации ретикулиновых волокон в совокупности с одним из следующих критериев:
• Количество митозов более 5 на 50 полей зрения при большом увеличении
• Участки некроза опухоли
• Инвазия в капсулу

Крайне сложно, классифицировать адренокортикальные опухоли, возникающие в детском возрасте, при этом частой является гипердиагностика карцином. Использование Weiss-шкалы нецелесообразно, в связи с этим была предложена специализированная система, разработанная Weineke J.A. (Таблица 1.6) и рекомендованная к применению исключительно у детей [International Agency..., 2022].

Таблица 1.6 – Система балльной оценки злокачественного потенциала опухоли коры надпочечника у детей [Weineke J.A. et al., 2003]

Масса опухоли > 400 г
Размер опухоли > 10,5 см
Инвазия в нижнюю полую вену
Инвазия капсулы
Инвазия в окружающие сосуды

Распространение на окружающие мягкие ткани или прилежающие органы
Участки некроза опухоли
>15 участков митоза в 20 полях зрения при большом увеличении
Патологические митозы

При наличии 2 и менее критериев подтверждается доброкачественная природа адренокортикальной опухоли; 3 критериев – опухоль с промежуточной степенью злокачественности; 4 и более критериев – АКР.

В дополнение к диагностическим алгоритмам при дифференциальной диагностике АКА и АКР возможно использование иммуногистохимического маркера Ki-67: для АКА характерен индекс пролиферации менее 5%, для АКР – более 5% [Ahmed A.A. et al., 2020; International Agency., 2022].

С целью подтверждения диагноза АКР также возможно оценивать уровень экспрессии IGF-2 (инсулиноподобный фактор роста-2) [Pereira S.S. et al., 2019]. Так, парануклеарная иммунореактивность IGF2 была признана наиболее информативным маркером для определения злокачественного потенциала опухоли вне зависимости от степени дифференцировки опухоли или гистологических характеристик [Soon P.S.H. et al., 2009].

Некоторые авторы считают, что для установления злокачественной природы образования коры надпочечников нет необходимости в диагностических алгоритмах. Так, в работе Walz M.K. et al. (2020) предложено осуществлять морфологическую диагностику АКР на основании только одного признака – наличия некрозов. В ретроспективный анализ клинических и морфологических данных были включены 837 опухолей коры надпочечников, в 32 из которых был диагностирован АКР. В отличие от доброкачественных опухолей при всех АКР были обнаружены очаги некрозов (Рисунок 1.9).

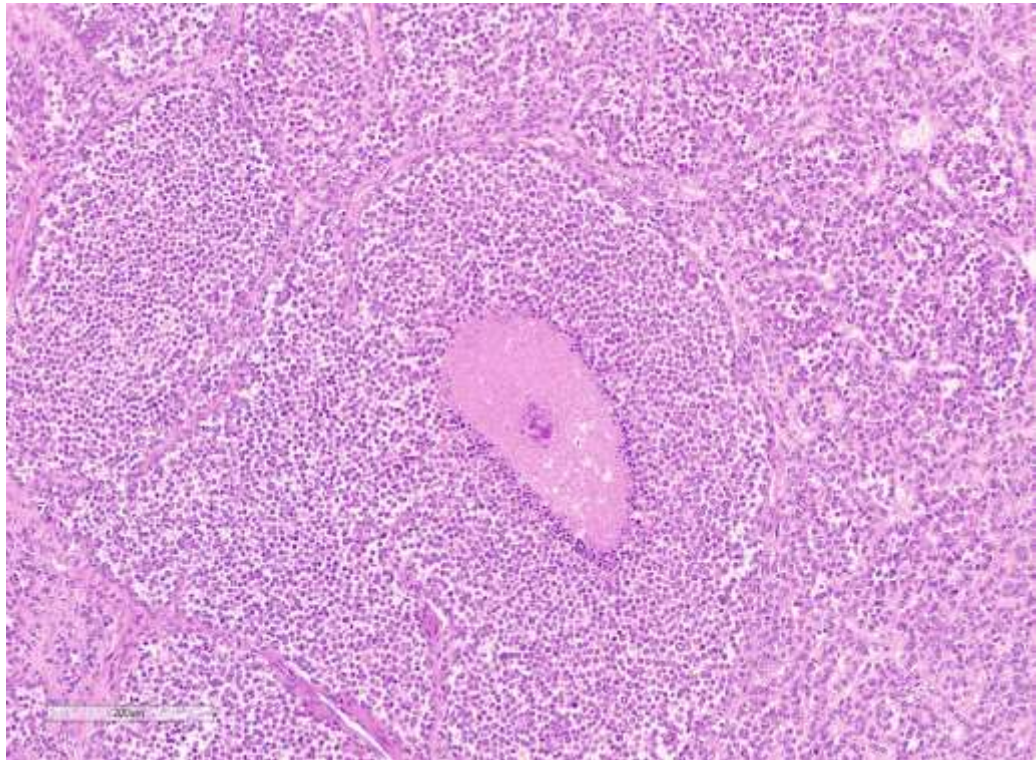


Рисунок 1.9 – Адренокортикальный рак, очаги некроза (confluenting necrosis)

Авторы считают, что оценка этого единственного морфологического параметра уже достаточна для дифференциальной диагностики АКР и АКА. При этом они отмечают, что “географические” очаги некротических клеток или некрозы единичных клеток, которые могут встречаться в ткани надпочечников, являются следствием ишемии. Злокачественную природу образования, по их мнению, в таких случаях можно исключить по преобладанию признаков воспаления и фиброза.

Таким образом, постановка диагноза АКР требует морфологического и иммуногистохимического подтверждения адренокортикального гистогенеза и злокачественного потенциала опухоли, которое обычно основывается на мультипараметрических алгоритмах и результатах иммуногистохимического исследования. Несмотря на предложенные к настоящему времени диагностические алгоритмы и панель для иммуногистохимического исследования дифференциальная диагностика карцином и аденом по-прежнему затруднена из-за отсутствия единого маркера, указывающего на

злокачественный характер новообразования. Кроме того, на данном этапе ни один из принятых многофакторных алгоритмов или балльных систем не был признан чувствительным или специфичным для всех клинических ситуаций.

1.4. Молекулярно-генетические характеристики аденокортикального рака

Канцерогенез при АКР, как и при других неопластических процессах, обусловлен мутациями в драйверных генах и активацией соответствующих сигнальных путей [Тёмный А.С., Казанцев А.П., 2022; Petr E.J., Else T., 2018]. В большинстве случаев эти мутации, приводящие к спорадическим случаям АКР, возникают спонтанно в соматических клетках коры надпочечника и, как правило, обусловлены неэффективностью репарации ДНК [Бяхова М.М. и др., 2017; Gara S.K. et al., 2018; Garinet S. et al., 2018; Kiseljak-Vassiliades K. et al., 2018].

Также в основе АКР могут лежать герминальные мутации: в этом случае заболевание будет наблюдаться в рамках того или иного наследственного синдрома. Полагают, что, как минимум, для герминальных мутаций реализуется теория двойного удара А.Кнудсона. Например, в случае синдрома Ли-Фраумени, одной только герминальной точечной мутации в гене *TP53* («первый удар») недостаточно. Для развития АКР требуется второе генетическое событие («второй удар») в аденокортикальных клетках, которое приводит к инактивации второго аллеля гена *TP53* и запуску туморогенеза: соматическая точечная мутация, утрата гетерозиготности или гиперметилирование промотора [Grisanti S. et al., 2022; Nicolson N.G. et al., 2018].

Молекулярно-генетические нарушения определяют цитологические, гистологические и иммуногистохимические характеристики АКР, их

изучению в последние годы было посвящено большое количество исследований, результаты которых существенно повлияли на современное представление о патогенезе и диагностике этого заболевания [Gambella A. et al., 2023; Guan Y. et al., 2022; Pozdeyev N. et al., 2021].

В настоящее время общепринятым является представление о молекулярной гетерогенности АКР, которая лежит в основе вариабельности клинической картины и течения заболевания. С другой стороны, в ходе ряда исследований удалось выявить специфические изменения на уровнях транскриптома и метилома, а также дополнительные драйверные гены, хромосомные aberrации и изменения спектра микроРНК [Buishand F.O. et al., 2020; Kwok G.T.Y. et al., 2019; Pittaway J.F.H., Guasti L., 2019].

В течение последних лет предпринимались попытки решения ключевых проблем: дифференциальной диагностики АКА и АКР, оценки потенциала злокачественной трансформации АКА, идентификации предикторов неблагоприятного прогноза при АКР и маркеров неэффективности консервативной терапии. Важно отметить, что большинство этих вопросов до сих пор остаются без ответа.

В ходе изучения *транскриптома* были выявлены различия в профиле экспрессии генов при АКА и АКР. В клетках АКР, по сравнению с АКА, наблюдается дерегулирование генов, участвующих в процессах контроля клеточного цикла, поддержания стабильности хромосом, выживаемости клеток, воспалении и иммунном ответе. Так, установлено, что для карцином свойственна гиперэксперессия одних генов: IGF2, MALD2L1 и CCNB1, и сниженная экспрессия других генов: ABLIM1, NAV3, SEPT4 и RPRM [Erickson L.A., 2018].

Одним из молекулярных событий, характерных для АКР, является гиперэксперессия, инсулинподобного фактора роста-2 (IGF-2 - Insulin Growth-like Factor-2), определяющего клеточную пролиферацию. При этом IGF2 экспрессируется гетерогенно как агрессивными, так и индолентными опухолями [Cheng Y. et al., 2022].

Также определены два гена - DLGAP5 и PINK1, которые, как полагают, в дальнейшем могут быть использованы для идентификации карцином, включая опухоли с неопределенным потенциалом злокачественности (2-3 балла по Weiss), и прогнозирования риска рецидива [Clay M.R. et al., 2022].

Профиль экспрессии микроРНК (miRNA) доброкачественных и злокачественных адренокортикальных опухолей различается и потенциально может быть использован для дифференциальной диагностики АКР и АКА. Так, в ряде работ было показано, что для АКР характерной является гиперэкспрессия miR483-5p и miR483-3p в сочетании со сниженной экспрессией miR-195. В исследовании Assié G. et al. (2014) был проведен анализ спектра микроРНК у пациентов с АКР, на основании чего выделены три кластера с характерными качественными и количественными различиями микроРНК: Mi1, Mi2 и Mi3 и, соответственно, с различным риском рецидива заболевания и общей выживаемостью. На сегодняшний день, по мнению экспертов ВОЗ, уровни экспрессии miR-195 и miR483-5p могут рассматриваться в качестве возможных прогностических маркеров [Chabre O. et al., 2013].

При оценке **метилирования ДНК** было обнаружено, что для АКР, по сравнению с АКА, характерно гипометилирование генома в целом [Armignacco R. et al., 2018]. При этом около 220 CpG-островков в промоторных областях отдельных генов, наоборот, гиперметилированы, что, по-видимому, может рассматриваться в качестве механизма выключения генов-онкосупрессоров. Было показано, что уровни метилирования CpG-островков варьируют у разных пациентов, при этом выраженность метилирования коррелирует с клинической картиной АКР. В частности, профиль гиперметилирования, обозначаемый как *CIMP* (CpG Island Methylator Phenotype), ассоциирован с наиболее неблагоприятным прогнозом [Barreau O. et al., 2013].

Хромосомные аберрации чаще присутствуют в клетках АКР по сравнению с АКА и включают обширные вставки, делеции и утрату

гетерозиготности. Для АКР характерен более широкий спектр хромосомных aberrаций: вставки в 4, 5, 7, 12, 16, 19 и 20 хромосомах; делеции в 11p, 2q, 11q, 13, 17p и 22 хромосомах [Chen Q. et al., 2021]. При АКА наиболее часто наблюдаются вставки в 9q35 регионе. При изучении трех независимых когорт пациентов с АКР были выявлены характерные аномалии числа копий: амплификации наблюдались в хромосомных областях, содержащих ген *TERT* (5p15.33), кодирующий обратную транскриптазу теломеразы, и ген *CDK4* (12q14). Делеции чаще встречались в 22 хромосоме, в области гена *ZNRF3* (22q12.1) и в хромосомах 9 и 13, содержащих гены *CDKN2A* (9p21.3) и *RB1* (13q14), соответственно [Brondani V.B. et al., 2021]. Показано, что утрата гетерозиготности в определенных областях ассоциирована с дупликацией всего генома. В свою очередь, полногеномная дупликация может быть предиктором более агрессивного течения и/или маркером прогрессирования АКР [Armignacco R. et al., 2018; Puglisi S. et al., 2018].

Спектр известных драйверных генов в соматических клетках включает в себя более 15 генов и, прежде всего, ген-онкосупрессор *TP53*, aberrации в котором встречаются в 1/3 всех случаев спорадического АКР у взрослых. Мутации в гене бета-катенина *CTNNB1* выявляют в 40% случаев спорадического АКР, но они также обнаруживаются АКА с аналогичной частотой [Haase M. et al., 2020]. Высокая встречаемость характерна и для мутаций в семействе генов *ZNRF*. Важно отметить, что герминальные мутации в некоторых генах, которые идентифицированы как драйверные при спорадических случаях АКР, приводят к возникновению наследственных синдромов, например, синдрома Беквита-Видемана (*IGF2*) и синдрома Ли-Фраумени (*TP53*). По результатам ряда исследований в список драйверных генов были включены гены *PRKAR1A*, *RPL22*, *TERF2*, *CCNE1* и *NF1* [Rahane C.S. et al., 2019; Romero Arenas M.A. et al., 2018].

Мутации в генах *TP53* и *CTNNB1* ассоциированы с более агрессивным течением АКР и худшим прогнозом, однако не имеют самостоятельного

значения в качестве независимого предиктора или маркера [Creemers S.G. et al., 2016; Erickson L.A., 2018; Ranathunga D.S. et al., 2020].

В исследовании Vatrano S. et al. (2018) было показано, что для каждого морфологического варианта АКР характерны определенные молекулярные профили, а также обнаружена их корреляция со специфическими клиническими и патологическими параметрами. Классический, онкоцитарный и миксоидный варианты отличались паттернами вариаций числа копий (*gain and loss of copy number variations*) драйверных генов *RB1*, *CDKN2A*, *ZNRF3*, *TERT*, *CDK4*. Сигнальный путь *p53/Rb1* являлся наиболее неблагоприятной молекулярной сигнатурой и ассоциировался с продвинутой стадией заболевания, высокими значениями индекса пролиферативной активности Ki-67, агрессивным статусом заболевания и худшей безрецидивной выживаемостью (БРВ) [Ren L. et al., 2022; Shebrain S., 2022].

В целом в настоящее время молекулярно-генетическими особенностями АКР считаются следующие: 1) гиперэкспрессия *IGF-2*; 2) высокая частота мутаций в гене *TP53*, ассоциация их с агрессивным клиническим течением заболевания; 3) высокая распространенность дефектов в Wnt-сигнальном пути (точечные мутации в гене *CTNNB1* и делеции в гене *ZNRF3*); 4) хромосомные aberrации и полногеномная дупликация как возможные механизмы прогрессирования АКР; 5) реактивация теломераз; 6) относительный дефицит «горячих мутационных точек» [Brabo E.P. et al., 2020; International Agency., 2022].

Генетическая предрасположенность к АКР. У большинства пациентов АКР является спорадическим. Редкие семейные случаи данного заболевания обусловлены герминальными мутациями в драйверных генах, в этом случае АКР является компонентом того или иного наследственного синдрома (Таблица 1.7).

Таблица 1.7 – Наследственные синдромы, ассоциированные с адренокортикальным раком

Синдром	Драйверные гены	Распространенность среди пациентов с АКР
Синдром Ли-Фраумени	<i>TP53</i>	3-5% среди взрослых; 50-80% среди детей
Синдром Линча	<i>MSH2, MSH6, MLH1, PMS2</i>	3% среди взрослых
МЭН 1 типа	<i>MEN1</i>	1-2% среди взрослых
Семейный аденоматозный полипоз	<i>APC</i>	менее 1%
Комплекс (синдром) Карни	<i>PRKARIA</i>	менее 1%
Синдром Беквита-Видемана	<i>IGF2, H19 в локусе 11p15</i>	менее 1%
Нейрофиброматоз 1 типа	<i>NF1</i>	менее 1%

Наиболее распространенным является синдром Ли-Фраумени, обнаруживаемый в большинстве случаев АКР – до 80% - у детей, до 5% - среди взрослых пациентов. Он наиболее часто встречается в южных регионах Бразилии, где 0,3% популяции являются носителями герминативной мутации *R337H* в гене *TP53* [Brenna C.T.A. et al., 2021]. Распространенность остальных синдромов составляет от долей процента до 3% среди взрослых пациентов с АКР.

Распространенность герминальных мутаций *de novo* в гене *TP53* достигает 25% среди всех пациентов с абберациями в данном гене. В связи с этим эксперты ВОЗ рекомендуют скринировать всех пациентов с АКР на наличие генетических заболеваний, ассоциированных с мутацией в гене *TP53*

и нарушением репарации ошибочно спаренных нуклеотидов [Guo J. et al., 2020; International Agency..., 2022].

1.5. Прогностические критерии аденокортикального рака

Помимо выявления различий между доброкачественными и злокачественными опухолями, важнейшей проблемой является прогноз АКР, решение которой подразумевает определение прогностических критериев, которые могут быть использованы клиницистами для выбора наиболее эффективной терапевтической стратегии. Биологические свойства и клиническое течение АКР крайне вариабельны, отмечается наличие индолентных и агрессивных опухолей. Появляется все больше доказательств того, что вариабельность прогноза при данном заболевании обусловлена его выраженной морфологической, пролиферативной и молекулярной гетерогенностью [Ткачук А.В. и др., 2021].

В настоящий момент не существует единой повсеместно признанной системы для прогностической стратификации АКР. Разделение АКР на опухоли с низким баллом (3 балла) и опухоли с высоким баллом по шкале Weiss не имеет прогностического значения. В качестве важнейших прогностических факторов рассматриваются поздняя стадия опухоли, идентификация элементов опухолевого роста в краях резекции, ангиоинвазия, high-grade опухоли, высокие значения индекса пролиферации Ki-67, а также некоторые молекулярные характеристики [Abdel-Rahman O., 2022; Ahmed A.A. et al., 2020; International Agency..., 2022].

Среди клинических критериев прогностически неблагоприятным считается манифестный гиперкортицизм у пациентов, которым была проведена радикальная резекция опухоли. Данные о взаимосвязи функциональной активности опухоли и прогноза противоречивы,

дискутируется влияние гиперсекреции кортизола, которая рассматривается некоторыми авторами в качестве неблагоприятного фактора, ассоциированного с повышенным риском рецидива и смерти [Jouinot A., Bertherat J., 2018]. Неблагоприятными прогностическими критериями также являются возраст пациента старше 50 лет, наличие общих симптомов, обусловленных ростом новообразования [International Agency., 2022].

Митотическая активность является параметром, ассоциированным с прогнозом заболевания, и отражает пролиферативную способность клеток АКР. Была разработана система классификации с выделением АКР низкой степени злокачественности (*low-grade*) (количество митозов менее 20 на 50 полей зрения при большом увеличении) и высокой степени злокачественности (*high-grade*) (количество митозов более 20 на 50 полей зрения при большом увеличении). АКР *high-grade* ассоциированы с быстрой опухолевой прогрессией и худшим прогнозом. По данным отдельных авторов, митотический индекс более 9 на 50 полей зрения при большом увеличении являлся независимым неблагоприятным прогностическим параметром [Duregon E. et al., 2015].

В нескольких исследованиях было показано, что пролиферативный индекс Ki-67 имеет большее прогностическое значение при АКР, чем количество митозов. Хотя оптимальные значения еще не определены, на данный момент предложены следующие градации результатов его оценки: Duregon E. et al. (2014) <20%, 20-50%, >50% и Beuschlein F. et al. (2015) - <10%, 10-20%. В соответствии с последними данными величина экспрессии Ki-67 более 15% является надежным предиктором неблагоприятного исхода у пациентов с АКР [Martins-Filho S.N. et al., 2021; Picard C. et al., 2019]. Как и в случае некоторых других типов рака, митотическая/пролиферативная активность в пределах одного образования часто гетерогенна, предпочтительна оценка участков с более высокими показателями [Duregon E. et al., 2015].

На основании объединения индекса пролиферативной активности Ki-67 с наиболее прогностически значимыми морфологическими параметрами из шкалы Weiss в 2015 г. была разработана шкала Helsinki [Pennanen M. et al., 2015]. В соответствии с результатами исследования Duregon E. et al. (2017), в котором был выполнен анализ 225 случаев АКР, эта шкала имеет наибольшую прогностическую значимость по сравнению с другими используемыми показателями, такими как стадия опухоли, митотический индекс и индекс пролиферативной активности Ki-67, при этом она применима ко всем гистологическим вариантам АКР. Система Helsinki базируется на применении параметров системы Weiss, основана на использовании пошагового регрессионного анализа и следующей формулы:

$$3 \times (\text{митотическая активность} > 5/50 \text{ HPF}) + 5 \times (\text{наличие опухолевого некроза}) + \text{уровень пролиферативной активности по Ki-67};$$

Сумма показателей более 8,5 ассоциируется с высоким метастатическим потенциалом опухоли и неблагоприятным прогнозом (соответствует АКР) [Duregon E. et al., 2017]. Прогностическая стратификация производилась в соответствии с пороговыми значениями <13 и ≥ 19 , то есть все случаи были разделены на три прогностически различные группы по результатам оценки статистической значимости с помощью log-rank теста. При этом предложены и другие возможные значения, но для определения оптимальных требуется проведение дальнейших исследований.

Помимо Ki-67 описаны и другие иммуногистохимические маркеры, имеющие прогностическую ценность. В частности, показано, что высокий уровень экспрессии SF1 коррелирует с худшим исходом заболевания [Jouinot A., Bertherat J., 2018]. Гиперэкспрессия SF-1 взаимосвязана с туморогенезом АКР за счет регуляции особого ряда SF-1-дозозависимых генов-мишеней [Doghman M. et al., 2007; 2013; Tamburello M. et al., 2022]. Один из этих генов

кодирует фактор семейства онкогенов VAV2, который связан с обменом гуаниновых нуклеотидов.

При изучении VAV2 в качестве предиктора прогноза при АКР была выявлена корреляция выраженности его экспрессии как с безрецидивной, так и общей выживаемостью (ОВ) пациентов [Sbiera S. et al., 2015; 2017]. Совместная оценка экспрессии VAV2 и индекса Ki-67 позволяет уточнить прогностическую стратификацию пациентов. При этом в случаях с высоким значением индекса Ki-67, но низкой экспрессией VAV2, отмечается значительно более высокая БРВ и ОВ по сравнению с пациентами с одинаково высокими значениями данных показателей. С учетом этих данных оценка иммуногистохимической экспрессии VAV2 может повысить эффективность прогноза АКР [Hasebe M. et al., 2022].

При определении прогностической значимости иммуногистохимических маркеров, панель которых включала MMP9, мелан-А, ингибин, кальретинин, D2-40, синаптофизин и Ki-67, было обнаружено, что негативная реакция при окрашивании антителами к ингибину, D2-40 или синаптофизину ассоциировалась с худшим прогнозом [Schweitzer S. et al., 2019; Zlatibor L. et al., 2020]. В данной работе пороговое значение индекса Ki-67, которое коррелировало с худшей выживаемостью, составило 7%.

Среди молекулярно-генетических факторов в качестве прогностических маркеров течения АКР эксперты ВОЗ предлагают рассматривать спектр микроРНК (miR). Так, снижение экспрессии miR-195 в сочетании с гиперэкспрессией miR-483-5p ассоциировано с более агрессивным течением АКР и худшей выживаемостью больных [Chabre O. et al., 2013]. MiR более стабильны, чем РНК, поэтому имеют важное преимущество для использования в рутинной практике [Jouinot A., Bertherat J., 2018].

В соответствии с несколькими исследованиями предложены маркеры, основанные на оценке экспрессии miR, однако их прогностическая ценность не была подтверждена в совокупности с другими прогностическими факторами или, как например в случае miR-210, не оценивалась с помощью

мультивариантного анализа [Duregon E. et al., 2014]. В качестве потенциальных предикторов прогноза рассматриваются длинные некодирующие РНК (lncRNAs), которые представляют собой РНК транскрипты длиной более 200 нуклеотидов, не являющиеся матрицей для синтеза белка.

LncRNAs играют важную функциональную роль в эпигенетической, транскрипционной или посттранскрипционной регуляции [Jonker P.K.C. et al., 2018]. Профиль экспрессии LncRNAs позволяет дифференцировать АКР и нормальную ткань или доброкачественные образования коры надпочечников, а также коррелирует с неблагоприятным исходом [Buishand F.O. et al., 2019].

Прогностическим потенциалом при АКР обладают также гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (hnRNPs) [Li H. et al., 2020; Pellegriti G., 2018.], которые представляют собой семейство РНК-связывающих белков, участвующих не только в сплайсинге гетерогенных ядерных РНК (hnRNAs) в зрелые мРНК, но также действующих как транс-факторы при регуляции экспрессии генов [Chaudhury A. et al., 2010; Liang W., Sun F., 2021].

Исследование патогенеза АКР на молекулярном уровне обеспечивает перспективы разработки новых, более эффективных терапевтических стратегий. Соматические мутации, приводящие к отсутствию экспрессии TP53 и/или повышенной экспрессии инсулиноподобного фактора роста II, являются наиболее частыми у пациентов с АКР и регистрируются в 90% случаев. При этом последняя мутация обусловлена эпигенетическими изменениями в локусе импринтированного гена 11p15 [Bertherat J., Bertagna X., 2009]. Мутации в гене TP53, так же, как и при опухолях других локализаций, ассоциированы с менее благоприятным прогнозом заболевания [Darabi S. et al., 2021].

Кроме того, потенциальный интерес представляет присущая пациентам с АКР активация пути β -катенина, а также роль, которую в онкогенезе играют EGFR, BRAF и онкогенные мутации RAS [Bertherat J., Bertagna X., 2009; Kotoula V. et al., 2009]. При комплексной характеристике генома с использованием экзомного секвенирования и анализа одиночных

нуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) установлено, что наиболее часто драйверными генами являются CTNNB1, TP53, CDKN2A, RB1 и MEN [Assié G. et al., 2014].

Исследование генетических особенностей онкогенеза АКР, проведенное у 90 пациентов с использованием экзомного секвенирования и анализа одиночных нуклеотидных последовательностей, профиля метилирования ДНК и белков с обращенной фазой (reverse phase protein array, RPPA) позволило предположить роль в туморогенезе при АКР генов PRKAR1A, RPL22, TERF2, CCNE1 и NF1 [Assié G. et al., 2014]. Авторы также проанализировали влияние полного удвоения генома на агрессивность АКР и выделили три различных клинических и молекулярных типа. В то же время следует учитывать, что в настоящее время не выделено ни одной мутации, роль которой была бы определяющей в развитии агрессивной АКР с неблагоприятным прогнозом [Bertherat J., Bertagna X., 2009].

Отмечено также, что изменение экспрессии определенных генов коррелирует с риском рецидива АКР и метастазирования опухоли, а также с выживаемостью пациентов. Среди возможных прогностических маркеров, которые заслуживают дальнейшего изучения, рассматривают экспрессию генов TOP2A, EZH2 и BARD1. При некоторых злокачественных заболеваниях, включая АКР, биомаркерами, имеющими прогностический потенциал, являются гены, связанные с метаболизмом железа. Например, в случае АКР наблюдается сниженная экспрессия ферропортина-1 и церулоплазмينا, которая также коррелирует с худшим прогнозом [Zhu B. et al., 2019]. Более того, уровень экспрессии ферропортина-1 отрицательно коррелирует со стадиями АКР. В двух исследованиях со схожими результатами пациенты с АКР были разделены на две группы с достоверно различными показателями выживаемости, которые коррелировали с митотической активностью и экспрессией генов клеточного цикла [De Reyniès A. et al., 2009; Giordano T.J. et al., 2009]. Прогностическое значение имела экспрессия генов BUB1B и PINK1. Концепция выделения двух групп АКР с различными показателями

выживаемости в дальнейшем была подтверждена кластерным анализом многомерных геномных данных, что послужило поводом для разделения таких пациентов на две подгруппы (C1A и C1B) с определенными молекулярно-генетическими характеристиками [Assié G. et al., 2014]. Кластер C1B, в который были объединены опухоли с более благоприятным прогнозом, характеризовался низкой частотой мутаций, редкими мутациями в драйверных генах и отсутствием гиперметилирования (*не-CIMP*). Напротив, молекулярная группа АКР с агрессивным поведением была отнесена к кластеру C1A и отличалась высокой частотой мутаций и изменений в драйверных генах. В этой группе АКР была также выделена подгруппа, которая характеризовалась гиперметилированием и отличалась худшими показателями выживаемости по сравнению с опухолями кластера C1A без гиперметилирования. Таким образом, в соответствии с паттерном метилирования кластер C1A был разделен на подгруппы с худшим (C1A и CIMP) и промежуточным прогнозом (C1A и *не-CIMP*).

В более крупном исследовании были выделены три класса АКР, различающиеся по показателям выживаемости, которые коррелировали с уровнем Ki-67. В качестве прогностического маркера также было предложено оценивать метилирование четырех генов (*PAX5*, *PAX6*, *PYCARD*, *GSTP1*), для которых продемонстрирована сильная корреляция с профилями метилома (CIMP или *non-CIMP*) и выживаемостью [Jouinot A. et al., 2017]. Метилирование выбранных генов было измерено методом специфичной для метилирования мультиплексной зависимой от лигирования амплификации зонда (MS-MLPA). Данный маркер был предиктором ОБ и БРВ независимо от стадии опухоли по классификации ENSAT и индекса пролиферативной активности Ki-67. При этом маркеры, направленные на оценку метилома при помощи метода MS-MLPA, фактически являются более перспективными для применения в клинической практике, чем РНК-маркеры, изученные в транскриптомных исследованиях, так как MS-MLPA основан на анализе ДНК и является более применимым в условиях рутинной практики. Тем не менее,

независимую прогностическую ценность метиломных маркеров в ряду других молекулярных маркеров, открытых в ходе исследования транскриптома, хромосомных аббераций и экспрессии miRNA еще предстоит выяснить.

По результатам мета-анализа пангеномных исследований была создана классификация на основании особенностей транскриптома, изменений хромосом и профиля метилома [Assié G. et al., 2019]. С учетом комбинации этих омиксных профилей были выделены три различных молекулярных класса (A1, A2, A3-B), которые характеризовались различной выживаемостью: для группы A1 пятилетняя выживаемость составила 9%, для группы A2 - 45% и 82% для группы от A3-B. В результате было показано, что молекулярный класс является независимым прогностическим фактором возникновения рецидива АКР на стадии I-III после выполнения оперативного вмешательства. При этом предложенная прогностическая модель, включающая комбинированную оценку стадии ENSAT, индекса пролиферативной активности Ki-67 и молекулярный класс, оказалась наиболее эффективной [Assié G. et al., 2019]. Однако в случае IV стадии АКР прогностическая ценность выделения данных молекулярных классов была ограничена. Таким образом, определения молекулярных классов опухоли может улучшить индивидуальную прогностическую стратификацию и предотвратить назначение нецелесообразной адъювантной терапии. В этом случае необходима разработка прогностических моделей, возможно, включающих в себя не только молекулярные, но и известные клинические, морфологические и иммуногистохимические маркеры.

Таким образом, несмотря на высокоагрессивное биологическое и клиническое поведение АКР, в некоторых случаях заболевание ассоциируется с длительной БРВ и ОВ. В связи с этим задача патоморфолога состоит не только в том, чтобы установить адренокортикальное происхождение и злокачественную природу новообразования надпочечника, но и осуществить прогноз выживаемости пациента.

Молекулярная и иммуногистохимическая гетерогенность различных вариантов АКР обуславливают необходимость индивидуального подхода к определению прогноза для пациента и оценке биологического поведения опухоли [Alyateem G., Nilubol N., 2021; Long B. et al., 2020]. Достоверная прогностическая стратификация при любом онкологическом заболевании имеет крайне важное значение для принятия решения о назначении адъювантной терапии, определения особенностей последующего наблюдения пациента, а также для обеспечения пациентов информацией о режимах лечения, ближайших и отдаленных исходах. В ряде работ были идентифицированы клиничко-патологические факторы при АКР, ассоциированные с повышенным риском рецидива и смерти, однако в большинстве сообщений эти данные противоречивы и не систематизированы, отсутствует консенсус о том, какие именно параметры являются ключевыми, не существует единой повсеместно принятой прогностической системы, и оптимальный метод для стратификации еще не определен [Araújo A.N., Bugalho M.J., 2022; Nowak K.M. et al., 2018].

Поиск новых молекулярных маркеров и выделение подгрупп АКР в соответствии молекулярной характеристикой, а также их возможное объединение с уже валидированными иммуногистохимическими маркерами в рамках алгоритмов прогнозирования течения заболевания поможет усовершенствовать прогностическую стратификацию. Для этого требуются дополнительные исследования, результаты которых позволят выявить наиболее значимые прогностические маркеры и оценить их прогностическую ценность в ряду уже апробированных показателей. Также необходимо оценить воспроизводимость различных молекулярных инструментов при исследовании одной опухоли и возможность их использования в клинической практике, то есть простоту применения и экономическую эффективность.

Совершенствование геномных технологий в последние десятилетия обусловило разработку новых молекулярных классификаций АКР и выделению подгрупп с различными показателями выживаемости пациентов.

Ряд новых иммуногистохимических и молекулярных маркеров, обладающих прогностическим потенциалом, находятся на стадии экспериментальных исследований или не валидированы на больших выборках. Вместе с тем отсутствуют систематизированные данные о маркерах, используемых в рутинной клинической практике. При этом анализ транскриптома и другие молекулярные инструменты все еще не являются широкодоступными, что свидетельствует о важности и необходимости использования рутинных маркеров при осуществлении прогностической стратификации пациентов с АКР.

1.6. Предикторы ответа на терапию аденокортикального рака

1.6.1. Предикторы ответа адренолитической терапии митотаном

Как уже было отмечено выше, важнейшим направлением изучения АКР является выявление маркеров или предикторов ответа на терапию. Хирургическое лечение пациентов с АКР в настоящее время является единственным возможным вариантом полного излечения опухоли [Buller D.M. et al., 2020; Delman A.M. et al., 2022; Gaujoux S. et al., 2017]. Однако в ситуациях распространённого опухолевого процесса (III-IV стадия заболевания по классификации ENSAT), невозможности хирургического пособия или нерадикально выполненного оперативного лечения, рецидива заболевания, а также в случаях радикально проведенной операции (R0) и высоком индексе пролиферативной активности в опухоли (Ki-67 более 10%), установленном по данным патоморфологического и иммуногистохимического (ИГХ)-исследования материала, препаратом выбора является митотан или его комбинация с цитотоксическими лекарственными средствами (ЛС) [Ткачук А.В. и др., 2022; Kastelan D. et al., 2020; Lerario A.M. et al., 2014].

Митотан, производное дихлордифенилтрихлорэтана, является безальтернативным по эффективности ЛС, применяемым в терапии АКР, который одобрен EMA (European Medicine Agency) и FDA (Agency of Food and Drug Administration, USA), а с 2018 г. зарегистрирован и разрешен к применению в Российской Федерации. Механизм действия митотана основан на избирательном повреждении ткани коры надпочечника, а именно на цитолитической активности в отношении его пучковой и сетчатой зон [Brönimann S. et al., 2023].

За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в понимании молекулярного ландшафта АКР, однако полученная информация недостаточно способствовала совершенствованию методов лечения и повышению клинической эффективности терапии [Vaidya A. et al., 2019; Zambaiti E. et al., 2021]. Спустя 60 лет с момента открытия митотана лучший альтернативный препарат все еще не разработан, и митотан по-прежнему является ключевой составляющей алгоритма лечения прогрессирующих стадий АКР [Бастрич А.Н. и др., 2022; Altieri B. et al., 2022]. Это может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, орфанный характер обсуждаемого заболевания не позволяет проводить крупные проспективные исследования, что является существенным ограничением для разработки новых препаратов. Во-вторых, широкое использование в клинической практике митотана требует удовлетворения дополнительного требования – препараты на основе малых молекул не должны метаболизироваться CYP3A4 [Kimpel O. et al., 2021; Holoubek S.A. et al., 2022; Kolomeytseva A.A. et al., 2018]. В-третьих, АКР является крайне гетерогенным заболеванием, что подтверждается высокой вариабельностью выживаемости и ответов пациентов на терапию. Неблагоприятный прогноз АКР не изменился ввиду отсутствия эффективных системных методов лечения, при этом значимые клинические преимущества не были продемонстрированы ни в одном из клинических исследований новых ЛС при прогрессирующих стадиях АКР

[Бритвин Т.А., Кривошеев А.В., 2016; Bronswijk M.J.H. et al., 2020; Michael N., Nilubol N., 2022].

Более того, несмотря на то что для лечения неоперабельных случаев АКР применение митотана известно с 1959 г., влияние препарата на улучшение выживаемости все еще является дискуссионным. Новые представления о возможностях проведения терапии митотаном у пациентов низкого и промежуточного риска рецидива основаны на результатах 3 фазы исследования ADIUVO, единственного проспективного рандомизированного исследования, продолжавшегося с 2008 по 2021 гг., представленных мировому медицинскому сообществу в феврале 2022 г. на симпозиуме Американского общества клинической онкологии (ASCO) [Kiseljak-Vassiliades K. et al., 2020; Padua T.C. et al., 2023].

В исследование был включен 91 пациент с радикально проведенным (R0) оперативным лечением АКР, I-III стадией заболевания по классификации ENSAT и индексом пролиферативной активности Ki-67 в опухоли $\leq 10\%$, 45 из которых получали митотан в адъювантном режиме, 46 пациентов составили группу динамического наблюдения. В соответствии с результатами исследования пятилетняя БРВ у пациентов низко-промежуточного риска рецидива составила около 75%, а адъювантная терапия митотаном не показала значительного положительного эффекта (8 случаев рецидива заболевания в группе пациентов с лекарственным лечением против 11 случаев рецидива заболевания в группе наблюдения).

Польза, которую получают от применения митотана пациенты с распространенным нерезектабельным или метастатическим заболеванием, также, как правило, незначительная [Michael N., Nilubol N., 2022]. Результаты наиболее масштабного на сегодняшний день исследования эффективности монотерапии митотаном продемонстрировали медиану выживаемости без прогрессирования и медиану общей выживаемости 4 и 18 месяцев, соответственно [Megerle F. et al., 2018].

Установлено, что противоопухолевый эффект митотана напрямую коррелирует с его уровнем в плазме крови: достижение целевой концентрации равной 14 мг/л считается наиболее значимым предиктором ответа на терапию и ассоциируется с более длительным периодом БРВ. Однако этот уровень концентрации является труднодостижимым и требует тщательного мониторинга фармакокинетических параметров, при этом некоторые исследования показывают, что только около 60% пациентов достигают этой целевой концентрации [Megerle F. et al., 2018; Kostianen I. et al., 2019; Ohmoto A. et al., 2021]. Кроме того, возникновение значительных побочных эффектов приводит к прекращению приема препарата приблизительно в 30% случаев [Kostianen I. et al., 2019; Long S.E., Miller B.S., 2019].

Результаты исследования ADIUVO позволили значительно приблизиться к разработке системы персонализированной терапии АКР. В настоящее время инициировано исследование ADIUVO-2, целью которого является сравнение эффективности митотана в группе пациентов высокого риска при использовании в режиме монотерапии и в комбинации с цисплатином/этопозидом [Gharzai L.D. et al., 2019; Terzolo M., Fassnacht M., 2022].

Таким образом, узкий терапевтический диапазон митотана с необходимостью тщательного мониторинга его концентрации в плазме крови, высокая токсичность, проявляющаяся в развитии широкого спектра побочных эффектов, и ограниченная эффективность ЛС обуславливают необходимость поиска прогностических критериев, позволяющих оценивать чувствительность опухоли к проводимому лечению.

В качестве потенциальных предикторов ответа на митотан предложены такие показатели, как уровни экспрессии большой субъединицы рибонуклеотидредуктазы M1 (RRM1), цитохрома P450 2W1 (CYP2W1) и фермента стерол-О-ацилтрансферазы-1 (SOAT1) [Жуликов Я.А. и др., 2021; Ткачук А.В. и др., 2022]. В работе Volante M. et al. (2012) в экспериментах впервые была продемонстрирована взаимосвязь между активностью RRM1,

фермента, участвующего в синтезе дезоксирибонуклеотидов для синтеза и репарации ДНК, и противоопухолевой активностью митотана в АКР. Так, в группе пациентов с низким уровнем экспрессии гена RRM1 лечение митотаном ассоциировалось с лучшей БРВ. В экспериментах *in vitro* в культуре клеток H295R наблюдалась чувствительность к митотану, сопровождавшаяся отсутствием усиления экспрессии гена RRM1, в то время как клетки линии SW-13 не отвечали на воздействие даже высоких доз терапевтического агента, демонстрируя при этом дозозависимое увеличение транскрипции гена. В результате дальнейшего РНК-специфичного подавления экспрессии гена RRM1 в резистентных к митотану клетках SW-13 наблюдалось увеличение чувствительности к препарату, что свидетельствовало о необходимости низкой экспрессии гена RRM1 для проявления эффекта воздействия митотана. Авторы отмечают, что отсутствие доступных образцов опухолей, полученных в когорте пациентов после лечения митотаном, не позволило провести последующий анализ тканей, чтобы предполагать усиление экспрессии RRM1 *in vivo*. В связи с этим вопрос, являются ли исходные уровни экспрессии гена RRM1 или активация его транскрипции при лечении предиктором ответа на митотан, еще предстоит изучить.

В последующей работе исследовательской группы Germano A. et al. (2015) было обнаружено, что RRM1 нарушает внутриклеточный метаболизм митотана *in vitro*, что может являться механизмом резистентности этого препарата в клетках АКР. Считается, что противоопухолевая активность митотана обеспечивается его метаболитами o,p'DDE и o,p'DDA. В данной работе антипролиферативные эффекты o,p'DDE и o,p'DDA, а также взаимосвязь чувствительности к ним с экспрессией RRM1 была продемонстрирована в культурах клеток АКР H295R и SW13. В данных клеточных линиях наблюдалась различная чувствительность к метаболитам митотана, а также различные профили его биодоступности. Так, в клетках SW13, резистентных к цитотоксическому действию o,p'DDE, наблюдалась

более высокая концентрация данного метаболита, и усиление экспрессии гена RRM1. Подавление экспрессии этого гена вызывало антипролиферативную активность о,р'DDE. Таким образом, было показано, что роль RRM1 в клетках АКР in vitro отлична от таковой в других клеточных моделях: RRM1 в данном случае не является мишенью действия препарата, а препятствует влиянию митотана за счет уменьшения его превращения в активные метаболиты (Рисунок 1.10).

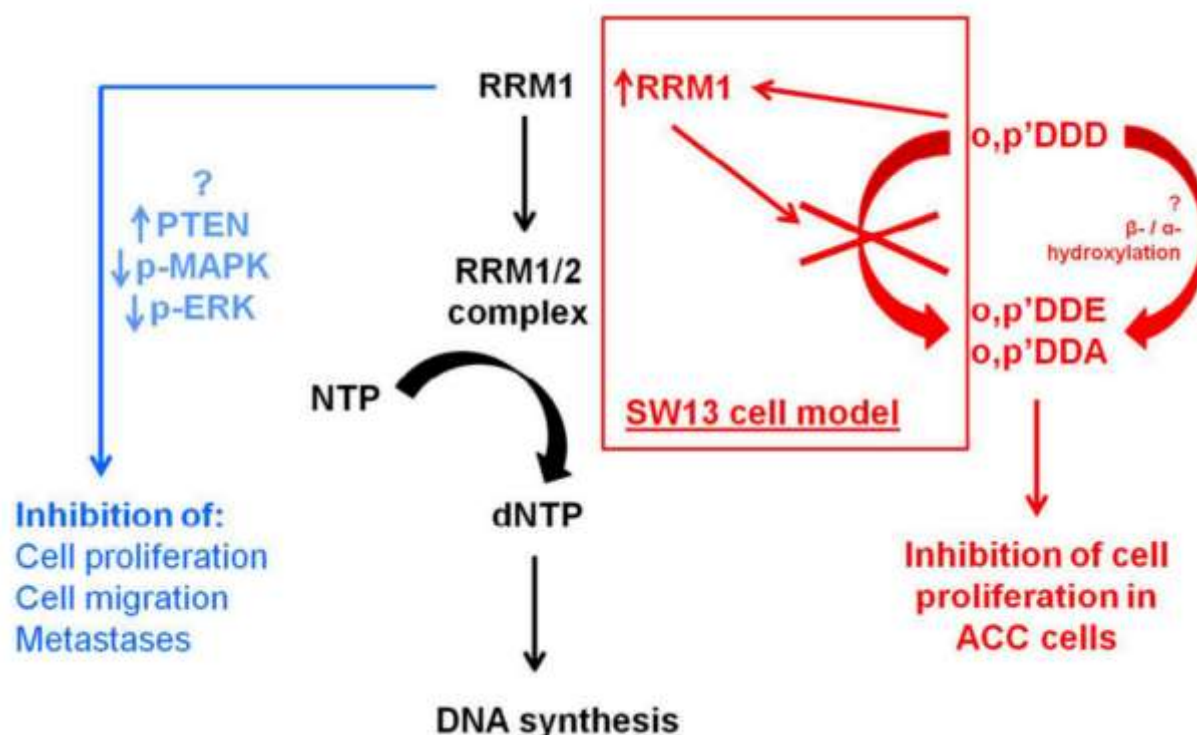


Рисунок 1.10 – Схематическое изображение потенциальной связи между RRM1 и снижением противоопухолевой активности митотана в клеточной линии SW13. Рибонуклеотидредуктаза является мультимерным ферментом, состоящим из 2 субъединиц (RRM1 и RRM2), который катализирует превращение рибонуклеозиддифосфатов в дезоксирибонуклеозиддифосфаты. Более того, субъединица RRM1 участвует в подавлении клеточной пролиферации, миграции и метастазировании. В клетках SW13 транскрипция гена RRM1 специфически активируется

митотаном и препятствует его превращению в активные метаболиты, тем самым снижая антипролиферативную активность этого препарата

В исследовании Ronchi C.L. et al. (2014) был продемонстрирован предиктивный потенциал CYP2W1. CYP2W1 относится к орфанным цитохромам человека из-за отсутствия данных о его физиологическом субстрате, при этом повышенная экспрессия данного цитохрома обнаружена в фетальных тканях и некоторых видах злокачественных опухолей. В данной работе наблюдалась высокая экспрессия его мРНК как в нормальной ткани, так и в опухолевых образованиях надпочечника, а иммунореактивность CYP2W1 ассоциировалась с гормональной активностью и более дифференцированным фенотипом АКР (более низкими значениями индекса пролиферативной активности Ki-67 и шкалы Weiss). При этом повышенная экспрессия CYP2W1 коррелировала с лучшей ОВ и БРВ у пациентов, получавших митотан, как в адъювантном, так и паллиативном сеттинге. По мнению авторов, окисление митотана при участии CYP2W1 может являться одним из механизмов его активации и обуславливать его специфическую активность в злокачественных новообразованиях надпочечника. Результаты другого исследования, в рамках которого также была оценена взаимосвязь иммунореактивности CYP2W1 и ответа на терапию АКР митотаном, свидетельствуют, что высокая экспрессия данного маркера ассоциирована с лучшей БРВ и ОВ у пациентов, получающих терапию данным препаратом [Van Koetsveld P.M. et al., 2020].

SOAT1 в различной степени обнаруживается в большинстве типов клеток и тканей организма, при этом максимальный уровень экспрессии фермента отмечен в клетках коры надпочечников, где он кодирует соответствующий белок и является мишенью стероидогенного фактора-1 (SF-1). SOAT1 участвует в обеспечении гомеостаза внутриклеточного холестерина и защите клеток надпочечников от потенциально опасного воздействия избытка свободного холестерина. По последним данным, высокая экспрессия

SOAT1 в злокачественных новообразованиях ассоциирована с низкой ОБ и неблагоприятным прогнозом, в том числе и при АКР [Lacombe A.M.F. et al., 2020]. Тем не менее, в одной из работ была обнаружена взаимосвязь противоопухолевой терапии митотаном с более длительным периодом до прогрессирования заболевания в случае высокой экспрессии SOAT1 [Sbiera S. et al., 2015]. Однако, по результатам многоцентрового ретроспективного исследования, в которое был включен 231 пациент с АКР, получавший митотан в адъювантном режиме, а также при распространенных формах заболевания, корреляции экспрессии SOAT1 с уровнями БРВ, ОБ и опухолевоспецифической выживаемости выявлено не было [Ławnicka H., 2023; Weigand I. et al., 2020].

В целом данные литературы свидетельствуют, что повышенная экспрессия CYP2W1, SOAT1 и сниженная иммунореактивность RRM1 ассоциированы с лучшим ответом на митотан. Тем не менее, в настоящее время отсутствует единое мнение о взаимосвязи иммунореактивности потенциальных предикторов и клинического ответа на терапию митотаном при АКР. Идентификация прогностически значимых биомаркеров поможет предотвратить нецелесообразное применение препарата и избежать риска развития нежелательных побочных эффектов у пациентов, не чувствительных к этому ЛС [Жуликов Я.А. и др., 2021]. Поиск прогностических характеристик АКР требует персонифицированного подхода к назначению терапии, выбор которой должен осуществляться после комплексного анализа морфологических параметров заболевания и состояния пациента [Ji D. et al., 2022]. Кроме того, низкая распространенность данного заболевания диктует необходимость согласованного междисциплинарного взаимодействия эндокринологов, хирургов, патоморфологов и химиотерапевтов. Молекулярно-генетические исследования АКР, вероятно, позволят углубить понимание патогенеза и биологического поведения этой опухоли, будут способствовать совершенствованию диагностики и персонализированного подхода к ведению пациентов.

1.6.2. Предикторы ответа на иммунотерапию

На сегодняшний день иммунотерапия рассматривается в качестве достаточно универсального метода лечения ЗНО. В частности, разработка группы препаратов-ингибиторов иммунных контрольных точек - позволила повысить клиническую эффективность противоопухолевой терапии, в том числе в отношении ряда ранее неизлечимых онкологических заболеваний [Боголюбова А.В. и др., 2015; De Filpo G. et al., 2021; Faron M. et al., 2022]. Однако, у значительной части пациентов не наблюдается ответа на данный вид лечения [Ribas A., Wolchok J.D., 2018].

Опухоли эндокринных желез и, в частности, АКТ, обычно вызывают слабый иммунный ответ. Это связано с низкой экспрессией PD-L1, зарегистрированной всего в 10% случаев АКТ, низким уровнем мутаций у большинства пациентов, а также наличием MSI-H менее, чем у 5% пациентов [Georgantzoglou N. et al., 2021].

Эффективность иммунотерапевтических препаратов может существенно различаться в зависимости от статуса экспрессии рецепторов в клетках опухоли и наличия микросателлитной нестабильности [Порубаева Э.Э. и др., 2022]. В то время как первое крупное исследование, в рамках которого оценивалась эффективность авелумаба у пациентов с распространенным АКТ, продемонстрировало крайне низкую частоту объективных ответов (6%) и медиану безрецидивной выживаемости (2,6 месяца), в последующих исследованиях пембролизумаба были получены более обнадеживающие результаты [Le Tourneau C. et al., 2018; Raj N. et al., 2020]. В исследование было включено 39 пациентов с распространенным АКТ, получавших пембролизумаб в стандартной дозе 200 мг/сут в течение 21 дня [Raj N. et al., 2020]. Частота объективных ответов составила 23% (95%-ный доверительный интервал (ДИ) 11-39) и частота достижения стабилизации заболевания – 52% (95% ДИ 33–69), что значительно выше, чем в

исследованиях авелумаба. Однако медиана безрецидивной выживаемости была довольно низкой и составила 2,1 месяц (95% ДИ 2–10,7), медиана средней длительности ответа – 4,1 месяца, общая выживаемость – 24,9 месяца. При этом ответ на терапию не коррелировал с экспрессией PD-L1 или микросателлитной нестабильностью/ дефицитом репарации несоответствия ДНК. В исследовании Habra M.A. et al. (2019) в качестве первичной конечной точки при применении пембролизумаба рассматривалось отсутствие прогрессирования на 27 неделе после начала терапии, ее достижение было отмечено у 36% (95% ДИ 13–65) пациентов, частота достижения стабилизации заболевания составила 56%.

Ниволумаб продемонстрировал лишь умеренную активность у 10 пациентов (многоцентровое исследование, II фаза) с медианой выживаемости без прогрессирования, составившей менее 2 месяцев [Carneiro V.A. et al., 2019].

На сегодняшний день в отношении АКР практически не разработан вопрос наличия и субпопуляционного состава иммунного инфильтрата, являющегося одним из прогностических факторов для ряда других опухолей человека [Fridman W.H. et al., 2012; Planchezhian M. et al., 2022; MacKinney E.C. et al., 2022; Mochizuki T. et al., 2017]. Клетки иммунной системы составляют важную часть микроокружения опухоли. Различные популяции иммунных клеток могут оказывать диаметрально противоположное влияние на рост и прогрессию злокачественного новообразования. Так, M1- макрофаги, Th1-цитотоксические Т-лимфоциты и зрелые дендритные клетки обладают противоопухолевой активностью, тогда как другие субпопуляции, например, M2-макрофаги, регуляторные Т-клетки и незрелые дендритные клетки обладают протуморогенной активностью [Fridman W.H. et al., 2011; Lu Q. et al., 2023; Subramanian C., Cohen M.S., 2022]. В то же время опухолевые клетки могут ингибировать направленный иммунный ответ, используя различные механизмы. Одним из таких механизмов является передача ингибирующего сигнала от рецепторов CTLA4 или PD1, экспрессируемых на поверхности

CD8⁺ Т-лимфоцитов, что вызывает анергию опухоль-специфических клонов и подавление противоопухолевого иммунного ответа [Bogolyubova A.V. et al., 2015; Peng Y. et al., 2020; Solak M. et al., 2021].

Детальный анализ иммунного инфильтрата АКР ранее не проводился. В то же время существует несколько работ, результаты которых показали присутствие иммунных клеток в строме данной опухоли. Так, в работе Thorsson V. et al. (2018) путем биоинформатического анализа был охарактеризован иммунный инфильтрат всех случаев опухолей, представленных в экспрессионной базе данных TCGA. В зависимости от совокупности иммунных сигнатур эти случаи делились на шесть подтипов. Среди проанализированных проб был 91 случай АКР, однако детальная характеристика иммунного инфильтрата была проведена для 78 случаев АКР. Большая часть проб АКР (49 из 78, 63%) была отнесена к четвертому подтипу, характеризующемуся малым количеством опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток. Тем не менее, 29% случаев (23 из 78) были отнесены авторами к третьему, так называемому воспалительному подтипу, отличительным признаком которого является повышенный уровень иммунных клеток в строме опухоли. Из этого следует, что АКР является гетерогенной группой опухолей в контексте состава иммунного инфильтрата.

Liu S. et al. (2018), выполнив биоинформатический анализ 92 проб АКР из базы данных TCGA, показали, что экспрессия бета-катенина 1 (CTNNB1), сверхэкспрессированного в опухолях коры надпочечников, коррелирует со снижением иммунного ответа (уменьшенным количеством опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, снижением CD8⁺ Т-клеток и увеличением В-клеток). Кроме того, экспрессия CTNNB1 была обратно пропорциональна экспрессии PD-L1. В то же время повышенная экспрессия PD-L1 коррелировала с лучшими показателями общей выживаемости пациентов.

В исследовании Fay A.P. et al. (2015) было проведено иммуногистохимическое окрашивание 28 случаев АКР антителами против CD45 и PD-L1, при этом установлено, что в трех случаях окрашивание PD-L1

наблюдалось на опухолевых клетках, в то время как у 19 пациентов наблюдалось окрашивание иммуноцитов антителами PD-L1 и CD45.

В работе Jiang A. et al. (2020) был выполнен анализ опухолюинфильтрирующих клеток препаратов метастатического АКР из базы данных TCGA на основании алгоритма CIBERSORT. Было установлено, что некоторые субпопуляции иммунных клеток (такие как В-клетки памяти и CD4+ Т-клетки памяти) могут рассматриваться в качестве независимых предикторов прогноза для пациентов с данным заболеванием. Li X. et al. (2020) продемонстрировали, что низкий уровень показателя «immune score», оцененного при помощи алгоритма ESTIMATE, ассоциировался с худшей выживаемостью пациентов с АКР из когорты TCGA. Впоследствии в исследовании Tian X. et al. (2020) была обнаружена положительная корреляция между количеством опухолю-инфильтрирующих тучных клеток и исходом заболевания у пациентов из когорты TCGA. Эти наблюдения были подтверждены данными Baechle J.J. et al. (2022).

Еще одним потенциальным предиктором выживаемости и терапевтической мишенью в АКР является иммунологическая контрольная точка CD276 (B7-H3) (трансмембранный гликопротеин типа I), для которой продемонстрирована взаимосвязь с выраженностью инвазии и ЭМТ [Alshabi A.M. et al., 2019; Liang J. et al., 2018], а также участие в негативной регуляции клеточного иммунного ответа [Пачуашвили Н.В. и др., 2022; Castellanos J.R. et al., 2017; Suh W.K. et al., 2003]. Предполагается, что CD276 (B7-H3) имеет важное значение в микроокружении опухоли и регуляции противоопухолевого иммунитета. В работе Liang J. et al. (2020) впервые была изучена взаимосвязь различных паттернов экспрессии данного маркера и клинических характеристик пациентов с АКР. В результате наблюдалась позитивная реакция на окрашивание с антителами к CD276 (B7-H3) в тканях АКР, включая опухолевые клетки и сосуды, усиленная экспрессия в случаях АКР с более агрессивным течением (поздние Т и ENSAT стадии), при этом выраженность экспрессии маркера коррелировала с уровнем ОБ пациентов.

При этом прогностическое значение данного параметра сохранялось и в мультивариантом анализе.

Таким образом, вопросы об ассоциации клинических характеристик АКР со степенью иммунной инфильтрации опухолей, а также о прогностическом потенциале последней остаются малоизученными и требует дальнейшей разработки. Более того, во всех вышеописанных исследованиях не производилась дифференцировка АКР по гистологическим вариантам. Большинство исследований опухоль-инфильтрирующих клеток, произведенных на основе результатов секвенирования РНК, рассматривают весь набор данных TCGA или же фокусируются только на одном из типов онкологического заболевания. Однако, следует учитывать, что в опухоли присутствует несколько гистологических подтипов, которые нередко различаются не только по морфологическим характеристикам собственно опухолевых клеток, но и по составу опухоль-инфильтрирующих клеток. Соответственно, при анализе случаев опухоли определенной локализации в одном наборе данных взаимосвязь между опухолевым микроокружением и, например, выживаемостью пациентов, может быть неверно интерпретирована.

1.6.3. Single-cell анализ в иммунотерапии опухолей

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 исследований, проведенных с использованием технологий single-cell [Gibellini L. et al., 2020].

Современные технологии single-cell анализа охватывают широкий спектр быстро развивающихся методов и представляют собой инструмент для исследования опухолей, позволяющий охарактеризовать их клеточный и

молекулярный состав [Gibellini L. et al., 2020; Muzzi J.C.D. et al., 2021]. В то время как традиционные технологии ограничены усредненным сигналом, часто отражающим молекулярное состояние наиболее многочисленных популяций клеток, single-cell анализ позволяет оценить гетерогенность опухоли на молекулярном уровне и определить клеточный состав ее микроокружения. Комплексное профилирование предоставляет возможность анализа типов клеток и молекулярных путей, обеспечивающих функционирование противоопухолевых механизмов, а также уклонение от иммунной системы. Кроме того, современные методы пространственной транскриптомики и протеомики сохраняют архитектуру ткани, что позволяет детально анализировать межклеточные взаимодействия [Davis-Marcisak E.F. et al., 2021; Shen C., Wang Y., 2023]. Углубленное понимание разнообразия состава иммунных клеток и сигнальных путей, связанных с изменениями состояний клеток в процессе терапии, потенциально может способствовать идентификации предикторов ответа и обнаружению новых терапевтических мишеней для преодоления резистентности опухоли к иммунотерапии [Huang Y.G. et al., 2022].

На рисунке 1.11 представлены наиболее распространенные технологии single-cell анализа.

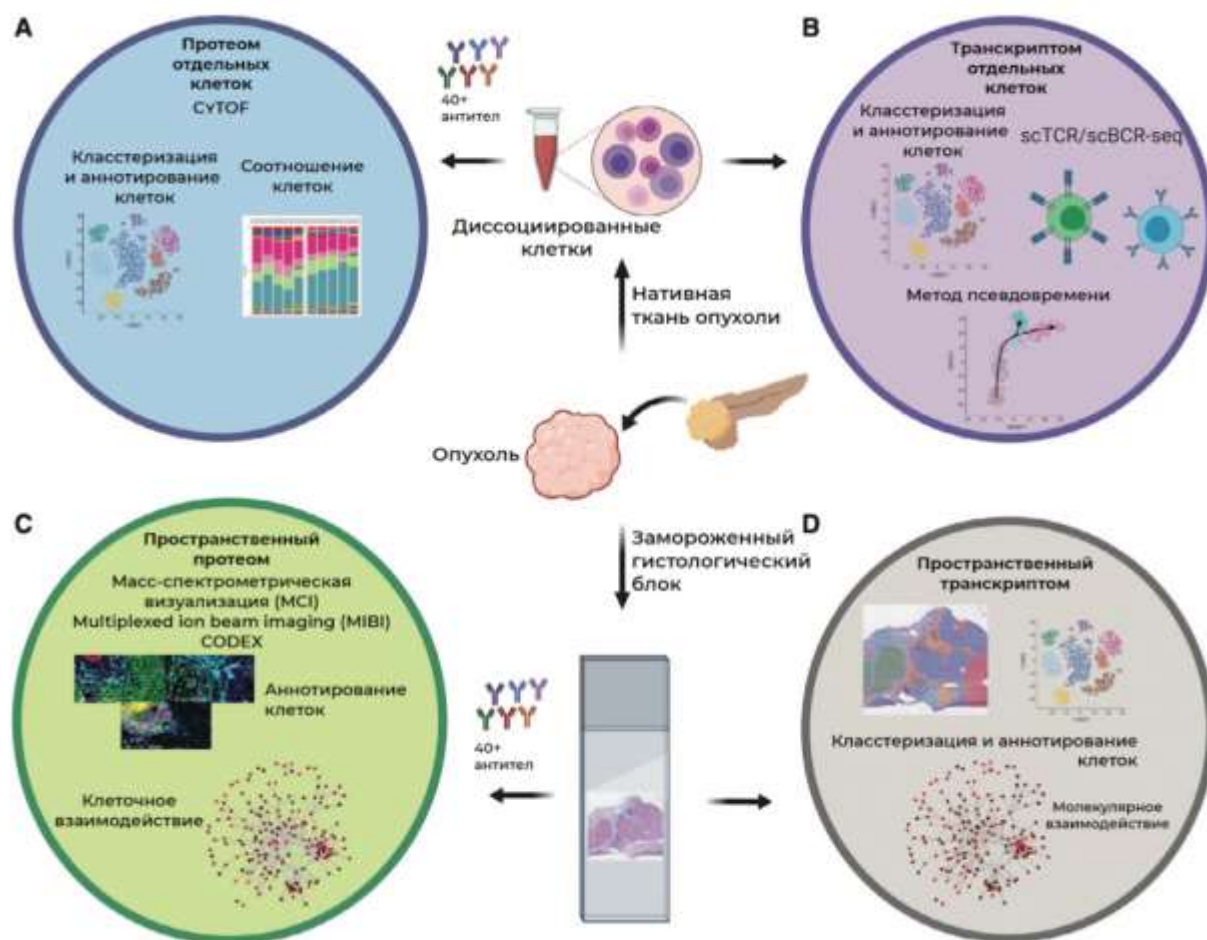


Рисунок 1.11 – Подходы к анализу транскриптома и протеома для понимания клеточного состава и межклеточных взаимодействий в опухоли. Выбор подхода зависит от доступности образцов, условий хранения и целей исследования [Davis-Marcisak E.F. et al., 2021].

А. Протеомика отдельных клеток (CyTOF) позволяет получить информацию о клеточном составе и состоянии отдельных клеток в опухоли.

В. Транскриптомика отдельных клеток позволяет проводить такой же анализ, но её геномный охват может обеспечить предсказание траектории развития клеток и репертуара Т- и В-клеток. Для корреляции состава клеток и их состояния с взаимодействием клеток пространственные технологии более информативны, чем анализ суспензии отдельных клеток.
scTCR/scBCR-seq: секвенирование рецепторов Т- и В- клеток.

С. С помощью пространственной протеомики и работе с отдельными клетками можно идентифицировать отдельные варианты клеток и определить специфические межклеточные взаимодействия.

Д. Несмотря на отсутствие возможности работы с отдельными клетками, пространственная транскриптомика может предсказать клеточные взаимодействия на основе молекулярной экспрессии рецепторов и лигандов между соседними клетками и обнаружить основные онкогенные пути в различных клеточных нишах, поскольку она не ограничена ранее выбранными маркерами

Каждая из этих технологий обеспечивает идентификацию молекулярного профиля единичных клеток, которые могут быть отсортированы в процессе анализа данных в отдельные клеточные популяции [Davis-Marcisak E.F. et al., 2021]. Single-cell анализ позволяет добиться более точной идентификации типов клеток, изменений клеточного состояния, а также проанализировать взаимосвязи молекулярных путей.

Важно учитывать, что выводы, полученные в результате использования данных технологий, зависят от дизайна исследования, подготовки образцов и методов анализа, выбранных для профилирования. В связи с быстрым развитием методов single-cell некоторые инструменты компьютерного анализа, позволяющие интерпретировать полученные данные, всё ещё находятся в стадии разработки. По мере распространения этих технологий интерпретация их результатов и клиническое применение будут расширяться на основе использования методов вычислительного анализа. На данном этапе существует необходимость разработки дополнительных вычислительных технологий для изучения путей, которые связаны с поведением каждого отдельного типа клеток и определяют внутри- и межклеточные взаимодействия. Так, очень перспективным направлением является single-cell анализ доклинических моделей и образцов человеческих тканей в процессе иммунотерапии (Рисунок 1.12) [Davis-Marcisak E.F. et al., 2021].

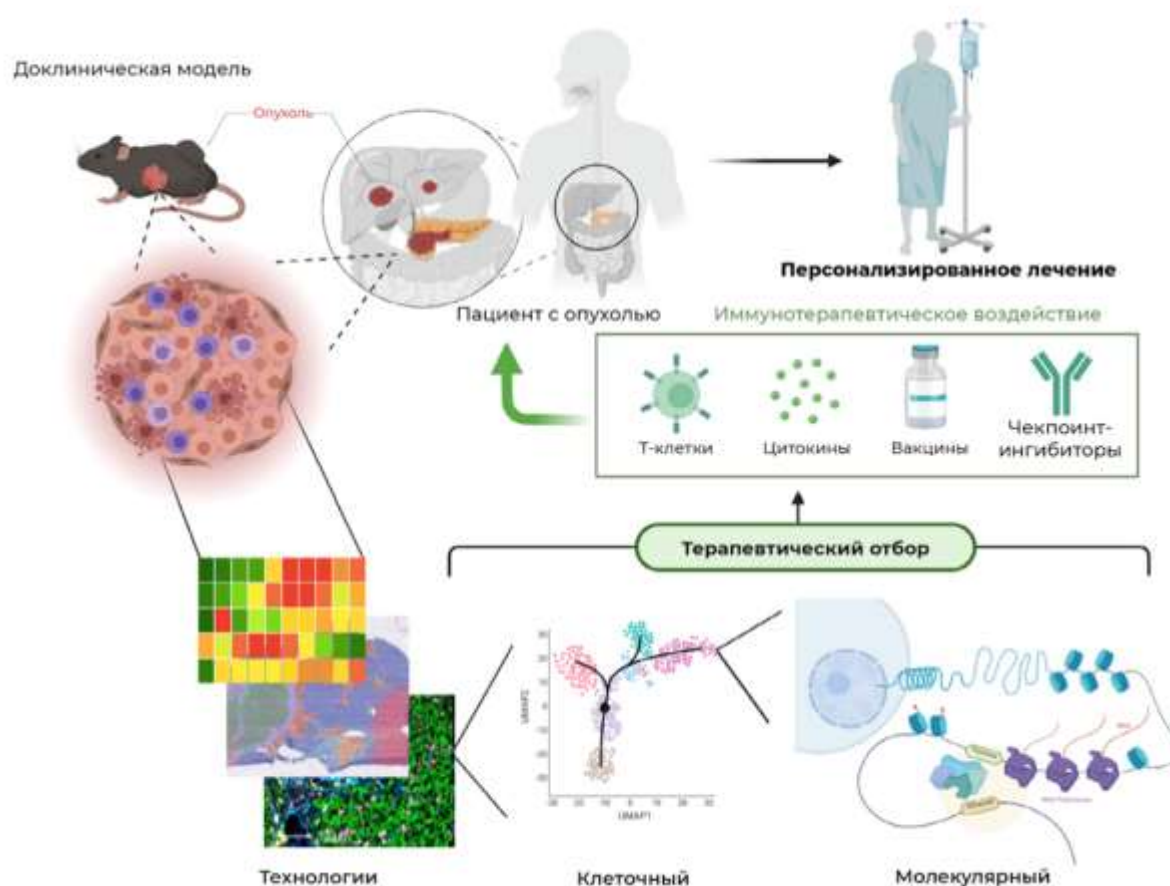


Рисунок 1.12 – Подход к исследованиям «от животного к человеку» с использованием высокоразрешающего анализа позволит создать следующее поколение противоопухолевых иммунотерапевтических средств

Применение методов Single-cell и пространственных технологий позволяет изучать типы клеток, которые обычно являются мишенью для иммунотерапии в доклинических моделях и в опухолях человека [Manso J., Pezzani R., 2019]. После определения общих свойств моделей проводятся исследования, направленные на выявление молекулярных и клеточных маркеров ответа с использованием мультиомных подходов. Сочетание различных уровней данных будет способствовать отбору пациентов для наиболее подходящей терапии, улучшению дизайна клинических исследований и разработке новых мишеней для иммунотерапии.

Таким образом, взаимодействие между опухолью и иммунной системой обеспечивается сложными механизмами, основную роль в которых играют злокачественные клетки, опухолевый инфильтрат, строма опухоли и сосудистая сеть, а также системные факторы. Гетерогенность внутриопухолевых иммунных клеток продолжает изучаться с помощью традиционных подходов. Применение технологий single-cell будет вызывать стремительное увеличение объемов новой научной информации и способствовать повышению эффективности трансляционных клинических исследований благодаря выявлению потенциальных биомаркеров. Данные, полученные с помощью этих новейших технологий, позволят выявить ключевые признаки ответа на иммунную терапию, что в свою очередь будут способствовать разработке методов персонализированной терапии, в том числе АКР.

Однако для того, чтобы сделать весь массив данных доступным для научного сообщества, необходимо усовершенствовать способы анализа данных. Высокая чувствительность single-cell технологий требует достаточного внимания к постановке и проведению экспериментов, крайне осторожного обращения с клетками во время предварительной обработки и адекватного анализа данных с помощью мощных биоинформационных инструментов [Xu F. et al., 2021]. Также необходимо проведение детальных исследований функций различных типов иммунных клеток в микроокружении опухоли. Понимание роли истощения и/или дисфункции Т-клеток опухолевого микроокружения и трансляция этих знаний в клиническую практику является важнейшей задачей борьбы с онкологическими заболеваниями [Davis-Marcisak E.F. et al., 2021; Ruggiero C. et al., 2022].

Таким образом, в настоящее время технологии single-cell анализа в первую очередь служат инструментом профилирования для создания новых гипотез об опухолевом микроокружении, мишенях терапии и предикторах ответа опухоли на лечение. В то же время молекулярные инструменты разработаны недостаточно и не являются широкодоступными, поэтому

сопоставление результатов применения этих технологий с данными, полученными в ходе использования традиционных методов исследований, остается важнейшим необходимым условием интеграции результатов single-cell анализа в существующие стратегии лечения.

1.6.4. Предикторы ответа на лечение аналогами соматостатиновых рецепторов

В нескольких исследованиях показано, что клетки АКР экспрессируют рецепторы соматостатина и могут представлять мишень для его синтетических аналогов, расширяя терапевтические возможности в отношении распространенного АКР [Mariniello B. et al., 2011; Germano A. et al., 2017].

Рецепторы к соматостатину (SSTR 1–5 подтипов) – это семейство G-белок-сопряженных рецепторов, посредством которых соматостатин реализует свои биологические эффекты в организме. Рецепторы соматостатина присутствуют во многих опухолевых клетках, секретирующих гормоны, однако наиболее часто избыточная экспрессия соматостатиновых рецепторов определяется на поверхности клеток нейроэндокринных опухолей [Коломейцева А.А. и др., 2018; Sada A. et al., 2020]. Синтетические аналоги соматостатина взаимодействуют с различными подтипами рецепторов, подавляют избыточную секрецию гормонов, оказывают антипролиферативный эффект, тормозят ангиогенез, индуцируют апоптоз клеток опухоли [Kolomeytseva A.A. et al., 2018; Pereira S.S. et al., 2018]. По мнению ряда авторов, определение иммунореактивности SSTR2A и SSTR 5 в опухолевой ткани пациентов с АКР, а также изучение эффективности применения пролонгированных аналогов соматостатина в лечении пациентов с распространенным АКР и позитивным статусом SSTR2A и SSTR5 в опухоли

является перспективным направлением [Kolomeytseva A.A. et al., 2018; Mariniello B. et al., 2011; Germano A. et al., 2017]. Однако необходимы дальнейшие исследования на большей выборке пациентов, которые позволят определить место этой группы препаратов в терапии пациентов с АКР, а также контингента пациентов, которым целесообразно проводить иммуногистохимическое исследование с антителами к рецепторам соматостатина.

1.6.5. Другие перспективные стратегии терапии аденокортикального рака

Одной из потенциально перспективных стратегий лечения АКР является воздействие на ось IGF-2, поскольку, как было отмечено выше, этот фактор роста играет важную роль в пролиферации и распространении опухолевых клеток при АКР [Fassnacht M. et al., 2015]. IGF-2 обуславливает активацию IGF-1R и инсулинового рецептора. Ингибиторы IGF-R1 в I фазе клинического исследования показали высокую противоопухолевую активность. Эффективность линситиниба, специфического ингибитора IGF-R1 и рецептора инсулина, была изучена в клиническом исследовании, в которое были включены 139 пациентов с прогрессирующим АКР, получавших стандартную химиотерапию. Нежелательные явления регистрировались редко, менее чем в 5% случаев, и в основном были представлены повышением утомляемости, тошнотой и гипергликемией. Однако исследование пришлось прервать довольно рано, поскольку не было получено статистически значимых различий по показателям конечных точек: ОВ и ВБП. Общая выживаемость при применении линситиниба составила в среднем 323 дня и для плацебо – 356 дней, отношение шансов (ОШ) = 0,94. Было отмечено, что концентрация митотана не оказывала фармакокинетического действия на линситиниб.

Авторы предположили, что для использования препаратов подобных групп необходимо более детальное изучение генетического профиля пациентов.

Использование ингибиторов mTOR также представляет определенный интерес, в недавних исследованиях *in vitro* подтверждено их аддитивное действие в комбинации с линситинибом [De Martino M.C. et al., 2019].

Действие моноклонального тела, антагониста IGF-R1 циксутумумаба в сочетании с темсиролимусом изучалось в I фазе когортного исследования, включавшего 26 пациентов. Использование данной комбинации привело к стабилизации заболевания на срок более, шести месяцев в 42% случаев [Naing A. et al., 2013]. Также действие циксутумумаба в сочетании с митотаном оценивалось в терапии пациентов с нерезектабельной рецидивирующей АКР и метастатическим поражением [Lerario A.M. et al., 2014]. Стабилизация заболевания была достигнута у 8 из 20 пациентов, однако медиана БРВ составила 6 недель.

Некоторые авторы исследовали эффективность монотерапии ингибиторами mTOR эверолимусом, сиролимусом и темсиролимусом, поскольку известно, что сигнальный путь mTOR является известным регулятором инсулиноподобных факторов роста. Однако на сегодняшний день в литературе имеются ограниченные о результатах этих исследований [De Martino M.C. et al., 2019; Fraenkel M. et al., 2013].

Еще одним ЛС, заслуживающим внимания, является кабозантиниб, ингибитор VEGFR2, MET и RET. Опубликованы результаты ретроспективного исследования, включающего 16 пациентов, получавших митотан и в дальнейшем продолжавших системную терапию кабозантинибом [Kroiss M. et al., 2020]. Частота объективных ответов составила 19%, частота достижения стабилизации заболевания – 50% и, что важно, концентрация митотана в сыворотке крови была ниже пороговых значений у всех пациентов (все пациенты прекратили прием препарата, 6 из 16 пациентов не принимали митотан >12 месяцев). Полученные результаты позволили перейти к II фазе исследования, важным критерием включения в которое является прекращение

приема митотана во избежание нежелательных фармакокинетических взаимодействий. Также у пациентов с АКР исследовался эффект ингибирования EGFR и VEGFR в сочетании с иммунотерапией или классической цитостатической терапией, однако ни один из вариантов лечения не продемонстрировал высоких результатов [Stigliano A. et al., 2017].

Были изучены и другие варианты таргетной терапии, включая оценку эффективности других таких препаратов, как сорафениб, ленватиниб, акситиниб, нилотиниб, фигутумумаб, как в виде монотерапии, так и комбинации (например, с иммунотерапией) [Altieri B. et al., 2020; Ardolino L. et al., 2020; Paragliola R.M. et al., 2020; Pegna G.J. et al., 2021].

До сих пор остаются неизученными терапевтические опции, включающие воздействие на сигнальные пути Wnt/бета-катенина; фактор транскрипции SF-1; ACAT1, на пути метаболизма эстрогенов, ингибиторы FGR [Stigliano A. et al., 2017; Altieri B. et al., 2016].

Заключение по главе 1

Проведенный анализ литературных данных свидетельствует, что накопленный в последние десятилетия биологами, клиницистами и патоморфологами большой объем знаний о клиническом течении и исходах, морфологической характеристике и молекулярном патогенезе АКР позволяет рассматривать эту опухоль в качестве гетерогенной группы заболеваний с различными демографическими характеристиками, клинической манифестацией, патоморфологическими и геномными особенностями, биологическим поведением и прогнозом для пациента. Установление диагноза АКР требует морфологического и иммуногистохимического подтверждения адренокортикального гистогенеза и злокачественного потенциала опухоли, которое обычно основывается на мультипараметрических алгоритмах и

результатах иммуногистохимического исследования. Тем не менее, многие вопросы дифференциальной диагностики, лечения и прогнозирования остаются до настоящего времени не решенными окончательно.

Во-первых, несмотря на предложенные диагностические алгоритмы и панель для иммуногистохимического исследования, дифференциальная диагностика карцином и аденом по-прежнему остается затруднена из-за отсутствия единого маркера, указывающего на злокачественный характер новообразования. Кроме того, на данном этапе ни одна из принятых многофакторных алгоритмов/балльных систем не была признана чувствительной или специфичной для всех клинических ситуаций.

Во-вторых, крайне важное значение ввиду морфологической неоднородности данной опухоли имеет определение гистологического подтипа. Тем не менее, к настоящему времени все еще не существует четких морфологических критериев для выделения вышеописанных вариантов АКР.

В-третьих, несмотря на высокоагрессивное биологическое и клиническое поведение АКР, в некоторых случаях заболевание ассоциируется с длительной безрецидивной и общей выживаемостью. Молекулярная и иммуногистохимическая гетерогенность различных вариантов АКР обуславливают необходимость индивидуального подхода к определению прогноза для пациента и особенностей биологического поведения опухоли. В настоящее время совершенствование геномных технологий способствовало разработке новых молекулярных классификаций АКР и выделению подгрупп пациентов с различными показателями выживаемости. Ряд новых иммуногистохимических и молекулярных маркеров, обладающих прогностическим потенциалом, находятся на стадии экспериментальных исследований или не валидированы пока на больших выборках. При этом анализ транскриптома и другие молекулярные инструменты все еще не являются широкодоступными, что свидетельствует о важности и необходимости использования рутинных маркеров для прогностической стратификации при рассматриваемой опухоли. Вместе с тем отсутствуют

систематизированные данные о маркерах, используемых в рутинной клинической практике. В ряде работ были идентифицированы клинко-патологические факторы, ассоциированные с повышенным риском рецидива и смерти при АКР, однако в некоторых случаях данные противоречивы и не систематизированы, отсутствует консенсус о том, какие именно параметры являются ключевыми, не существует единой общепринятой прогностической системы, не определен оптимальный подход к стратификации пациентов с этим заболеванием.

В-четвертых, в настоящее время отсутствует единое мнение о роли характеристик иммунореактивности как потенциальных предикторов клинического ответа на терапию АКР. Особенности этой опухоли требуют разработки персонифицированного подхода к назначению терапии, выбор которой должен осуществляться на основании данных комплексного анализа иммунологических показателей, морфологических параметров и состояния пациента.

В-пятых, вопрос об ассоциации клинических характеристик АКР со степенью иммунной инфильтрации опухолей, а также прогностическом потенциале последней остается малоизученным и требует дальнейшей разработки. Большинство исследований опухоль-инфильтрирующих клеток на основе данных секвенирования РНК рассматривают весь набор данных TCGA или же фокусируются только на одном из типов онкологического заболевания. При этом не учитываются гистологические подтипы опухоли, которые часто различаются не только по морфологическим характеристикам самих опухолевых клеток, но и по составу опухоль-инфильтрирующих клеток. Соответственно, при анализе случаев опухоли определенной локализации в одном наборе данных взаимосвязь между опухолевым микроокружением и, например, выживаемостью пациентов, может быть неверно интерпретирована.

В-шестых, актуальной представляется интеграция результатов применения новейших технологий, например, single-cell анализа, в

используемые в клинической практике стратегии лечения АКР и их сопоставление с результатами использования традиционных методов исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. 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 Москвы: ГKB 50 им. С.И. Спасокукоцкого ДЗМ, Первая Градская больница им. Н.И. Пирогова, НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина, МНИОИ им. П.А. Герцена, ГКГ МВД России, СМ-клиника, Сеченовский Университет, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, ГKB имени В. П. Демихова ДЗМ, НМИЦ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России, НМХЦ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ГKB им. Ф.И. Иноземцева, ГKB №52 ДЗМ, МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ, Клиническая больница № 83 ФМБА России, МГОб № 62 ДЗМ, ГKB им. С.П. Боткина ДЗМ, ГKB №40 ДЗМ, а также Санкт-Петербурга, Красноярска, Читы, Томска, Чебоксар, Волгограда, Киева.

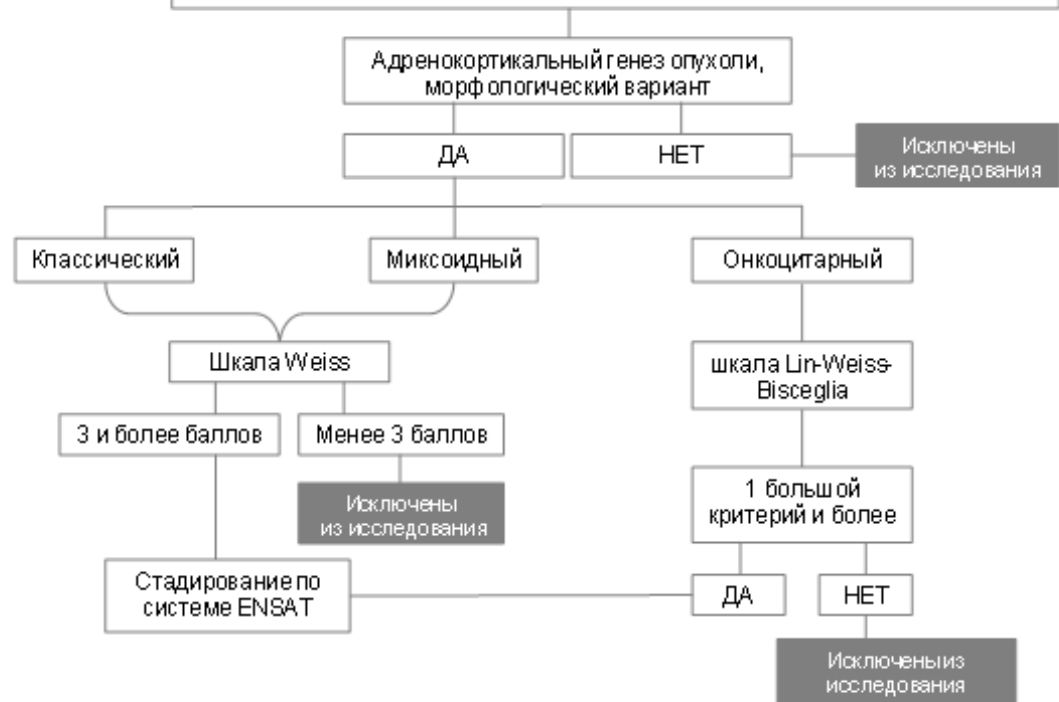
Создание Референс-центра патоморфологических, иммуногистохимических и лучевых методов исследования на базе НМИЦ эндокринологии Минздрава России в 2019 году позволило нам создать регистр пациентов с этим крайне редким заболеванием и собрать уникальную коллекцию клинических и патоморфологических данных пациентов не только из Москвы, но и из других регионов Российской Федерации.

Данное исследование включало 7 этапов (Рисунок 2.1).

Пациенты с адренокортикальным раком (АКР), получившие лечение в НМИЦ эндокринологии Минздрава России, а также консультативный операционный материал пациентов из других лечебных учреждений (n = 73)

ЭТАП 1. Сбор клинико-анамнестических данных пациентов после оперативного лечения или после обращения для консультации операционного материала из другого лечебного учреждения

ЭТАП 2. Морфологическая диагностика АКР с подробным описанием морфологического подтипа и других гистологических особенностей



ЭТАП 3. Создание регистра пациентов с АКР

Анализ доступных клинических данных, включающих результаты гормонального и инструментального обследования

Определение статуса заболевания

Определение общей (ОВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости

ЭТАП 4. Определение экспрессии иммуногистохимических маркеров:

Диагностическое значение SF-1, Inhibin A, Melan A, p53, антимитохондриальные антитела

Маркеры пролиферативной активности Ki67, фосфоистон 3

Предикторы эффективности митотана RRM1, цитохром P4502W1, SOAT1

Предикторы эффективности ингибиторов соматостатина Соматостатиновые рецепторы 2 и 5 подтипов

Предикторы эффективности иммунотерапии Ингибитор контрольных точек PDL1, CD45, CD3, CD4, CD8, CD68

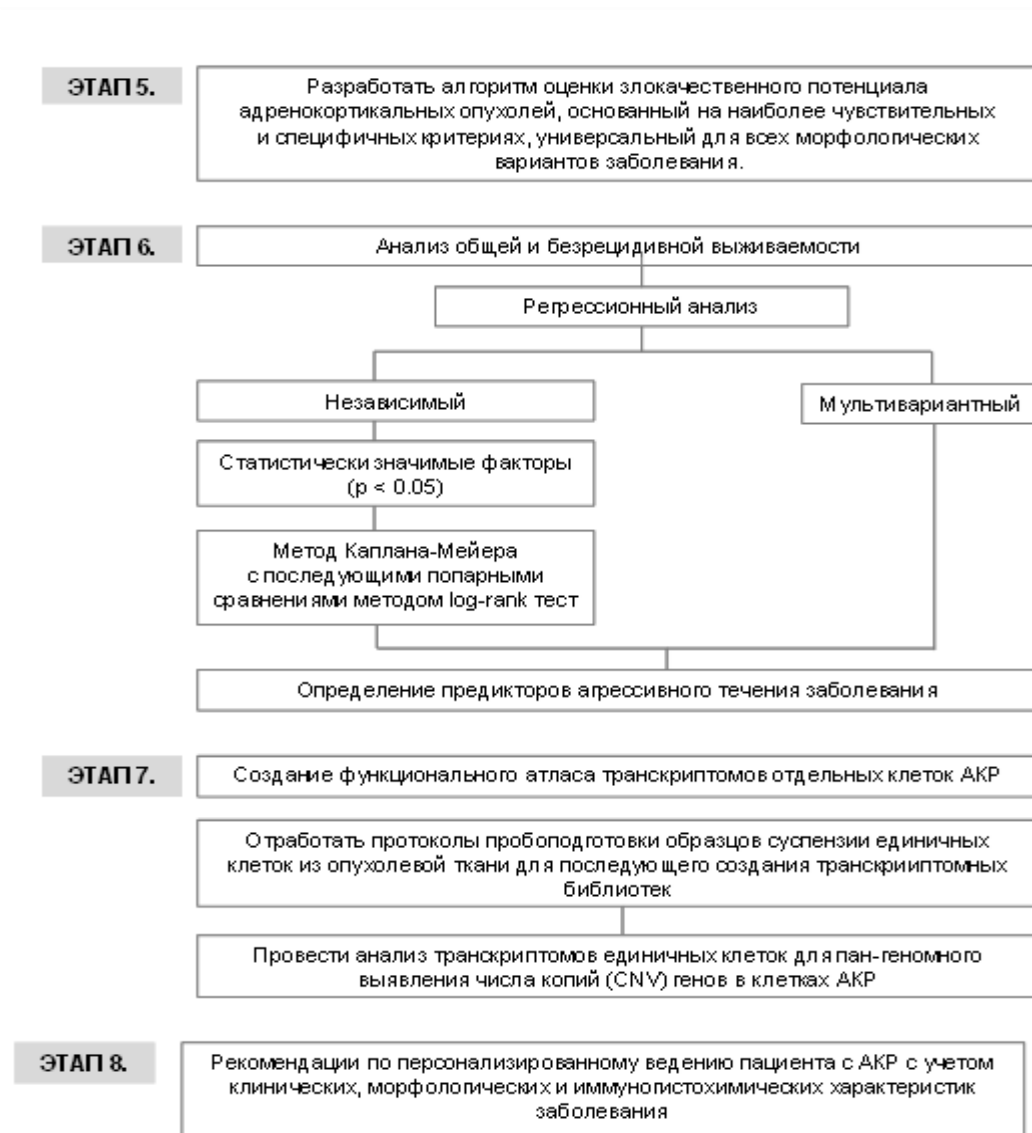


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

На *первом этапе* осуществили сбор клинико-анамнестических данных пациентов после оперативного лечения или после обращения для консультации операционного материала из другого лечебного учреждения.

На следующем этапе исследования (*втором*) были проанализированы доступные клинические данные, включающие результаты гормонального и инструментального обследования, и определение статуса заболевания, безрецидивной и общей выживаемости.

Задачей *третьего этапа* стала диагностика морфологических вариантов АКР с подробным описанием их гистологических особенностей.

На *четвертом этапе* была определена экспрессия иммуногистохимических маркеров (SF-1, Inhibin A, Melan A, Ki67, p53, Антимитохондриальные антитела, фосфогистон 3, RRM1, цитохром P4502W1, SOAT1, соматостатиновые рецепторы 2 и 5 подтипов, ингибитор контрольных точек PDL1, CD45, CD3, CD4, CD8, CD68).

При проведении *пятого этапа* исследования были проанализированы общая и безрецидивная выживаемость, определены предикторы агрессивного течения заболевания и эффективности консервативной терапии (адренолитическая терапия, биотерапия с использованием аналогов соматостатина и иммунотерапия).

Затем на *шестом этапе* проведенного исследования выполнены задачи первого этапа реализации проекта по созданию функционального атласа транскриптомов отдельных клеток надпочечников при норме, патологии и в эмбриональном развитии: адаптированы и отработаны протоколы подготовки суспензии клеток надпочечника, начато формирование базы транскриптомов на уровне отдельных клеток с использованием технологии секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq), спроектирована инфраструктура для хранения и обработки данных.

На *заключительном (седьмом этапе)* были разработаны рекомендации по персонализированному ведению пациента с АКР с учетом клинических, морфологических и иммуногистохимических характеристик заболевания.

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 (Хельсинский декларация) и положений рекомендаций надлежащей клинической практики (GCP - good clinical practice).

Дизайн исследования утвержден комиссией по вопросам этики какого учреждения (№ протокола).

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 невключения были:

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

2.2. Материалы исследования

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 2.2).

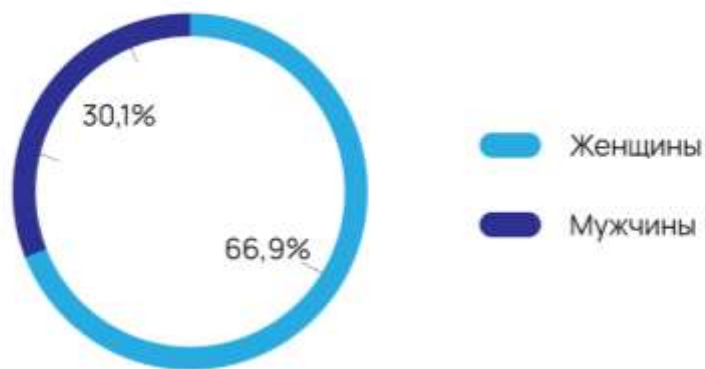


Рисунок 2.2 – Распределение обследованных больных (n=73) по полу

На Рисунке 2.3 представлено распределение обследованного контингента по возрасту.



Рисунок 2.3 – Распределение обследованных больных по возрасту (n=73)

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% (Таблица 2.1), при этом соотношение количества больных старше и младше 50 лет было примерно одинаковым (50,7% и 49,3%, соответственно).

Таблица 2.1 – Распределение обследованных по возрастным группам ($n=73$)

Возраст (года)	n	%
младше 20	3	4,1
21-30	8	11,0
31-40	15	20,5
41-50	11	15,1
51-60	23	31,5
61-70	10	13,7
71-80	2	2,7
старше 80	1	1,4

Гормональные нарушения были диагностированы у 26 обследованных пациентов (35,6%). Функциональная активность аденокортикального рака у больных нашей когорты представлены на Рисунке 2.4.



Рисунок 2.4 – Функциональная активность АКТГ у обследованных больных ($n=73$)

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 (Рисунок 2.5).



Рисунок 2.5 – Стадия АКР по системе ENSAT у обследованных больных (n=73)

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 21 см и в среднем составлял $8,5 \pm 0,53$ см (Рисунок 2.6).

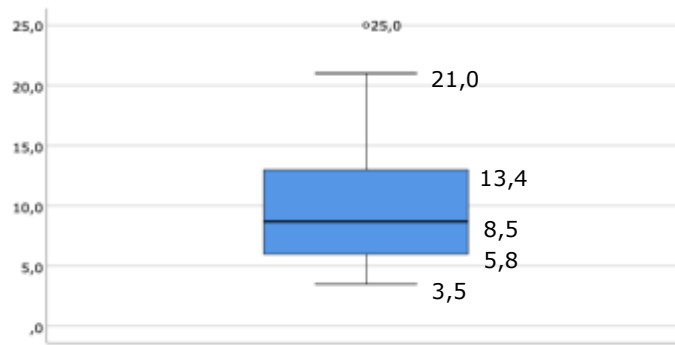


Рисунок 2.6 – Распределение размеров опухоли у обследованных больных (n=73)

Распределение обследованных пациентов по морфологическому варианту АКР представлено на Рисунке 2.7.

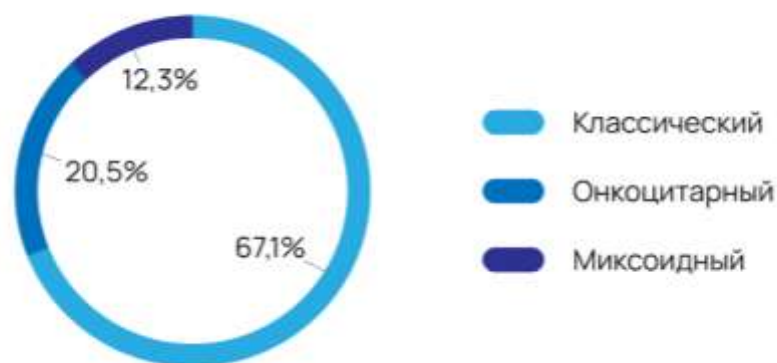


Рисунок 2.7 – Морфологический вариант опухоли у обследованных больных (n=73)

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.

Количество баллов по шкале Weiss в когорте обследованных составило от 4 до 9 (в среднем – $6,1 \pm 0,4$ баллов). Частота выявления критериев данной шкалы у обследованных пациентов представлена на Рисунке 2.8.

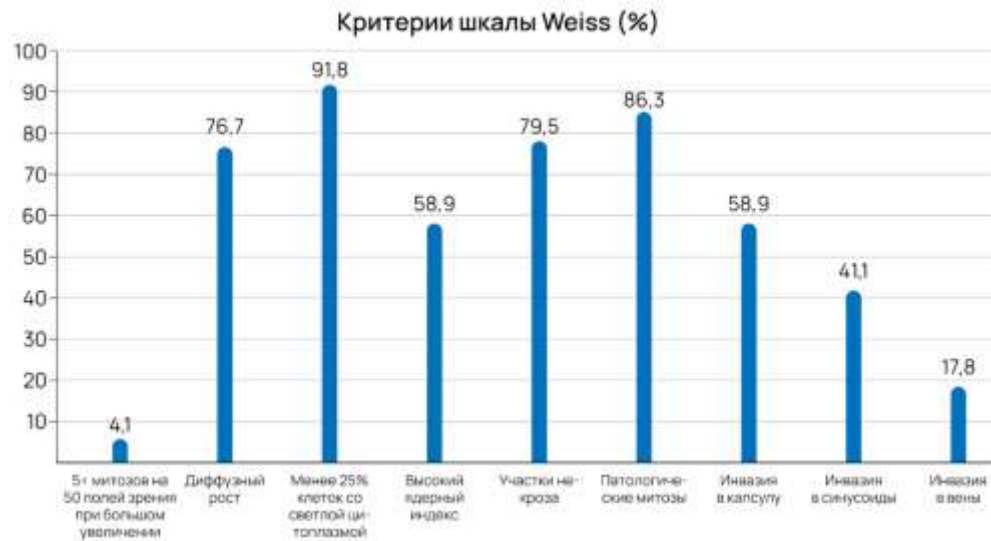


Рисунок 2.8 – Частота критериев шкалы Weiss у обследованных больных (n=73)

Инвазия АКР в вены была выявлена у 17,8% обследованных (n=13). На Рисунке 2.9 представлено распределение данного критерия у пациентов с различным морфологическим вариантом АКР. Статистически значимых различий по частоте инвазии опухоли в вены в зависимости от ее морфологического типа установлено не было (Chi-square $p = 0,08$).

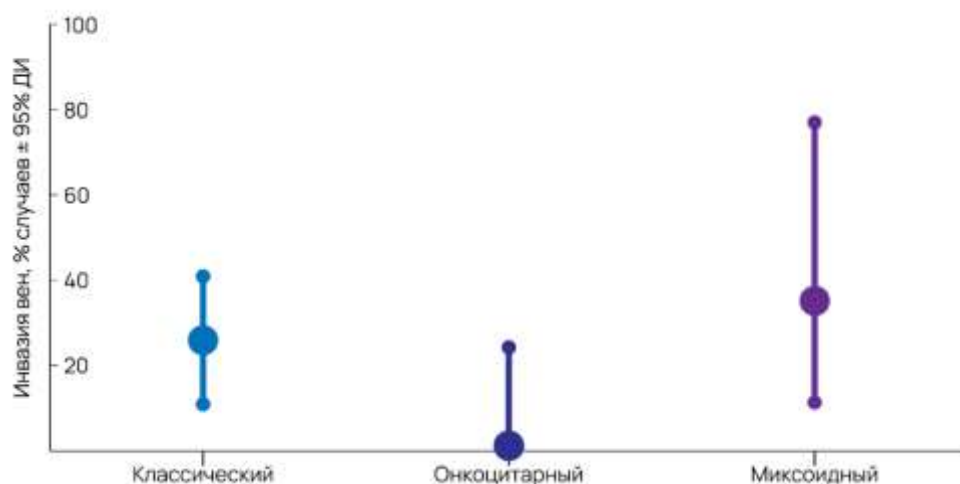


Рисунок 2.9 – Распределение частоты инвазий опухоли в вены у пациентов с различными морфологическими типами АКР

Инвазию АКР в синусоиды имели 41,1% обследованных (n=30). На Рисунке 2.10 представлено распределение данного критерия у пациентов с различным морфологическим вариантом АКР. У 50,0% пациентов с классическим типом АКР было документировано инвазию опухоли в синусоиды, что было достоверно ($\text{Chi-square } p = 0,03$) чаще в сравнении с больными с онкоцитарным типом (20,0%). У обследованных с миксоидным типом данный показатель составил 33,3%.

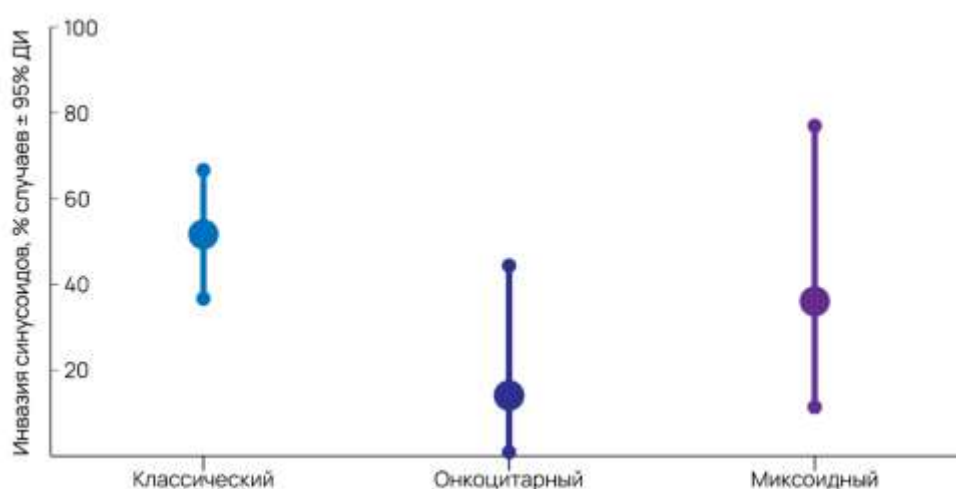


Рисунок 2.10 – Частота инвазии опухоли в синусоиды у пациентов с различными морфологическими типами АКР

Инвазия АКР в капсулу была выявлена у 58,9% обследованных (n=43). У 63 чел. (86,3%) имела место патологическая митотическая активность. На Рисунке 2.11 представлено распределение по данному критерию пациентов с различным морфологическим вариантом АКР.

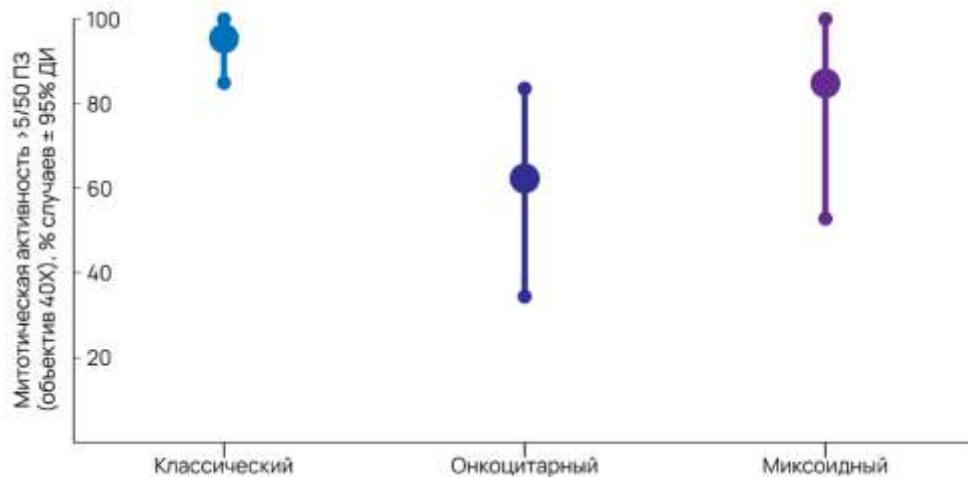


Рисунок 2.11 – Частота выявления патологических митозов у пациентов с различными морфологическими типами АКР

У 93,9% пациентов с классическим типом АКР и у 88,9% обследованных с миксоидным типом были установлены патологические митозы, значение этих показателей статистически значимо было выше ($p < 0,0001$), чем у больных с онкоцитарным типом (60,0%).

При морфологическом анализе участки некроза были выявлены у 79,5% обследованных ($n=58$). На Рисунке 2.12 представлено распределение пациентов с различным морфологическим вариантом АКР по данному критерию.

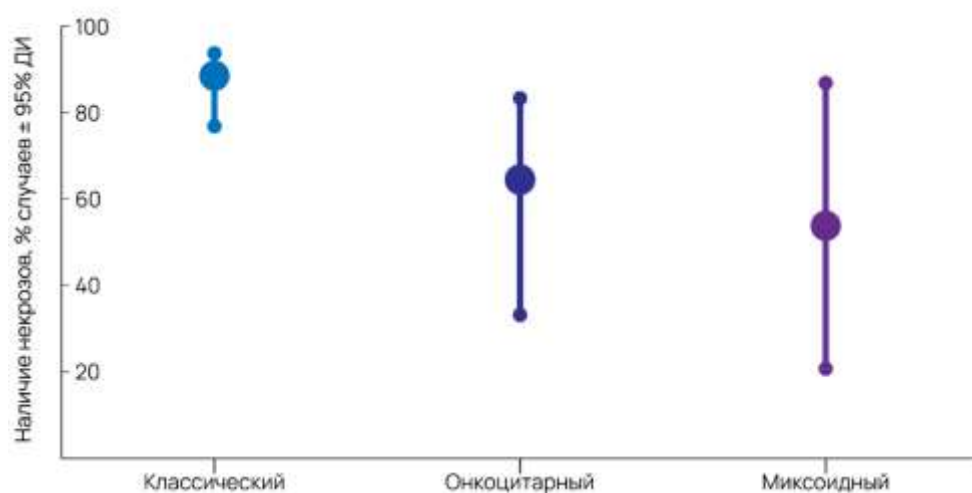


Рисунок 2.12 – Частота выявления некрозов у пациентов с различными морфологическими типами АКР

У 89,8% пациентов с классическим типом АКР было выявлено наличие некрозов, что было достоверно ($\text{Chi-square } p=0,0073$) выше значения показателя в группе больных с онкоцитарным типом (60,0%) и миксоидным типом (55,6%).

Частота обнаружения высокого ядерного индекса в когорте обследованных составляла 58,9% и достоверно не отличалась ($\text{Chi-square } p=0,064$) у пациентов с различными морфологическими типами АКР (Рисунок 2.13).

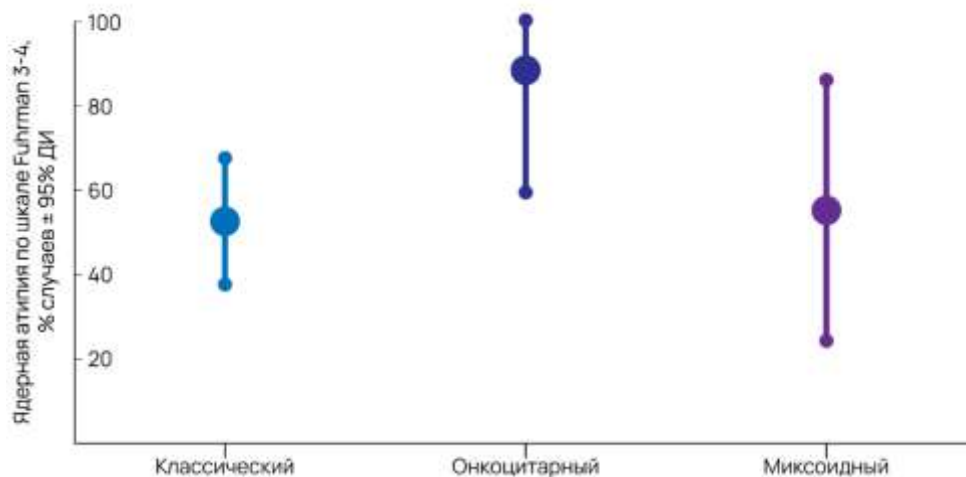


Рисунок 2.13 – Распределение пациентов с различными морфологическими типами АКР по частоте высокой ядерной атипии

В когорте обследованных 67 чел. (91,8%) имели менее 25% клеток со светлой цитоплазмой в образце опухоли, а более 5 митозов на 50 полей зрения при большом увеличении было документировано в 4,1% случаев ($n=3$).

Диффузный рост исследуемой опухоли был выявлен у 76,7% обследованных (n=56). На Рисунке 2.14 представлено распределение пациентов с различным морфологическим вариантом АКР по данному критерию.

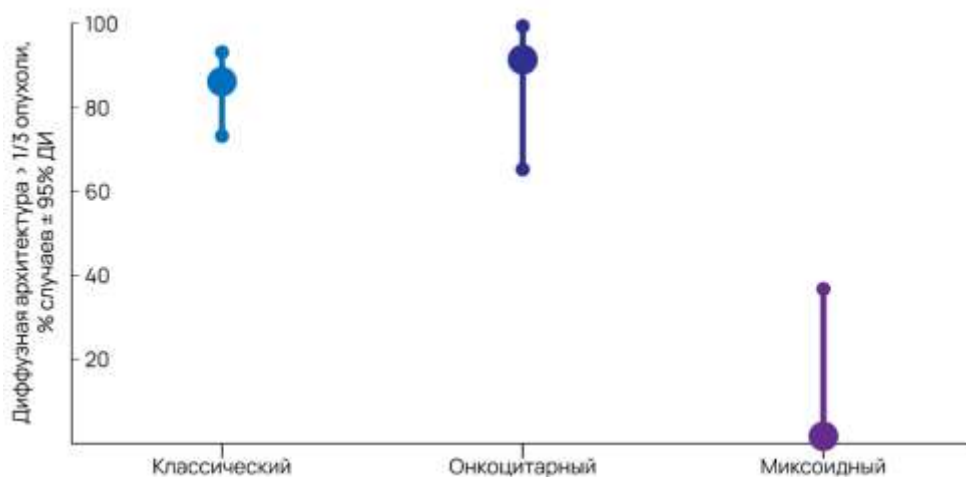


Рисунок 2.14 – Распределение частоты диффузного роста опухоли у пациентов с различными морфологическими типами АКР

У 85,7% пациентов с классическим типом АКР и у 93,3% обследованных с миксоидным типом был установлен диффузный рост опухоли. При этом больных с онкоцитарным типом таких случаев документировано не было.

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% (Рисунок 2.15).

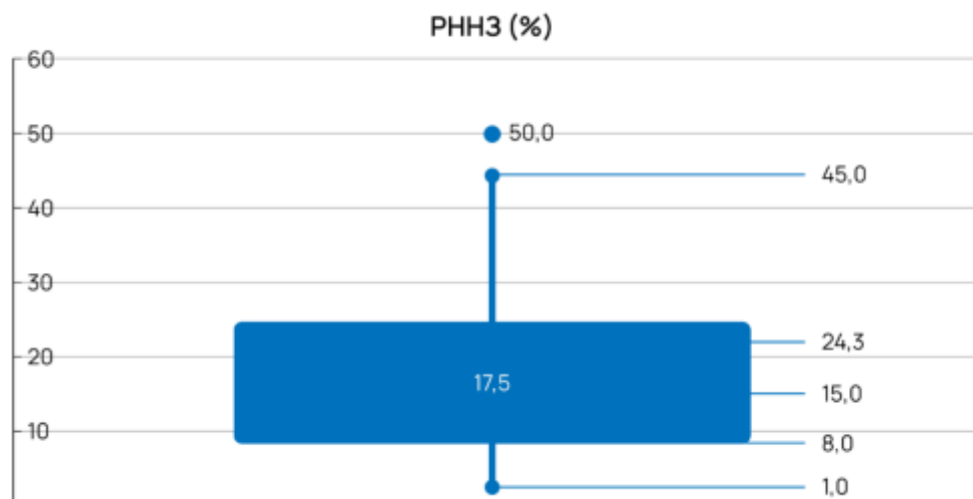


Рисунок 2.15 – Распределение значений маркера РННЗ у обследованных больных (n=73)

2.3. Методы исследования

2.3.1. Клинико-лабораторные методы

Характеристики пациентов, включенных в исследование, были получены путем анализа «Медицинской карты стационарного больного» и заносились в специально разработанную «Индивидуальную карту обследования больных с АКР, которым проведена адреналэктомия», которая включала паспортную часть, данные анамнеза заболевания пациента, характеристику протекания основного заболевания (наличие гормональной активности и др.), анализ морфологической гистологической структуры АКР, оценку результатов предварительно проведенной химиотерапии, результаты иммуногистохимического исследования, особенности периода наблюдения.

Для определения типа функциональной активности АКР у обследованных пациентов оценивали уровни кортизола, тестостерона и альдостерона в периферической крови. Кровь для определения гормонов в

сыворотке периферической крови отбирали натошак из кубитальной вены в объеме 10 мл. Сыворотку охлаждали ледяной водой и центрифугировали при 1500 оборотах в течение 10 мин в центрифуге с охлаждением не позднее 30-60 мин после забора. Иммуноферментные методы использовались для определения в сыворотке периферической крови дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС), общего тестостерона и альдостерона с помощью стандартных наборов 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 методом ИФА. Образец сыворотки крови с эндогенным кортизолом инкубировали в лунке с энзимным конъюгатом. После инкубации несвязанный конъюгат вымывали водой. Количество связанной пероксидазы обратно было пропорционально концентрации кортизола в образце. После добавления субстрата интенсивность образующейся окраски была обратно пропорциональна концентрации кортизола в исследуемом образце.

2.3.2. 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 (Рисунок 2.16).



Рисунок 2.16 – Гистопроцессор «Leica ASP6025 S» («Leica Biosystems», Германия)

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) (Рисунок 2.17-2.18).



Рисунок 2.17 – Микротом «Leica RM 2125 RTS» («Leica Biosystems», Германия)



Рисунок 2.18 – «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) (Рисунок 2.19).



Рисунок 2.19 – «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 $\times 400$, цитоплазма опухолевых клеток (прозрачность 0-25% и 26-100%) и архитектура роста (диффузный и недиффузный), наличие или

отсутствие атипичных митозов, некрозов и однозначной капсулярной, венозной, синусоидальной и смежной 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 скорость определялась путем подсчета 50 полей высокой мощности (400×) с помощью микроскопа «Leica DM2500» («Leica Microsystems», Германия). Выбранные области предметного стекла содержали самые высокие концентрации митотических фигур. Каждые 10 полей зрения подсчитывались на разных предметных стеклах по мере возможности.

Архитектура определялась, как «диффузная», когда доля слоев клеток без характерного рисунка роста составляла более 33% опухоли.

Выстланные эндотелием сосуды с мышечным слоем, рассматривались как вены, в отличие от синусоидов, не имеющих мышечной стенки. Вена или синусоид внутри или снаружи опухоли надпочечника, которые содержали опухолевые клетки в просвете и прилегали к ее стенке, определяли как венозную или синусоидальную инвазию. Опухоль, полностью прорастающую в собственную псевдокапсулу, определяли как однозначную капсулярную инвазию.

На основании результатов гистологического исследования осуществлялось стадирование по системе ENSAT (Таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Стадирование АКР по классификации ENSAT

Стадия ENSAT	Определение	Описание
I	T1, N0, M0	наличие опухоли диаметром до 5 см в пределах надпочечника
II	T2, N0, M0	наличие опухоли диаметром более 5 см в пределах надпочечника
III	T1-T2, N1, M0 T3-T4, N0-N1, M0	вовлечение прилежащих тканей, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах или вовлечение регионарных вен
IV	T1-T4, N0-N1, M1	наличие отдаленных метастазов

2.3.3. Иммуногистохимические методы

Иммуногистохимическое исследование проводили на полностью автоматизированном 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-Roche», США).

Все гистологические препараты отсканированы при помощи системы Aperio производства Leica Biosystems для обеспечения объективного подсчета и анализа полученных результатов.

Подсчет пролиферативной активности опухолевых клеток (Ki-67) осуществлялся визуально в 10 полях зрения при увеличении x400 и определялся как процент окрашенных клеточных ядер в участках опухоли с наибольшей активностью (горячие точки).

Подсчет фигур митоза осуществлялся при визуальной оценке в 10 полях зрения при увеличении x400 при наличии позитивного окрашивания и характерных морфологических признаков.

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) осуществлялось в соответствии со следующими принципами:

1) Ядерная экспрессия молекулярных маркеров.

Для каждого маркера степень экспрессии оценивалась полуколичественным методом с использованием 10 бальной шкалы (количество клеток на 100 посчитанных, при подсчете не менее 1000 клеток).

- При условии отсутствия экспрессии в клетках опухоли данного маркера - 0 баллов

- Число позитивных клеток от 1 до 10% - 1 балл
- Число позитивных клеток от 11 до 20% - 2 балла
- Число позитивных клеток от 21 до 30% - 3 балла
- Число позитивных клеток от 31 до 40% - 4 балла
- Число позитивных клеток от 41 до 50% - 5 баллов
- Число позитивных клеток от 51 до 60% - 6 баллов
- Число позитивных клеток от 61 до 70% - 7 баллов
- Число позитивных клеток от 71 до 80% - 8 баллов
- Число позитивных клеток от 81 до 90% - 9 баллов
- Число позитивных клеток от 91 и более - 10 баллов.

Интенсивность окрашивания оценивалась с использованием 4 бальной шкалы

- Отсутствие окрашивания - 0 баллов
- Слабое и умеренное окрашивание (+) - 1 балл
- Интенсивное окрашивание (+++) - 2 балла.

2) Цитоплазматическая экспрессия молекулярных маркеров.

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

- При условии отсутствия экспрессии в клетках опухоли данного маркера - 0 балл
- Число позитивных клеток от 1 до 33% - 1 балл
- Число позитивных клеток от 34 до 66% - 2 балла
- Число позитивных клеток от 66 до 100% - 3 балла.

3) Оценка экспрессии рецепторов соматостатина осуществлялась по системе Marco Volante (мембранная, мембранно-цитоплазматическая, цитоплазматическая реакция).

2.3.4. Методы анализа иммунного инфильтрата

Анализ состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток проводился при помощи четырех методов. Во-первых, был использован алгоритм CIBERSORT [Newman A.M. et al., 2015], примененный к повторной количественной оценке с использованием данных Kallisto и Gencode GTF TCGA. Во-вторых, 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. B-

третьих, 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 использованы 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 проводился 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 (Рисунок 2.20-2.23).

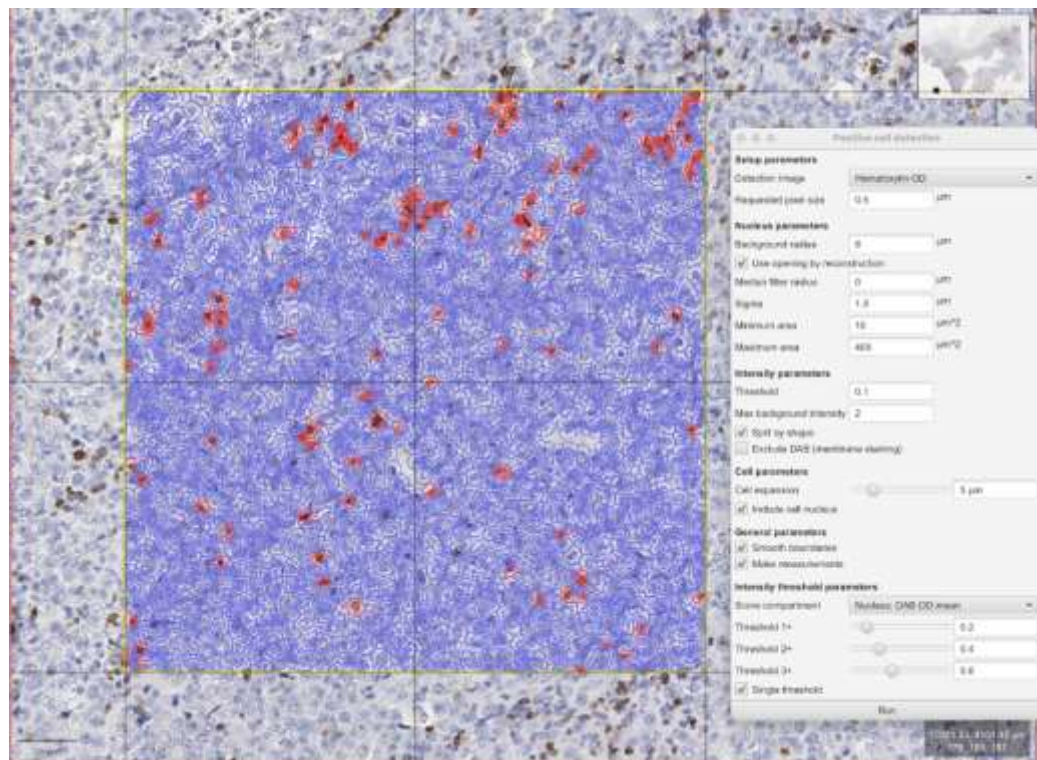


Рисунок 2.20 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 (увеличение x100), подсчет иммунных клеток в паренхиме опухоли

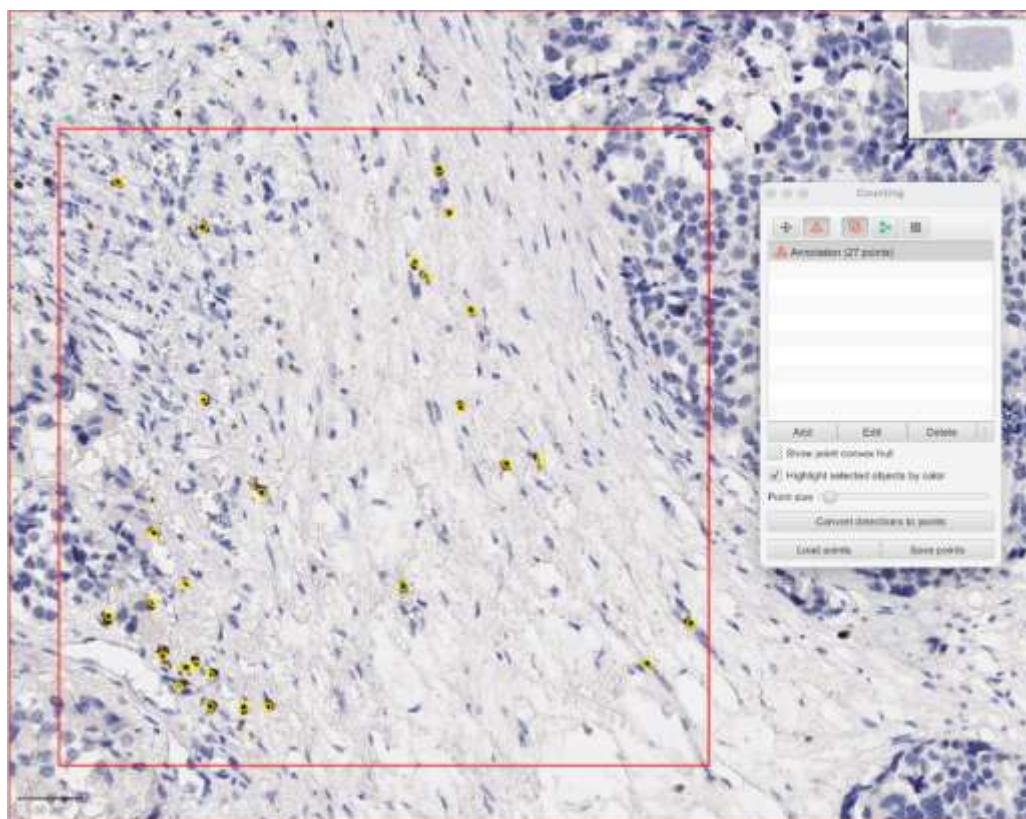


Рисунок 2.21 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 (увеличение 100), подсчет иммунных клеток в строме опухоли

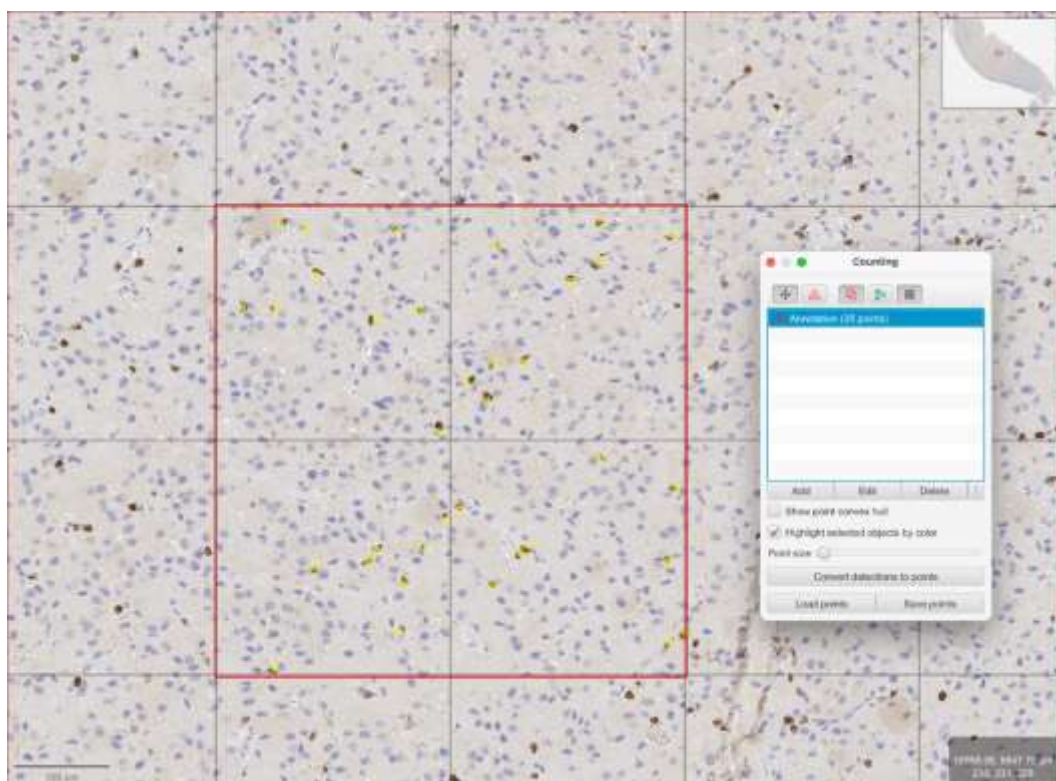


Рисунок 2.22 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака,

иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 (увеличение x100), подсчет иммунных клеток в паренхиме опухоли

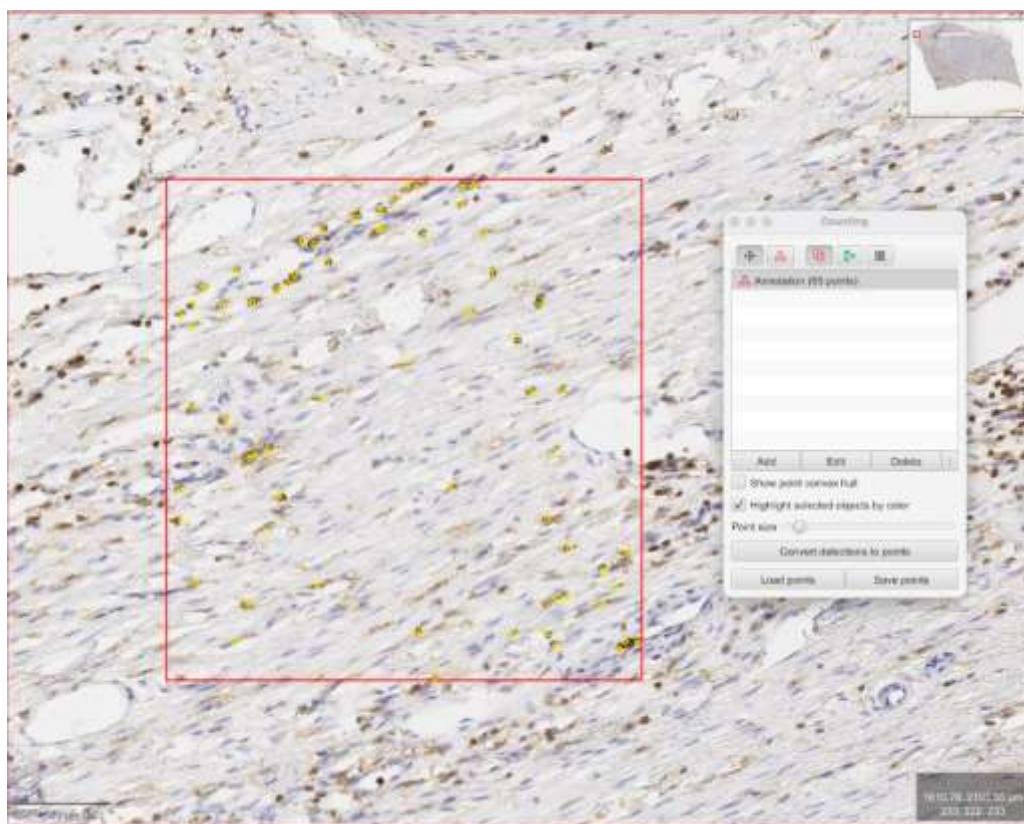


Рисунок 2.23 – Онкоцитарный вариант аденокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD45 (увеличение x100), подсчет иммунных клеток в строме опухоли

2.3.5 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 локоритарный рецидив), а также 2 образца условно-нормальной окружающей ткани, удаленной при адреналэктомии по поводу АКР. Забор биологического материала проводился

непосредственно во время плановых операций. Основные клинико-морфологические показатели приведены в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 - Характеристика выборки образцов пациентов, больных аденокортикальным раком

№	Пол	Возраст	Клинические симптомы	Стадия	Гистологический тип
1	F	33	Синдром Кушинга	III	классический
2	M	59	Синдром Кушинга	II	классический
3	F	55	Синдром Кушинга	III	онкоцитарный
4	F	32	Нефункционирующая опухоль	I	классический
5	F	40	Синдром Кушинга	II	классический
6	F	47	Синдром Кушинга	II	классический
7	F	63	Гиперальдостеронизм	III	миксоидный

В лаборатории молекулярной и медицинской генетики готовили суспензии единичных клеток. Ткань после хирургического вмешательства помещали в среду (Gibco) с добавлением 2% FBS на леду. Фрагменты опухолевой ткани (по 1 мм³) обрабатывали коллагеназой I–IV (Worthington Biochemical по 1 мг/мл) и Dispase (2 мг/мл, Thermo Fisher) с добавлением раствора ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, 1:100) и RNaseOut (Thermo Fisher, 1:1000). Диссоциацию проводили при температуре 37°C с вращением в течение 45 мин.

Полученный раствор фильтровали через клеточный фильтр Cell Strainers (размер пор 70 мкм). Предварительно фильтр смачивали 1 мл цитратно-

солевого буфера (3xSSC: 40 mM DTT: 1% BSA: RNase Inhibitor 100 U/ml). После фильтрации, осевшие клетки на мембране фильтра промывали 2 раза 1-2 мл цитратно-солевого буфера. Полученную клеточную суспензию после фильтрации центрифугировали 7 минут, 1000 g, 4°C, затем удалили супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 3100 мкл промывочного буфера (PBS: 6 mM Глюкоза: 20 mM HEPES: 10% FBS) и добавляли 900 мкл Debris Removal Solution (Miltenyi BioTech). 4 мл PBS аккуратно наслаивали на клеточную суспензию, далее центрифугировали 7 минут, 1300 g, 4°C.

Отбирали супернатант, клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл цитратно-солевого буфера. Отбирали 900 мкл клеточной суспензии ресуспендировали в FBS с 5% ДМСО и криоконсервирован в жидком азоте.

Получение клеточных суспензий единичных клеток образцов коры надпочечников человека методом уксусно-метанольной диссоциации/фиксации (АСМЕ). Образец ткани 200-900 мг замораживали в криопробирке, криопробирку погружали в жидкий азот, затем помещали в морозильник на -80° С. После заморозки образцы переносили на рабочую поверхность, обработанную средством для деконтаминации от РНКазы, RNaseZap, Thermo FS. Образцы ткани мелко нарезали на чашке Петри на льду. Затем ткань перемещали в 10 мл буфера АСМЕ (12 mQ: 2 Ледяная уксусная кислота: 3 Метанол: 2 Глицерин: 1 N-ацетил-цистеин) и ставили на ротационный перемешиватель на 60 минут, пипетируя образцы каждые 20 минут. Полученный раствор фильтровали через клеточных фильтр Cell Strainers, размер пор 70 мкм. Предварительно фильтр был смочен 1 мл цитратно-солевого буфера (3xSSC: 40 mM DTT: 1% BSA: RNase Inhibitor 100 U/ml). После фильтрации, осевшие клетки на мембране фильтра промывали 2 раза 1-2 мл цитратно-солевого буфера. Полученную клеточную суспензию после фильтрации центрифугировали 7 минут, 1000 g, 4° С, затем удалили супернатант.

Клеточный осадок ресуспендировали в 3100 мкл промывочного буфера (PBS: 6 mM глюкоза: 20 mM HEPES: 10% FBS) и добавляли 900 мкл Debris

Removal Solution (Miltenyi BioTech), 4 мл PBS аккуратно наслаивали на клеточную суспензию, далее центрифугировали 7 минут, 1300 g, 4°C. Отбирали супернатант, клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл цитратно-солевого буфера. Отбирали 900 мкл клеточной суспензии и добавляли 100 мкл DMSO, пипетировали и замораживали при -80°C.

Секвенирование единичных клеток. Набор Single Cell 3'v3.1 (Dual index) и контроллер Chromium (10X Genomics) использовались 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 дублиеты 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, эти данные были интегрированы с помощью Harmony, а затем сгруппированы с помощью Seurat. Кластеризация была проверена по генетическим маркерам клеток надпочечника (Таблица 2.4), чтобы обеспечить правильное определение клеточных кластеров, которые будут повторяться в образцах.

Таблица 2.4 - Генетические маркеры клеток надпочечников [Huang et al. 2021]

Клеточные типы	Гены-маркёры
Адренкортикальные клетки	<i>STAR, CYP21A2, HSD3B2</i>
Клетки клубочковой зоны	<i>CYP11B2</i>
Клетки пучковой зоны	<i>CYP11B1</i>
Клетки сетчатой зоны	<i>SULT2A1, CYB5A</i>
Медуллярные клетки	<i>PNMT, TH, CHGA</i>
Эндотелиальные клетки	<i>CDH5, TM4SF1, PECAM1</i>
Фибробласты	<i>LUM, COL1A1, COL1A2</i>
Гладкомышечные клетки сосудов	<i>MYH11, ACTA2, TAGLN</i>

Макрофаги	<i>CD68, CD163, VSIG4</i>
Т-клетки	<i>CD3D, CD3E, CD8A, TRAC1, CD69</i>
Естественные киллеры	<i>GZMB, GNLY, KLRF1</i>
В-клетки	<i>CD79A, CD79B, MZB1, IGHG2, MS4A1</i> <i>CD27</i>

Визуализации клеточных кластеров были сделаны 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 $\log_{2}FC < 0,4$ и гены, экспрессирующиеся менее чем в 20% клеток кластера. Кроме того, после тестирования все гены с отсутствующей или почти отсутствующей экспрессией были исключены, поскольку их дифференциальная экспрессия могла быть вызвана разным составом окружающей ткани между исследуемой опухолью и условно-здоровой окружающей тканью.

Выделение тотальной РНК. Выделяли РНК с использованием реактива ExtractRNA (Евроген) по протоколу производителя. Метод основан на использовании гомогенизирующего монофазного водного раствора фенола и гуанидин-изотиоцианата. К суспензии клеток добавляли 1 мл реагента ExtractRNA. Инкубировали при комнатной температуре 15 минут. Добавляли к раствору 0,2 мл хлороформа из расчета 0,2 мл к 1 мл реагента, после чего перемешивали в течение 15 с. Инкубировали при комнатной температуре 5 мин., затем центрифугировали при температуре 4°C в течение 15 минут при 13,4 тыс. об. /мин. Отобрали верхний водную фазу, содержащую РНК в новый

эппендорф объемом 1,5 мл. К водной фазе добавляли 0,5 мл изопропанола, затем вновь центрифугировали в течение 10 минут на 13,4 тыс. об./мин. К осадку РНК добавляли 2 мл 75% этанола, центрифугировали в течение 5 минут при 13 тыс. об./мин. и удаляли надосадочную жидкость. Высушивали осадок и растворяли его в стерильной воде, свободной от РНКаз.

Определение качества и концентрации РНК. По окончании выделения 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. Коллагеназа представляет собой протеазу, расщепляющую связь между нейтральной аминокислотой (X) и глицином в последовательности Pro-X-Gly-Pro, которая с высокой частотой встречается в коллагене. Коллагеназа уникальна среди протеаз по своей способности расщеплять нативные коллагеновые фибриллы тройной спирали, обычно встречающиеся в соединительных тканях, таких как кожа, сухожилия, кровеносные сосуды и кости. Коллагеназа действует относительно мягко, хорошо диссоциирует при физиологических температурах и pH и не требует механического перемешивания или специального оборудования.

Для полной диссоциации тканей использовали нейтральную протеазу – диспазу. Диспаза хорошо диссоциирует ткани при физиологических температурах и pH и поддерживает целостность клеточной мембраны. При использовании этих протеаз получали ткань, хорошо диссоциированную на единичные клетки, и высокую выживаемость клеток - более 70% (Таблица

2.5), было подготовлено 7 образцов с помощью ферментативной диссоциации.

Эффективность диссоциации оценивали с помощью микроскопии (Axio Imager M2, ZEISS) и окраски флуоресцентным интеркалирующим красителем DAPI (Рисунок 2.24). При анализе с помощью микроскопии отмечалось большое количество клеточного дебриса и мертвых клеток (Рисунок 2.24 А). Для избавления от клеточного дебриса использовали Debris Removal Solution, Miltenyi Biotec согласно протоколу производителя. Количество клеток, а также их жизнеспособность в готовой суспензии оценивали с помощью автоматического счетчика клеток, а также отбирали пробу на микроскопию для визуальной оценки степени повреждения клеток и наличия дебриса (Рисунок 2.24 Б).

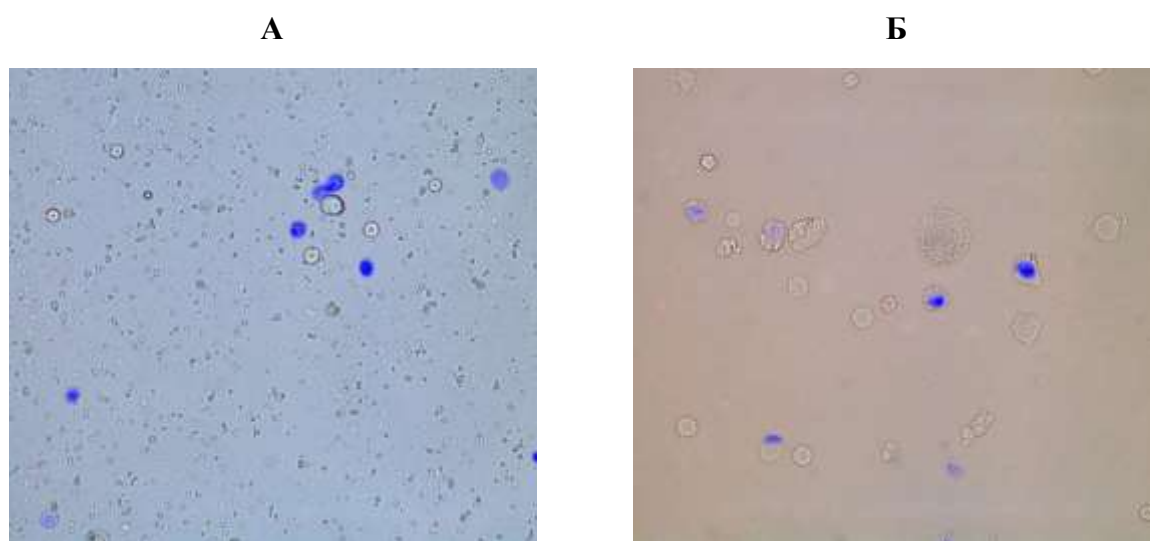


Рисунок 2.24 - А) Клеточная суспензия из кортикального слоя надпочечника до удаления клеточного дебриса и мертвых клеток.

Увеличение x40, окраска DAPI.

Б) Клеточная суспензия из кортикального слоя надпочечника после очистки от дебриса. Увеличение x40, окраска DAPI

В процессе проведения работы оптимизировали метод метанольно-уксусной диссоциации (АСМЕ) замороженных тканей в жидком азоте, что позволяло одновременно диссоциировать ткань с помощью уксусной кислоты и фиксировать клетки метанолом. Благодаря возможности приготовления суспензий клеток из замороженных в азоте образцов, метод АСМЕ позволяет решить проблему своевременной транспортировки образцов и их хранения в случае невозможности приступить к работе немедленно. Однако, возникал вопрос сохранения целостности клеток при данном типе диссоциации. Целостность клеток и эффективность диссоциации АСМЕ оценивали с помощью микроскопии (Axio Imager M2, ZEISS) и окраски флуоресцентным интеркалирующим красителем DAPI (Рисунок 2.25).

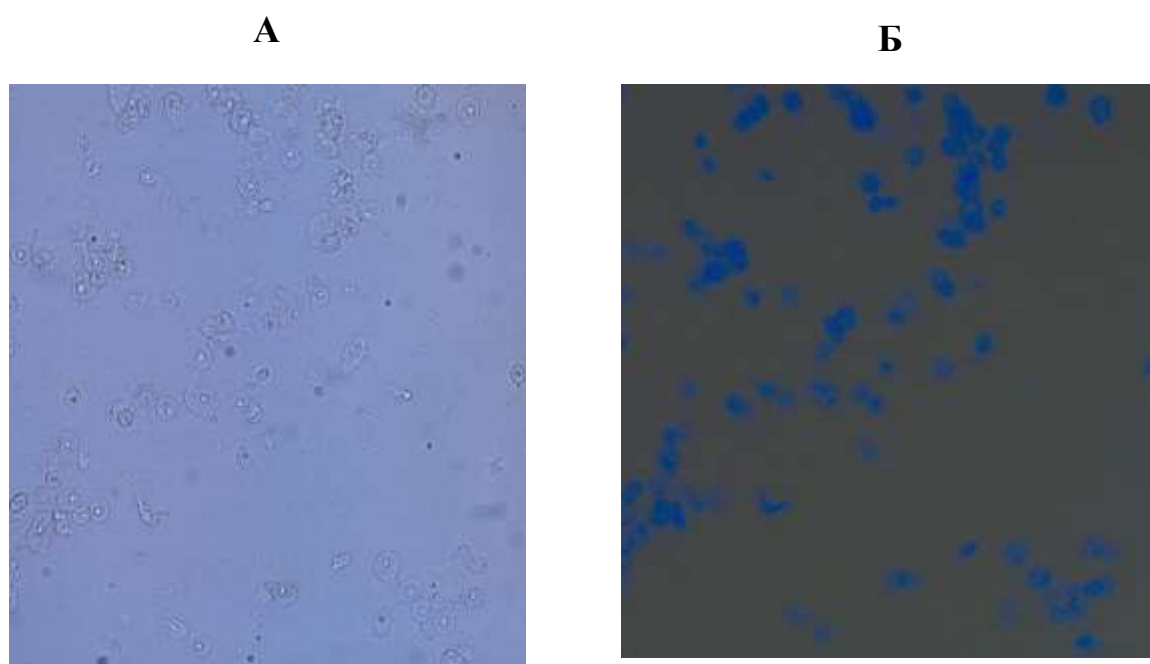


Рисунок 2.25 - Клеточная суспензия из кортикального слоя надпочечника, диссоциированная с помощью метода АСМЕ. Увеличение x40 (А), окраска DAPI (Б)

Также необходимо было оценить качество тотальной РНК, выделенной из клеточной суспензии, приготовленной ферментативной и уксусно-метанольной диссоциации. Для оценки качества РНК клеточных суспензий

выделяли тотальную РНК из полученных клеток и анализировали количество *18S* и *28S* рРНК с помощью фрагментного анализатора (Рисунок 2.26). Соотношение *28S/18S* рРНК называется числом целостности РНК (RIN). Целостность РНК является важной характеристикой для исследований экспрессии генов.

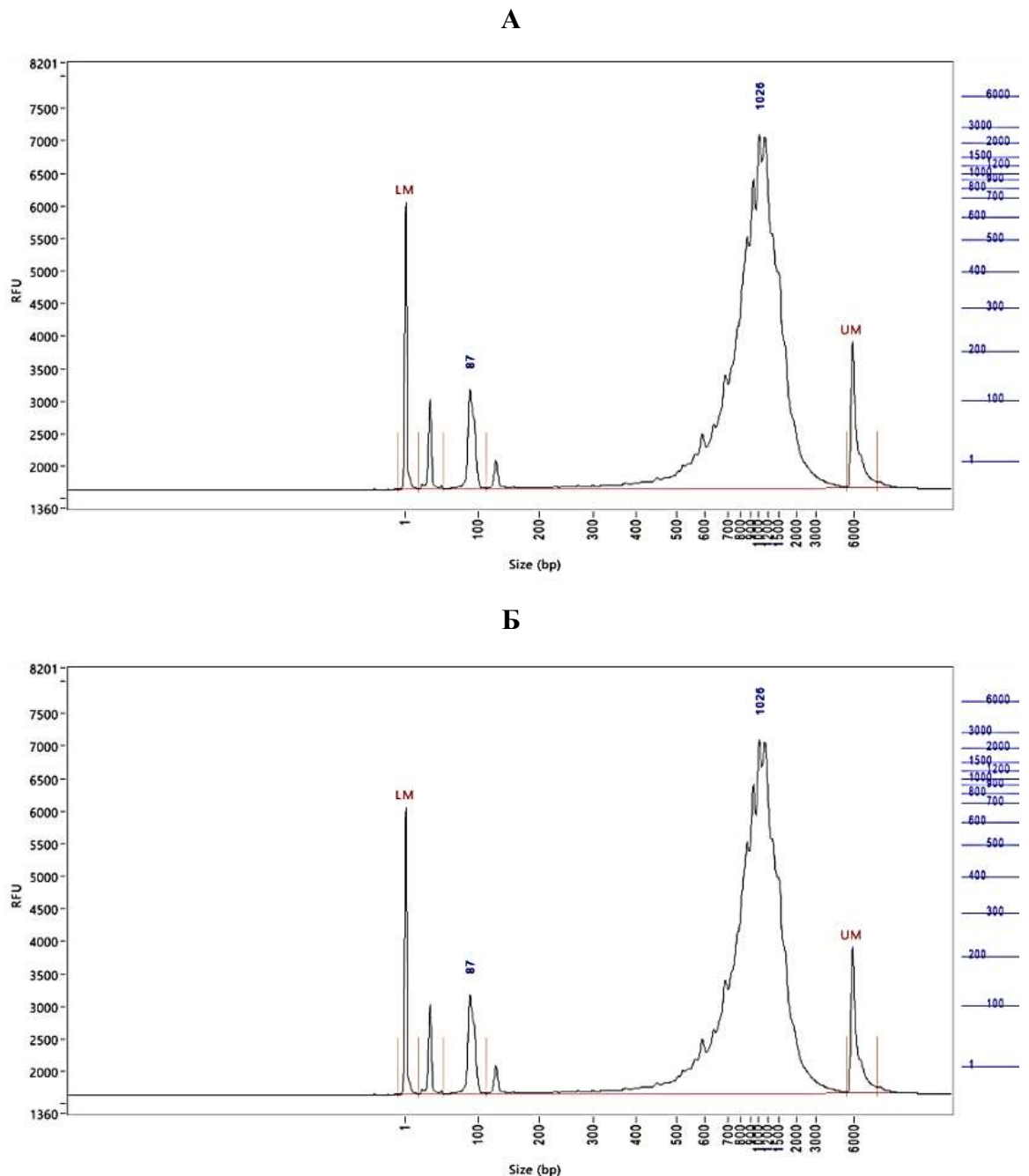


Рисунок 2.26 - А) Профиль РНК, выделенной из единичных клеток коры надпочечников, приготовленных ферментативным способом. Розовым

цветом обозначены 18S рРНК, голубым цветом 28S рРНК. Б) Профиль РНК, выделенной из единичных клеток коры надпочечников, приготовленных методом АСМЕ

RIN клеток, полученных с помощью ферментативной диссоциации, был выше 7, что свидетельствовало о высоком качестве РНК. В результате было получено 6 образцов клеточных суспензий, приготовленных методом АСМЕ из замороженных тканей с не уступающих по качеству клеточным суспензиям, сделанных с помощью ферментативной диссоциации (Таблица 2.5). Все клеточные суспензии фиксировали и замораживали при -80°C. В дальнейшем исследовании использовали все полученные клеточные суспензии.

Таблица 2.5 - Образцы клеточных суспензий

Образец	Описание	Метод диссоциации	Метод фиксации	% живых клеток
2210884550	АКР	ферментативная	1 мл 80% метанола	93%
2210886313	АКР	ферментативная	1 мл 80% метанола	72%
2211006319	АКР	ферментативная	1 мл 80% метанола	76%
2221006319	АКР	ферментативная	1 мл 80% метанола	87%
2211006449	АКР	ферментативная	1 мл 80% метанола	88%
2231006449	АКР	ферментативная	1 мл 80% метанола	88%
2201016213	Условно-здоровая ткань	АСМЕ	10% ДМСО	-

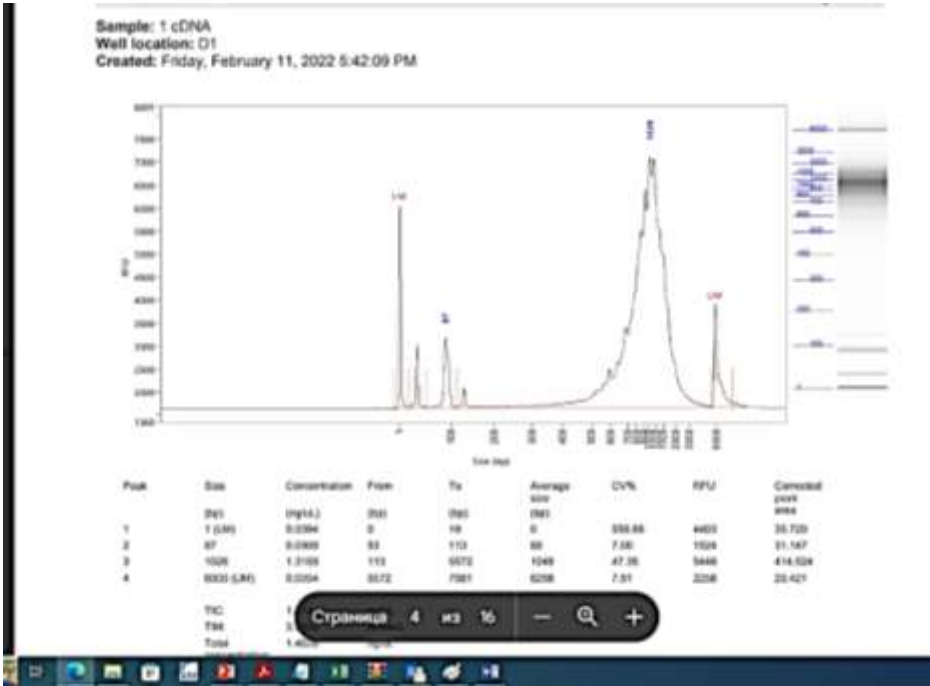
2211016213	АКР	АСМЕ	10% ДМСО	-
2211037277	АКР (рецидив)	ферментативная	1 мл 80% метанола	77%
2221037277	АКР (рецидив)	АСМЕ	10% ДМСО	-
2011092011	АКР	АСМЕ	10% ДМСО	-
2001092011	Условно-здоровая ткань	АСМЕ	10% ДМСО	-
2011037478	АКР	АСМЕ	10% ДМСО	-

Перед началом процесса приготовления транскриптомных библиотек фиксированные метанолом и замороженные суспензии единичных клеток перемещались на лед для постепенной разморозки. Спустя 5-10 минут суспензию центрифугировали, метанол тщательно удаляли, осадок ресуспендировали в цитратно-солевом растворе. Затем количество клеток оценивали с помощью автоматического счетчика клеток, их концентрацию доводили до 2500 кл./мкл, на один образец загружали 10 000 клеток.

Затем суспензии единичных клеток загружали на чип 10X Chromium с использованием набора Chromium Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1, 16 rxns. согласно протоколам производителя (10x Genomics, CG000204 Rev D). Очистку образцов, реакцию обратной транскрипции и кДНК амплификация проводили по стандартным инструкциям производителя с рекомендованным набором реактивов. Качество кДНК единичных клеток оценивали с помощью фрагментного анализатора. Длина фрагментов кДНК составляла от 200 до 6000 нуклеотидов. Однако в образцах могли присутствовать фрагменты с более низкой молекулярной массой от 15 до 150 нуклеотидов (Рисунок 2.27).

А

Б



По данным фрагментного анализа кДНК-библиотек, полученных из замороженных образцов с использованием уксусно-метанольной диссоциации/фиксации, заметной деградации мРНК по сравнению с методом ферментативной диссоциации не наблюдалось. Следовательно, метод АСМЕ можно применять для приготовления клеточных суспензий из свежемороженых образцов.

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 адренокартикального рака и в 19 154 клетках условно-здоровой ткани коры надпочечников. Данное количество клеток является репрезентативным и может использоваться для последующих исследований.

2.4. 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. В случае метастатического поражения регионарных лимфоузлов или при

подозрении на их поражение по клинико-инструментальным данным проводилась лимфодиссекция. Эндоскопическая (лапароскопическая, ретроперитонеоскопическая) адреналэктомия выполнялась при сочетании следующих факторов: размер опухоли менее 6 см, I и II стадия заболевания по ENSAT (отсутствие признаков инвазии опухоли в окружающие структуры), достаточный опыт подобных вмешательств у хирурга и лечебного учреждения. Целесообразность повторных операций при рецидивах определялась индивидуально, мультидисциплинарным консилиумом, с учетом распространённости процесса, вероятности полной циторедукции, биологических особенностей опухоли и возможности консервативного лечения. Всем пациентам с АКР и верифицированным/высоковоероятным гиперкортицизмом проводилась заместительная терапия надпочечниковой недостаточности интраоперационно и в послеоперационном периоде в соответствии с клиническими рекомендациями.

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. В режиме высоких доз контроль уровня митотана в крови проводился через 2–3 недели после начала терапии. Рекомендованный диапазон терапевтической концентрации при лабораторном мониторинговании составлял от 14 до 20 мкг/мл. Доза митотана, необходимая для достижения и/или поддержания его концентрации в крови в терапевтическом диапазоне, индивидуальна и, как правило, составляла 4 – 8 г/сут.

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.

Пациентам с неоперабельным АКР, наличием распространенного метастатического процесса после резекции первичной опухоли, быстрым прогрессированием заболевания проводилась цитотоксическая терапия по схеме этопозид, доксорубицин, цисплатин в соответствии с режимами, указанными в клинических рекомендациях, – на фоне продолжающегося приема митотана ежедневно в дозе, обеспечивающей его содержание в сыворотке крови на уровне 14-20 мкг/лм без перерыва между циклами химиотерапии (схема EDP-M).

2.5. 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 достоверности различий между показателями групп сравнения производилась с помощью t-критерия Стьюдента, критерия Фишера, критерия Хи-квадрат, U-критерия Манна-Уитни.

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 коэффициент Спирмена ($r=0\pm 0,25$). Наличие прямой корреляционной зависимости устанавливали при положительных значениях r , обратной – при отрицательных. Сила обнаруженной корреляционной связи оценивалась следующим образом:

- при r от 0,76 до 1,0 (от -0,76 до -1,0) – как сильная;
- при r от 0,51 до 0,75 (от -0,51 до -0,75) – как средняя;
- при r от 0,26 до 0,5 (от -0,26 до -0,5) – как умеренная.

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 коэффициента.

Для анализа выживаемости использовалась регрессионная модель Кокса. 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. Логистическая регрессия — это разновидность множественной регрессии, общее назначение которой состоит в исследовании связи между зависимым бинарным признаком и/или несколькими количественными или качественными независимыми признаками.

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,

$0, \dots, i$ – коэффициенты.

Функция потерь для логистической регрессионной модели:

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

$logloss$ – функция $logloss$;

β – веса параметров;

λ_i – 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).

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАНТОВ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА

3.1. Гистологические особенности различных морфологических вариантов аденокортикального рака

На данном этапе исследования в анализ были включены 73 пациента с новообразованиями надпочечника. Среди обследованного материала классический морфологический вариант АКР был диагностирован в 67,1% случаев (n=49), онкоцитарный тип – в 20,5% случаев (n=15), миксоидный тип опухоли – в 12,3% (n=9). Выявленные гистологические варианты АКР отличались выраженной морфологической гетерогенностью (Рисунки 3.1-3.6).



Рисунок 3.1 – Классический гистологический вариант
аденокортикального рака



Рисунок 3.2 – Онкоцитарный гистологический вариант
адренокортикального рака

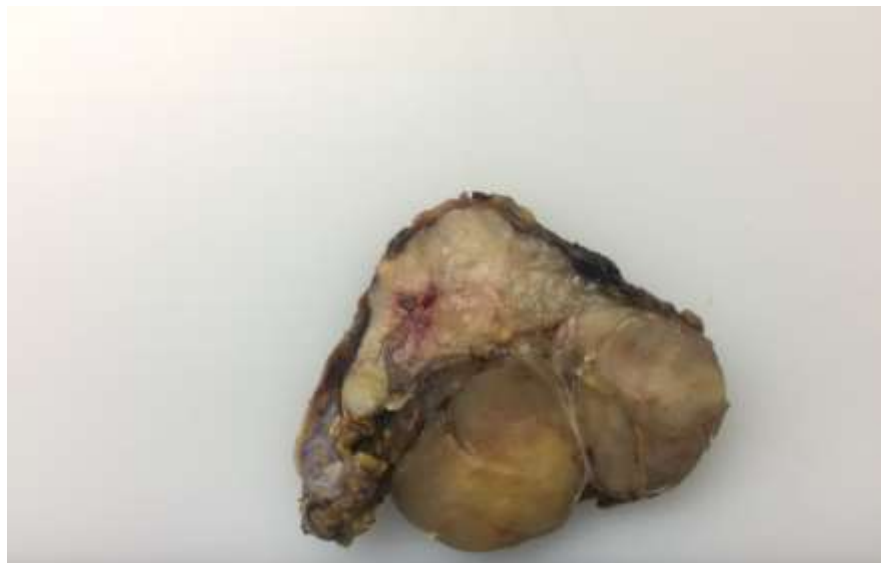


Рисунок 3.3 – Миксоидный гистологический вариант
адренокортикального рака

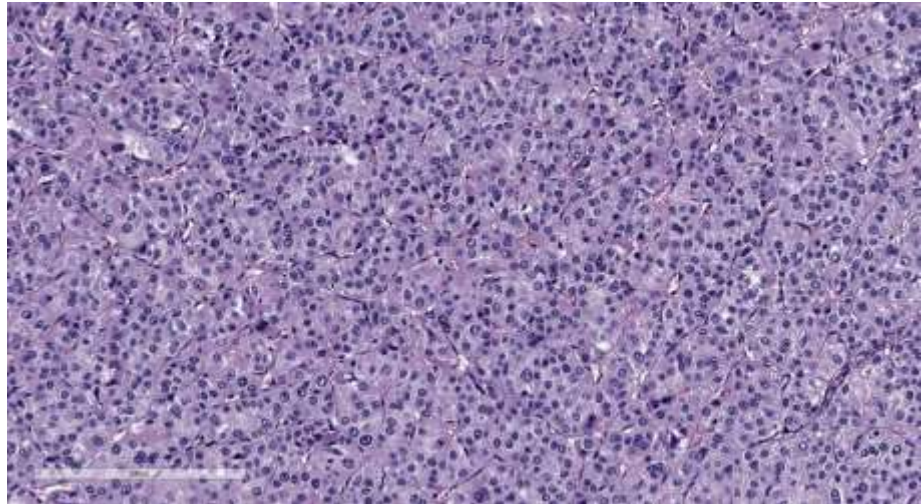


Рисунок 3.4 – Классический гистологический вариант
адренокортикального рака. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)



Рисунок 3.5 – Онкоцитарный гистологический вариант
адренокортикального рака. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

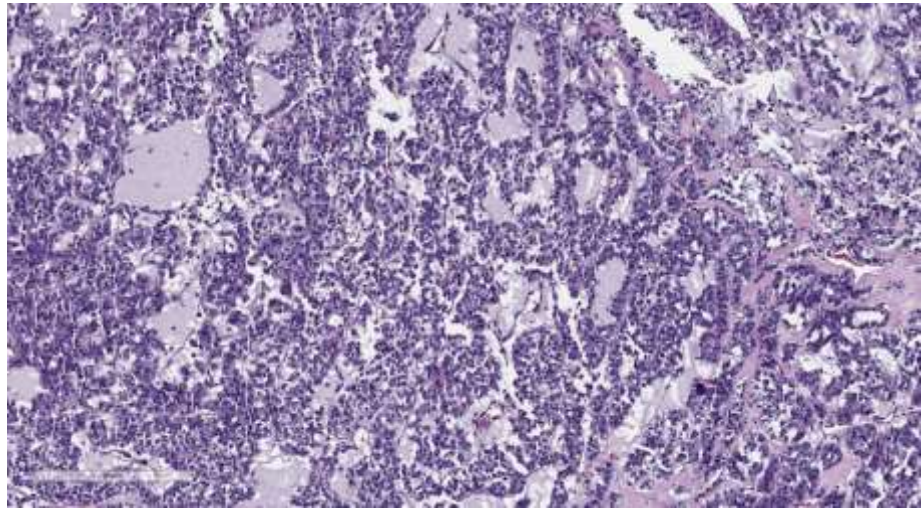


Рисунок 3.6 – Миксоидный гистологический вариант
адренокортикального рака. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)



Рисунок 3.7 – Макроскопически гетерогенный АКР (классический и
миксоидный варианты)

В исследуемом материале преобладал классический вариант 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 (Рисунок 3.8), трабекулярный - в виде различных по ширине тяжей, разделенных тонкими соединительнотканными перегородками (Рисунок 3.9), альвеолярный - в виде крупных гнезд (Рисунок 3.10), псевдожелезистый - формирующий структуры, напоминающие железы с просветом в центре (Рисунок 3.11), карциноидоподобный (Рисунок 3.12) - напоминающий по строению карциноид, рост в виде цепочек, напоминающий строение дольковой карциномы молочной железы.

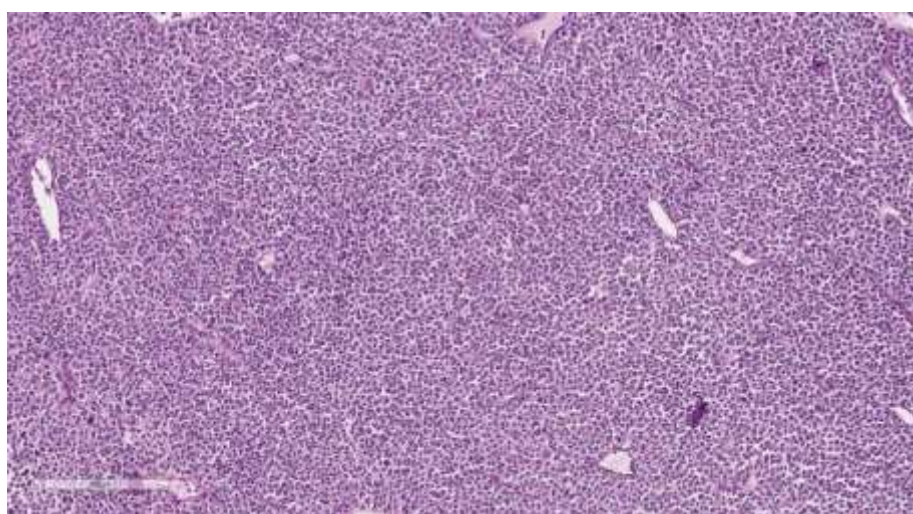


Рисунок 3.8 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, диффузный паттерн: характеризуется солидными полями с практически полным отсутствием стромы. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

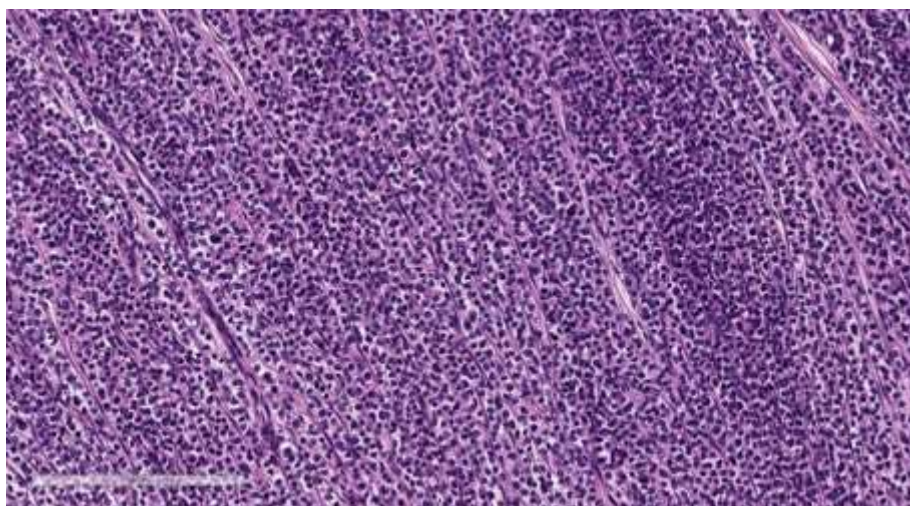


Рисунок 3.9 – Аденокортикальный рак, классический гистологический вариант, трабекулярный паттерн: в виде различных по ширине тяжей, разделенных тонкими соединительнотканными перегородками. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

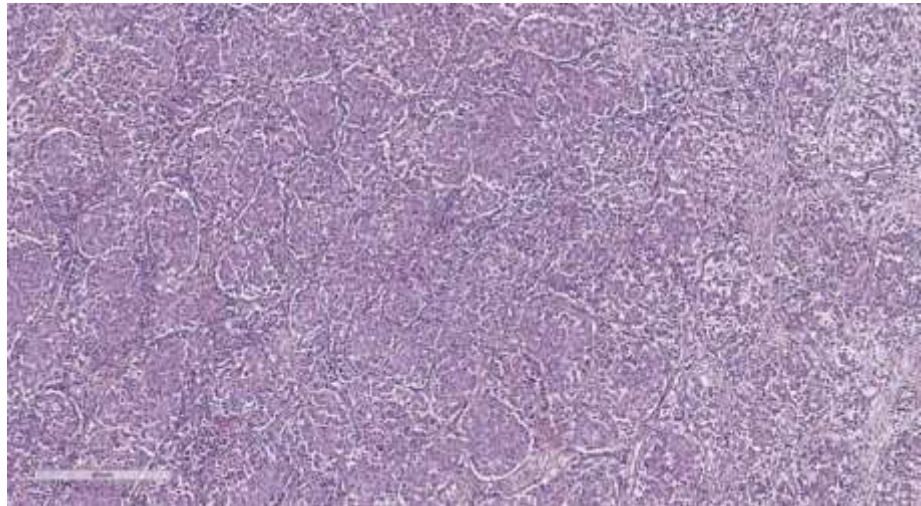


Рисунок 3.10 – Аденокортикальный рак, классический гистологический вариант, альвеолярный паттерн: в виде крупных гнезд. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

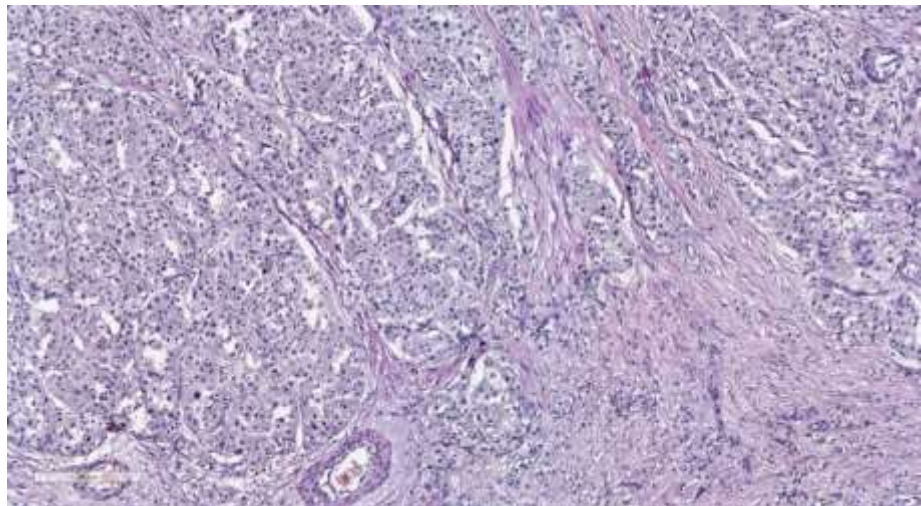


Рисунок 3.11 – Аденокортикальный рак, классический гистологический вариант, псевдожелезистый паттерн: формирующий структуры, напоминающие железы с просветом в центре. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

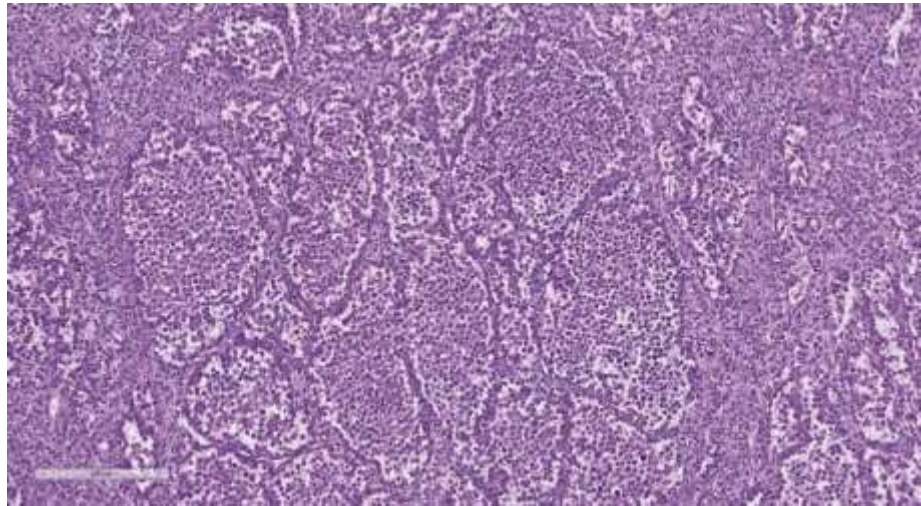


Рисунок 3.12 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, карциноидоподобный паттерн, напоминающий по строению карциноид. Увеличение $\times 100$ (окраска: гематоксилин и эозин)

Размеры опухолевых клеток варьировали от средних, относительно мономорфных эозинофильных, напоминающих клетки пучковой и сетчатой зоны коры надпочечника, до крупных, выраженно полиморфных и многоядерных гигантских, а также светлых клеток (Рисунок 3.13, Рисунок 3.14).

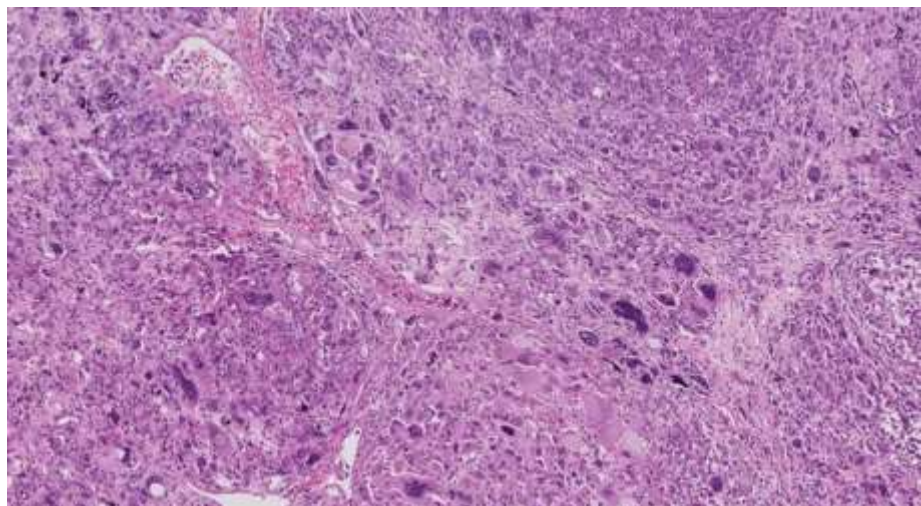


Рисунок 3.13 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант. Клетки опухоли крупные, выраженно полиморфные, местами многоядерные гигантские. Увеличение $\times 100$ (окраска: гематоксилин и эозин)

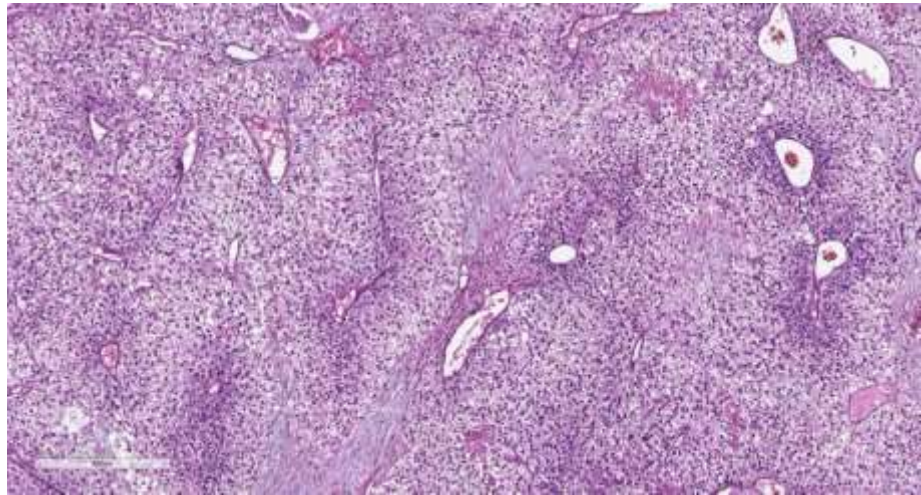


Рисунок 3.14 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант. Клетки опухоли со светлой цитоплазмой.

Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

В данном варианте АКР часто встречались обширные очаги некроза, иногда по типу комедо-некрозов (Рисунок 3.15).

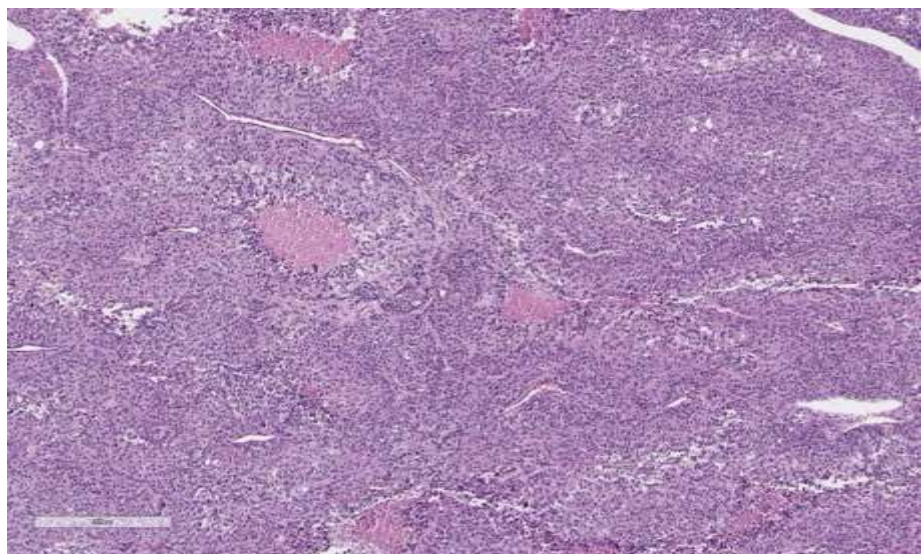


Рисунок 3.15 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант. В опухоли присутствуют очаги некрозов по типу комедо-некрозов. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

Для опухоли было характерно наличие толстой фиброзной капсулы, в которой нередко обнаруживались признаки инвазивного опухолевого роста. Более того, 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: наличием 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 вариант АКР, на долю которого приходилось 20,5% случаев (n=15).

Особенность онкоцитарного гистологического подтипа заключается в том, что эти опухоли состоят преимущественно из онкоцитов. Онкоцитарные клетки АКР в 1-2 раза больше нормальных клеток надпочечника, полиморфны, с зернистой ярко-эозинофильной обильной цитоплазмой и центральным пикнотичным ядром. Зернистость цитоплазмы обусловлена накоплением митохондрий, которые могут занимать до 60% объема клетки. Для данного подтипа АКР было выявлено три основных паттерна роста: диффузный (Рисунок 3.16), трабекулярный (Рисунок 3.17) и псевдожелезистый (Рисунок 3.18).

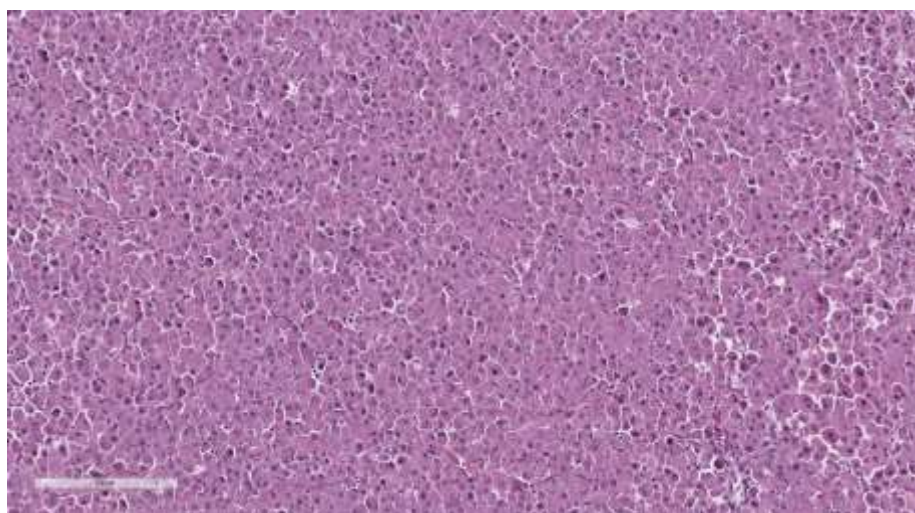


Рисунок 3.16 – Адренокортикальный рак, онкоцитарный гистологический вариант, диффузный паттерн: солидные поля опухолевых клеток с практически полным отсутствием стромы. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

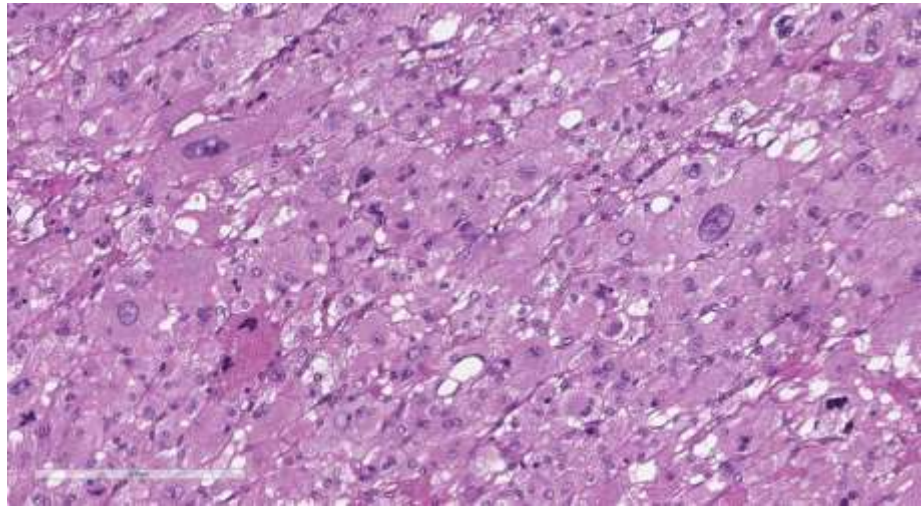


Рисунок 3.17 – Адренокортикальный рак, онкоцитарный гистологический вариант, трабекулярный паттерн в виде различных по ширине тяжей, разделенных тонкими соединительнотканными перегородками. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

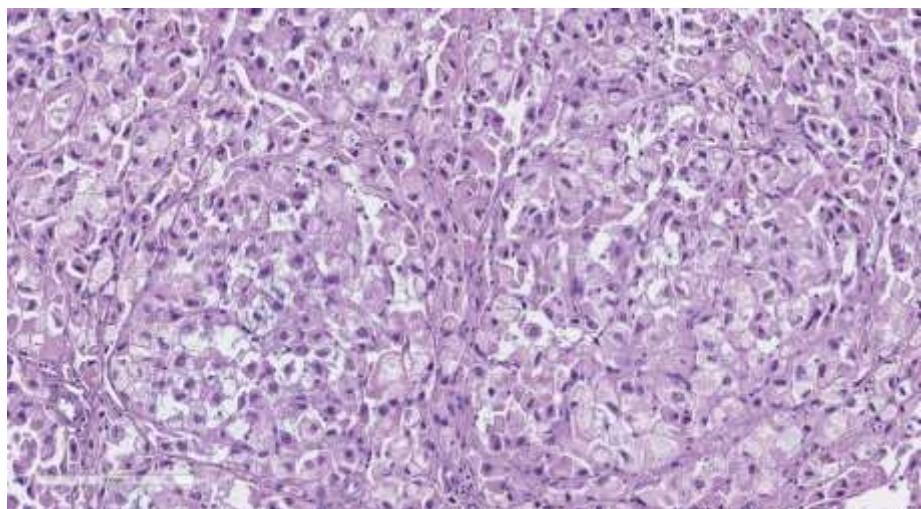


Рисунок 3.18 – Адренокортикальный рак, онкоцитарный гистологический вариант, псевдожелезистый паттерн: опухолевые клетки формируют структуры, напоминающие железы с просветом в центре. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

Миксоидный вариант АКР был диагностирован в 12,3% случаев (n=9). Для миксоидного морфологического варианта АКР были характерны несколько паттернов: трабекулярный (Рисунок 3.19), псевдожелезистый

(Рисунок 3.20), рост в виде цепочек в миксоидной строме (Рисунок 3.21), криброзный (Рисунок 3.22).

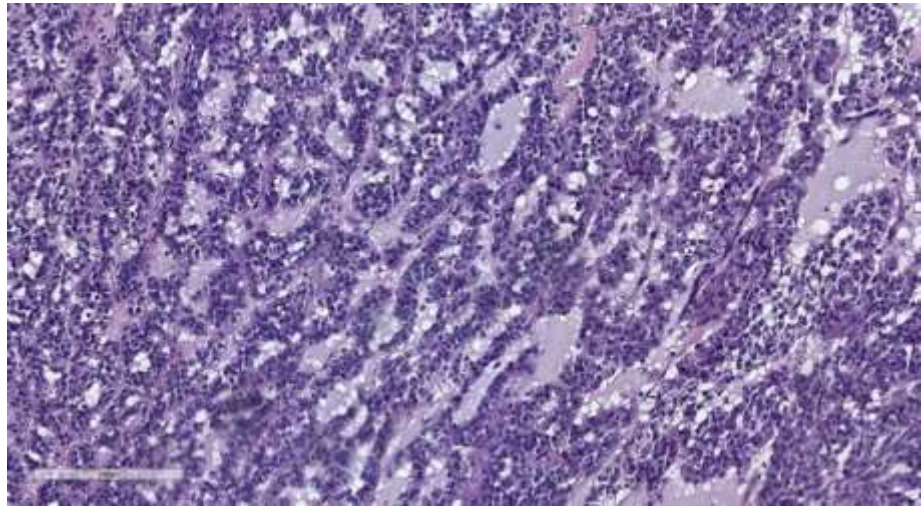


Рисунок 3.19 – Адренокортикальный рак, миксоидный гистологический вариант, трабекулярный паттерн: опухолевые клетки собраны в различные по ширине тяжи в миксоидной строме. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

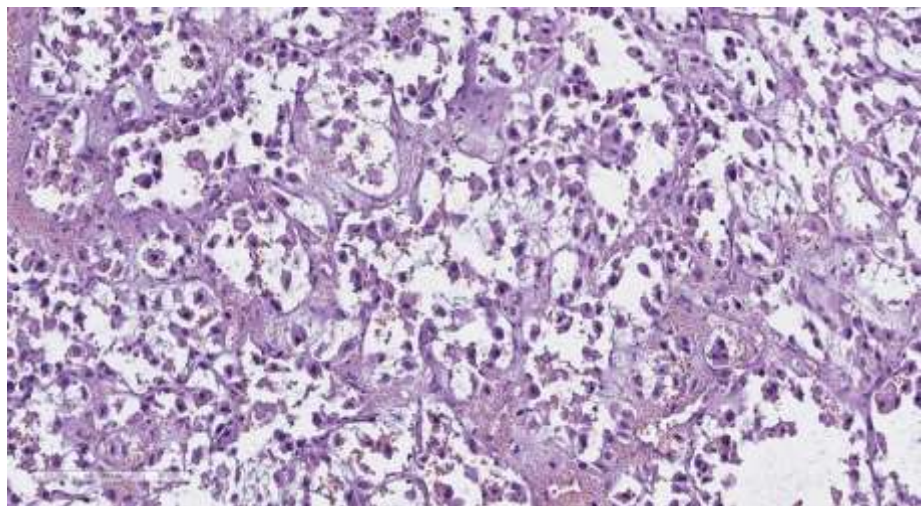


Рисунок 3.20 – Адренокортикальный рак, миксоидный гистологический вариант, псевдожелезистый паттерн: формирующиеся структуры напоминают железы с просветом в центре. Увеличение x100 (окраска: гематоксилин и эозин)

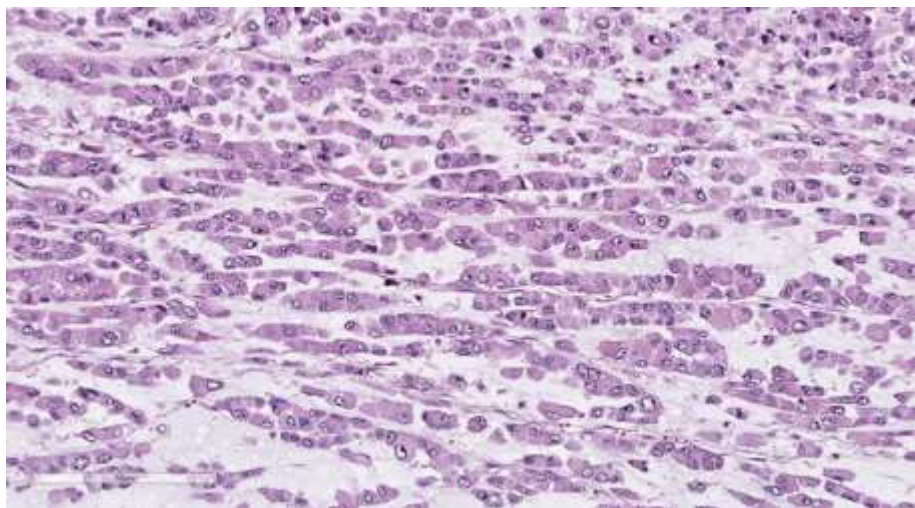


Рисунок 3.21 – Адренокортикальный рак, миксоидный гистологический вариант, с формированием цепочек: рост опухолевых клеток в виде цепочек в миксоидной строме. Увеличение $\times 100$ (окраска: гематоксилин и эозин)

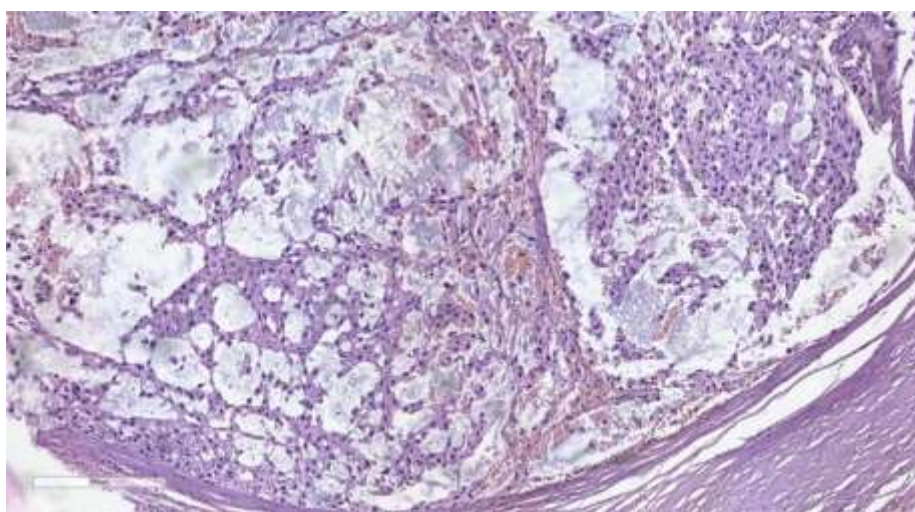


Рисунок 3.22 – Адренокортикальный рак, миксоидный гистологический вариант, криброзный паттерн: формирование округлых, резко очерченных просветов. Увеличение $\times 100$ (окраска: гематоксилин и эозин)

В миксоидных опухолях встречались относительно мономорфные клетки небольшого и среднего размера с легкой и умеренной ядерной атипией и скудной светлой эозинофильной цитоплазмой. Миксоидный матрикс обычно положительно окрашивается альциановым синим и является

отрицательным в отношении муцикармина или PAS-реакции [Kim E.I. et al., 2020]. В миксоидном варианте также обнаруживались немиксоидные области, представленные эозинофильными или светлыми клетками с диффузным, трабекулярным или гнездным типом роста.

3.2. Иммуногистохимические особенности различных морфологических вариантов аденокортикального рака

На следующем этапе исследования 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.

SF-1, Inhibin A, Melan A использовались для подтверждения аденокортикального генеза различных морфологических вариантов АКР. Подтверждение происхождения опухоли из коры надпочечников является важным диагностическим этапом, так как спектр заболеваний, с которыми проводится дифференциальная диагностика, достаточно широк. SF-1 (также известный как 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 (Рисунок 3.23).

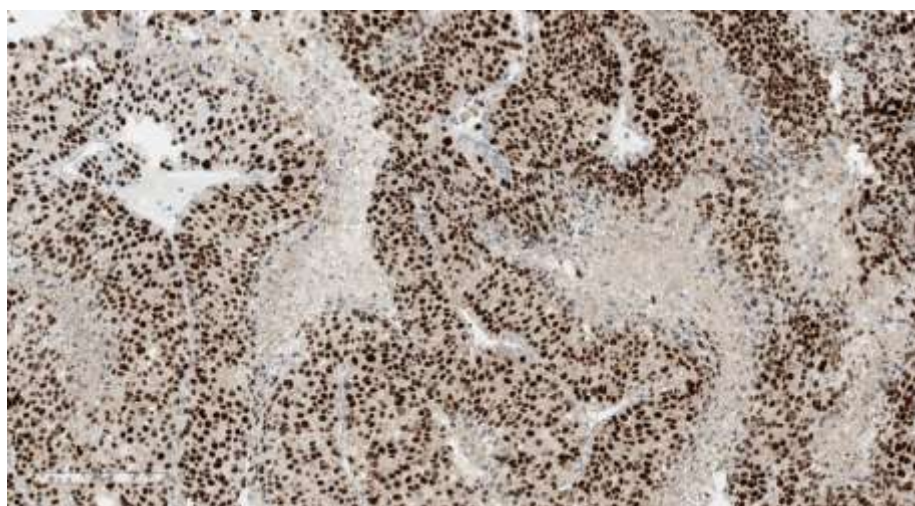


Рисунок 3.23 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к SF-1, позитивная ядерная реакция в опухолевых клетках.

Увеличение x100

Иммунореактивность Melan A - маркера, первоначально считавшегося специфичным для диагностики меланомы, 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 адренокортикальных новообразованиях, но его специфическая роль недостаточно изучена. Экспрессия данных маркеров различалась в зависимости от исследуемого морфологического варианта заболевания (Рисунок 3.24-3.25).

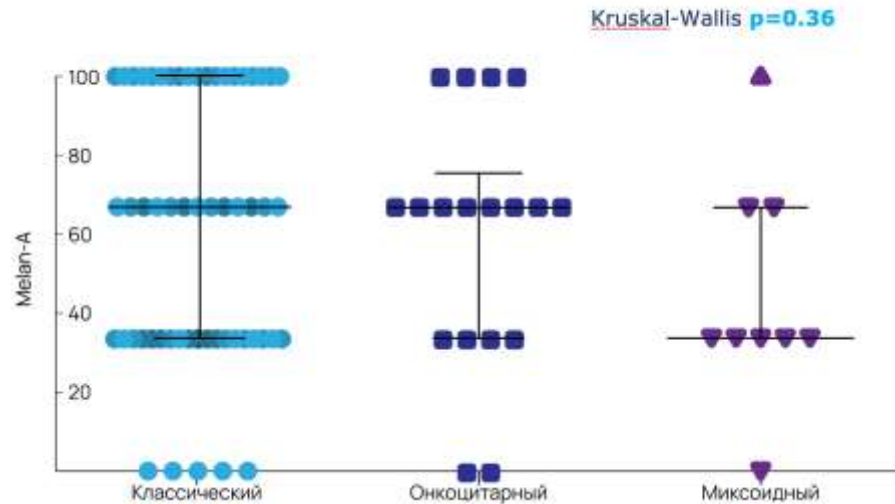


Рисунок 3.24 – Экспрессия Melan A в различных вариантах АКР

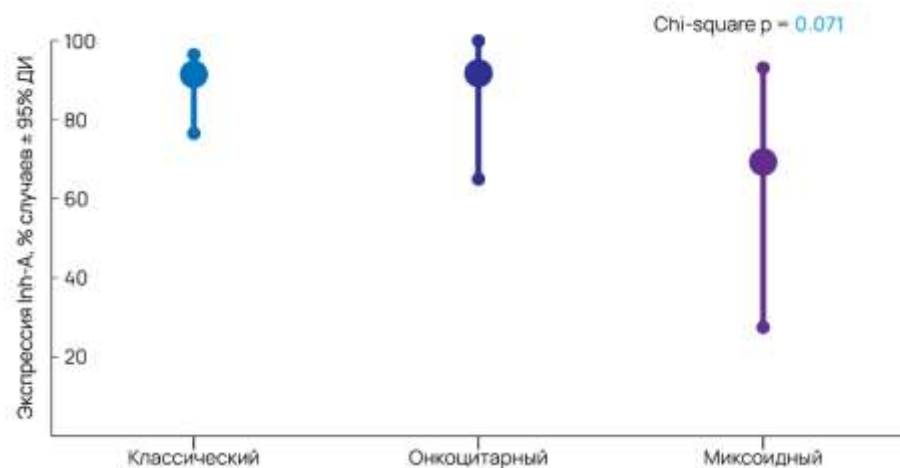


Рисунок 3.25 – Экспрессия Inhibin A в различных вариантах АКР

В нашем исследовании выраженность экспрессии Melan A в классическом варианте АКР варьировала от слабой до выраженной с равномерным распределением количества случаев (Рисунок 3.26-3.28), в то время как в онкоцитарном варианте преобладала умеренная, а в миксоидном – слабая иммунореактивность данного маркера. Достоверных различий уровня экспрессии данного маркера в зависимости от морфологического варианта АКР не выявлено.



Рисунок 3.26 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Melan A, слабая мембранная позитивная реакция. Увеличение x100

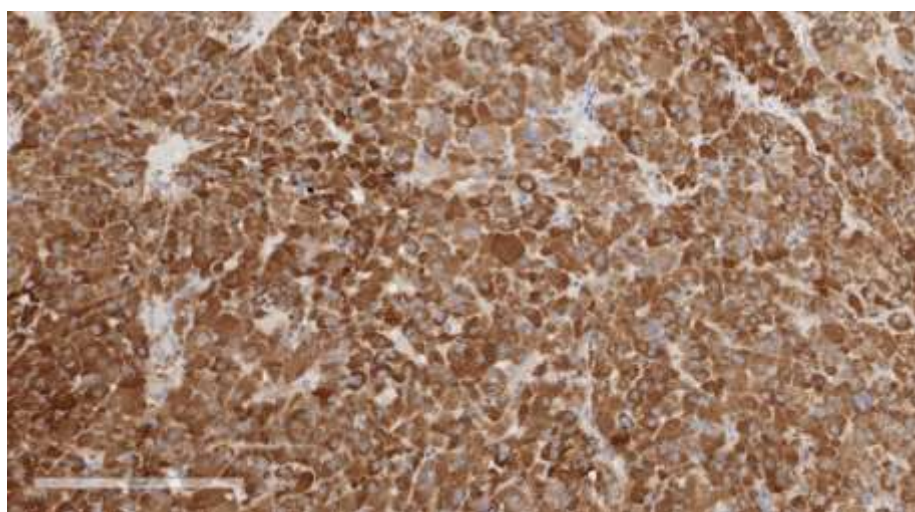


Рисунок 3.27 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Melan A, цитоплазматическая диффузная позитивная реакция. Увеличение x100

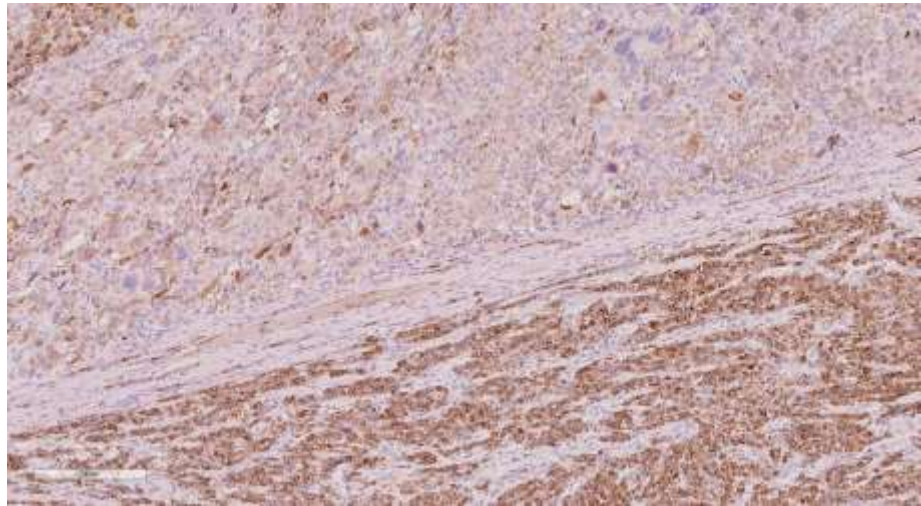


Рисунок 3.28 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Melan A, гетерогенная позитивная реакция. Увеличение x100

Для классического и онкоцитарного вариантов была характерна средняя и слабая выраженность экспрессии Inhibin A (Рисунок 3.29-3.31), 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.

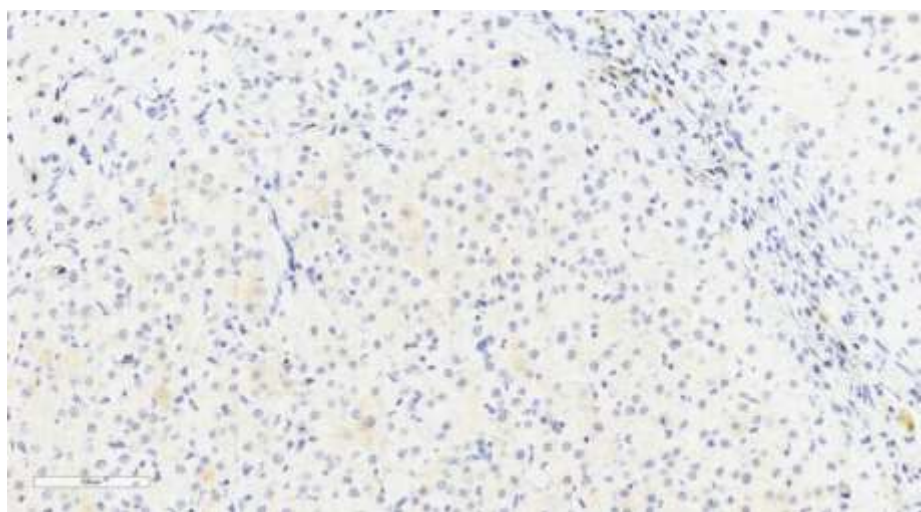


Рисунок 3.29 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с

антителами к Inhibin A, слабая цитоплазматическая очаговая позитивная реакция. Увеличение x100

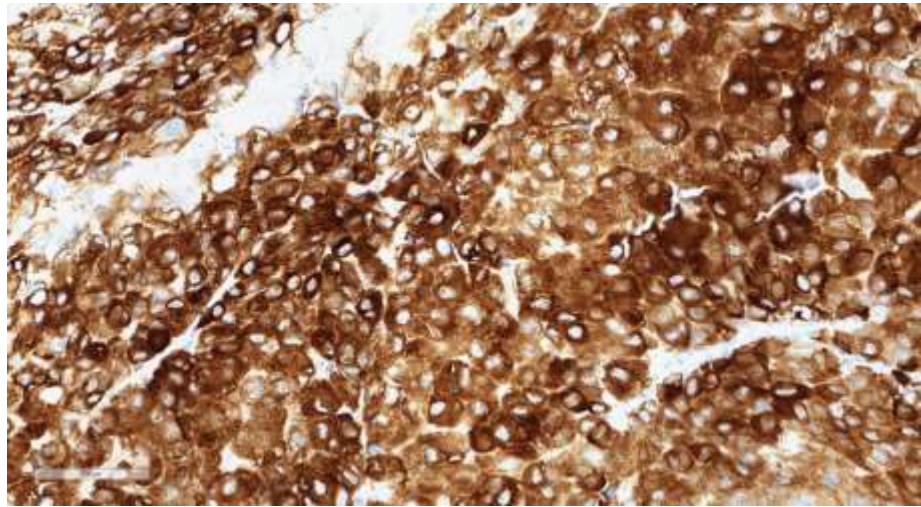


Рисунок 3.30 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Inhibin A, цитоплазматическая диффузная позитивная реакция. Увеличение x100

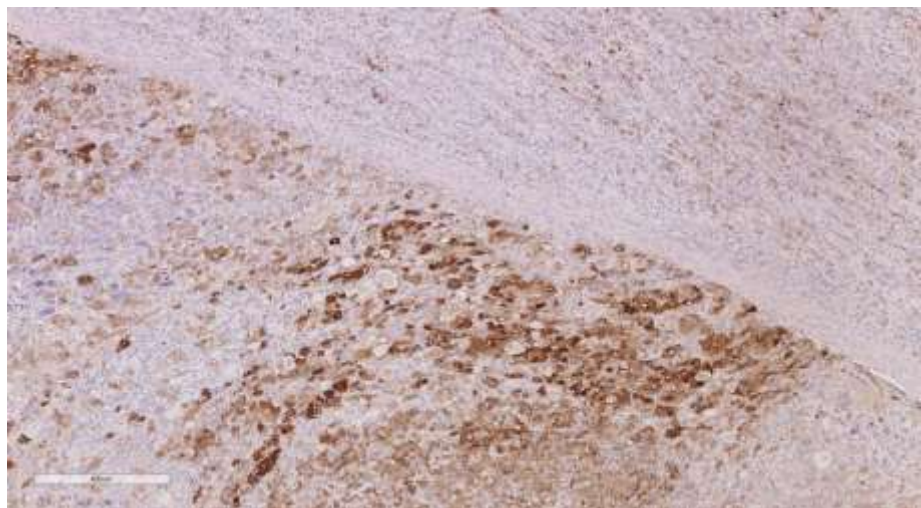


Рисунок 3.31 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Inhibin A, выраженная гетерогенная позитивная реакция. Увеличение x100

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

АМА в клинической практике является сывороточным маркером первичного билиарного цирроза печени, однако его оценка при АКР позволяет идентифицировать онкоцитарную дифференцировку опухоли [Порубаева Э.Э., и др., 2022]. В нашем исследовании экспрессия АМА отличалась сильным диффузным иммуногистохимическим окрашиванием эозинофильной гранулярной цитоплазмы только при онкоцитарном гистологическом подтипе АКР (Рисунок 3.32-3.34).

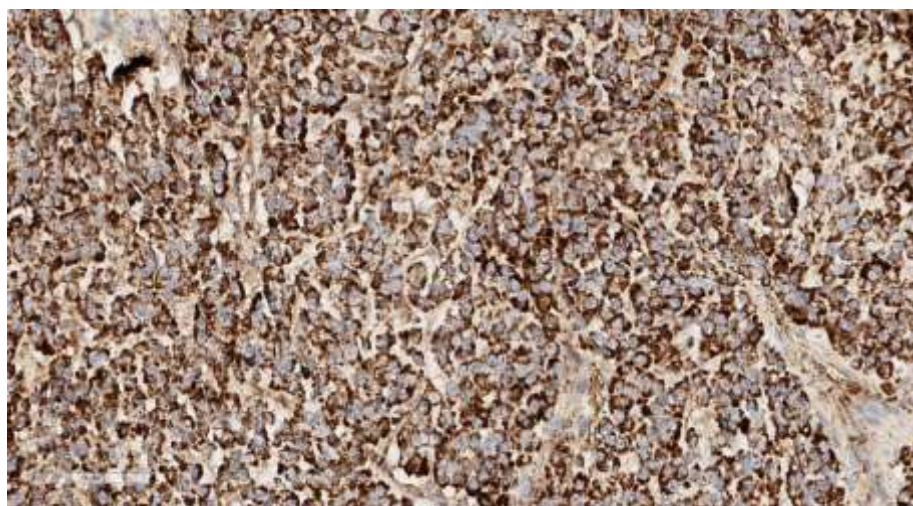


Рисунок 3.32 – Адренокортикальный рак, онкоцитарный гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антимитохондриальными антителами, умеренная диффузная цитоплазматическая реакция. Увеличение x100

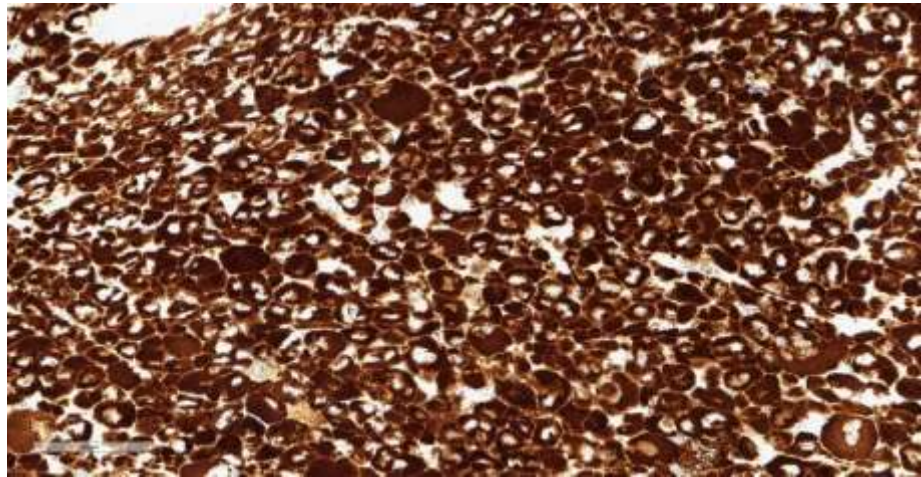


Рисунок 3.33 – Адренокортикальный рак, онкоцитарный гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антимитохондриальными антителами, выраженная диффузная цитоплазматическая реакция. Увеличение x100

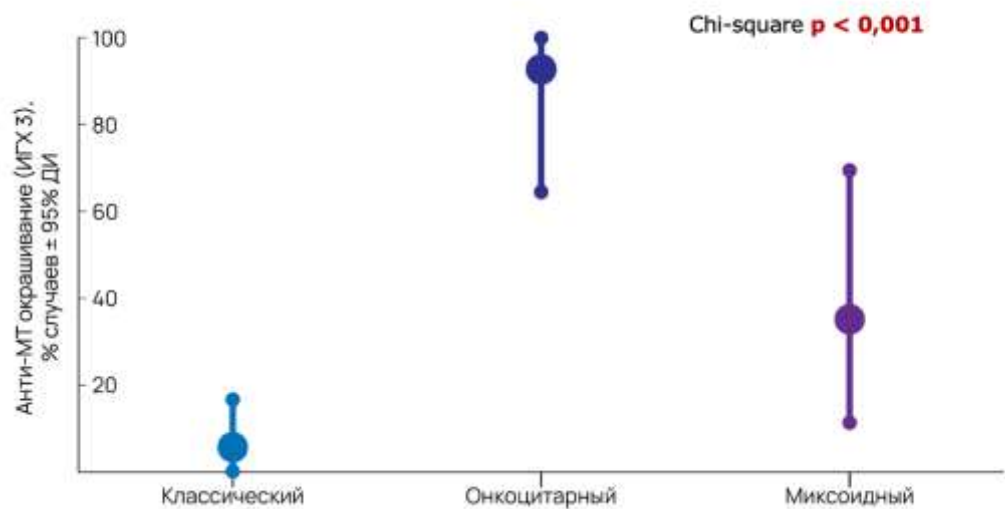


Рисунок 3.34 – Экспрессия антимитохондриальных антител в различных вариантах АКР

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 М-фазы). Установлено, что медиана пролиферативной активности в

классическом варианте АКР составляла 20%, в онкоцитарном варианте – 10%, в миксоидном варианте – 15% (Рисунок 3.35-3.37).

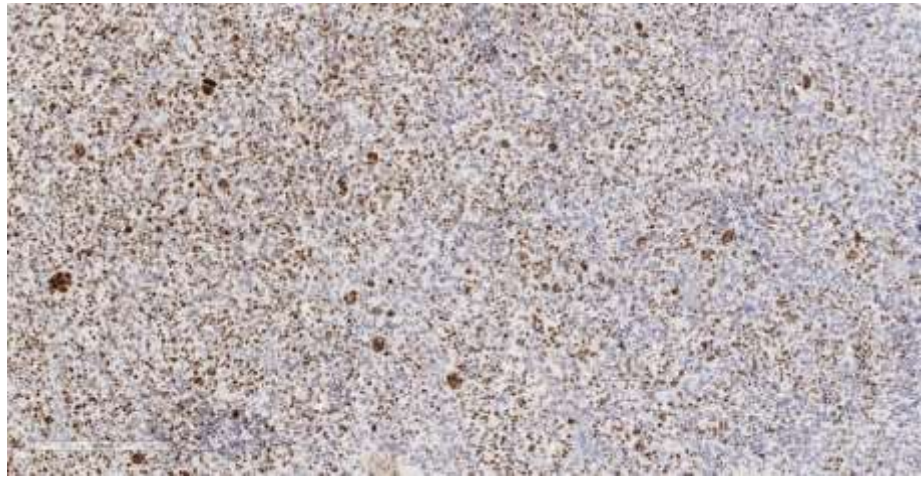


Рисунок 3.35 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67. Увеличение x100

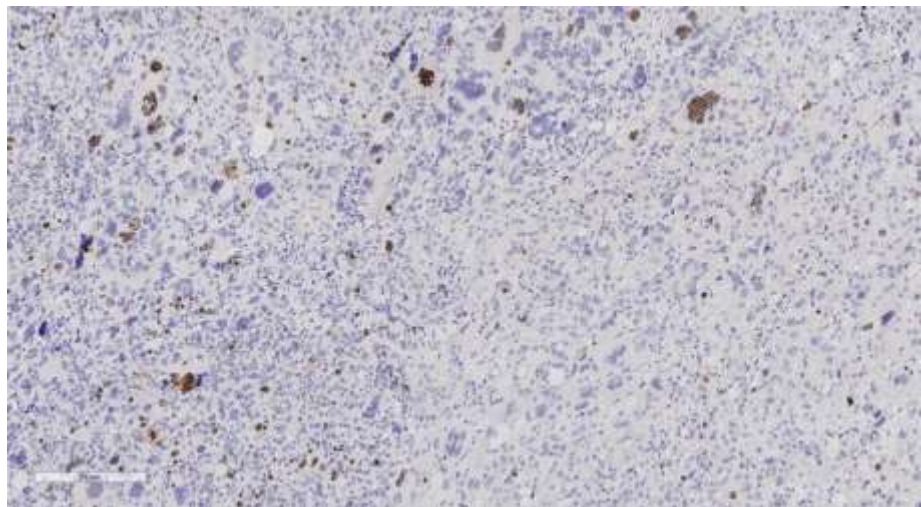


Рисунок 3.36 – Адренокортикальный рак, классический гистологический вариант, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67, выраженная гетерогенность реакции. Увеличение x100

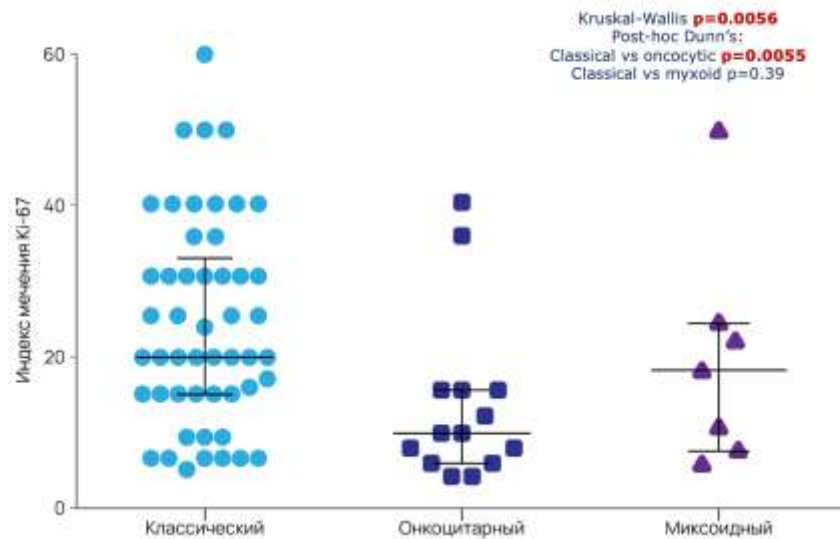


Рисунок 3.37 – Индекс пролиферативной активности Ki-67 в различных вариантах АКТ

По различным данным, экспрессия p53 наблюдается в 15 - 60% АКТ, таким образом, обнаружение иммунореактивности данного маркера может подтверждать злокачественный характер исследуемой опухоли надпочечника [Brenna C.T.A. et al., 2021; Manso J., Pezzani R., 2019]. В нашем исследовании экспрессия p53 наблюдалась в 18,6% случаев ($n=14$). Кроме того, достоверных различий уровня экспрессии данного маркера в зависимости от исследуемых морфологических вариантов АКТ не выявлено (Рисунок 3.38).

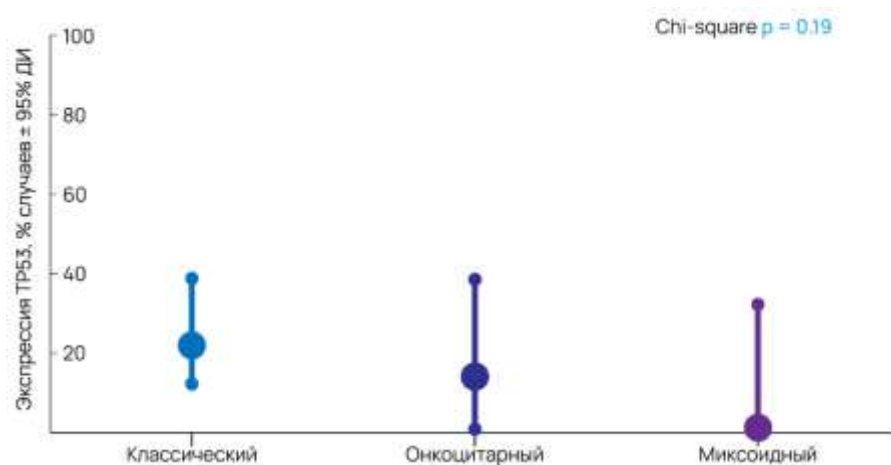


Рисунок 3.38 – Экспрессия p53 в различных вариантах АКТ

3.3. Транскриптомный профиль аденокортикального рака

В каждом из проанализированных 13 образцов 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 на основе референсных профилей экспрессии различных клеточных типов нормальной ткани взрослого надпочечника человека.

Во всех проанализированных образцах доминирующей популяцией оказались клетки с аденокортикальным типом дифференцировки. Количество перицитов было ниже в образцах опухолевой ткани АКР, что свидетельствовало об агрессивном характере развития опухоли АКР (Рисунок 3.39, 3.40) и об ограничении роста нормальных клеток кровеносных сосудов.

Эндотелий, гладкомышечные клетки стенки крупных сосудов, VSMC, макрофаги и лимфоидные клетки T/NK-ряда также были представлены во всех исследованных опухолевых и условно здоровых тканях надпочечников (Рисунки 3.41, 3.42). 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 3.43).

В целом на уровне первичного предварительного анализа наблюдалась закономерная тенденция к более высокой «чистоте» опухолевых суспензий в отношении содержания клеток с аденокортикальным типом дифференцировки по сравнению с условно здоровой тканью надпочечника (Рисунки 3.44, 3.45), что соответствует общепризнанной особенности АКР, наиболее часто демонстрирующего диффузный характер роста с минимальным количеством стромального компонента.

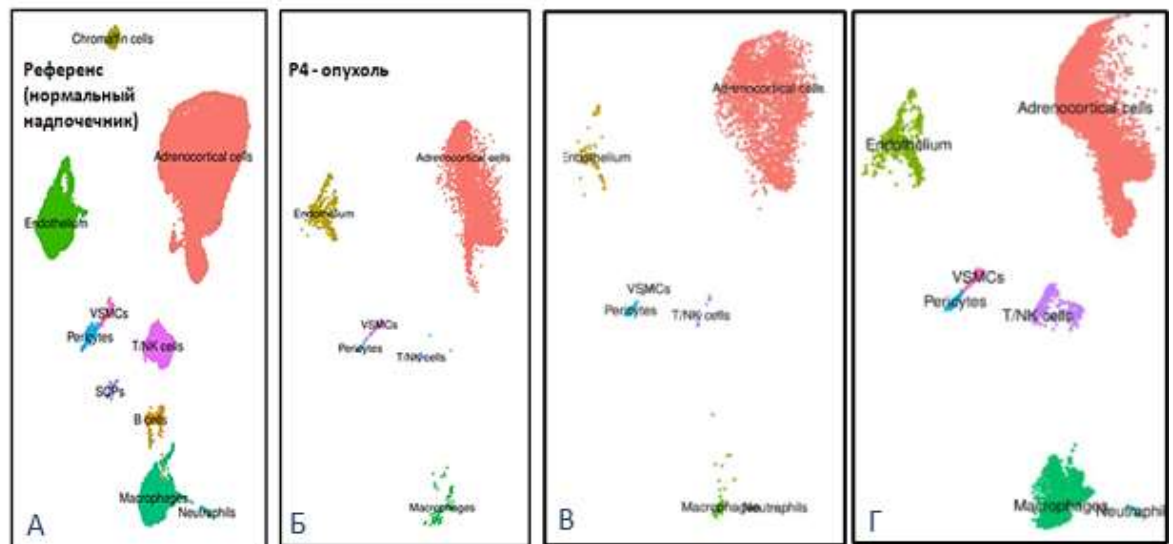


Рисунок 3.39 - Картирование клеточных типов на референс (А) для репрезентативных проб классического (Б), миксоидного (В), онкоцитарного подтипов АКР

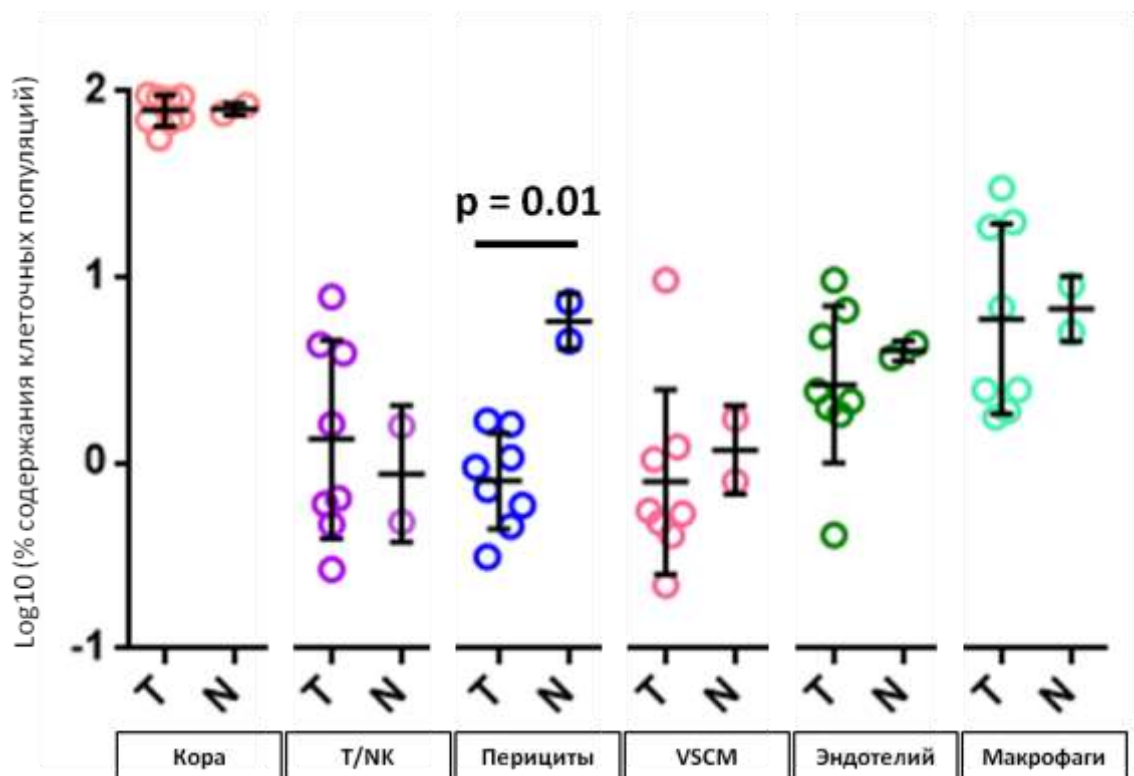


Рисунок 3.40 - Процентное содержание основных клеточных типов в опухолевых и условно здоровых тканях надпочечника. Т – клетки из образцов АКР, N – клетки условно здоровой окружающей ткани надпочечника

При совместном картировании данных, полученных в парных образцах опухолевой и условно здоровой ткани надпочечников пациентов № 4 и № 6, опухолевые и нормальные клетки надпочечников кластеризовались отдельно друг от друга в UMAP-координатах, что указывает на значительные различия транскриптомных профилей нормальных и злокачественных адренокортикальных клеток (Рисунок 3.41).

Таким образом, 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.

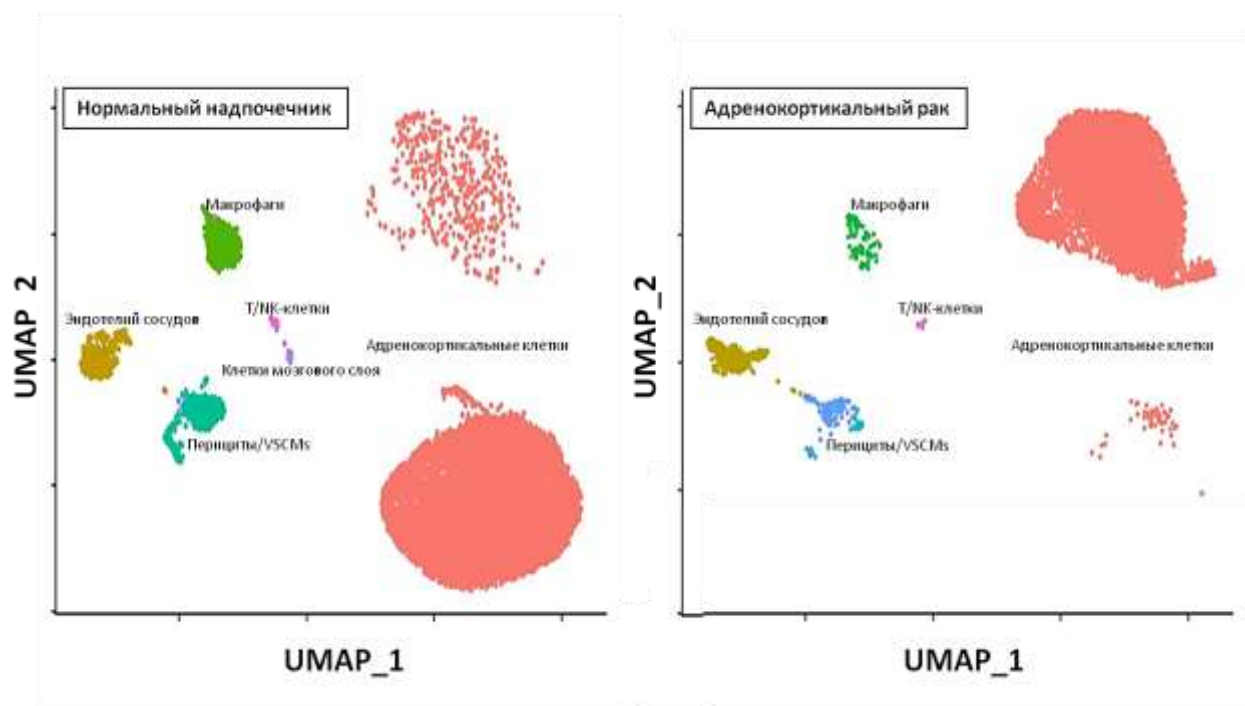


Рисунок 3.41 - Совместное картирование клеточных типов парных нормальной и опухолевой ткани коры надпочечника (пациенты № 4 и № 6)

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 3.42).

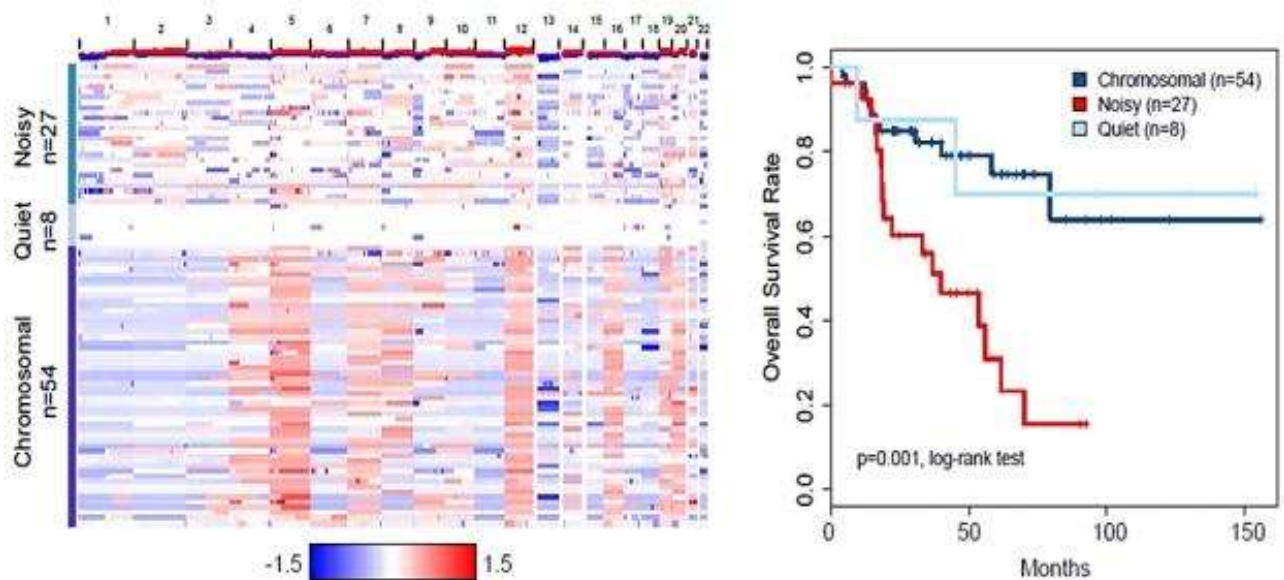


Рисунок 3.42 - CNV-подтипы АКР по данным bulk-CNV-профилирования The Cancer Genome Atlas (TCGA) [Zheng S. et al., 2016]

На Рисунке 3.43 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

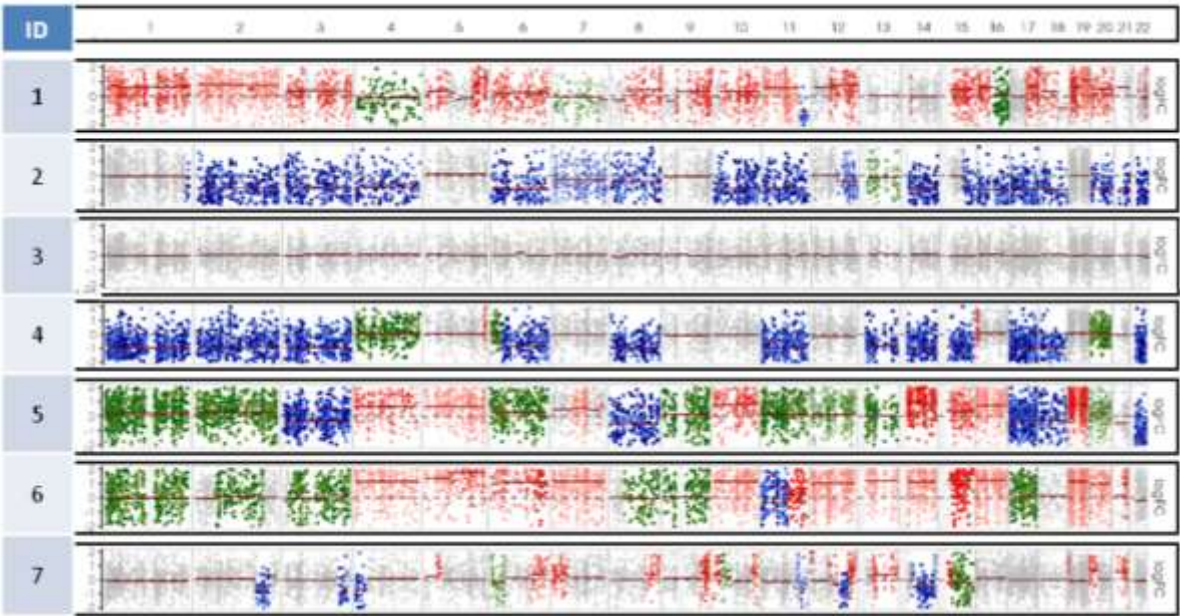
является отличительной особенностью наиболее частого «chromosomal» CNV-типа АКР (Рисунок 3.44).

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.

Установлено, что рецидивная опухоль в выборке (пациент №1) демонстрировала существенно отличающийся от первичных АКР паттерн CNV с обширными полнохромосомными амплификациями при практически полном отсутствии делеций (Рисунок 3.43).

Для определения локализации злокачественных CNV- событий в клетках коры надпочечников результаты Numbat единичных клеток были кластеризованы отдельно друг от друга в UMAP-координатах (Рисунок 3.44). Все клетки АКР содержали различные CNV, а также условно здоровые адренокартикальные клетки коры надпочечников имели CNV, что может служить маркером прогнозирования злокачественности: возникновения рецидива, отдаленных метастазов, поскольку CNV возникают во всех клетках коры надпочечников, или некроза опухоли.



ID	Стадия TNM/ENSAT, морфологический вариант	Гормональная активность
1	T3N0M0/III, рецидив, классический вариант	Кортизол (синдром Кушинга)
2	T2N0M0/II, классический вариант	Кортизол (синдром Кушинга)
3	T3N0M0/III, онкоцитарный вариант	Альдостерон (первичный альдостеронизм)
4	T1N0M0/I, классический вариант	Нефункционирующая
5	T2N0M0/II, классический вариант	Кортизол (синдром Кушинга)
6	T2N0M0/II, классический вариант	Кортизол (синдром Кушинга)
7	T4N0M0/III, миксоидный вариант	Кортизол (синдром Кушинга)

Рисунок 3.43 - 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

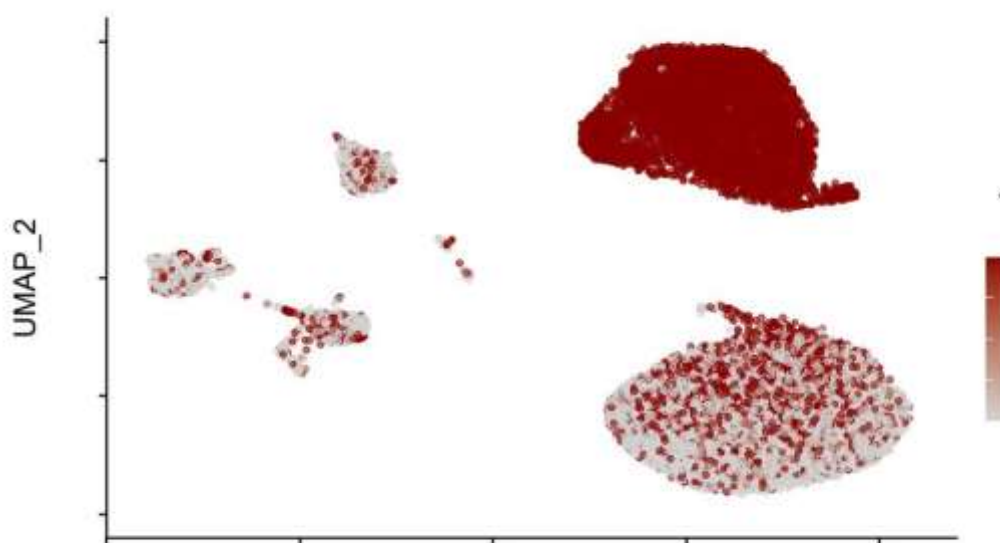


Рисунок 3.44 - Прогнозируемая вероятность злокачественности (CNV-анализ)

3.4. Новая гистологическая система стратификации риска адренокортикальных опухолей

В исследование были включены пациенты с новообразованиями надпочечников, получившие лечение в ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, а также консультативный операционный материал пациентов из других лечебных учреждений. У всех больных проведена адреналэктомия в период с 2005 по 2022 г. Пациенты, не достигшие 18 лет на момент хирургического лечения, не были включены в исследование. Всего для исследования было отобрано 143 случая опухолей надпочечников.

Все образцы опухолевой ткани верифицировали в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей надпочечника (ВОЗ, 2022). При макроскопическом исследовании указывали максимальный размер образования (см) и массу опухоли (г). В образцах оценивали паттерн

роста, ядерный полиморфизм, наличие и количество митозов в 10 полях зрения при увеличении микроскопа в 400 раз, наличие патологических митозов, некрозов, количество клеток со светлой цитоплазмой. Тщательно исследовали капсульную, сосудистую опухолевую инвазию, поражение периадреналовой жировой клетчатки.

Размер выборки составил 143 пациента, которые 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 3.45).

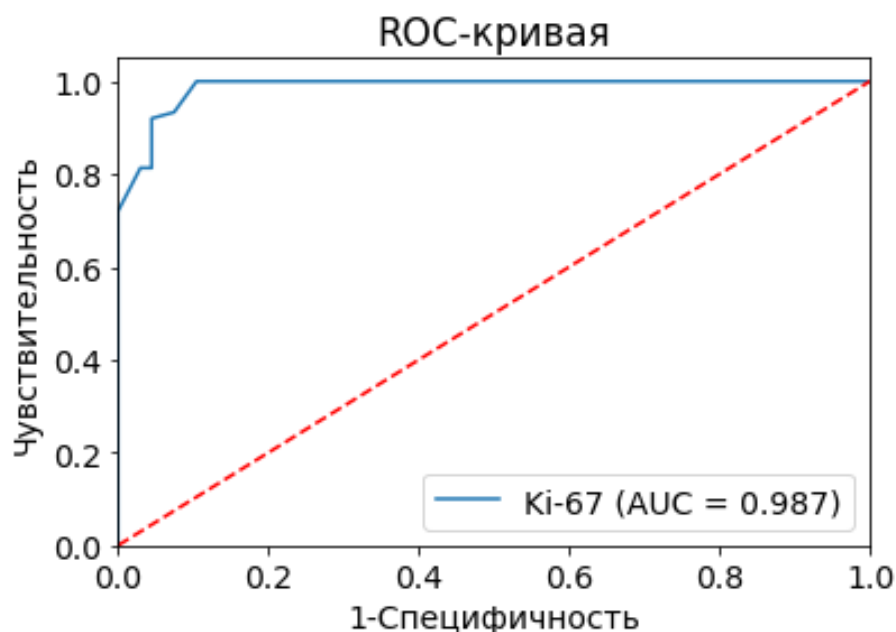


Рисунок 3.45 – ROC-анализ уровня Ki-67 в отношении диагностики АКР

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

Юдена была выбрана отрезная точка Ki-67 равная 5%. Матрица классификации данной точки представлена в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Матрица классификации для диагностики АКР с использованием отрезной точки Ki-67 равной 5%

Величины Ki-67	АКР	АКА / ОНЗП
$Ki-67 \geq 5\%$	36	6
$Ki-67 < 5\%$	0	53

Таким образом, у всех пациентов с $Ki-67 < 5\%$ гистологический диагноз – АКА.

На следующем этапе был также выполнен ROC анализ показателя Ki-67 для пациентов, у которых уровень Ki-67 был более или равен 5% (рисунок 3.46).

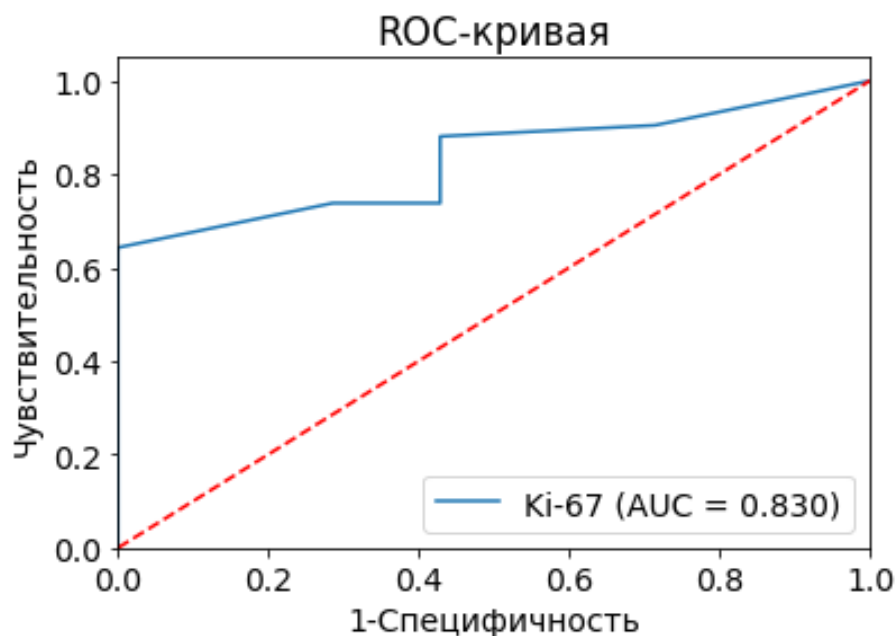


Рисунок 3.46 – ROC-анализ уровня Ki-67 в отношении диагностики АКР

AUC=0,830 (95% ДИ: 0,696-0,964), что соответствует удовлетворительной диагностической эффективности данного показателя. Согласно индексу Юдена была выбрана отрезная точка Ki-67 равная 11%. Матрица классификации данной точки представлена в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Матрица классификации для диагностики АКР с использованием отрезной точки Ki-67 равной 11%

Величины Ki-67	АКР	АКА / ОНЗП
$Ki-67 \geq 11\%$	23	0
$Ki-67 < 11\%$	13	6

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 11-регуляризацией. Отклик – гистологический диагноз. Используемый набор предикторов:

1. Размер образования (максимальный) – числовой параметр;
2. РННЗ – числовой параметр;
3. Ki-67 – числовой параметр;
4. Митозы – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);
5. Ядерный полиморфизм – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);
6. Патологические митозы – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);
7. Инвазия в капсулу – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);
8. Диффузный рост – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);

9. Инвазия в синусоиды – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);

10. Инвазия в вены – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);

11. Некрозы – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет);

12. Эозинофильные клетки – бинарный параметр в формате (1/0, что соответствует да/нет).

В результате была получена регрессионная модель:

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

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

Веса остальных параметров модели были равны 0, то есть остальные признаки не учитывались при постановке диагноза.

При значении $p \geq 0,5$ гистологический диагноз будет соответствовать АКР, при значении $p < 0,5$ – АКА. Матрица классификации модели представлена в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Матрица классификации для диагностики АКР с использованием логистической регрессионной модели

Величины Ki-67	АКР	АКА / ОНЗП
Результат модели – АКР	13	3
Результат модели – АКА	0	3

Таким образом, в диагностике АКР используются 8 параметров:

1. Размер опухоли

2. Масса опухоли
3. Ki-67
4. Митозы
5. Ядерный полиморфизм
6. Патологические митозы
7. Инвазия в капсулу
8. Некрозы

Диагностика осуществляется в 3 этапа:

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

2. Ki-67 $<5\%$ \rightarrow Диагноз: АКА

Ki-67 $\geq 11\%$ \rightarrow Диагноз: АКР

3. Ki-67 = 5-10%

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

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

$p \geq 0,5 \rightarrow$ Диагноз: АКР

$p < 0,5 \rightarrow$ Диагноз: АКА.

Итоговая матрица классификации представлена в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Итоговая матрица классификации для диагностики АКР

Обучающая выборка	АКР	АКА / ОНЗП
Результат диагностики – АКР	68	3
Результат диагностики – АКА	0	57
Тестовая выборка		
Результат диагностики – АКР	8	0
Результат диагностики – АКА	0	7

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

Клинический пример 1. Пациентка Л., 66 лет. Обратилась с жалобами на эпизоды повышения АД до 200/120 мм рт. ст., общую слабость и повышенную утомляемость. При обследовании по данным УЗИ выявлено образование в области левого надпочечника.

По данным МСКТ выявлено солидное образование левого надпочечника максимальным диаметром 37 мм, нативной плотностью 25-35 НУ. Альдостерон – 120 пг/мл, ренин – 0.22 нг/мл/час, АРС – 545 (до 300). В суточной порции мочи метелированные катехоламины в норме. При обследовании в динамике альдостерон – 218 пг/мл (<199), ренин – 1.566 нг/мл/час (2,79 – 61,83), АРС – 139 (до 100), кортизол при ночном подавляющем тесте с 1 мг дексаметазона – 2 мкг/дл, АКТГ утр. – 8.9 пг/мл (7,2 – 63,3).

При проведении ПЭТ/КТ с 18ФДГ выявлена гиперфиксация РФП образованием левого надпочечника, SUV max 21.33. Установлен предварительный диагноз – опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом.

Пациента была госпитализирована в хирургическое отделение, где проведена плановая эндоскопическая левосторонняя адреналэктомия.

Результаты патологоанатомического исследования представлены в Таблице 3.5.

В январе 2023 диагностировано распространение опухолевого процесса – локорегионарный рецидив. Безрецидивная выживаемость составила 12 мес.

Клинический пример 2. Пациентка П., 58 лет. Обратилась с жалобами на эпизоды повышения АД до 180/120 мм рт. ст. Со слов пациентки в 2012 году впервые диагностировано образование в левом надпочечнике размерами 27x15x17 мм.

По данным МСКТ от 2018 г. – в левом надпочечнике образование размерами 67x46x46 мм, овоидной формы.

По результатам гормонального обследования опухоль с признаками гормональной активности (гиперкортицизм): кортизол – 375,7 нмоль/л, АКТГ – 4,1 пмоль/л (6 – 58), альдостерон – 130,7 пг/мл (<199), ренин – 3,9 мкМЕ/мл (2,79 – 61,83).

Учитывая высокий злокачественный потенциал образования в проекции правого надпочечника, выполнено плановое хирургическое лечение в объеме левосторонней адреналэктомии с опухолью. Результаты патологоанатомического исследования представлены в Таблице 3.5.

На данный момент пациентка жива без признаков прогрессирования заболевания, безрецидивная и общая выживаемость составляют 35 мес.

Клинический пример 3. Пациентка С., 53 лет. При обследовании в мае 2015 г. по данным УЗИ было найдено образование правого надпочечника размером около 44 мм, при повторном исследовании в мае 2016 г. – образование 58 мм.

Проведена дополнительно МСКТ, по результатам которой установлено образование в правом надпочечнике размерами 67х43х35 мм, плотность образования до в/в контраста 38-56 ед. Н, после артериальная фаза +43-70 ед. Н, в венозную фазу +55-100 ед. Н. По результатам обследования данных в пользу гормональной активности не получено.

Пациентке выставлен предварительный диагноз – опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом. Выполнено хирургическое лечение в объеме правосторонней адреналэктомии с опухолью. Результаты патологоанатомического исследования представлены в Таблице 3.5.

На момент обследования безрецидивная и общая выживаемость составили 13 и 37 мес. соответственно, установлен системный рецидив, пациентка скончалась.

Клинический пример 4. Пациентка Ю., 49 лет. Предъявляет жалобы на повышение АД до 280/160 мм рт. ст., на фоне постоянной многокомпонентной антигипертензивной терапии, боль в спине с иррадиацией в нижние

конечности, выраженную слабость, увеличение массы тела на 12 кг за последние 3 мес.

По данным лабораторных исследований: альдостерон – 644 пг/мл (<199); ренин – 1,67 (2,79 – 61,83), кортизол крови – 1351,89 нмоль/л, АКТГ – 24,8 пмоль/л (6 – 58).

Выполнено хирургическое лечение в объеме левосторонней адреналэктомии с опухолью. Результаты патологоанатомического исследования представлены в Таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Результаты патологоанатомического исследования пациентов с опухолями надпочечника

Показатели	1	2	3	4
Размер, см	3,7	6,7	4,0	5,0
Масса, г	40	70	30	40
Ki67, %	10	15	10	6
Митозы	нет	да	нет	нет
Ядерный полиморфизм	нет	нет	нет	да
Патологические митозы	нет	да	да	нет
Инвазия в капсулу	нет	да	да	нет
Некрозы	да	да	нет	нет
Диффузный рост	нет	нет	да	нет
Инвазия в синусоиды	нет	нет	нет	нет
Инвазия в вены	нет	нет	нет	нет

Эозинофильные клетки	нет	да	да	нет
Weiss/Lin— Weiss—Bisceglia	1 малый критерий	5	1 большой и 1 малый критерии	1
Диагноз в соответствии с Weiss/Lin— Weiss—Bisceglia	Опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом	АКР, миксоидный вариант	АКР, онкоцитарный вариант	АКА
Диагноз в соответствии с новой шкалой	АКР	АКР	АКР	АКА

Таким образом, в исследуемом материале классический морфологический вариант АКР был диагностирован в 68% (n=51) случаев, онкоцитарный тип – в 20% (n=15), миксоидный тип опухоли – в 12% (n=9) случаев. На данном этапе исследования были охарактеризованы основные гистологические варианты обсуждаемого заболевания с описанием паттернов роста. Размеры опухолевых клеток в классическом варианте АКР варьировали от средних до крупных. В данном гистологическом подтипе выявлены диффузный, трабекулярный, альвеолярный, псевдожелезистый, карциноидоподобный паттерны роста, а также рост в виде цепочек.

Установлено, что опухолевые клетки онкоцитарного варианта в 1-2 раза больше нормальных клеток надпочечника, полиморфны, с зернистой ярко-эозинофильной обильной цитоплазмой и центральным пикнотичным ядром. Для данного подтипа АКР было выявлено три основных паттерна роста: диффузный, трабекулярный и псевдожелезистый.

В миксоидных опухолях встречались относительно мономорфные клетки небольшого и среднего размера с легкой и умеренной ядерной атипией и скудной светлой эозинофильной цитоплазмой. Для данного

морфологического варианта АКР были характерны трабекулярный, псевдожелезистый, криброзный паттерны роста и рост в виде цепочек в миксоидной строме.

Иммуногистохимическая диагностика АКР все еще представляет значительные трудности ввиду отсутствия высокоспецифичных маркеров, тем не менее, согласно нашим результатам, иммуногистохимическая панель маркеров, включающая SF-1, Melan A, Inhibin A, позволяет со 100%-ной чувствительностью подтвердить корковый гистогенез опухоли надпочечника. В свою очередь каждый гистологический вариант может характеризоваться различной выраженностью иммунореактивности исследуемых маркеров: миксоидный вариант отличается достоверным снижением экспрессии Inhibin A, особенностью онкоцитарного варианта является сильное диффузное иммуногистохимическое окрашивание эозинофильной гранулярной цитоплазмы с АМА. Обнаружены статистически значимые различия индекса пролиферативной активности Ki-67 в зависимости от исследуемых морфологических вариантов АКР.

По результатам анализа клеточного состава образцов окружающей ткани надпочечника и опухолевых образцов АКР количество перицитов было ниже в образцах опухолевой ткани АКР. Транскрипционные профили нормальных и опухолевых адренокортикальных клеток надпочечника значительно отличаются друг от друга.

Анализ CNV единичных клеток показал, что рецидивная опухоль АКР имела значительное число амплификаций, на фоне полного отсутствия делеций. Продемонстрировано наличие множественных сегментарных амплификаций/делеций в гормонально-активной опухоли (при первичном альдостеронизме). В остальных образцах АКР были выявлены множественные полнохромосомные CNV.

ГЛАВА 4. ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА

4.1. Общая и безрецидивная выживаемость пациентов с различными морфологическими вариантами аденокортикального рака

На следующем этапе нашего исследования у 73 пациентов с различными морфологическими вариантами АКР были проанализированы безрецидивная и общая выживаемость методом Каплана-Мейера с последующими попарными сравнениями методом log-rank тест. Среди обследованного материала классический морфологический вариант АКР был диагностирован в 67,1% случаев (n=49), онкоцитарный тип – в 20,5% случаев (n=15), миксоидный тип опухоли – в 12,3% (n=9).

Медианы БРВ у пациентов с классическим (n=49), онкоцитарным (n=15) и миксоидным (n=9) типом опухоли представлены в Таблице 4.1.

Морфологический тип АКР	Me
Классический	23,0
Онкоцитарный	43,0
Миксоидный	13,0
Все пациенты	32,0

Таблица 4.1 – Медиана (мес.) БРВ у пациентов с различными морфологическими вариантами 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 4.1 представлены результаты анализа БРВ в зависимости от морфологического варианта АКР методом Каплан-Майера.

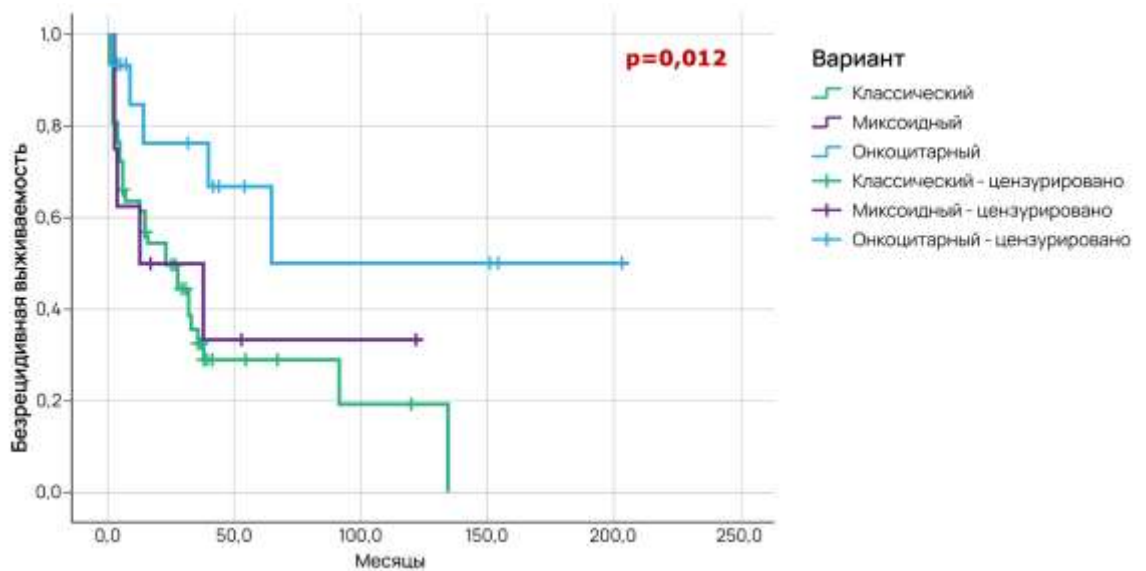


Рисунок 4.1 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от морфологического варианта АКР

Как видно, 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.

На Рисунке 4.2 представлены результаты анализа ОВ в зависимости от морфологического варианта АКР методом Каплан-Майера.

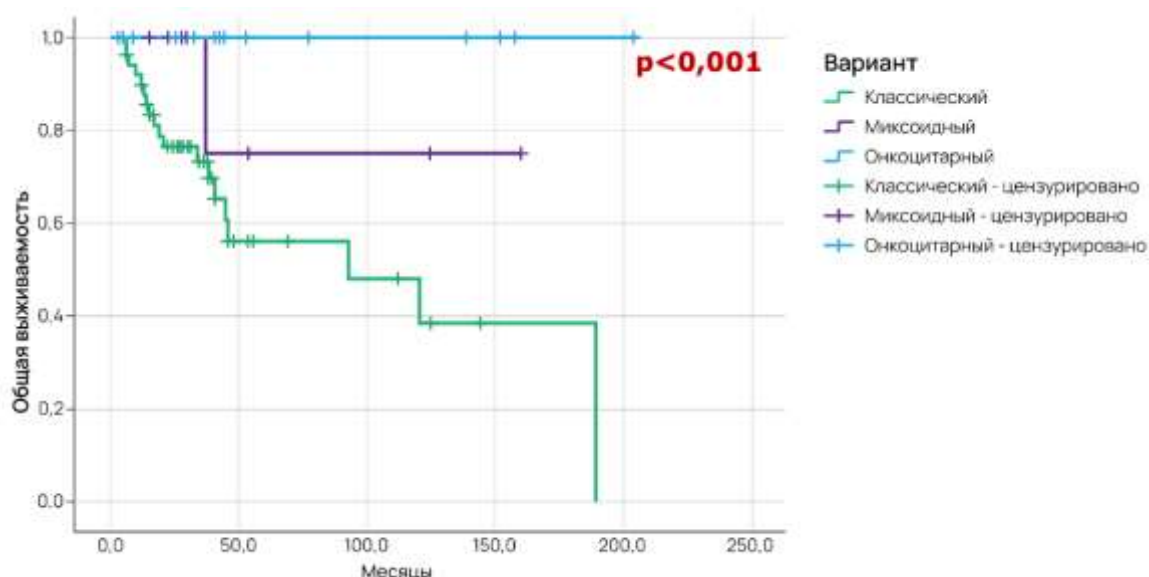


Рисунок 4.2 – Общая выживаемость в зависимости от морфологического варианта АКР

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

Итак, медиана БРВ в исследуемой когорте составила 32,0 мес., у пациентов с классическим вариантом АКР – 23,0 мес., с миксоидным – 13,0 мес. Выявлено, что 5-летняя БРВ была максимальной у пациентов с онкоцитарным вариантом АКР и составляла 66,8%, у больных с классическим вариантом данный показатель был на уровне 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 в течение 10,4 года. Половина больных с онкоцитарным вариантом не имели рецидива заболевания на протяжении 17,5 лет. Обнаружено, что 5-летняя ОВ у обследованных с онкоцитарным вариантом составляла 100% и сохранялась на таком уровне в течение 17,5 лет наблюдения.

У больных с классическим типом значение данного показателя составило 55,9%, с миксоидным – 75,0%, эти уровни ОВ сохранялись на протяжении 13,5 лет катмнеза. Через 15,6 лет наблюдения у всех пациентов с классическим морфологическим вариантом АКР зафиксирован летальный исход.

4.2. Влияние клинико-морфологических и клинико-иммунофенотипических параметров на уровни общей и безрецидивной выживаемости

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).

Частота выявления различных критериев данной шкалы у обследованных представлена на Рисунке 4.3.



Рисунок 4.3 – Частота наличия критериев шкалы Weiss у обследованных пациентов (n=73)

Инвазия АКР в вены была выявлена у 17,8% обследованных (n=13). На Рисунке 4.4 представлено распределение данного критерия в зависимости от морфологического варианта АКР.

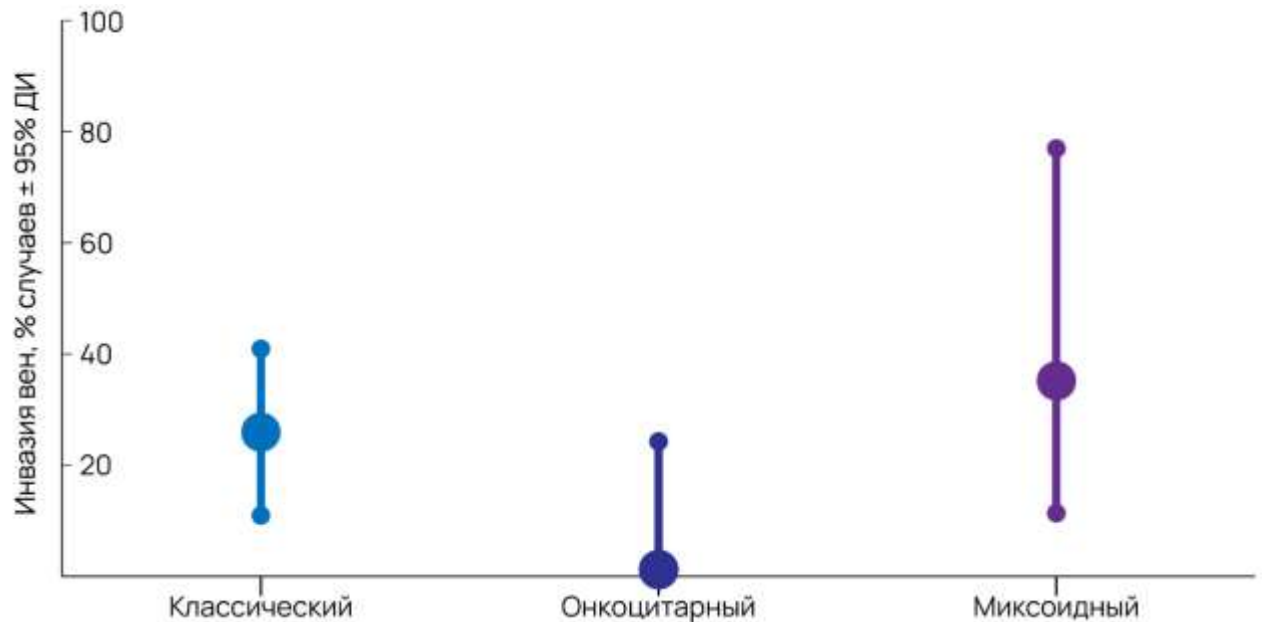


Рисунок 4.4 – Частота инвазии опухоли в вены у пациентов с различными морфологическими вариантами АКР

Статистически достоверных различий по частоте инвазии опухоли в вены в зависимости от ее морфологического типа обнаружено не было (Chi-square $p = 0,08$).

Инвазия АКР в синусоиды обнаружена в 41,1% случаев (n=30). На Рисунке 4.5 представлено распределение данного критерия у пациентов с различными морфологическими вариантами АКР.

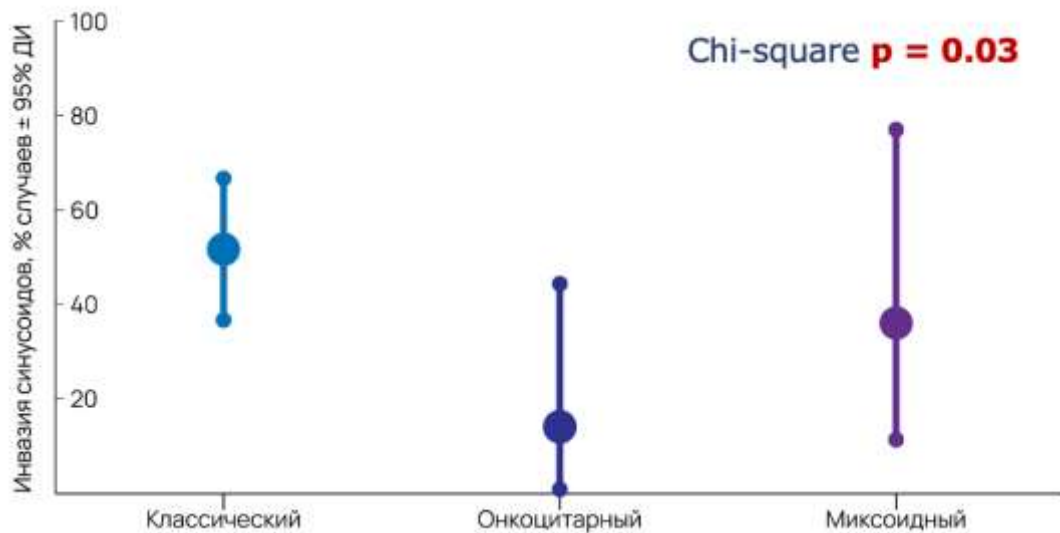


Рисунок 4.5 – Частота инвазии опухоли в синусоиды у пациентов с различными морфологическими типами АКР

Инвазия опухоли в синусоиды установлена у 50,0% пациентов с классическим вариантом АКР, что было достоверно ($\text{Chi-square } p = 0,03$) 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 ($n=43$).

При морфологическом исследовании участки некроза обнаруживались в 79,5% случаев ($n=58$). На Рисунке 4.6 представлено распределение данного критерия у пациентов с различными морфологическими вариантами АКР.

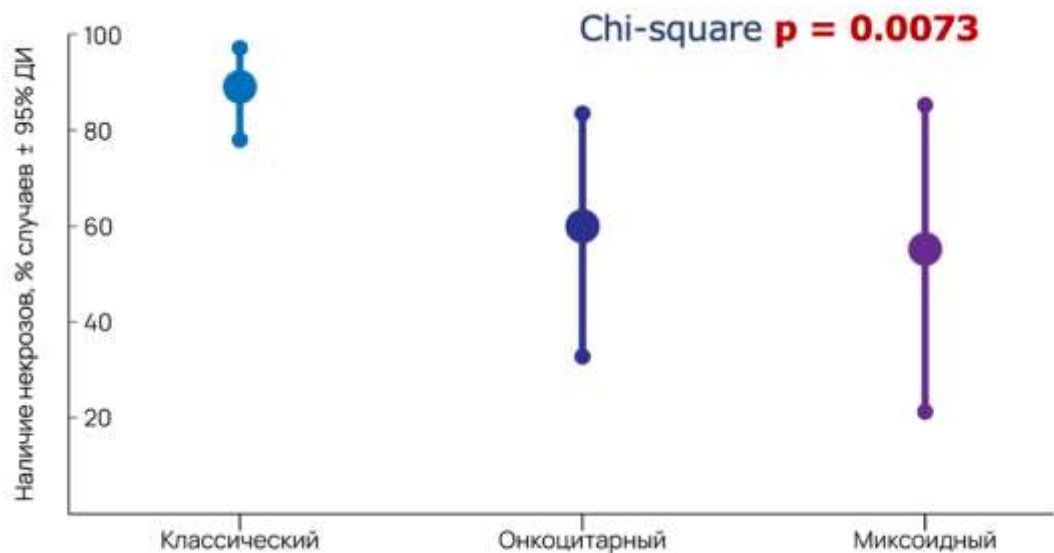


Рисунок 4.6 – Частота выявления некрозов у пациентов с различными морфологическими типами АКР

Наличие некрозов выявлено у 89,8% пациентов с классическим типом АКР, что было достоверно ($p=0,0073$) чаще по сравнению с соответствующими значениями показателя при онкоцитарном (60,0%) и миксоидном типах (55,6%).

Критерий «высокий ядерный индекс» в когорте обследованных обнаружен в 58,9% случаев. Достоверных отличий в зависимости от морфологического типа АКР не выявлено ($p=0,064$) (Рисунок 4.7)

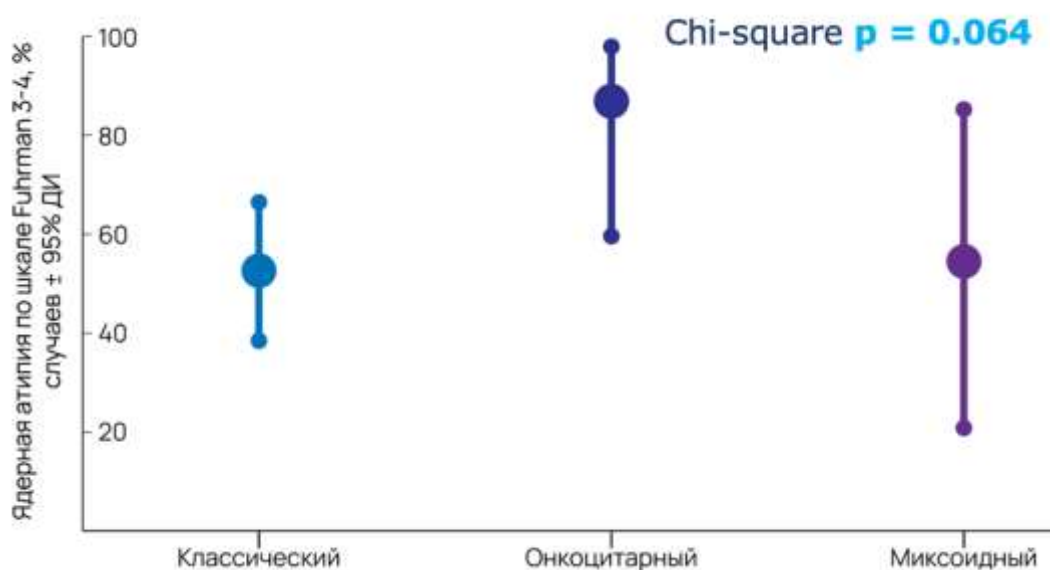


Рисунок 4.7 – Частота выявления высокой ядерной атипии у пациентов с различными морфологическими типами АКР

Диффузный рост исследуемой опухоли был выявлен у 76,7% обследованных ($n=56$). На Рисунке 4.8 представлено распределение данного критерия у пациентов с различными морфологическими вариантами АКР.

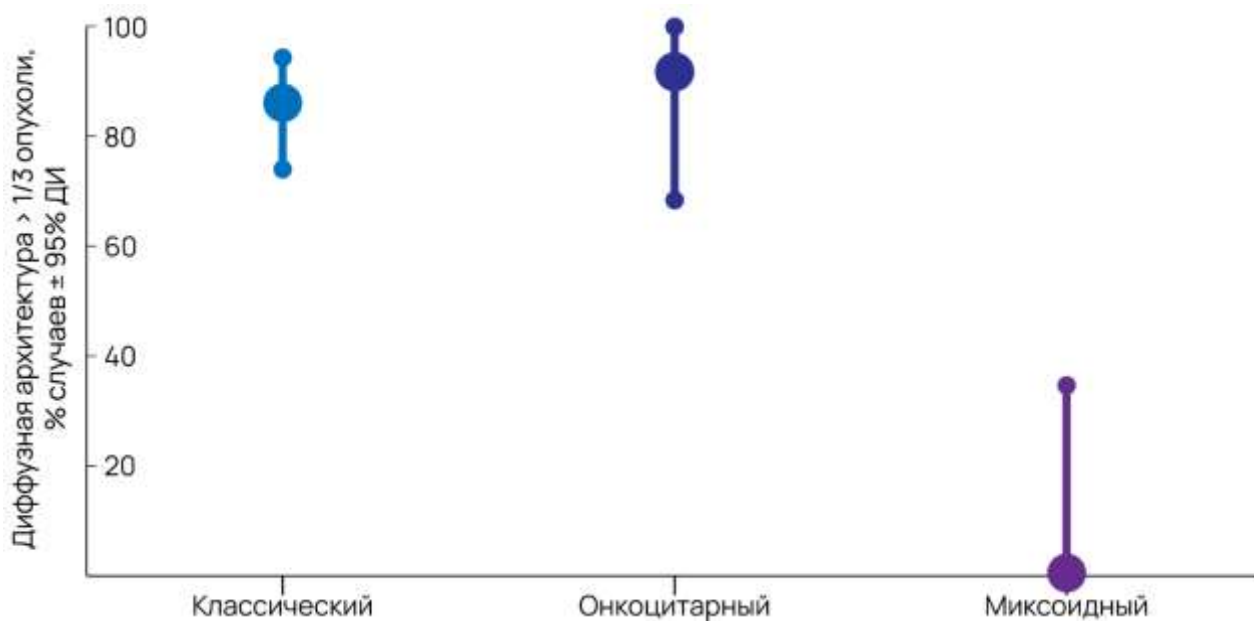


Рисунок 4.8 – Частота выявления диффузного роста опухоли у пациентов с различными морфологическими типами АКР

Диффузный рост опухоли установлен 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. На Рисунке 4.9 представлено распределение данного критерия в зависимости от морфологического варианта АКР.

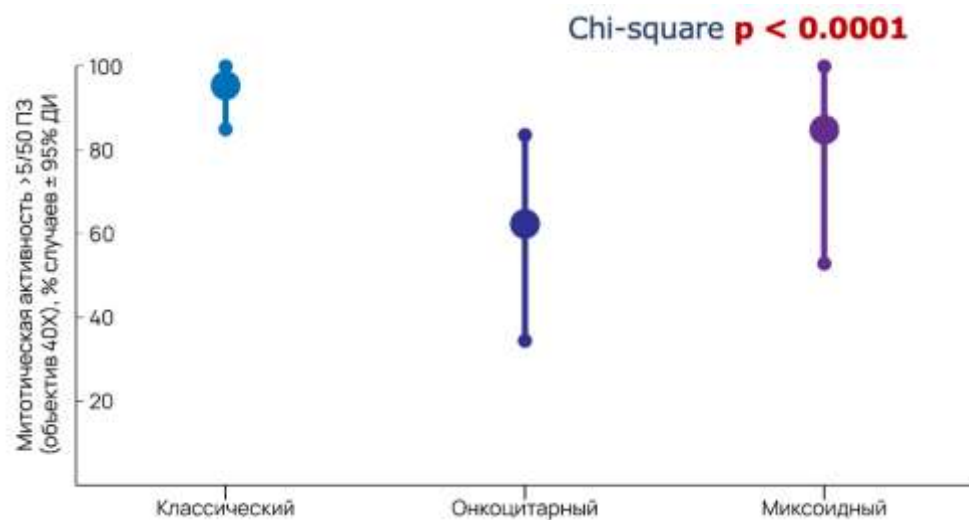


Рисунок 4.9 – Частота выявления патологических митозов у пациентов с различными морфологическими типами АКР

Наличие этого критерия выявлено в 93,9% случаев классического типа АКР и в 88,9% миксоидного типа, статистически значимо чаще ($p < 0,0001$) чаще по сравнению с соответствующими значениями в группе пациентов с онкоцитарным типом АКР (60,0%).

Из всех параметров шкалы Weiss единственным критерием, ассоциированным с прогнозом пациента, в нашем исследовании являлось наличие патологических митозов. На Рисунке 4.10 представлены результаты анализа БРВ в зависимости от наличия патологических митозов методом Каплан-Майера.

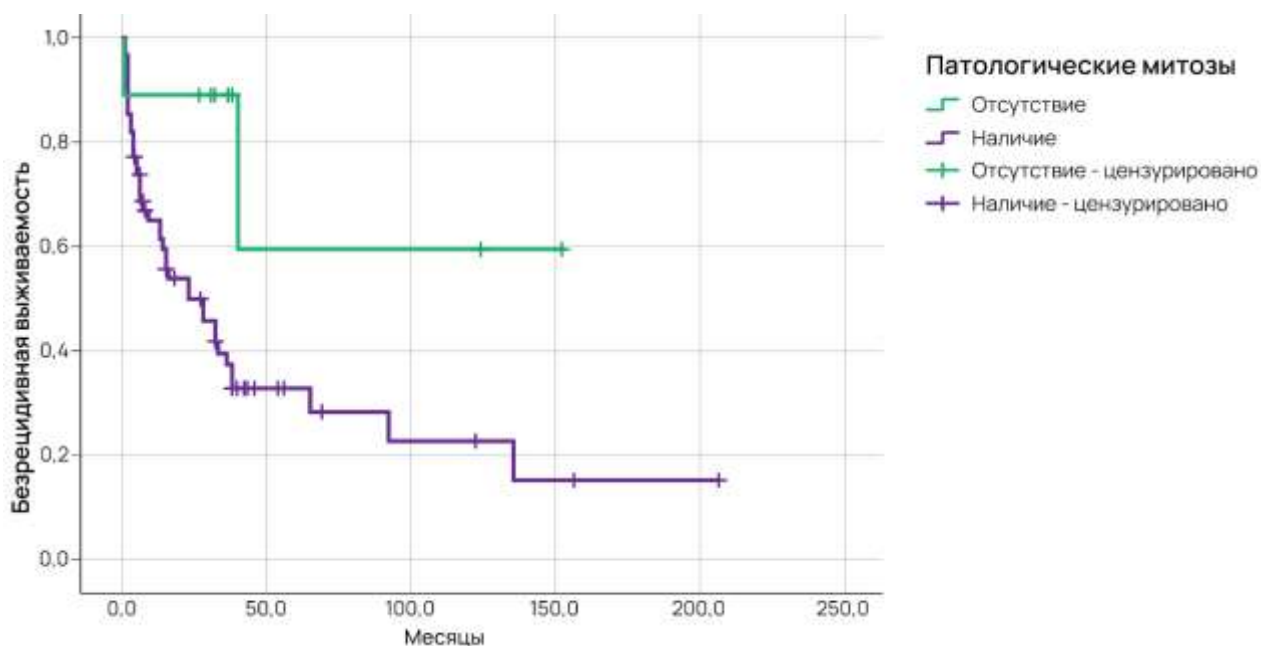


Рисунок 4.10 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от наличия патологических митозов

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, обнаружена наличие патологических митозов было ассоциировано с меньшим уровнем БРВ.

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 (PHH3) у обследованных пациентов в среднем составляли $17,5 \pm 11,4$ их уровни варьировали от 1 до 50,0 (Рисунок 4.11).

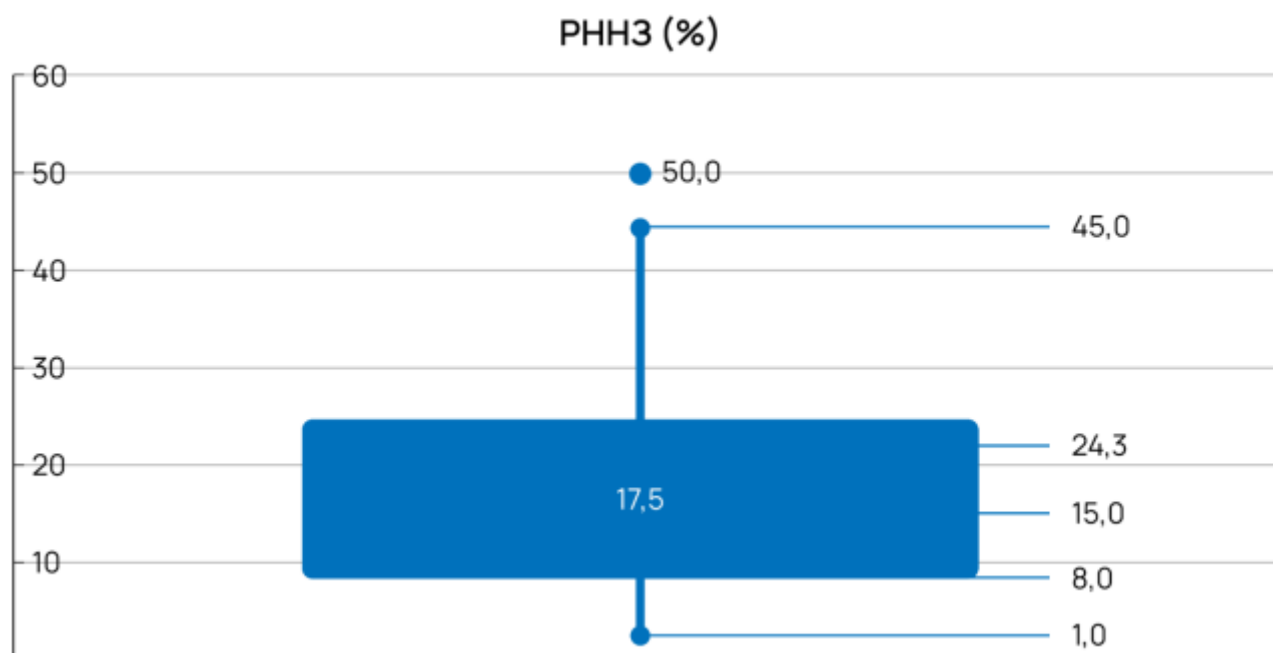


Рисунок 4.11 – Распределение значений маркера фосфогистона НЗ (РННЗ) у обследованных больных (n=73)

Результаты оценки БРВ у пациентов при различных значениях РННЗ представлены в Таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Медиана (мес.) БРВ у пациентов при различных значениях РННЗ

РННЗ	Me
0-10	65,0
10-20	32,0
Более 20	6,0

В исследуемой когорте медиана БРВ при значениях РННЗ 0-10 составляла 65,0 мес., 10-20 – 32,0 мес., более 20 – 6,0 мес.

На Рисунке 4.12 представлены результаты анализа БРВ в зависимости от значений РННЗ методом Каплан-Майера.

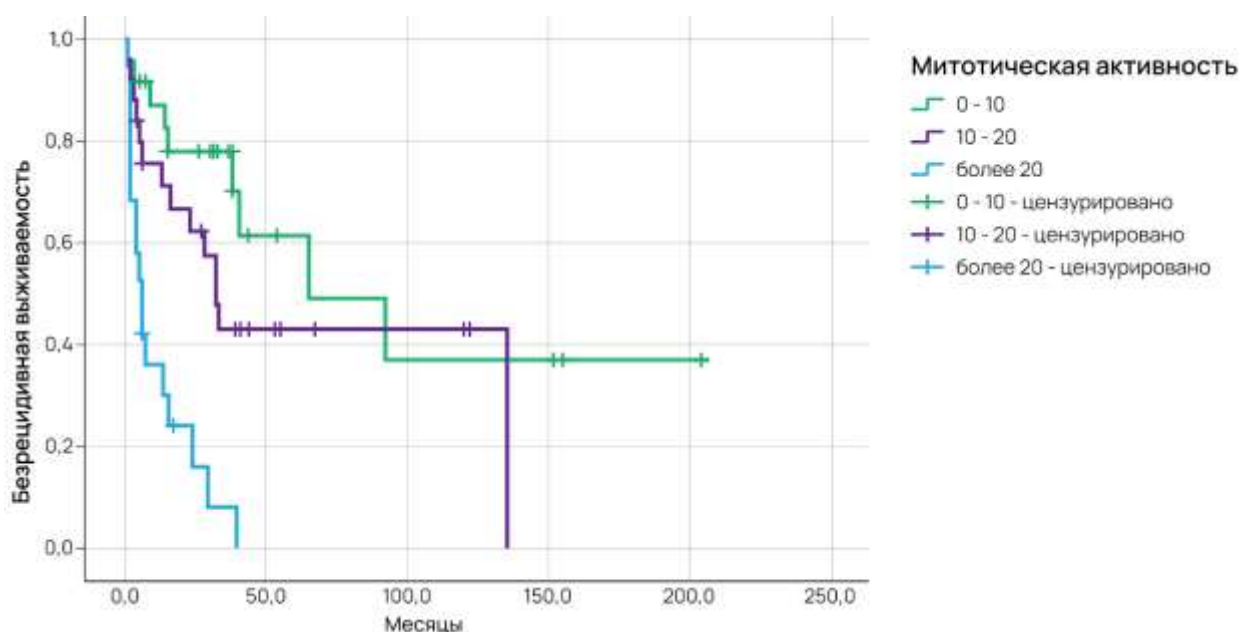


Рисунок 4.12 – Безрецидивная выживаемость пациентов с АКР в зависимости от митотической активности

Выявлено, что 5-летняя БРВ у пациентов со значениями РННЗ 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 РННЗ 0-10. У всех пациентов со значениями данного показателя 10-20 через 10,8 лет наблюдения зафиксирован рецидив. У всех пациентов с уровнем РННЗ более 20 рецидив АКР наблюдался в течение 3-х лет.

Результаты оценки медианы ОВ у пациентов при различных значениях РННЗ представлены в Таблице 4.3

Таблица 4.3 – Медиана (мес.) ОВ у пациентов при различных значениях РННЗ

РННЗ	Ме
0-10	190
10-20	-
Более 20	21,0

Как видно, в исследуемой когорте медиана ОВ при значениях РННЗ 0-10 составляла 190 мес. (15,8 лет), более 20 – 21,0 мес.

На Рисунке 4.13 представлены результаты анализа ОВ в зависимости от значений РННЗ методом Каплан-Майера.

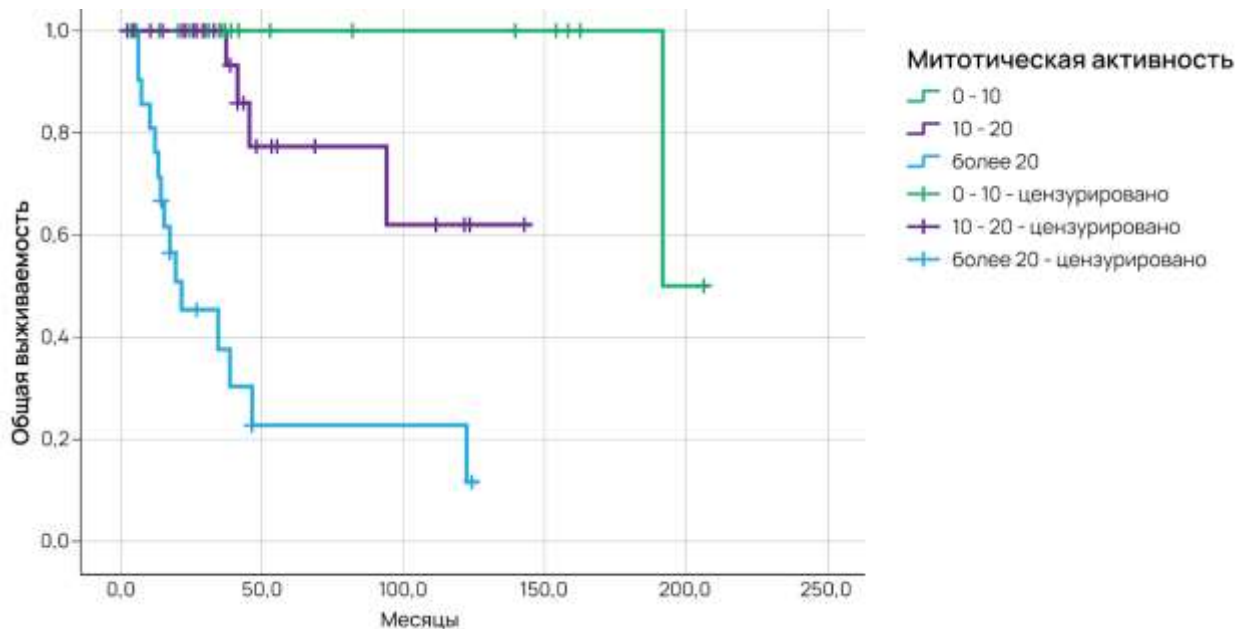


Рисунок 4.13 – Общая выживаемость пациентов с АКР в зависимости от значений митотической активности

В соответствии с результатами анализа выживаемости 5-летняя ОВ у пациентов со значениями РННЗ 0-10 составляла 100%, 10-20 – 70,0 %, более 20 – 21,0%. Через 17,5 лет наблюдения в группе пациентов со значениями РННЗ 0-10 значение ОВ было на уровне 50%.

По результатам ИГХ 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 4.4.

Таблица 4.4 – Медиана (мес.) БРВ у пациентов при различных значениях Ki-67

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

Установлено, что в когорте обследованных медиана БРВ при Ki-67 0-10% составляла 135,0 мес. (11,2 года), при 12-25% – 16,0 мес., при 30-60% – 23,0 мес.

На Рисунке 4.14 представлены результаты анализа БРВ в зависимости от значений уровня Ki-67 методом Каплан-Майера.

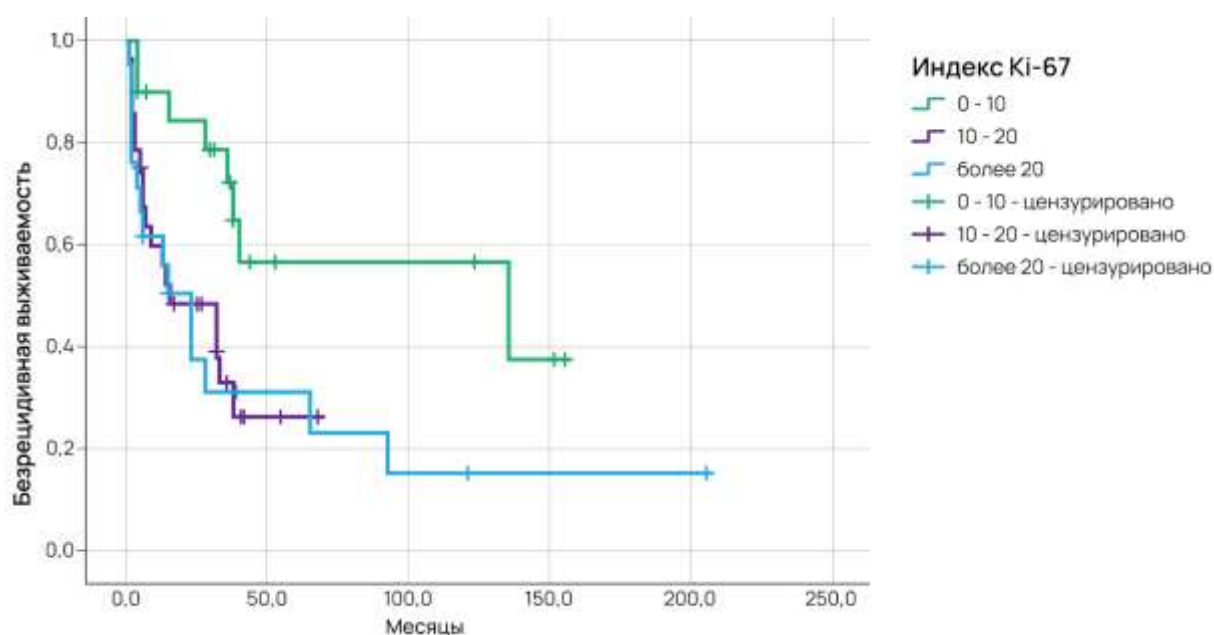


Рисунок 4.14 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровней Ki-67

Установлено, что 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.

Результаты оценки медианы ОВ у пациентов при различных значениях Ki-67 представлены в Таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Медиана (мес.) ОВ у пациентов при различных значениях Ki-67

Ki-67 (%)	Me
0-10	-
12-25	46,0
30-60	93,0

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).

На Рисунке 4.15 представлены результаты анализа ОВ в зависимости от значений Ki-67 методом Каплан-Майера.

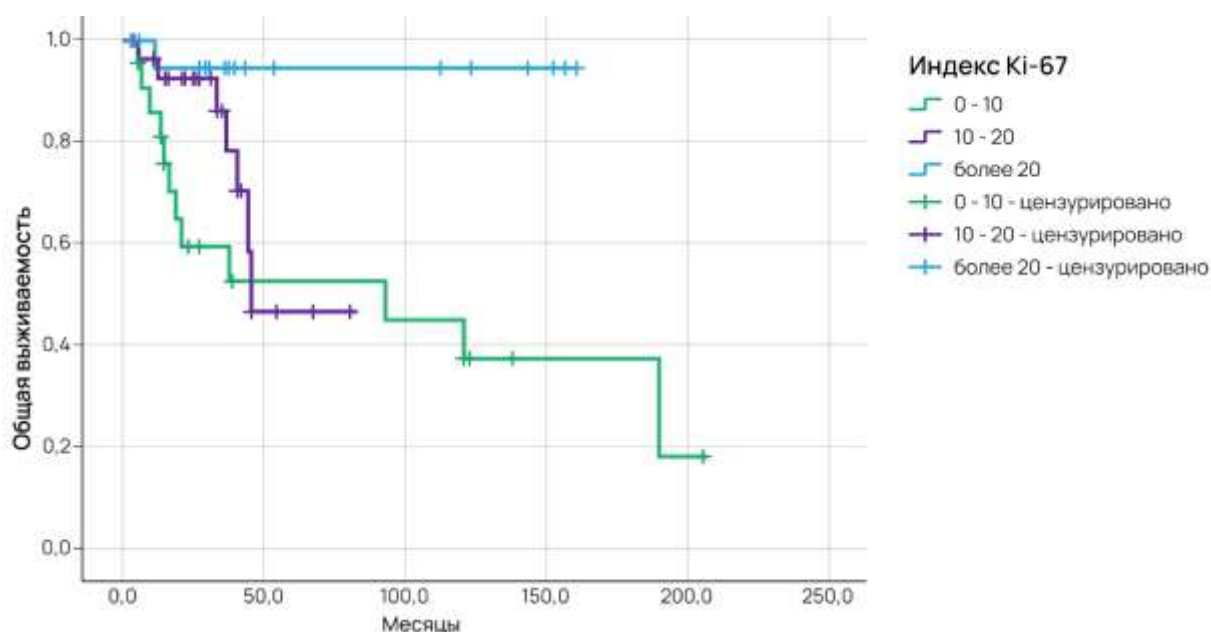


Рисунок 4.15 – Общая выживаемость в зависимости от значений Ki-67

Выявлено, что 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%). При анализе функциональной активности АКР было установлено, что у 21 пациента (28,8%) был диагностирован гиперкортицизм, у одного больного – гиперандрогения (1,4%), у одного - гиперальдостеронизм (1,4%) и у 3 пациентов (4,1%) имело место смешанная гормональная активность.

Результаты оценки медианы БРВ у пациентов при наличии и отсутствии гормональной активности представлены в Таблице 4.6.

Таблица 4.6 – 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

Согласно полученным данным медиана БРВ у пациентов с гиперкортицизмом (n=21) составляла 38,0 мес., с гиперандрогенией (n=1) – 23,0 мес., гиперальдостеронизмом (n=1) – 1,0 мес., при смешанной форме ГА (n=3) – 65,0 мес. и при отсутствии ГА (n=47) – 32,0 мес.

На Рисунке 4.16 представлены результаты анализа БРВ в зависимости от гормональной активности АКР методом Каплан-Майера.

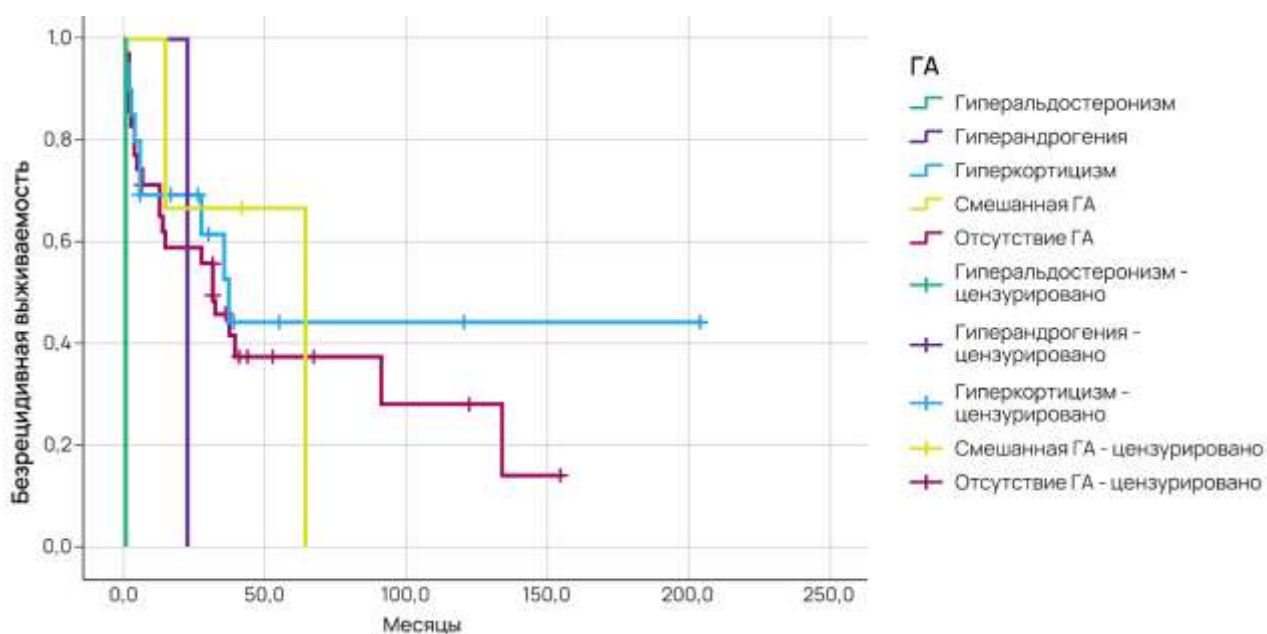


Рисунок 4.16 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровней гормональной активности

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 4.7.

Таблица 4.7 – 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

Установлено, что показатели 5-летней БРВ для пациентов с I, II, III и IV стадий АКР составили 62,2%, 40,3%, 32,8% и 0% соответственно.

Пятилетняя ОВ составила 100,0%, 80,4%, 63,6% и 0% для пациентов с I, II, III и IV стадий АКР по системе ENSAT, соответственно (Рисунок 4.17).

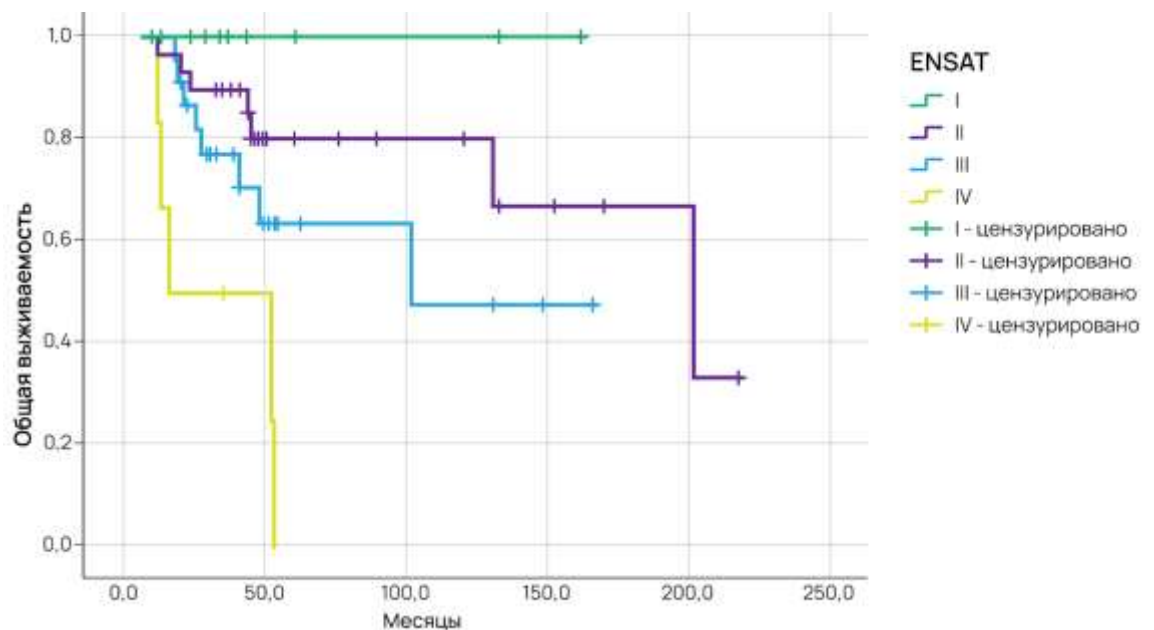


Рисунок 4.17 – Общая выживаемость в зависимости от стадии АКР по системе ENSAT

Как видно, 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.

Таким образом, в соответствии с результатами оценки злокачественного потенциала АКР в исследуемой когорте пациентов (n=73) выявлено, что количество баллов по шкале Weiss в среднем составляло $6,1 \pm 0,4$ баллов, при этом инвазия в вены была установлена в 17,8% случаев, в синусоиды – в 41,1% случаев, в капсулу – в 58,9%; участки некроза были диагностированы у 79,5% пациентов (n=58), диффузный рост опухоли – у 76,7% (n=56), патологические митозы – у 86,3% (n=63); частота обнаружения высокого ядерного индекса составляла 58,9%; менее 25% клеток со светлой цитоплазмой обнаружено в 91,8% случаев, а более 5 митозов на 50 полей зрения при большом увеличении наблюдалось у 4,1% пациентов. Обращает внимание, что при классическом подтипе АКР достоверно ($p < 0,05$) чаще было выявлено наличие некрозов (89,8%), инвазия опухоли в синусоиды (50,0%), патологические митозы (93,9%) в сравнении с показателями при других морфологических подтипах АКР. У 85,7% пациентов с классическим вариантом АКР и у 93,3% обследованных с онкоцитарным вариантом был установлен диффузный рост опухоли, в то время как у пациентов с миксоидным вариантом таких случаев выявлено не было. Патологические митозы были единственным критерием шкалы Weiss, ассоциированными с прогнозом пациента. При этом показатель 5-летней БРВ у пациентов при наличии патологических митозов в опухоли составил 32,0%, а при их отсутствии БРВ достигала 60,0%.

Показатель пролиферативной активности РННЗ в среднем составлял $17,5 \pm 11,4$ и варьировал от 1 до 50,0. Выявлено, что 5-летняя БРВ в группе пациентов со значениями РННЗ 0-10 достигла 61,0%, 10-20 – 42,0%. У всех пациентов с уровнем данного показателя более 20 рецидив основного заболевания выявлялся в течение 3-х лет наблюдения. Установлено, что 5-летняя ОВ у пациентов со значениями РННЗ 0-10 составляла 100%, 10-20 – 70,0%, более 20 – 21,0%. Через 17,5 лет наблюдения у половины (50,0%)

обследованных в группе со значениями этого показателя от 0 до 10 не было зафиксировано смертельного исхода. Также в соответствии с результатами иммуногистохимического исследования установлено, что медиана индекса пролиферативной активности Ki-67 в исследуемой когорте была на уровне 17%. Выявлено, что 5-летняя БРВ у пациентов со значениями Ki-67 0-10% составляла 59,0%, 12-25% – 28,0%, 30-60% – 32,0%; 5-летняя ОВ у пациентов в группе со значениями Ki-67 0-10% составляла 95,0% и сохранялась на таком уровне в течение 13,5 лет наблюдения, со значениями 12-25% – 48,0%, 30-60% – 52,0%.

При анализе функциональной активности опухолей установлено, что медиана БРВ у пациентов с гиперкортицизмом (n=21) составляла 38,0 мес., с гиперандрогенией (n=1) – 23,0 мес., гиперальдостеронизмом (n=1) – 1,0 мес., при смешанной форме ГА (n=3) – 65,0 мес. и при отсутствии ГА (n=47) – 32,0 мес.

Выявлено, что 5-летняя БРВ в группе пациентов с гиперкортицизмом составила 45,0% и сохранялась на таком уровне на протяжении 17 лет наблюдения, в случае смешанной ГА – 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 материала 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 для пациентов с I, II, III и IV стадий АКР составили 62,2%, 40,3%, 32,8% и 0% соответственно. Пятилетняя ОВ составила 100,0%, 80,4%, 63,6% и 0% для обследованных с I, II, III и IV стадий АКР по системе ENSAT. В группе пациентов с I стадией АКР по данной классификации на протяжении 12,5 лет наблюдения смертельных исходов не

выявлено. В группе пациентов со II стадией в течение 17,5 лет катамнеза у 36,0% пациентов не наблюдалось смертельного исхода; при III стадии через 13 лет наблюдения – у 49,0% больных. У всех пациентов с IV стадией заболевания летальный исход был зафиксирован в течение 4 лет.

4.3. Анализ предикторов агрессивного и неблагоприятного течения адренокортикального рака

Результаты регрессионного анализа (Рисунок 4.18) свидетельствуют, что факторами, статистически значимо влияющими на БРВ обследованных пациентов с АКР, являются:

- Морфологический вариант опухоли
- Гормональная активность (избыточная секреция альдостерона)
- Митотическая активность (значение маркера PNH3)
- Индекс Ki-67
- Наличие патологических митозов.

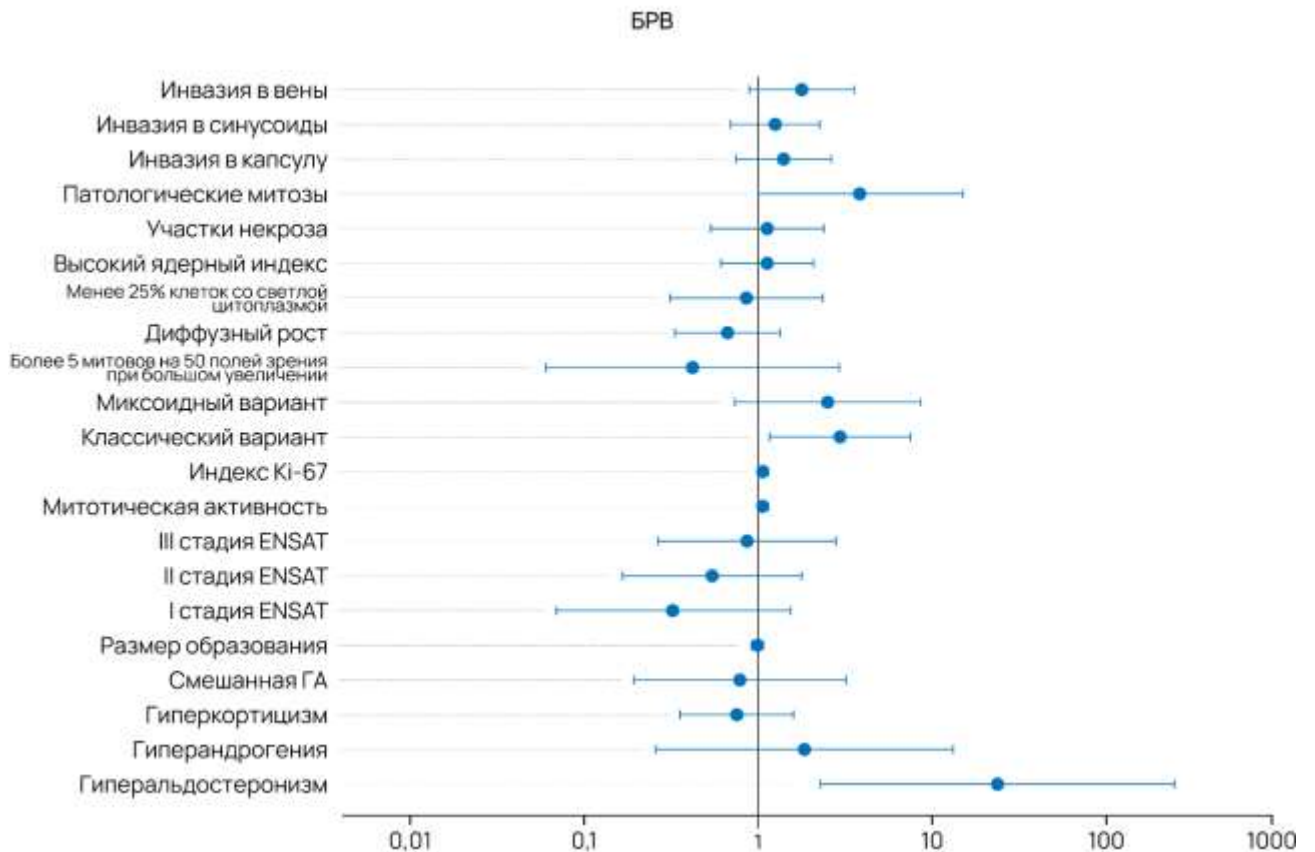


Рисунок 4.18 – HR с 95% ДИ предикторов безрецидивной выживаемости у обследованных пациентов с адренокортикальным раком

Многофакторный регрессионный анализ, основанный на статистике Вальда (W), позволил выявить, что одним из статистически значимых прогностических факторов риска возникновения рецидива обсуждаемого заболевания являлся классический морфологический вариант АКР – $W=5,44$ при $p=0,02$ (Таблица 4.8). Миксоидный вариант также увеличивал шанс рецидива, но не достигал уровня статистической значимости ($W=2,41$ при $p=0,12$).

Таблица 4.8 – Влияние морфологического варианта АКР на БВР

Вариант АКР	W	Exp (B)	p
Классический	5,44	3,153	0,02
Миксоидный	2,41	2,704	0,12
Онкоцитарный	5,44	-	0,06

Примечание: W – статистика Вальда, Exp (B) – бета-коэффициент регрессии, p – достоверность различий, рассчитанная при помощи χ^2 (Хи-квадрата)

При оценке влияния морфологического варианта опухоли на значение БВР было установлено, что при онкоцитарном варианте рецидивы заболевания возникали достоверно ($\chi^2=6,25$, $p=0,012$) реже, по сравнению с классическим.

Также выявлено, что статистически значимым прогностическим фактором риска возникновения рецидива АКР являлась избыточная секреция альдостерона – $W=7,23$ при $p=0,07$ (Таблица 4.9).

Таблица 4.9 – Влияние гормональной активности АКР на БВР

Вариант ГА	W	Exp (B)	p
Гиперкортицизм	0,41	0,78	0,52
Гиперандрогения	0,43	1,97	0,51
Гиперальдостеронизм	7,23	27,4	0,007
Смешанная	0,10	0,80	0,76

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

При оценке взаимосвязи функциональной активности опухоли и значения БВР было установлено, что при гиперальдостеронизме рецидивы заболевания развивались достоверно чаще в сравнении с отсутствием ГА ($\chi^2=17,0$, $p<0,001$) и повышенной секрецией кортизола ($\chi^2=9,5$, $p=0,002$). В настоящее время результаты проведенных исследований о влиянии

гормональной активности на выживаемость пациентов с АКР неоднозначны [Bogolyubova A.V. et al., 2022]. Так, гиперсекреция кортизола являлась неблагоприятным фактором, ассоциировавшимся с повышенным риском рецидива и смерти в некоторых работах, однако в ряде других исследований, в том числе в нашем, прогностическая ценность гиперкортицизма не была подтверждена.

Установлено, что еще одним статистически значимым прогностическим фактором риска возникновения рецидива АКР являлось повышение значений маркера РННЗ – $W=20,5$, $p<0,001$, при этом увеличение уровня митотической активности на 1,0 соответствовало повышению шанса рецидива в 1,1 раза (Таблица 4.10, Рисунок 4.19).

Таблица 4.10 – Влияние митотической активности АКР на БВР

РННЗ	W	Exp (B)	p
	20,5	1,06	<0,001

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

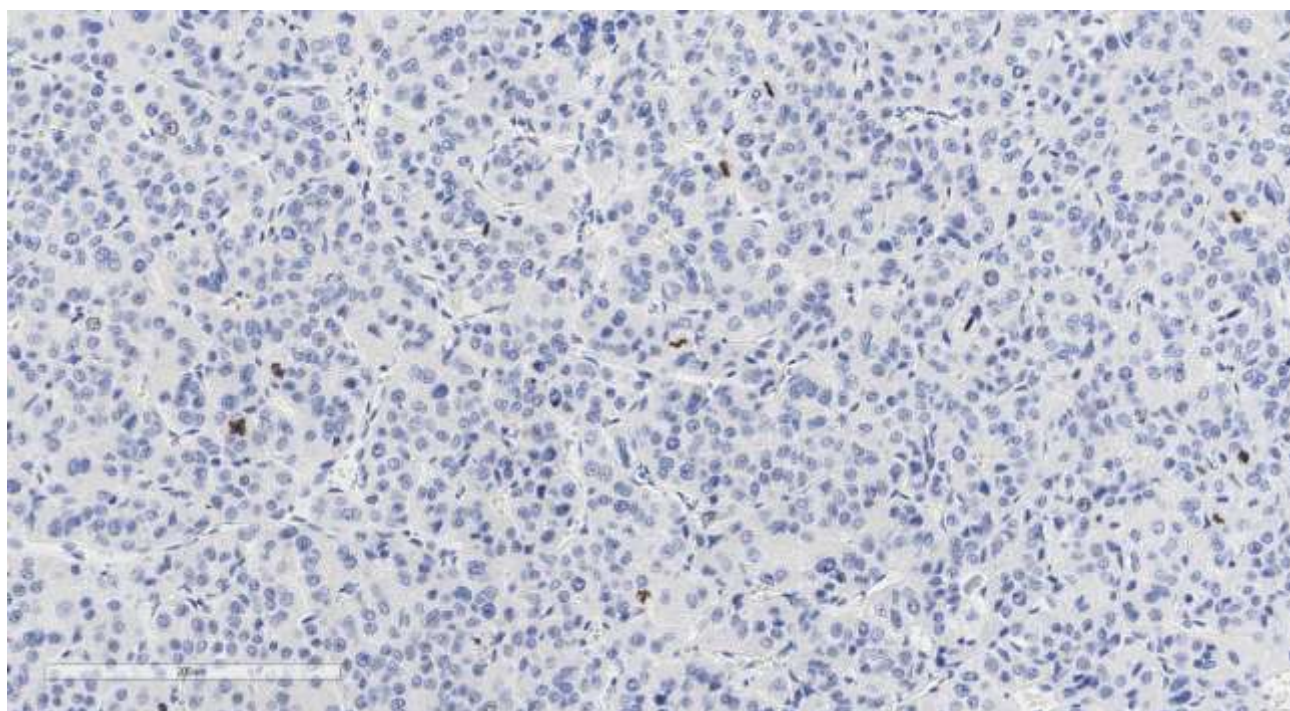


Рисунок 4.19 – Адренокортикальный рак, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к фосфогистону H3 (увеличение x100)

При оценке влияния митотической активности опухоли на значение БРВ было установлено, что у пациентов при значениях РННЗ более 20 рецидивы заболевания развивались достоверно чаще, в сравнении с данными обследованных при показателях до 10 ($\chi^2=23,1$, $p<0,001$) и 10-20 ($\chi^2=12,2$, $p<0,001$).

Установлено, что значение индекса Ki-67 является статистически значимым прогностическим фактором риска возникновения рецидива АКР – $W=8,0$, $p=0,005$, при этом каждое увеличение данного показателя на 1% соответствовало повышению шанса рецидива на 3,2% (Таблица 4.11, Рисунок 4.20).

Таблица 4.11 – Влияние значения индекса Ki-67 на БРВ

Ki-67	W	Exp (B)	p
	8,0	1,032	0,005

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

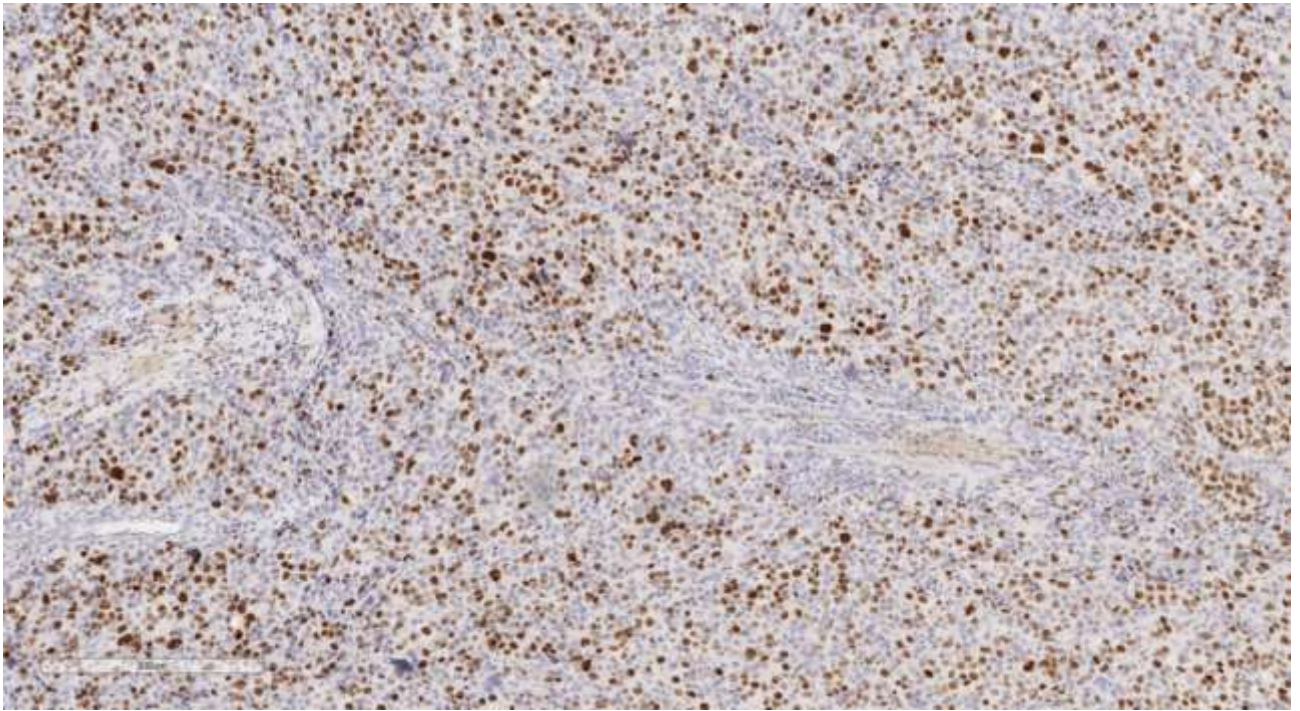


Рисунок 4.20 – Адренокортикальный рак, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67 (увеличение x100)

При оценке влияния индекса Ki-67 на значение БРВ было установлено, что в группе пациентов со значениями этого показателя 0-10% рецидивы заболевания развивались достоверно реже, по сравнению с соответствующими значениями в группах пациентов с показателями 12-25% ($\chi^2=5,9$, $p=0,015$) и 30-60% ($\chi^2=6,1$, $p=0,013$).

Один из параметров шкалы Weiss – наличие патологических митозов – также был определен в качестве статистически значимого прогностического фактора риска возникновения рецидива АКР – $W=8,0$, $p=0,005$ (Таблица 4.12).

Таблица 4.12 – Влияние наличия патологических митозов на БРВ

Патологические митозы	W	Exp (B)	p
	3,8	4,156	0,050

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

В группе пациентов с наличием патологических митозов рецидивы заболевания были выявлены достоверно чаще, по сравнению с группой их отсутствия ($\chi^2=4,7$, $p=0,031$). Представляет интерес установленное наличие корреляции данного критерия с меньшим уровнем БРВ, так как ранее среди всех параметров шкалы Weiss единственным критерием, ассоциированным с выживаемостью, являлось количество митозов. В этих случаях наблюдалась гиперэкспрессия мРНК CCNB2 и AURKA, которая коррелировала с худшей выживаемостью пациентов. Предполагается, что гиперэкспрессия данных генов может быть причиной возникновения атипических митотических фигур. В дальнейшем данный патологический критерий может иметь важное клиническое значение, так как будет являться предиктором ответа на терапию ингибиторами мРНК AURKA.

Результаты регрессионного анализа, представленные на Рисунке 4.21, свидетельствуют, что факторами, статистически достоверно влияющими на ОВ обследованных пациентов с АКР, являются:

- Стадия заболевания по классификации ENSAT
- Митотическая активность
- Индекс Ki-67
- Морфологический вариант опухоли

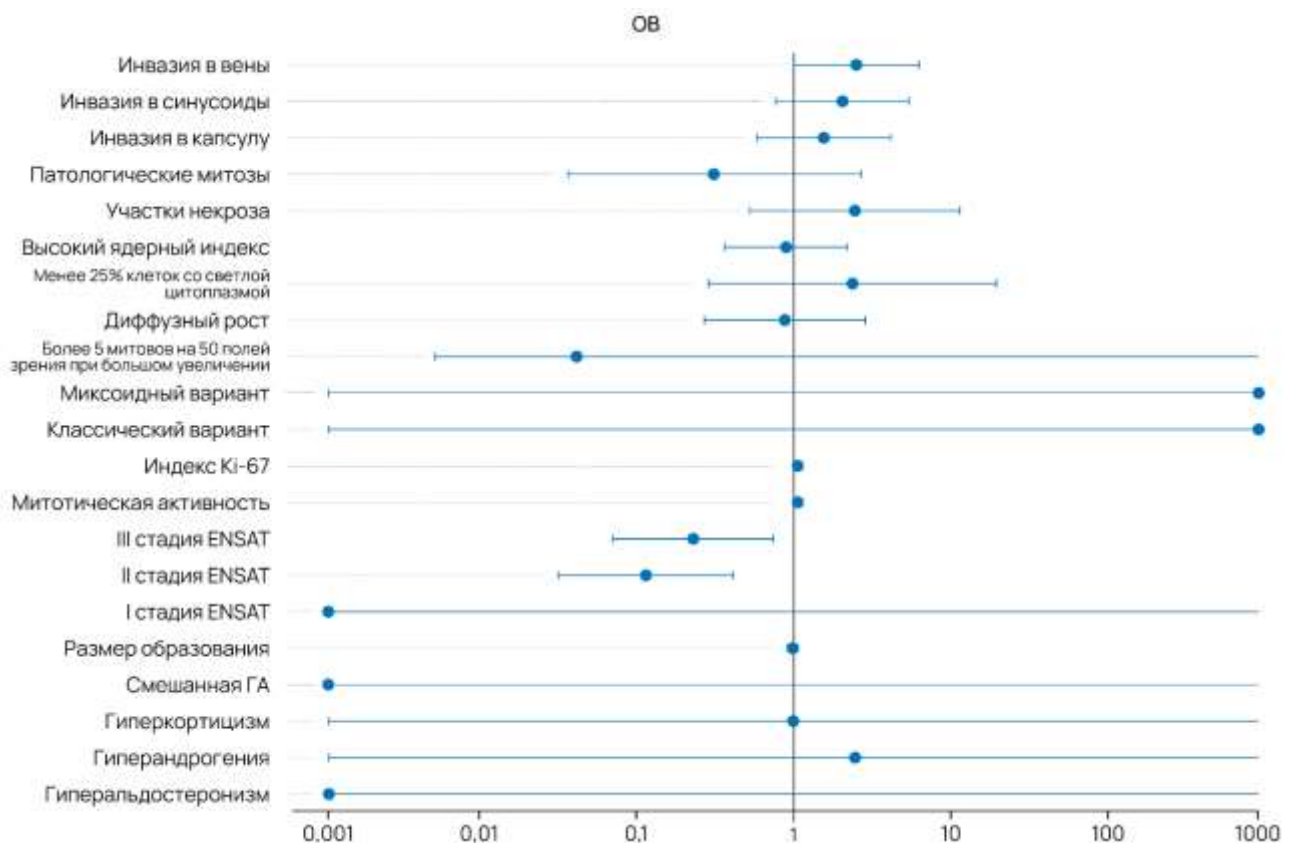


Рисунок 4.21 – HR с 95% ДИ предикторов общей выживаемости у обследованных пациентов с адренокортикальным раком

Было продемонстрировано влияние стадии заболевания по классификации ENSAT на продолжительность жизни пациента ($\chi^2=19,4$, $p<0,001$).

Обращает внимание, что стадии ENSAT I-III ассоциировались с меньшими шансами летального исхода по сравнению со стадией IV, но при этом статистически значимые различия были выявлены по сравнению со значением показателя при стадии II АКР ($p = 0,033$). У пациентов с IV стадией была установлена достоверно меньшая продолжительность жизни по сравнению с соответствующими уровнями этого показателя у больных с остальными стадиями заболевания ($p=0,002$, $p<0,001$, $p=0,011$ для I, II, III стадий соответственно).

На данном этапе в клинической практике стадия по классификации ENSAT является одним из наиболее важных факторов для оценки прогноза пациента. Вместе с тем в настоящем исследовании в случае БРВ различия не достигали статистической значимости. Следует отметить, что в подгруппе со стадией IV в случае анализа ОВ было всего 6, а в случае БРВ – 3 пациента, что затрудняет поиск статистически значимых отличий.

Митотическая активность являлась еще одним статистически значимым прогностическим фактором неблагоприятных исходов (смерти) – $W=20,8$, $p<0,001$, при этом увеличение значения РННЗ на 1,0 соответствовало повышению шанса летального исхода в 1,1 раза (Таблица 4.13).

Таблица 4.13 – Влияние митотической активности АКР на ОВ

РННЗ	W	Exp (B)	p
	20,82	1,08	<0,001

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

При оценке влияния митотической активности опухоли на величину ОВ было установлено, что в случае значений РННЗ более 20 летальный исход наступал достоверно чаще по сравнению с соответствующим значением у пациентов с уровнями митотической активности до 10 ($\chi^2=24,8$, $p<0,001$) и 10-20 ($\chi^2=16,8$, $p<0,001$).

Выявлено, что значение индекса Ki-67 является статистически значимым прогностическим фактором риска смерти – $W=8,0$, $p<0,001$, при этом каждое увеличение данного показателя на 1% соответствовало повышению шанса летального исхода на 5,8% (Таблица 4.14).

Таблица 4.14 – Влияние значения индекса Ki-67 на ОВ

Ki-67	W	Exp (B)	p
	13,2	1,058	<0,001

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

При оценке влияния индекса Ki-67 на уровень БВР было установлено, что при его значении 0-10% летальный исход наступал достоверно реже по сравнению с соответствующей частотой у пациентов со значениями 12-25% ($\chi^2=4,8$, $p=0,029$) и 30-60% ($\chi^2=9,4$, $p=0,002$).

Выявлено, что классический вариант АКР ассоциировался с более высоким риском смерти по сравнению с онкоцитарным вариантом ($\chi^2=7,8$, $p=0,05$). Статистически значимых различий с миксоидным вариантом также, как и в случае БРВ, обнаружено не было. Возможно, это обусловлено малым размером выборки пациентов с миксоидным вариантом АКР ($n=8$ и $n=9$ для БРВ и ОВ, соответственно).

Полученные результаты свидетельствовали, что факторами, статистически значимо влияющими на развитие рецидива АКР у обследованных пациентов, являются: классический морфологический вариант АКР ($W=5,44$ при $p=0,02$); избыточная секреция альдостерона ($W=7,22$ при $p=0,07$); митотическая активность ($W=20,5$, $p<0,001$), при этом увеличение значения маркера РННЗ на 1,0 соответствовало повышению шанса рецидива в 1,1 раза; значение индекса Ki-67 ($W=8,0$, $p=0,005$), при этом каждое увеличение данного показателя на 1% соответствовало повышению шанса рецидива на 3,2%; наличие атипических митозов ($W=8,0$, $p=0,005$).

Установлено, что факторами, статистически значимо влияющими на продолжительность жизни обследованных пациентов с АКР, являются: стадия заболевания по классификации ENSAT ($\chi^2=19,4$, $p<0,001$), при этом обследованные с IV стадией имели достоверно меньшую ОВ по сравнению с

ее уровнями у пациентов с остальными стадиями заболевания ($p=0,002$, $p<0,001$, $p=0,011$ для I, II, III стадий соответственно); митотическая активность ($W=20,8$, $p<0,001$) – увеличение значения РННЗ на 1,0 соответствовало повышению шанса летального исхода в 1,1 раза; значение индекса Ki-67 ($W=8,0$, $p<0,001$), при этом каждое увеличение данного показателя на 1% соответствовало повышению шанса летального исхода на 5,8%; морфологический вариант опухоли – классический тип АКР ассоциировался с более высоким риском смерти, по сравнению с онкоцитарным ($\chi^2=7,8$, $p=0,05$).

Таким образом, в исследуемом материале классический морфологический вариант АКР был диагностирован в 67,1% случаев ($n=49$), онкоцитарный вариант – в 20,5% случаев ($n=15$), миксоидный вариант – в 12,3% ($n=9$). Медиана БРВ в исследуемой когорте пациентов составляла $32,0 \pm 7,3$ мес., у пациентов с классическим вариантом АКР – $23,0 \pm 7,9$ мес., с миксоидным – $13,0 \pm 20,6$ мес. Выявлено, что 5-летняя БРВ была максимальной у пациентов с онкоцитарным гистологическим типом АКР и составляла 66,8%, у пациентов с классическим типом данный показатель составил 33,3%, с миксоидным – 29,9%. При классическом варианте опухоли у всех пациентов рецидив АКР возник через 10,8 лет наблюдения. У 36,0% обследованных с миксоидным вариантом ремиссия сохранялась в течение 10,4 года. У половины пациентов с онкоцитарным вариантом рецидив заболевания не наблюдался на протяжении 17,5 лет. Выявлено, что 5-летняя ОВ у обследованных с онкоцитарным типом достигла 100% и сохранялась на таком уровне в течение 17,5 лет наблюдения, у больных с классическим типом составила 55,9%, с миксоидным – 75,0% и оставалась такой на протяжении 13,5 лет катамнеза. Через 15,6 лет наблюдения у всех пациентов с классическим вариантом АКР наблюдался летальный исход.

В соответствии с результатами анализа злокачественного потенциала АКР в исследуемой когорте пациентов ($n=73$) выявлено, что количество баллов по шкале Weiss в среднем составляло $6,1 \pm 0,4$ баллов, при этом инвазия в вены была установлена в 17,8% случаев, в синусоиды – в 41,1% случаев, в

капсулу – в 58,9%; участки некроза были диагностированы у 79,5% пациентов (n=58), диффузный рост опухоли – у 76,7% (n=56), патологическая митотическая активность – у 86,3% (n=63) больных. Частота обнаружения высокого ядерного индекса составляла 58,9%; менее 25% клеток со светлой цитоплазмой обнаружено в 91,8% случаев, а более 5 митозов на 50 полей зрения при большом увеличении наблюдалось у 4,1% пациентов.

Обращает на себя внимание, что при классическом типе АКР достоверно ($p < 0,05$) чаще было выявлено наличие некрозов (89,8%), инвазия опухоли в синусоиды (50,0%), патологические митозы (93,9%) по сравнению с показателями при других морфологических вариантах обсуждаемой опухоли. У 85,7% пациентов с классическим типом АКР и у 93,3% обследованных с онкоцитарным типом был установлен диффузный рост опухоли, при этом в случае миксоидного типа данный критерий выявлен не был. Показатель 5-летней БРВ у пациентов при наличии патологических митозов в опухоли составил 32,0%, а при их отсутствии – достигал 60,0%.

Значения маркера РННЗ у обследованных пациентов в среднем составляли $17,5 \pm 11,4$ и варьировали от 1 до 50,0. Выявлено, что 5-летняя БРВ в группе пациентов со значениями РННЗ 0-10 достигла 61,0%, 10-20 – 42,0%. У всех пациентов с уровнем данного показателя более 20 рецидив основного заболевания выявлялся в течение 3-х лет наблюдения. Установлено, что 5-летняя ОВ у пациентов со значениями РННЗ 0-10 составляла 100%, 10-20 – 70,0%, более 20 – 21,0%. Через 17,5 лет наблюдения у половины (50,0%) обследованных в группе со значениями этого показателя от 0 до 10 не было зафиксировано смертельного исхода. Также при проведении иммуногистохимического исследования было установлено, что медиана индекса пролиферативной активности Ki-67 в исследуемой когорте пациентов составила 17%.

Выявлено, что 5-летняя БРВ у пациентов со значениями Ki-67 0-10% составляла 59,0%, 12-25% – 28,0%, 30-60% – 32,0%; 5-летняя ОВ у пациентов в группе со значениями Ki-67 0-10% составляла 95,0% и сохранялась на таком

уровне в течение 13,5 лет наблюдения, со значениями 12-25% – 48,0%, 30-60% – 52,0%. В когорте обследованных медиана БРВ у пациентов с гиперкортицизмом (n=21) составляла 38,0 мес., с гиперандрогенией (n=1) – 23,0 мес., гиперальдостеронизмом (n=1) – 1,0 мес., при смешанной форме ГА (n=3) – 65,0 мес. и при отсутствии ГА (n=47) – 32,0 мес. Выявлено, что 5-летняя БРВ в группе пациентов с гиперкортицизмом составила 45,0% и сохранялась на таком уровне на протяжении 17 лет наблюдения, в случае смешанной ГА – 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 материала 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 для пациентов с I, II, III и IV стадий АКР составили 62,2%, 40,3%, 32,8% и 0% соответственно. Пятилетняя ОВ составила 100,0%, 80,4%, 63,6% и 0% для обследованных с I, II, III и IV стадий АКР по системе ENSAT. В группе пациентов с I стадией АКР по данной классификации на протяжении 12,5 лет наблюдения смертельных исходов не выявлено. В группе пациентов со II стадией в течение 17,5 лет катамнеза отсутствие смертельного исхода наблюдалось у 36,0%; в случае III стадии через 13 лет наблюдения – у 49,0%. У всех пациентов с IV стадией заболевания летальный исход наблюдался в течении 4 лет.

Выявлено, что факторами, статистически достоверно влияющими факторами на развитие рецидива АКР у обследованных пациентов являются: классический морфологический вариант АКР (W=5,44 при p=0,02); избыточная секреция альдостерона (W=7,22 при p=0,07); митотическая активность (W=20,5, p<0,001), при этом увеличение значения маркера РННЗ

на 1,0 соответствовало повышению шанса рецидива в 1,1 раза; значение индекса Ki-67 ($W=8,0$, $p=0,005$), при этом каждое увеличение данного показателя на 1% соответствовало повышению шанса рецидива на 3,2%; наличие атипических митозов ($W=8,0$, $p=0,005$).

Установлено, что статистически достоверно влияющими факторами на продолжительность жизни обследованных пациентов с АКР являются: стадия заболевания по классификации ENSAT ($\chi^2=19,4$, $p<0,001$), при этом обследованные с IV стадией имели достоверно меньшую ОВ по сравнению с ее уровнем у больных с остальными стадиями заболевания ($p=0,002$, $p<0,001$, $p=0,011$ для I, II, III стадий соответственно); митотическая активность ($W=20,8$, $p<0,001$) – увеличение значения РННЗ на 1,0 соответствовало повышению шанса летального исхода в 1,1 раза; значение индекса Ki-67 ($W=8,0$, $p<0,001$), при этом каждое увеличение данного показателя на 1% соответствовало повышению шанса летального исхода на 5,8%; морфологический вариант опухоли – классический тип АКР ассоциировался с более высоким риском смерти, по сравнению с онкоцитарным ($\chi^2=7,8$, $p=0,05$).

ГЛАВА 5. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ПРИ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОМ РАКЕ

5.1. Предикторы эффективности адренолитической терапии митотаном при аденокортикальном раке

5.1.1. Характеристика изучаемой популяции

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 5.1.

Таблица 5.1 – Клинические и морфологические характеристики двух групп пациентов с АКР, получающих терапию митотаном и находящихся на

	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%)

динамическом наблюдении

5.1.2. Анализ экспрессии SOAT1, CYP2W1 и RRM1 в различных морфологических вариантах аденокортикального рака

На Рисунках 5.1-5.3 представлены результаты анализа экспрессии SOAT1, CYP2W1 и RRM1 в зависимости от различных гистологических подтипов обсуждаемого заболевания.

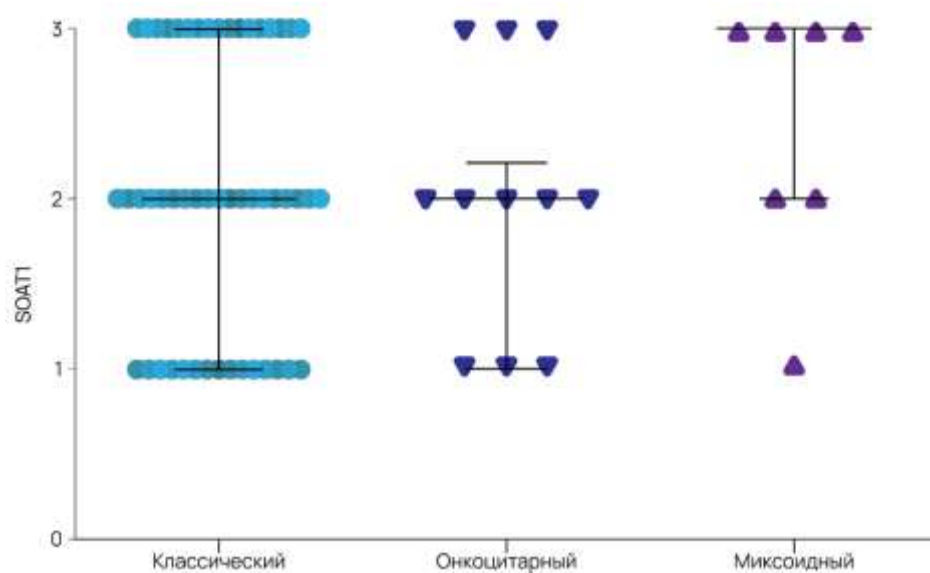


Рисунок 5.1 – Распределение иммунореактивности SOAT1 в различных вариантах аденокортикального рака

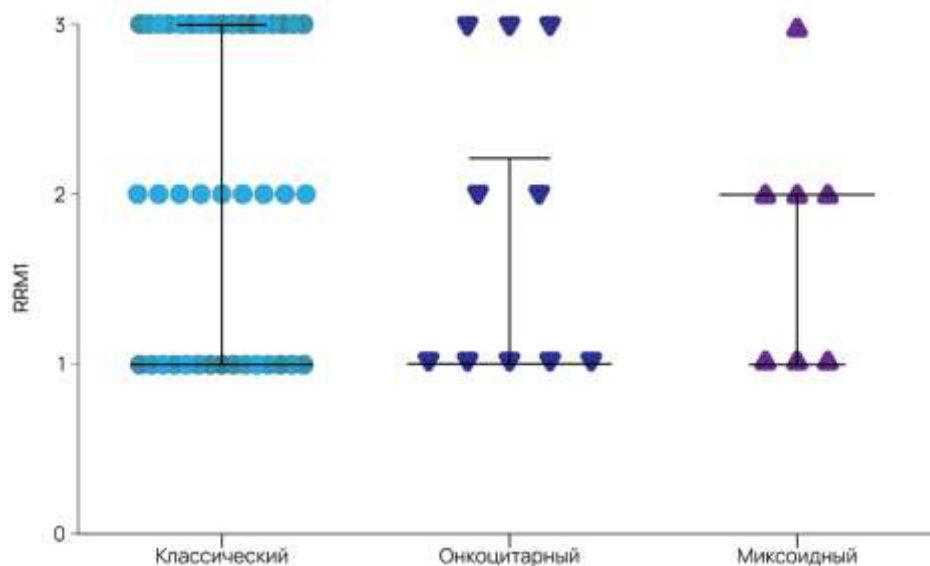


Рисунок 5.2 – Распределение иммунореактивности RRM1 в различных вариантах адренокортикального рака

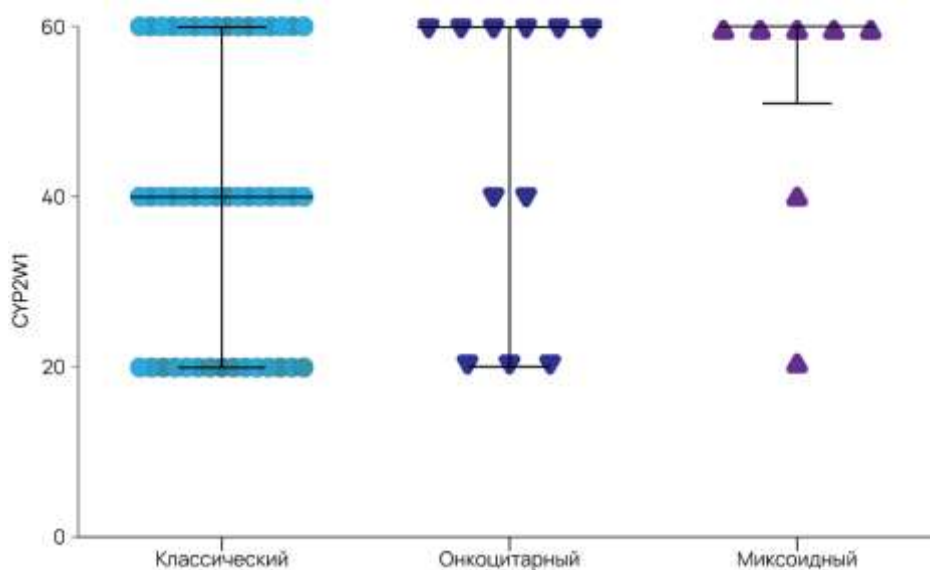


Рисунок 5.3 – Распределение иммунореактивности CYP2W1 в различных вариантах адренокортикального рака

Профиль экспрессии классического варианта АКР характеризовался относительно равномерным распределением уровней иммунореактивности SOAT1, CYP2W1 и RRM1 (Рисунок 5.4-5.6).

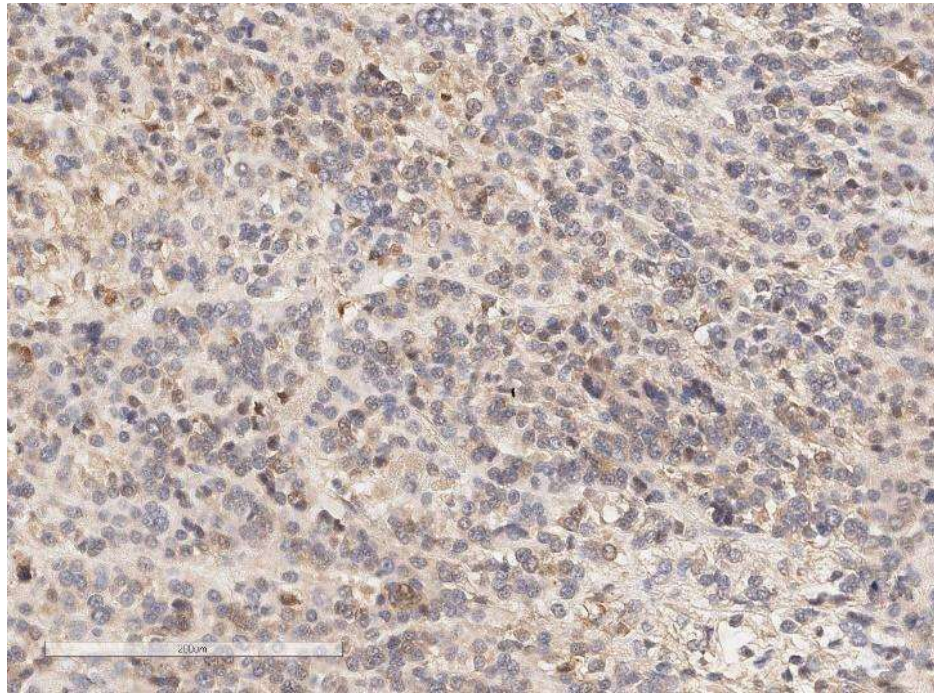


Рисунок 5.4 – Слабая иммуногистохимическая экспрессия CYP2W1 в классическом варианте адренокортикального рака

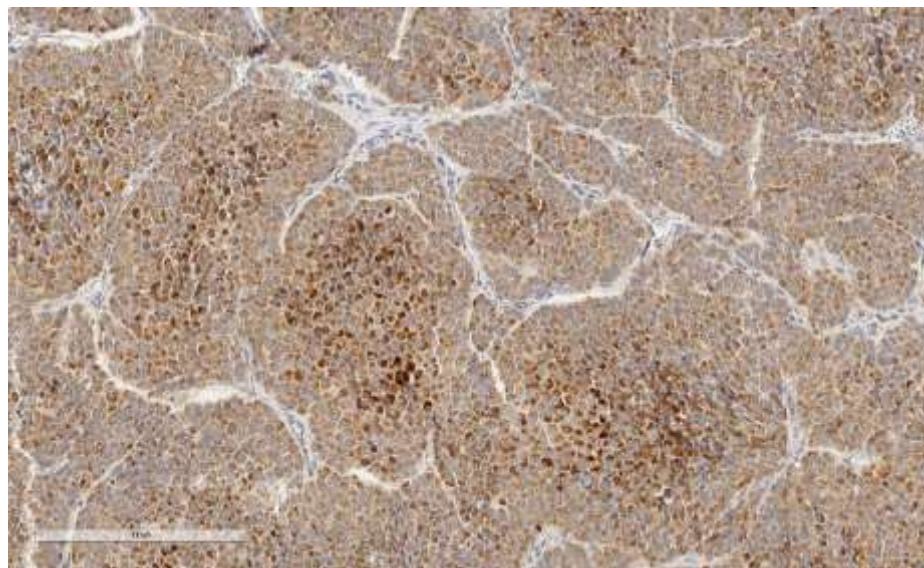


Рисунок 5.5 – Выраженная иммуногистохимическая экспрессия RRM1 в классическом варианте адренокортикального рака

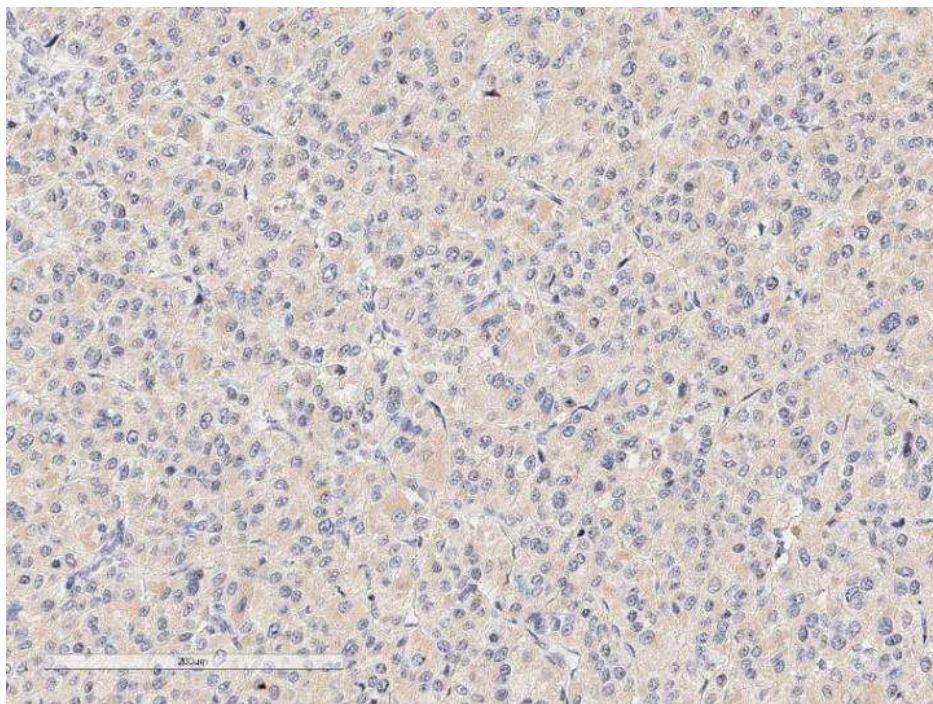


Рисунок 5.6 – Слабая иммуногистохимическая экспрессия RRM1 в классическом варианте аденокортикального рака

Онкоцитарный вариант отличался преимущественно умеренной и низкой иммунореактивностью SOAT1 (Рисунок 5.7-5.8), при этом уровни экспрессии других исследуемых маркеров характеризовались обратно пропорциональным распределением, а именно высокой иммунореактивностью CYP2W1 и низкой иммунореактивностью RRM1.

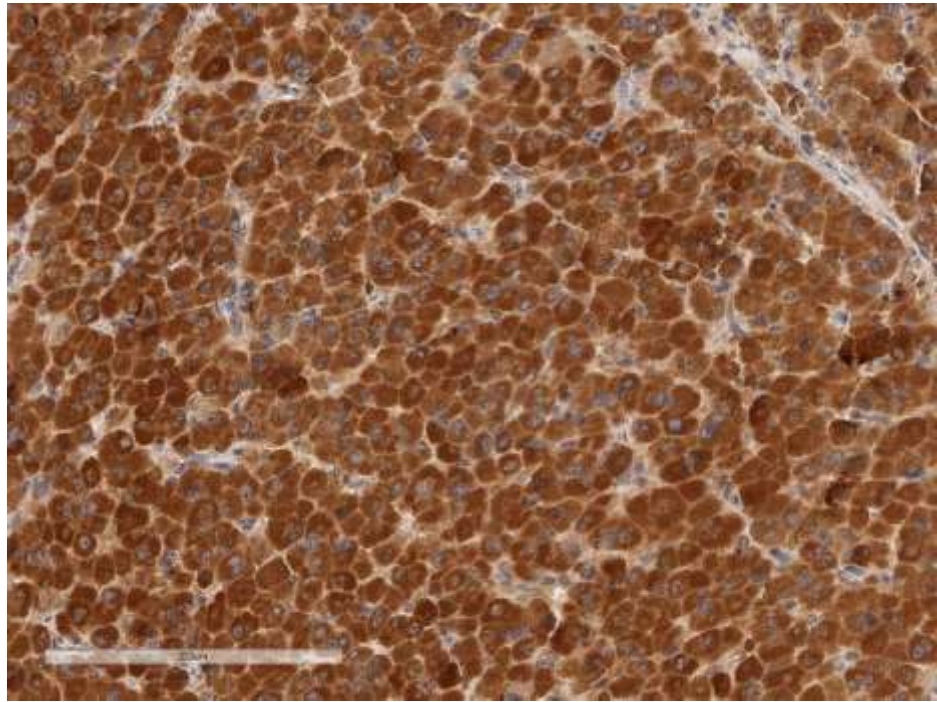


Рисунок 5.7 – Выраженная иммуногистохимическая экспрессия SOAT1 в онкоцитарном варианте адренокортикального рака

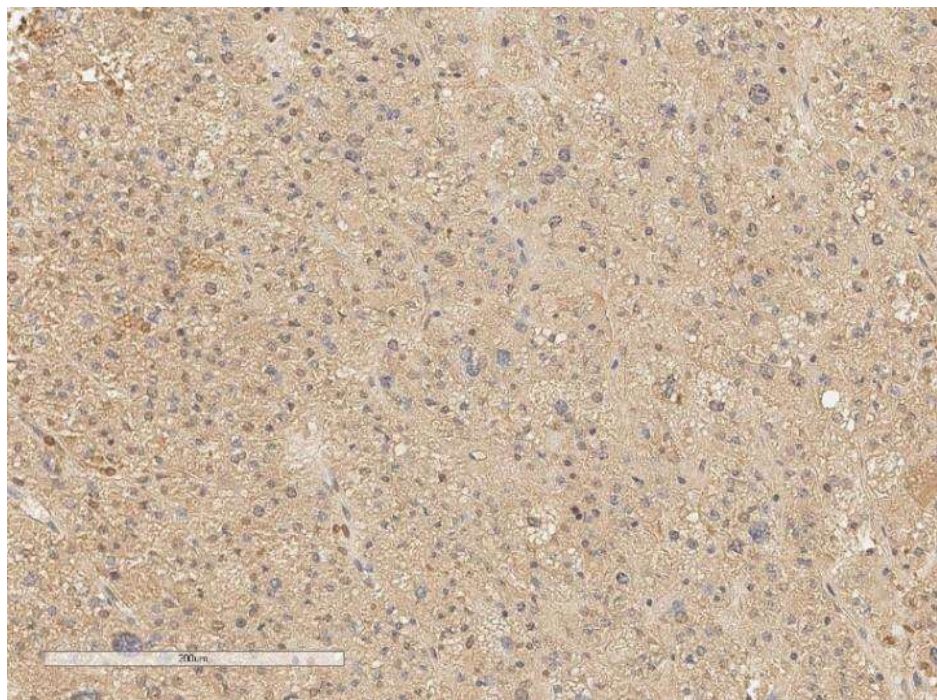


Рисунок 5.8 – Слабая иммуногистохимическая экспрессия SOAT1 в онкоцитарном варианте адренокортикального рака

Миксоидный вариант характеризовался выраженной иммунореактивностью SOAT1 и CYP2W1 (Рисунок 5.9), при этом отмечена преимущественно низкая и умеренная экспрессия RRM1.

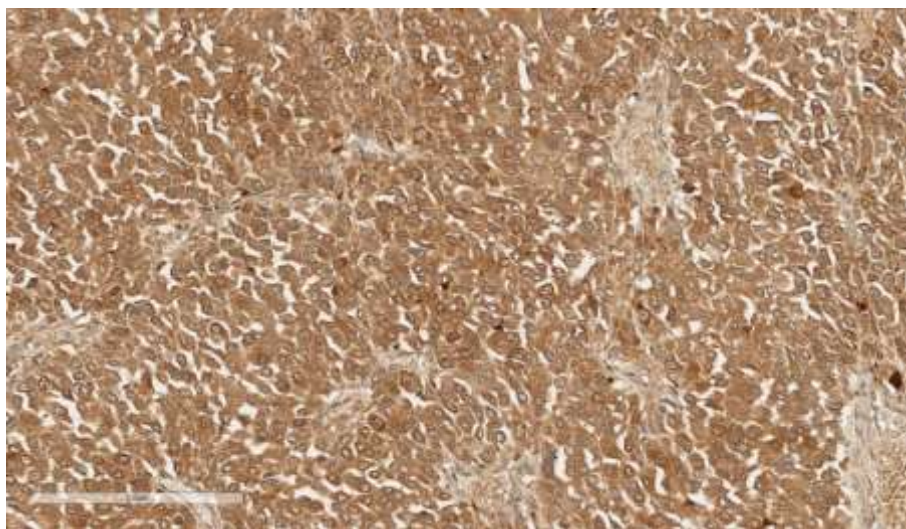


Рисунок 5.9 – Выраженная иммуногистохимическая экспрессия CYP2W1 в миксоидном варианте АКР

5.1.3. Значение безрецидивной выживаемости пациентов, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении

На Рисунке 5.10 представлены результаты анализа БРВ пациентов с АКР, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W1 и RRM1 методом Каплан-Майера.

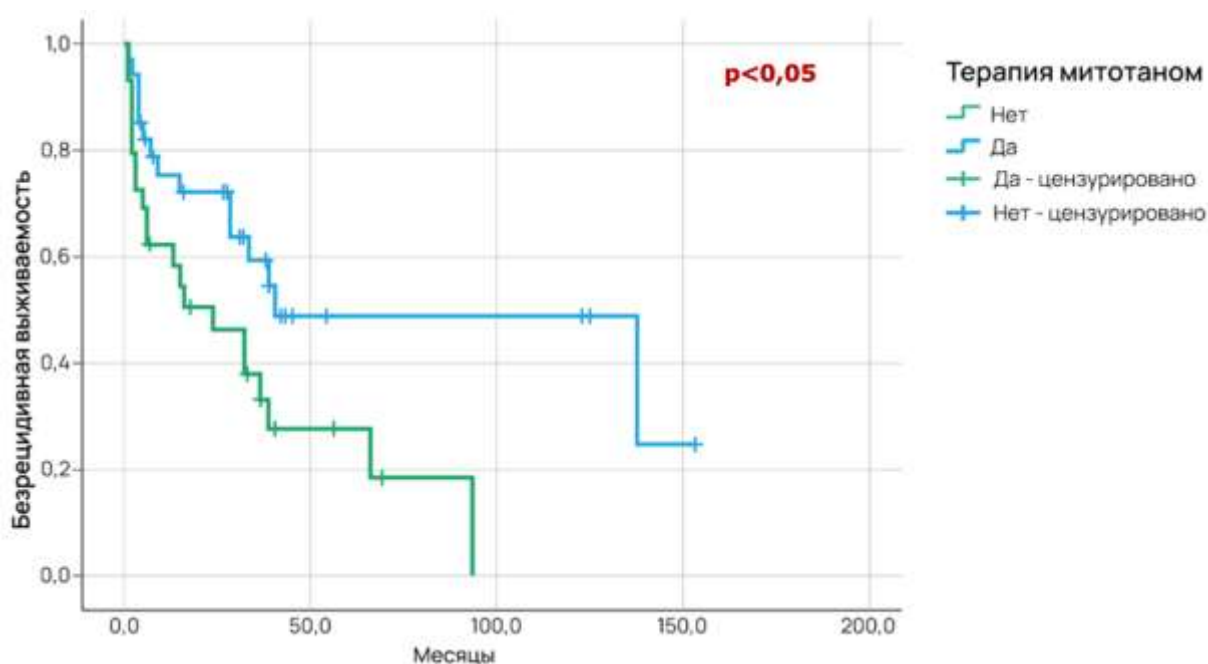


Рисунок 5.10 – Безрецидивная выживаемость пациентов с адренокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W2 и RRM1

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 АКР, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W2 и RRM1 представлены в Таблице 5.2.

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

Таблица 5.2 – Медиана (мес.) БРВ пациентов с адренокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W2 и RRM1

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 5.11) в сравнении с пациентами, принимающими митотан, при данном уровне экспрессии маркера.

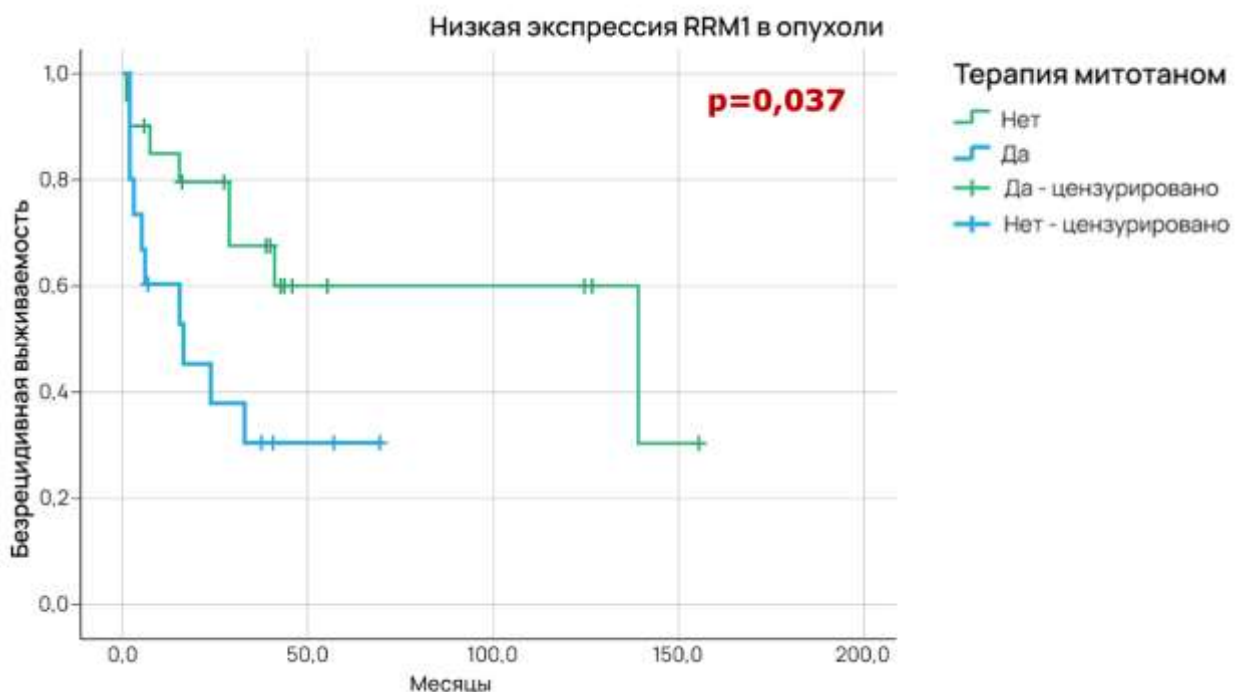


Рисунок 5.11 – Безрецидивная выживаемость пациентов с адренокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, при низком уровне экспрессии RRM1

В случаях умеренной и высокой экспрессии RRM1 статистически значимых различий БРВ в обеих группах пациентов не выявлено (Рисунок 5.12).

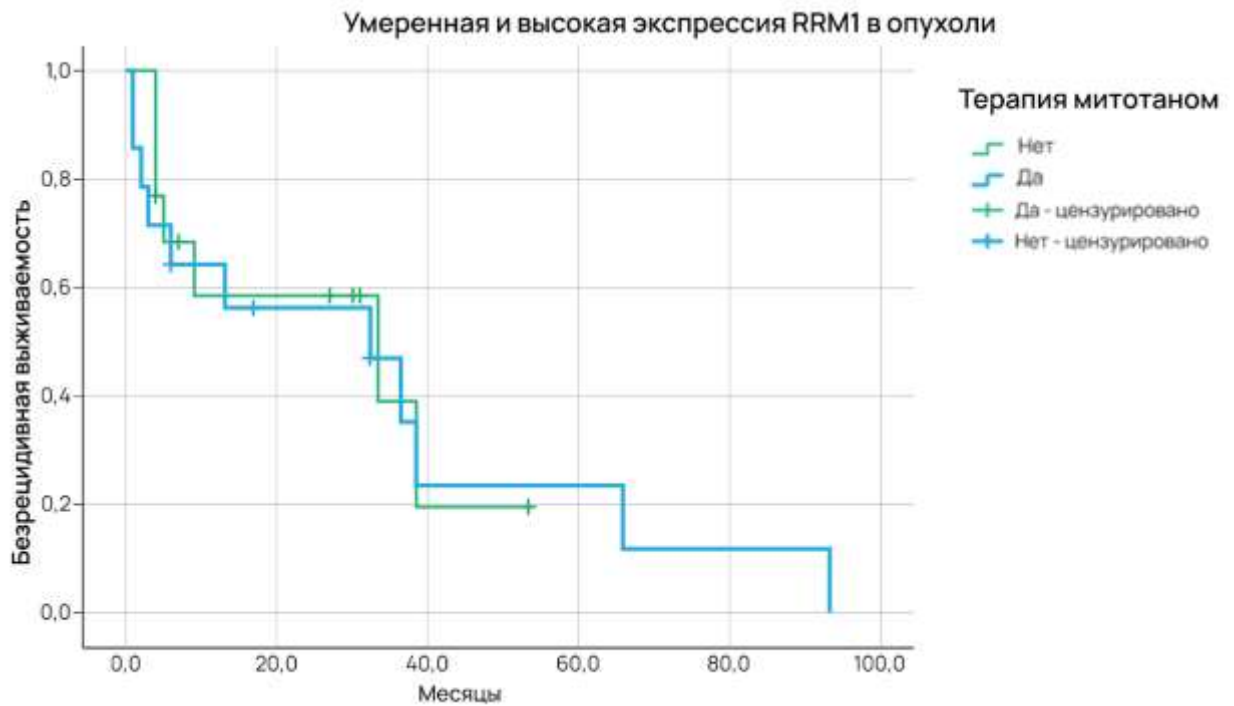


Рисунок 5.12 – Безрецидивная выживаемость пациентов с
адренокортикальным раком, получающих терапию митотаном и
находящихся на динамическом наблюдении, при умеренном и высоком
уровне экспрессии RRM1

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 5.3.

Таблица 5.3 – 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

Согласно полученным данным, при низком уровне экспрессии RRM1 медиана БРВ пациентов, получающих митотан, составила 16,0 мес., для пациентов, находящихся на динамическом наблюдении – 135,0 мес. В случае умеренного и высокого уровня экспрессии данного маркера медианы БРВ составили 32,0 мес. и 33,0 мес., соответственно.

В случае низкой и умеренной экспрессии SOAT1 БРВ в когорте обследованных, не принимающих противоопухолевую терапию, величина БРВ была статистически значимо выше (Рисунок 5.13), чем у пациентов, получающих митотан.

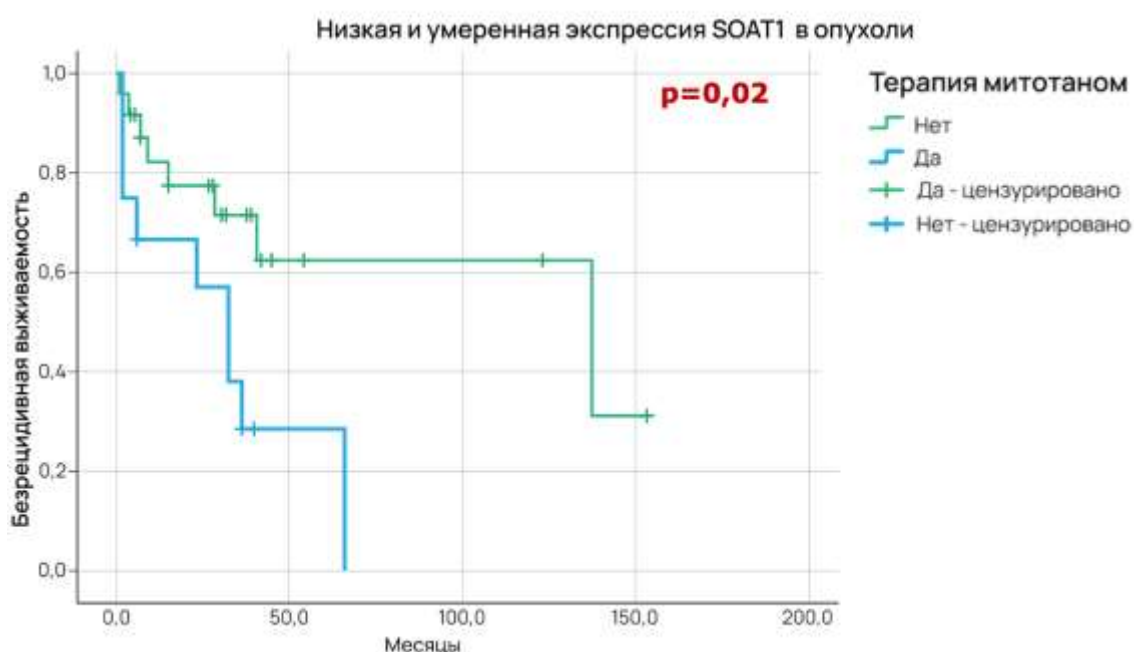


Рисунок 5.13 – Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокортикальным раком, получающих терапию митотаном и

находящихся на динамическом наблюдении, при низком и умеренном уровне экспрессии SOAT1

При высоком уровне иммунореактивности маркера статистически значимые различия не обнаружены (Рисунок 5.14).

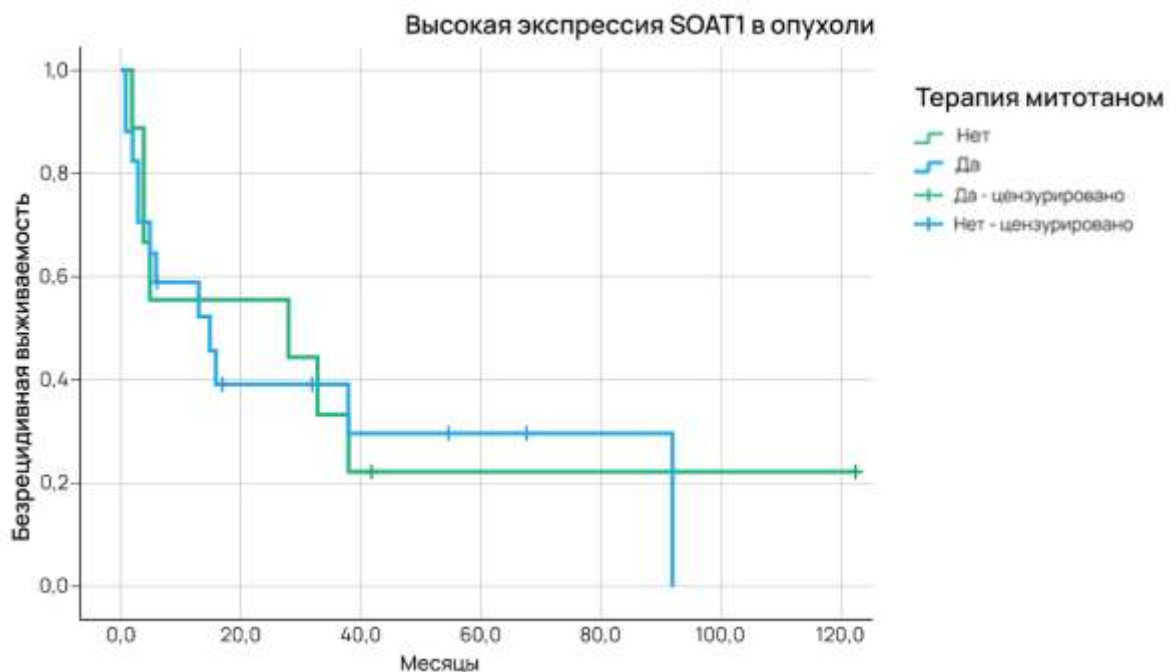


Рисунок 5.14 – Безрецидивная выживаемость пациентов с адренокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, при высоком уровне экспрессии SOAT1

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 обсуждаемым заболеванием, принимающих митотан и находящихся на динамическом наблюдении, с учетом уровня экспрессии SOAT1 представлены в Таблице 5.4.

Таблица 5.4 – 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

Как видно, при низком и умеренном уровне экспрессии SOAT1 медиана БРВ в основной группе пациентов составила 32,0 мес., в контрольной группе – 135,0 мес. В случае высокого уровня экспрессии данного маркера медианы БРВ составили 15,0 мес. и 28,0 мес., соответственно.

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 (Рисунок 5.15).

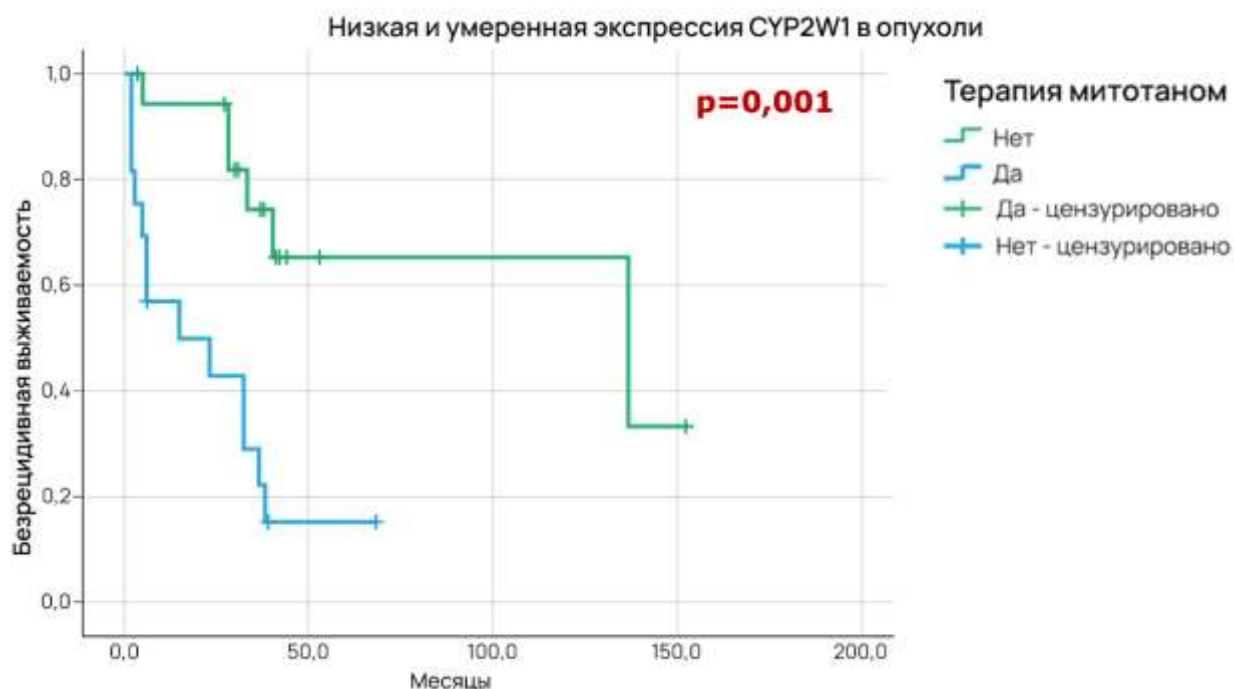


Рисунок 5.15 – Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокортикальным раком, получающих терапию митотаном и

находящихся на динамическом наблюдении, при низком и умеренном уровне экспрессии CYP2W1

Статистически значимых различий БРВ в обеих группах пациентов при высокой экспрессии CYP2W1 не выявлено (Рисунок 5.16).

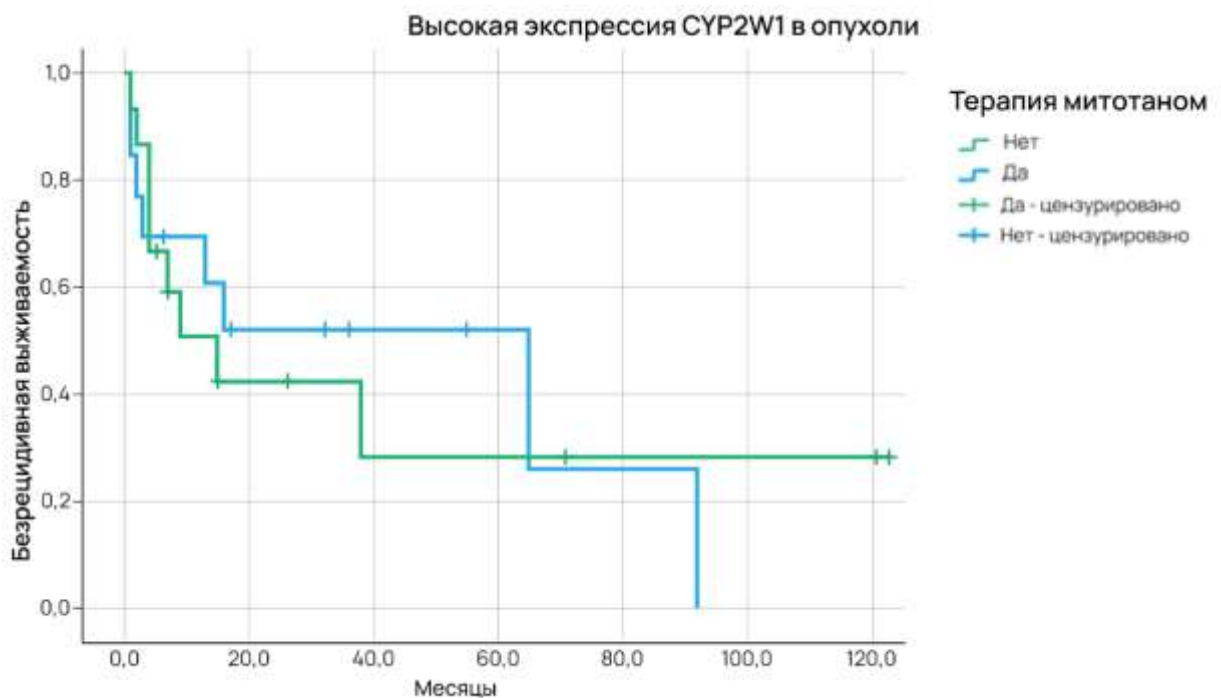


Рисунок 5.16 – Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокортикальным раком, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, при высоком уровне экспрессии CYP2W1

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 5.5.

Таблица 5.5 – 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 мес., находящихся на динамическом наблюдении – 135,0 мес. В случае высокого уровня экспрессии данного маркера медианы БРВ составили 65,0 мес. и 15,0 мес., соответственно.

Далее для того, чтобы устранить влияние стадии ENSAT на БРВ пациентов, была выполнена двухфакторная Сох-регрессия со стратификацией по уровню экспрессии обсуждаемых иммуногистохимических маркеров. Результаты регрессионного анализа с поправкой на стадию ENSAT представлены в Таблицах 5.6-5.8.

Таблица 5.6 – Влияние уровня экспрессии CYP2W1 на БРВ пациентов, получающих митотан, с поправкой на стадию ENSAT

Уровень экспрессии CYP2W1		W	Exp (B)	p
Низкий и умеренный	Терапия митотаном	6,48	4,28	0,01
	Стадия ENSAT	1,55	0,53	0,21
Высокий	Терапия митотаном	0,01	0,97	0,95
	Стадия ENSAT	0,06	0,88	0,80

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

Таблица 5.7 – Влияние уровня экспрессии SOAT1 на БРВ пациентов, получающих митотан, с поправкой на стадию ENSAT

Уровень экспрессии SOAT1		W	Exp (B)	p
Низкий и умеренный	Терапия митотаном	3,48	2,66	0,06
	Стадия ENSAT	1,24	0,56	0,27
Высокий	Терапия митотаном	0,09	0,84	0,77
	Стадия ENSAT	0,77	0,60	0,38

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

Таблица 5.8 – Влияние уровня экспрессии RRM1 на БРВ пациентов, получающих митотан, с поправкой на стадию ENSAT

Уровень экспрессии RRM1		W	Exp (B)	p
Низкий и умеренный	Терапия митотаном	2,67	2,32	0,10
	Стадия ENSAT	1,47	0,54	0,23
Высокий	Терапия митотаном	0,06	0,87	0,81
	Стадия ENSAT	0,90	0,59	0,34

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

При анализе иммунореактивности RRM1, SOAT1, CYP2W1 с учетом поправки на стадию ENSAT обнаружено, что при низком и умеренном уровне экспрессии CYP2W1 у пациентов, получающих терапию митотаном, риск рецидива был в 4,28 раза выше ($p=0,011$), чем у пациентов без лечения. Аналогичная тенденция - повышение риска рецидива более чем в 2,5 раза выявлена при низкой и умеренной экспрессии SOAT1 ($p=0,062$). Однако учитывая то, что статическая значимость не достигается, можно говорить только о вероятностном характере события.

Проведенное исследование показало, что профиль экспрессии классического варианта АКР характеризовался относительно равномерным распределением уровней иммунореактивности SOAT1, CYP2W1 и RRM1. Онкоцитарный вариант отличался преимущественно умеренной и низкой иммунореактивностью SOAT1, при этом уровни экспрессии других исследуемых маркеров характеризовались обратно пропорциональным распределением - высокой иммунореактивностью CYP2W1 и низкой иммунореактивностью RRM1. Миксоидный вариант характеризовался выраженной иммунореактивностью SOAT1 и CYP2W1, при этом отмечена преимущественно низкая и умеренная экспрессия RRM1.

В соответствии с результатами анализа БРВ пациентов с АКР, получающих терапию митотаном и находящихся на динамическом наблюдении, без учета уровней экспрессии SOAT1, CYP2W1 и RRM1 методом Каплан-Майера 5-летняя БРВ в группе пациентов на терапии данным противоопухолевым препаратом составляла 27,6%, в контрольной группе – 48,8%. Медиана БРВ пациентов, получающих митотан, составила 23,0 мес., у пациентов, находящихся на динамическом наблюдении – 40,0 мес.

При включении в анализ уровней экспрессии иммуногистохимических маркеров SOAT1, CYP2W2 и RRM1 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 значения показателей составили 23,4% и 19,5%, соответственно. При низком уровне экспрессии RRM1 медиана БРВ пациентов, получающих митотан, составила 16,0 мес., у пациентов, находящихся на динамическом наблюдении – 135,0 мес. В случае умеренного и высокого уровня экспрессии данного маркера медианы БРВ составили 32,0 мес. и 33,0 мес., соответственно. При низком и умеренном уровне экспрессии SOAT1 медиана БРВ в основной группе пациентов составила 32,0 мес., в контрольной группе – 135,0 мес.

При высоких уровнях экспрессии данного маркера медианы БРВ составили 15,0 мес. и 28,0 мес., соответственно. 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. 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.

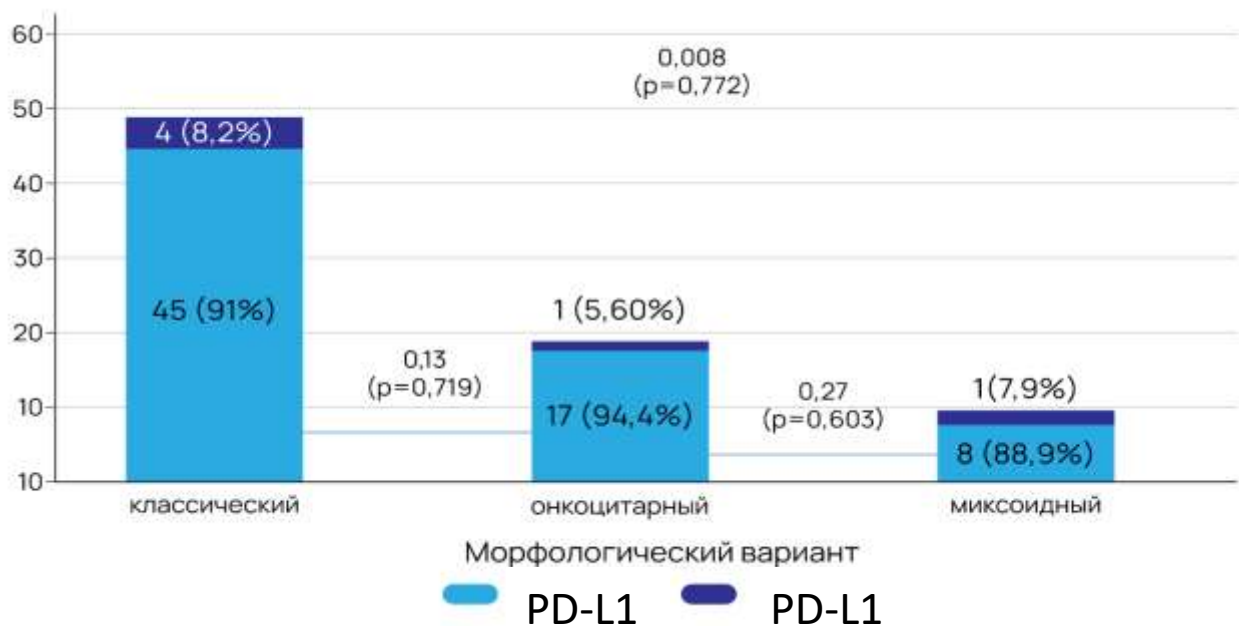
Согласно полученным данным, при низком и умеренном уровне экспрессии CYP2W1 медиана БРВ пациентов, получающих митотан, составила 15,0 мес., находящихся на динамическом наблюдении – 135,0 мес. В случае высокого уровня экспрессии данного маркера медианы БРВ составили 65,0 мес. и 15,0 мес., соответственно. при анализе иммунореактивности RRM1, SOAT1, CYP2W1 с учетом поправки на стадию ENSAT обнаружено, что при низком и умеренном уровне экспрессии CYP2W1 у пациентов, получающих терапию митотаном, риск рецидива был в 4,28 раза выше ($p=0,011$), чем у пациентов без лечения. Аналогичная тенденция в отношении повышения риска рецидива заболевания более чем в 2,5 раза выявлена при низкой и умеренной экспрессии SOAT1 ($p=0,062$).

Таким образом, при анализе БРВ с учетом профиля экспрессии данных маркеров выявлено, что низкая и умеренная экспрессия RRM1, SOAT1 и CYP2W1 в АКР ассоциирована с лучшей БРВ.

5.2. Предикторы эффективности биотерапии с использованием аналогов соматостатина и иммунотерапии

5.2.1. Анализ экспрессии соматостатиновых рецепторов 2 и 5 типов и PD-L1 в зависимости от морфологических вариантов

На данном этапе был проведен анализ данных 78 пациентов с АКР. Классический морфологический вариант заболевания 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 5.17 представлена экспрессия PD-L1 в зависимости от обсуждаемых морфологических вариантов.

Рисунок 5.17 – Экспрессия PD-L1 в зависимости от морфологических вариантов АКР

В большей части случаев отмечалось отсутствие экспрессии PD-L1. 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 Рисунках 5.18-5.19 представлена экспрессия соматостатинового рецептора RSST 2 в зависимости от морфологических вариантов опухоли.

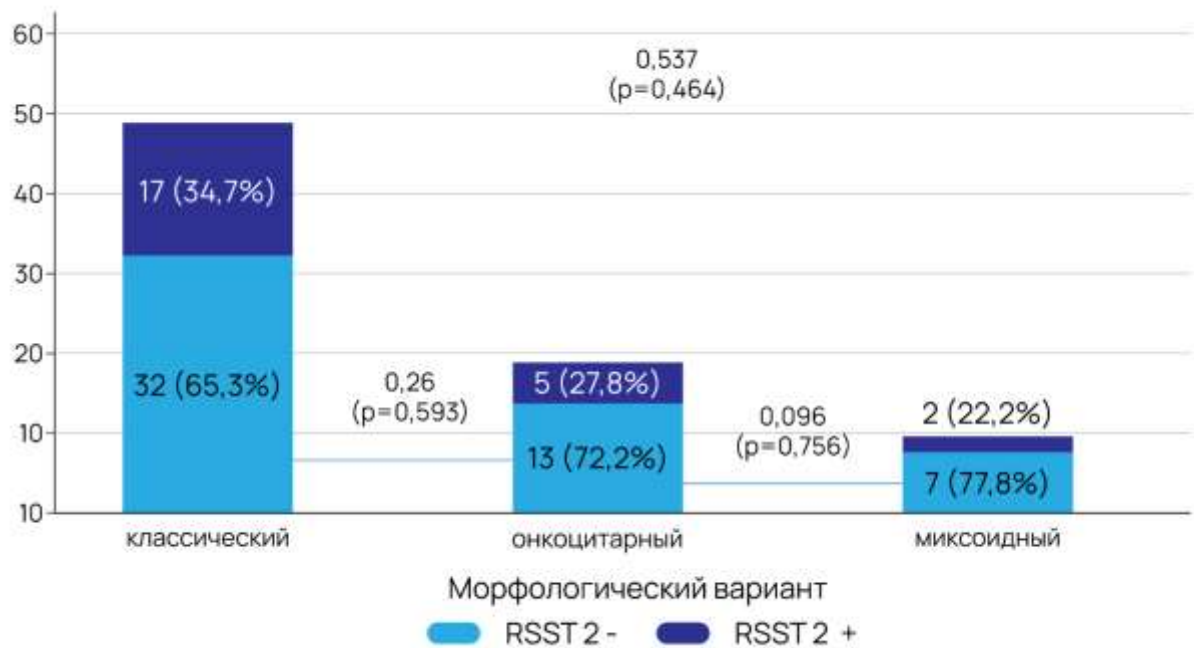


Рисунок 5.18 – Экспрессия соматостатинового рецептора RSST 2 в зависимости от морфологических вариантов АКР



Рисунок 5.19 – Иммуногистохимическая экспрессия соматостатинового рецептора RSST 2 в 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 Рисунках 5.20-5.21 представлена экспрессия соматостатинового рецептора RSST 5 в зависимости от морфологических вариантов опухоли.

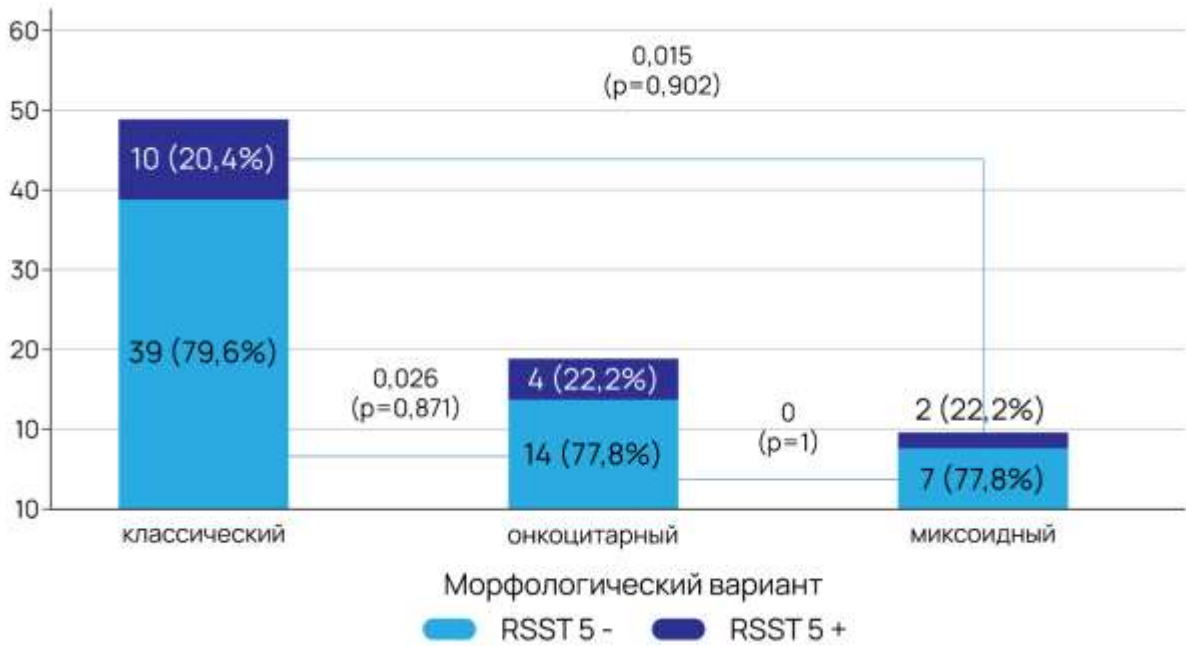


Рисунок 5.20 – Экспрессия соматостатинового рецептора RSST 5 в зависимости от морфологических вариантов АКР

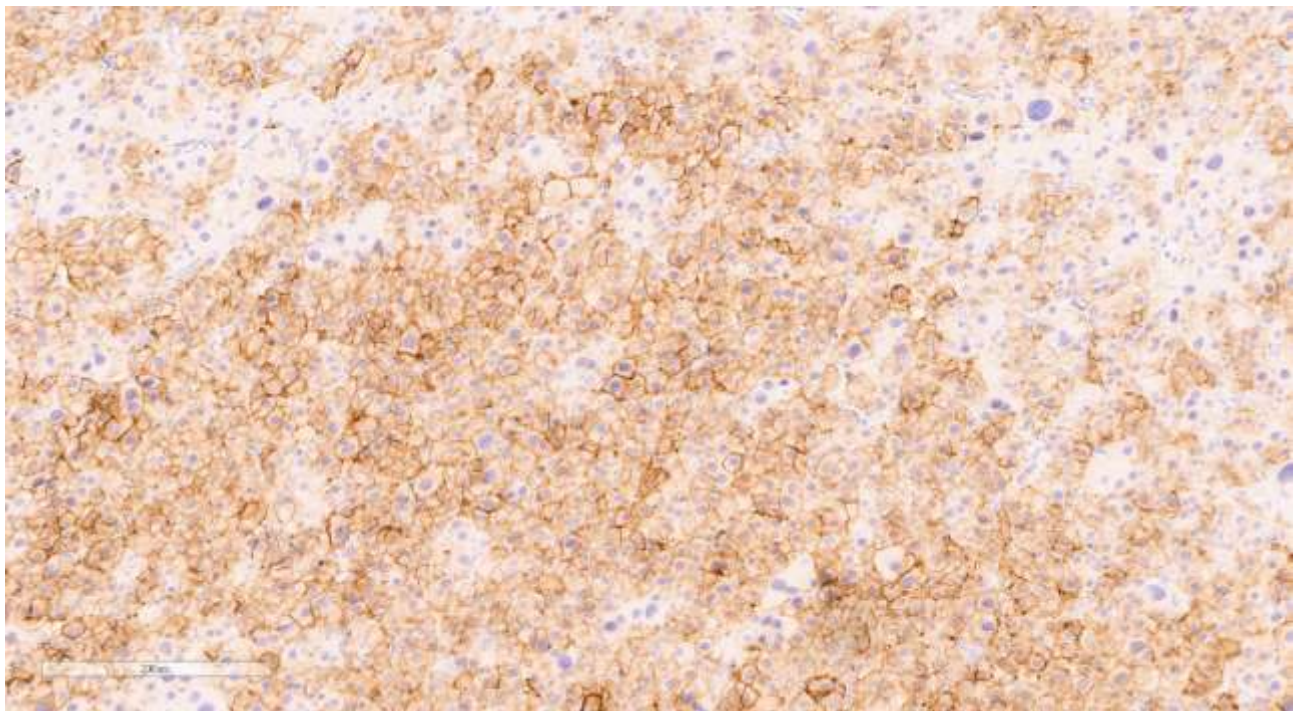


Рисунок 5.21 – Иммуногистохимическая экспрессия соматостатинового рецептора RSST 5 в АКР

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 были не достигали статистической значимости.

5.2.2. Оценка влияния экспрессии соматостатиновых рецепторов и PD-L1 на общую и безрецидивную выживаемость

В Таблицах 5.10 и 5.11 представлены результаты оценки взаимосвязи экспрессии PD-L1 и уровней ОБ и БРВ пациентов с АКР.

Таблица 5.10 – 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

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

Таблица 5.11 – 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 регрессии 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.

В Таблицах 5.12 и 5.13 представлены результаты оценки значимости изменений экспрессии соматостатинового рецептора RSST 2 в отношении уровня ОБ и БРВ пациентов с АКР.

Таблица 5.12 – Результаты оценки регрессии Кокса для общей выживаемости и фактора экспрессии RSST 2

Фактор	W	Exp (B)	p
RSST 2	0,425	0,811	0,514

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

Таблица 5.13 – Результаты оценки регрессии Кокса для безрецидивной выживаемости и фактора экспрессии RSST 2

Фактор	W	Exp (B)	p
RSST 2	0,425	0,811	0,514

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

Обе модели статистически незначимы, то есть экспрессия RSST 2 не ассоциирована с увеличением риска летального исхода и рецидива.

Аналогично, в Таблицах 5.14 и 5.15 представлены результаты оценки влияния экспрессии соматостатинового рецептора RSST 5 на уровни ОБ и БРВ. Выявленные различия были статистически незначимы, то есть экспрессия RSST 5 не повышает риски смерти и рецидива.

Таблица 5.14 – Результаты оценки регрессии Кокса для общей выживаемости и фактора экспрессии RSST 5

Фактор	W	Exp (B)	p
RSST 5	0,578	1,318	0,447

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

Таблица 5.15 – Результаты оценки регрессии Кокса для безрецидивной выживаемости и фактора экспрессии RSST 5

Фактор	W	Exp (B)	p
RSST 5	0,988	1,418	0,32

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

Таким образом, проведенное исследование показало, что экспрессия соматостатиновых рецепторов 2 и 5 типов не влияет на риски смертности и рецидива АКР, тогда как экспрессия PD-L1 значительно повышает риски как летального исхода, так и рецидива опухоли.

У пациентов с классическим вариантом АКР экспрессия PD-L1 отмечалась в 8,2% случаев (n=4), с онкоцитарным – в 5,6% случаев (n=1), с миксоидным – в 7,9% (n=1). Экспрессия RSST 2 выявлена в 34,7% случаев (n=17) при классическом варианте, в 27,8% (n=5) случаев при онкоцитарном АКР, в 22,2% (n=2) случаев - при миксоидном варианте опухоли. Экспрессия RSST 5 отмечалась в 20,4% случаев при классическом варианте (n=10), в 22,2% - при онкоцитарном (n=4), в 22,2% случаев (n=2) при миксоидном варианте АКР.

Несмотря на различия частоты встречаемости экспрессии PD-L1 и соматостатиновых рецепторов 2 и 5 типов у пациентов с разными

морфологическими вариантами АКР, различия относительных частот (долей) являются статистически недостоверными. Экспрессия соматостатиновых рецепторов 2 и 5 типов не влияет на риски смертности и рецидива опухоли, тогда как экспрессия PD-L1 значительно повышает эти риски.

5.3. Предикторы эффективности иммунотерапии

5.3.1. Характеристика изучаемых популяций

В исследование было включено 2 когорты пациентов с АКР: пациенты из базы данных The Cancer Genome Atlas (TCGA), а также пациенты, получавшие лечение в НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ.

Исходно для когорты пациентов TCGA были отобраны данные 78 пациентов с доступными результатами секвенирования РНК. Дифференциальная диагностика проводилась на основе анализа изображений с высоким разрешением срезов опухоли, доступных в Cancer Digital Slide Archive (<https://cancer.digitalslidearchive.org/>, дата обращения: 20.10.2022), выполненного тремя патологоанатомами независимо друг от друга. Для некоторых случаев АКР были доступны только замороженные срезы тканей низкого качества, которые не могли быть использованы для точного определения гистологического варианта опухоли. Данные случаи были исключены из исследования. Таким образом, когорта TCGA включала 54 пациента (Таблица 5.16).

Таблица 5.16 – Гистологические характеристики случаев, включенных в когорту TCGA

ID (TCGA)	Гистологический тип
Терапия митотаном	23,0 ± 9,0
Динамическое наблюдение	40,0 ± 30,0
TCGA-OR-A5J1-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5J2-01	классический
TCGA-OR-A5J3-01	классический
TCGA-OR-A5J5-01	классический
TCGA-OR-A5J6-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5J7-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5J8-01	саркоматоидный
TCGA-OR-A5J9-01	классический
TCGA-OR-A5JA-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5JB-01	саркоматоидный
TCGA-OR-A5JC-01	классический
TCGA-OR-A5JD-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5JE-01	классический
TCGA-OR-A5JF-01	классический с онкоцитарными фокусами
TCGA-OR-A5JG-01	миксоидный
TCGA-OR-A5JJ-01	классический
TCGA-OR-A5JK-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5JL-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5JM-01	классический
TCGA-OR-A5JP-01	классический
TCGA-OR-A5JQ-01	миксоидный
TCGA-OR-A5JR-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5JS-01	классический
TCGA-OR-A5JT-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5JV-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5JX-01	классический
TCGA-OR-A5JZ-01	классический с онкоцитарными фокусами
TCGA-OR-A5K0-01	классический
TCGA-OR-A5K1-01	классический
TCGA-OR-A5K2-01	классический
TCGA-OR-A5K3-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5K4-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5K5-01	классический
TCGA-OR-A5K6-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5K8-01	классический
TCGA-OR-A5K9-01	классический
TCGA-OR-A5L5-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5LA-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5LK-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5LL-01	классический
TCGA-OR-A5LM-01	классический
TCGA-OR-A5LN-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5LO-01	классический
TCGA-OR-A5LP-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5LR-01	онкоцитарный
TCGA-OR-A5LS-01	миксоидный
TCGA-OR-A5LT-01	онкоцитарный
TCGA-OU-A5PI-01	классический
TCGA-P6-A5OF-01	классический
TCGA-PA-A5YG-01	онкоцитарный
TCGA-PK-A5H8-01	классический
TCGA-PK-A5H9-01	классический
TCGA-PK-A5HA-01	классический
TCGA-PK-A5HB-01	классический
TCGA-PK-A5HB-01	классический

В изученном материале классический морфологический вариант АКР был диагностирован в 52% случаев (n=28), онкоцитарный вариант – в 39% случаев (n=21), миксоидный вариант – в 5% случаев (n=3), саркоматоидный – в 4% случаев (n=2).

Другую исследуемую когорту представляли парафиновые блоки с детальным клиническим и патологическим описанием случаев пациентов с АКР, проходивших лечение в НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ между 2010 и 2020 гг. В анализ были включены данные 21 пациента. Среди обследованного материала классический морфологический вариант опухоли был диагностирован в 48% случаев (n=10), онкоцитарный вариант – в 43% случаев (n=9), миксоидный вариант – в 9% случаев (n=2).

5.3.2. Значения выживаемости при различных морфологических подтипах аденокортикального рака

Установлены статистически достоверные различия уровней выживаемости пациентов с классическим и онкоцитарным подтипами АКР. На Рисунках 5.22-5.25 представлены кривые Каплана-Мейера для ОВ и беспрогрессивной выживаемости когорты TCGA, а также ОВ и БРВ когорты НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ.

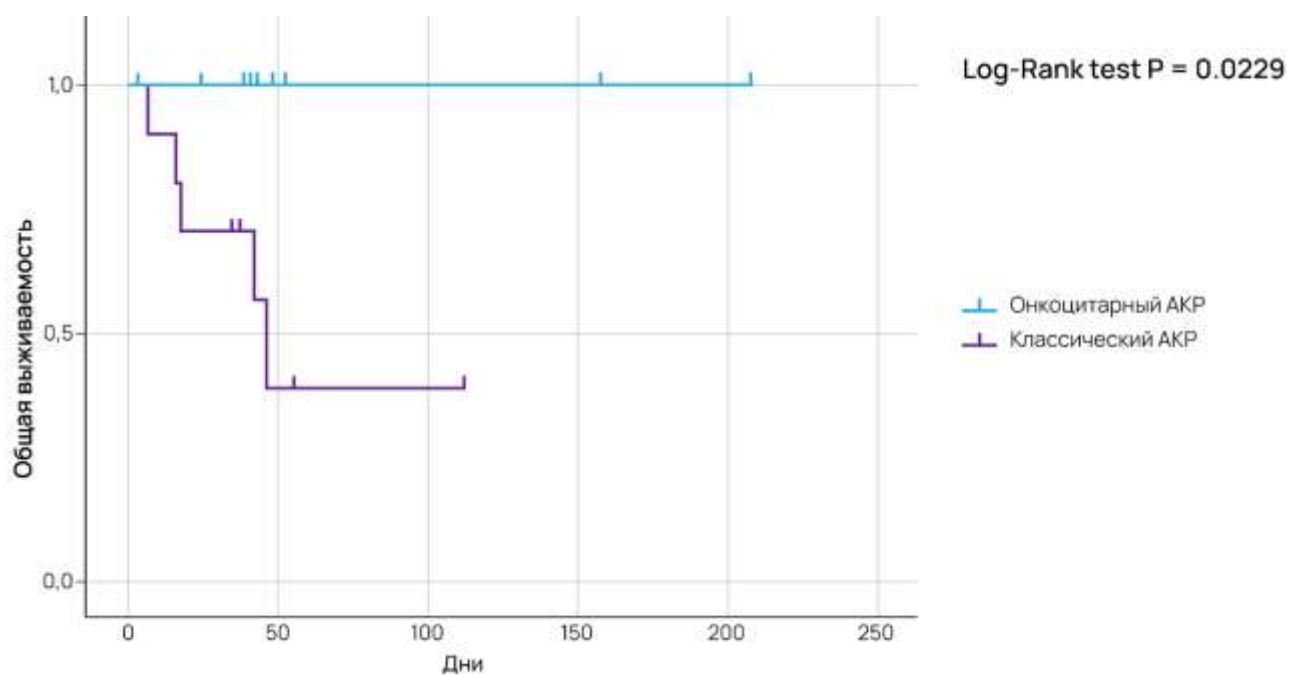


Рисунок 5.22 – Общая выживаемость пациентов когорты TCGA с онкоцитарным и классическим вариантами адренокортикального рака

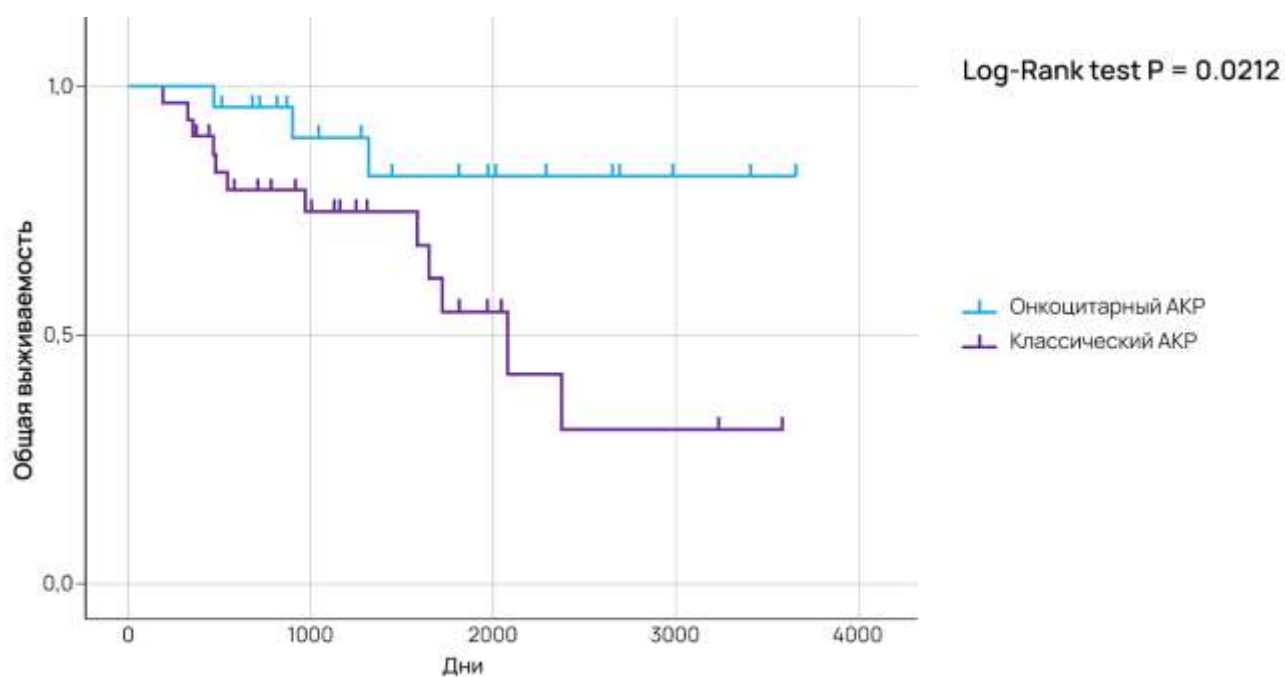


Рисунок 5.23 – Беспрогрессивная выживаемость пациентов когорты TCGA с онкоцитарным и классическим вариантами адренокортикального рака

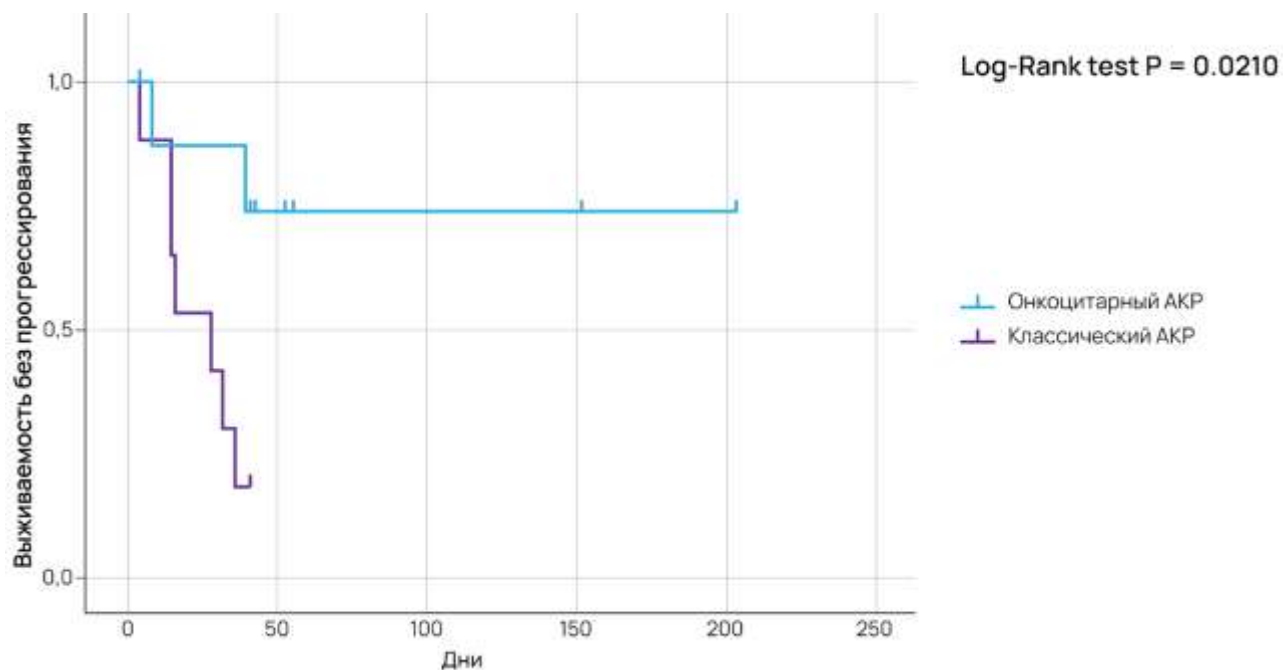


Рисунок 5.24 – Общая выживаемость пациентов когорты НМИЦ
Эндокринологии МЗ РФ с онкоцитарным и классическим вариантами
адренокортикального рака

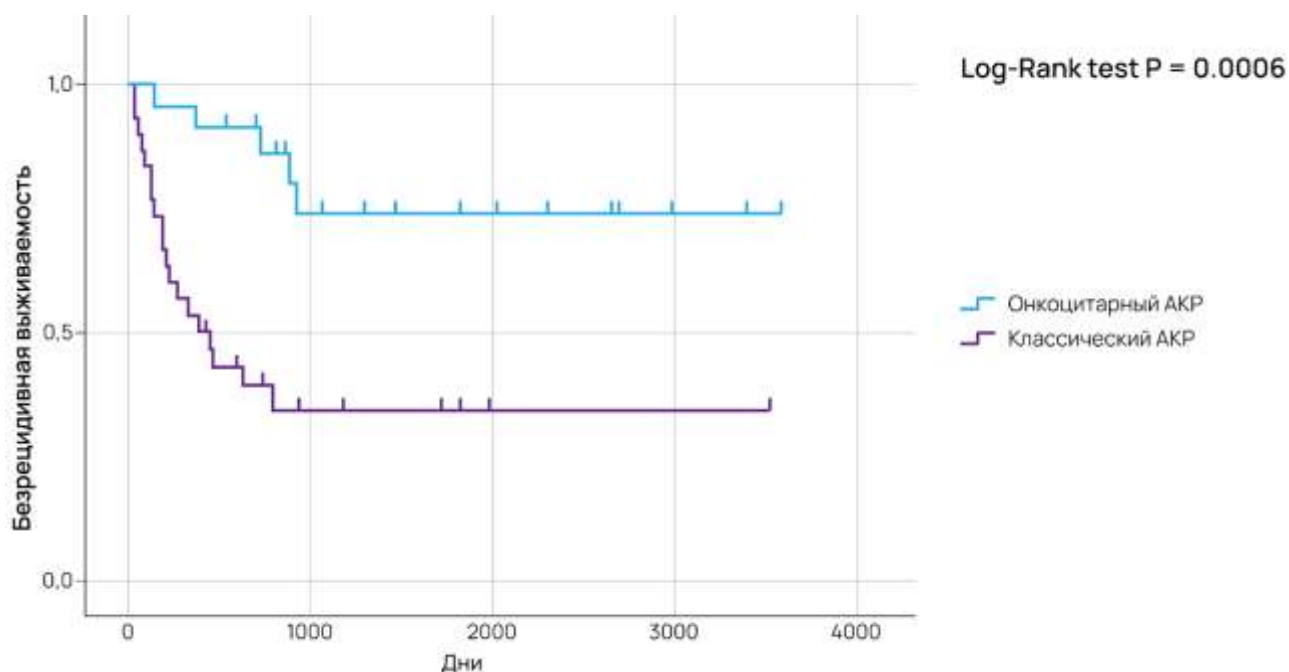


Рисунок 5.25 – Безрецидивная выживаемость пациентов когорты
НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ с онкоцитарным и классическим вариантами
адренокортикального рака

Следует отметить также наличие статистически значимой корреляции между уровнями ОВ, беспрогрессивной выживаемости, с одной стороны, и гистологическим вариантом АКР в когорте TCGA, с другой. Коэффициенты корреляции Спирмена составили 0,307 ($p=0,0320$) и 0,436 ($p=0,0017$), соответственно.

5.3.3. Взаимосвязь степени иммунной инфильтрации с различными морфологическими подтипами аденокортикального рака

Далее для проверки гипотезы о потенциальных различиях интенсивности иммунной инфильтрации между классическим и онкоцитарным вариантами АКР был 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 5.17 и на Рисунках 5.26-5.45 представлены результаты анализа различных подтипов иммунных клеток в паренхиме и строме опухоли обсуждаемого заболевания.

Таблица 5.26 – Наличие различных подтипов иммунных клеток в паренхиме и строме опухоли адренокортикального 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)

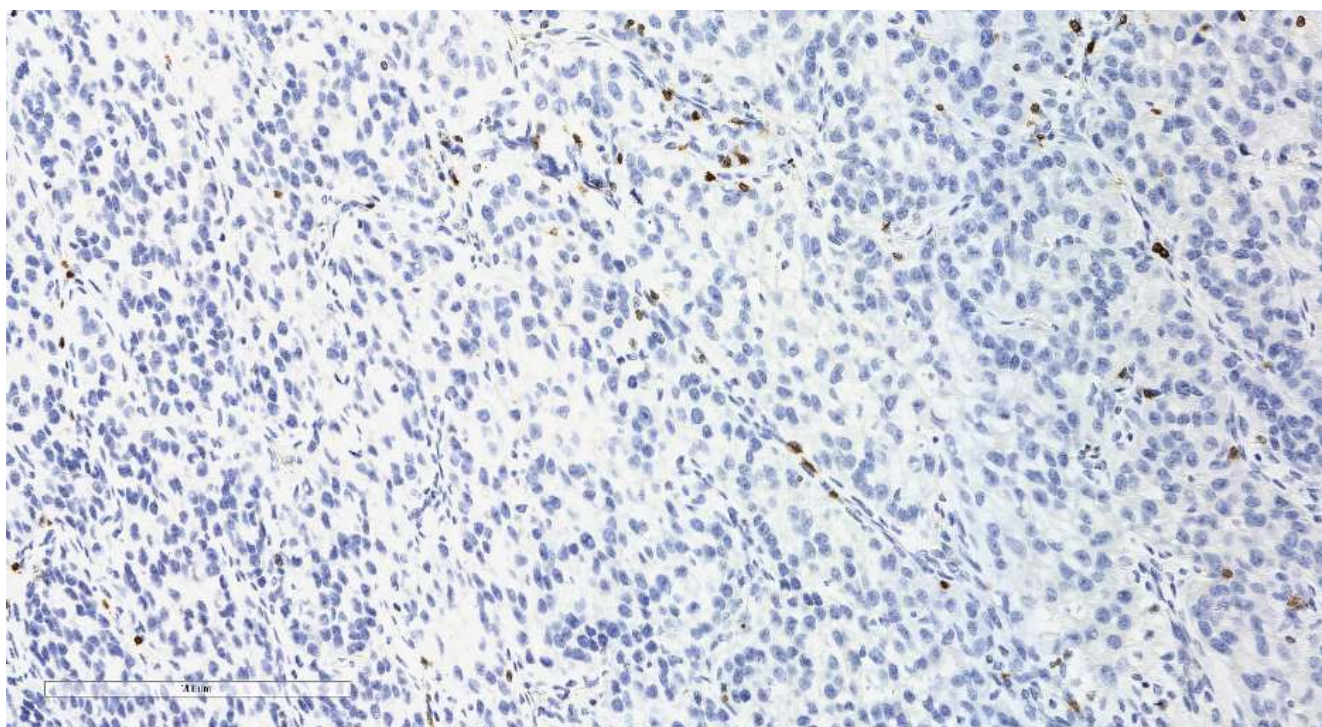


Рисунок 5.27 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

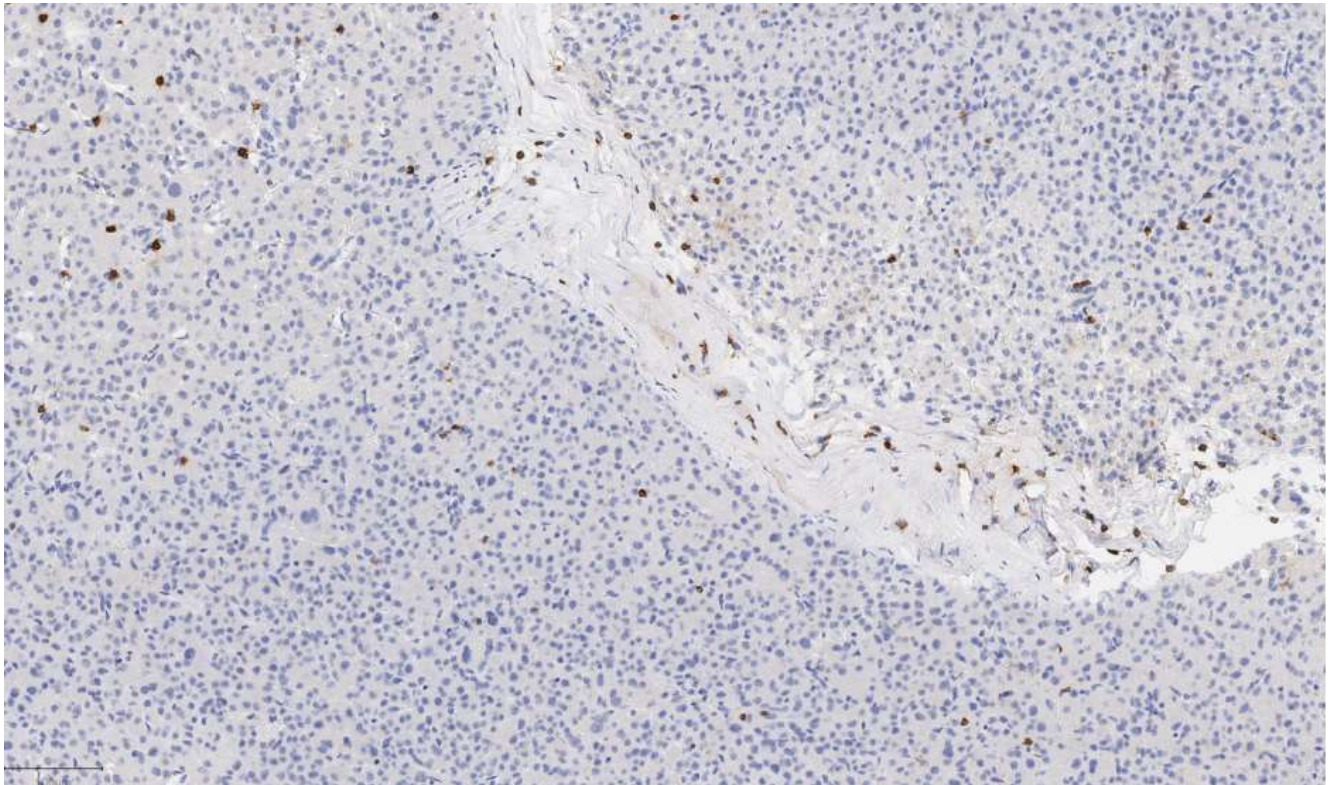


Рисунок 5.28 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 в строме опухоли (увеличение x100)

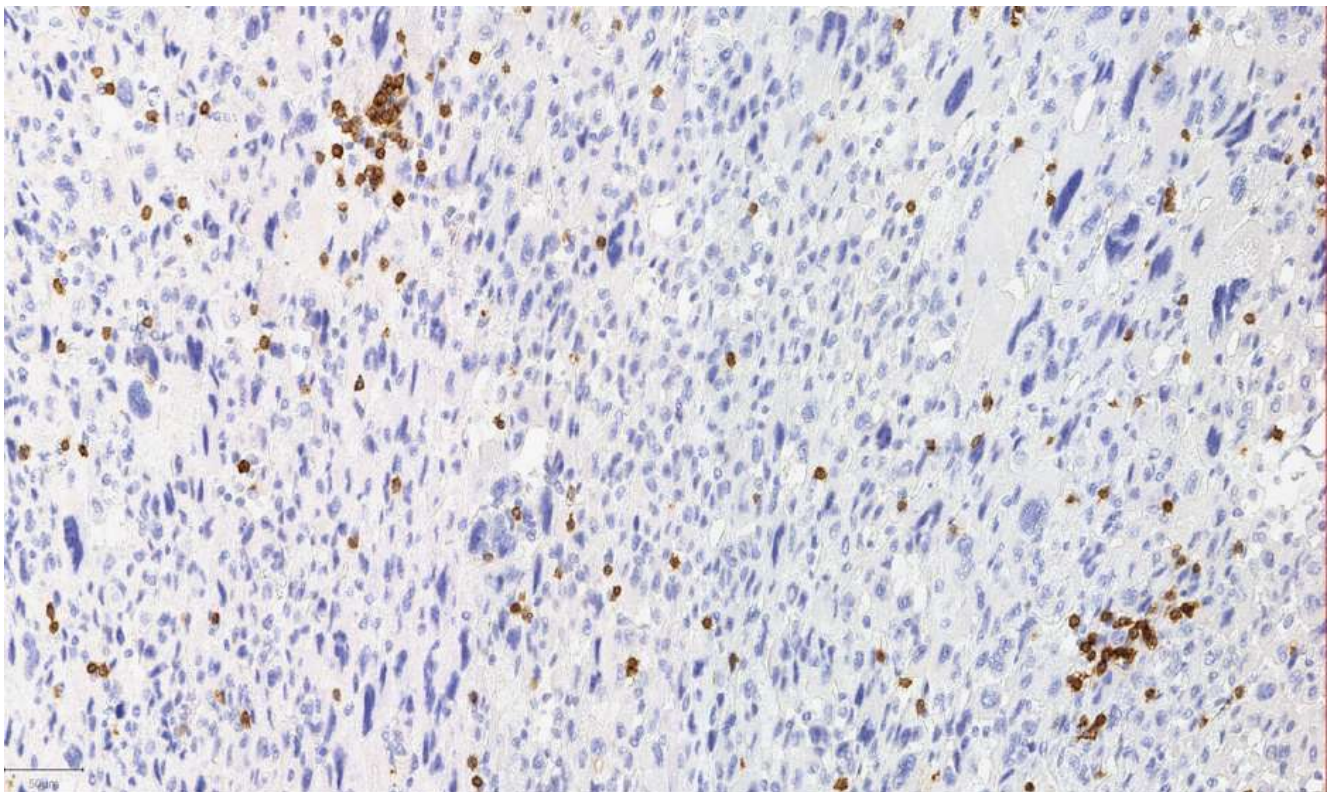


Рисунок 5.29 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака,

иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 в паренхиме
опухоли (увеличение x100)

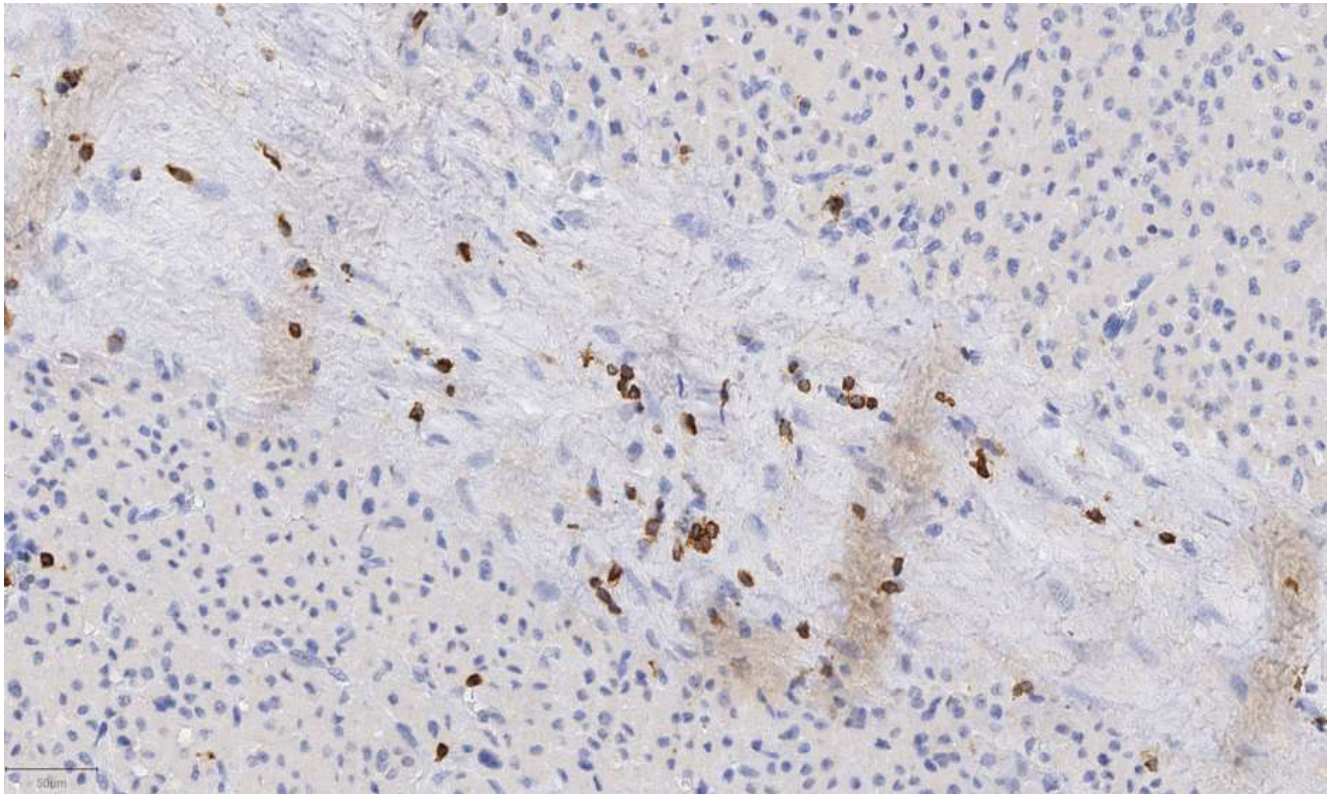


Рисунок 5.30 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака,
иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 в строме опухоли
(увеличение x100)

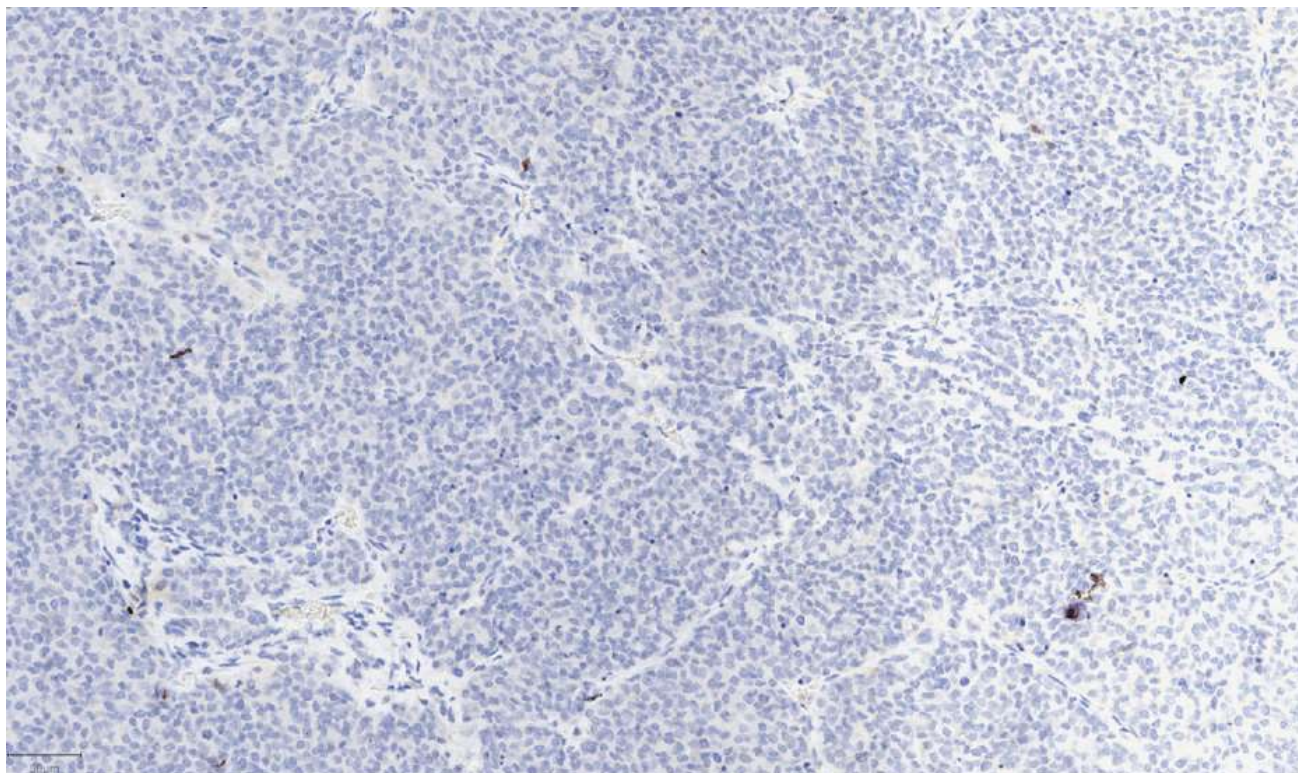


Рисунок 5.31 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD4 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

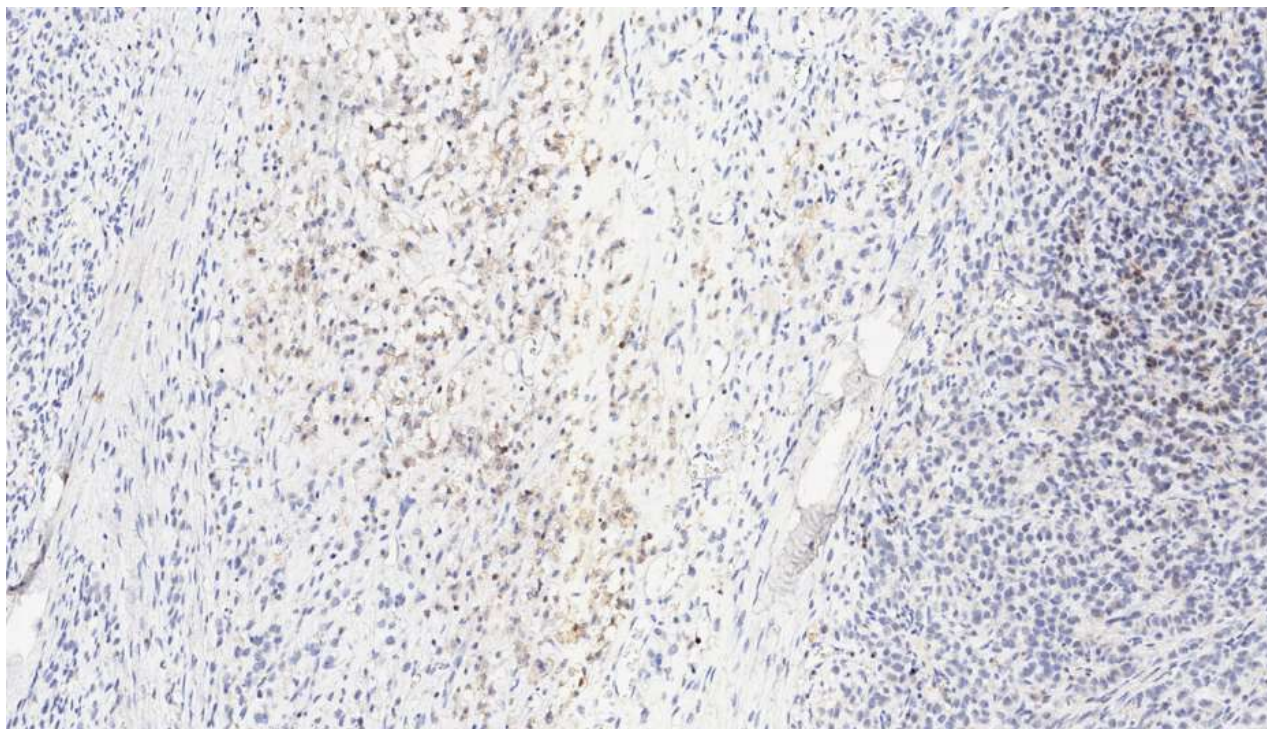


Рисунок 5.32 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD4 в строме опухоли (увеличение x100)

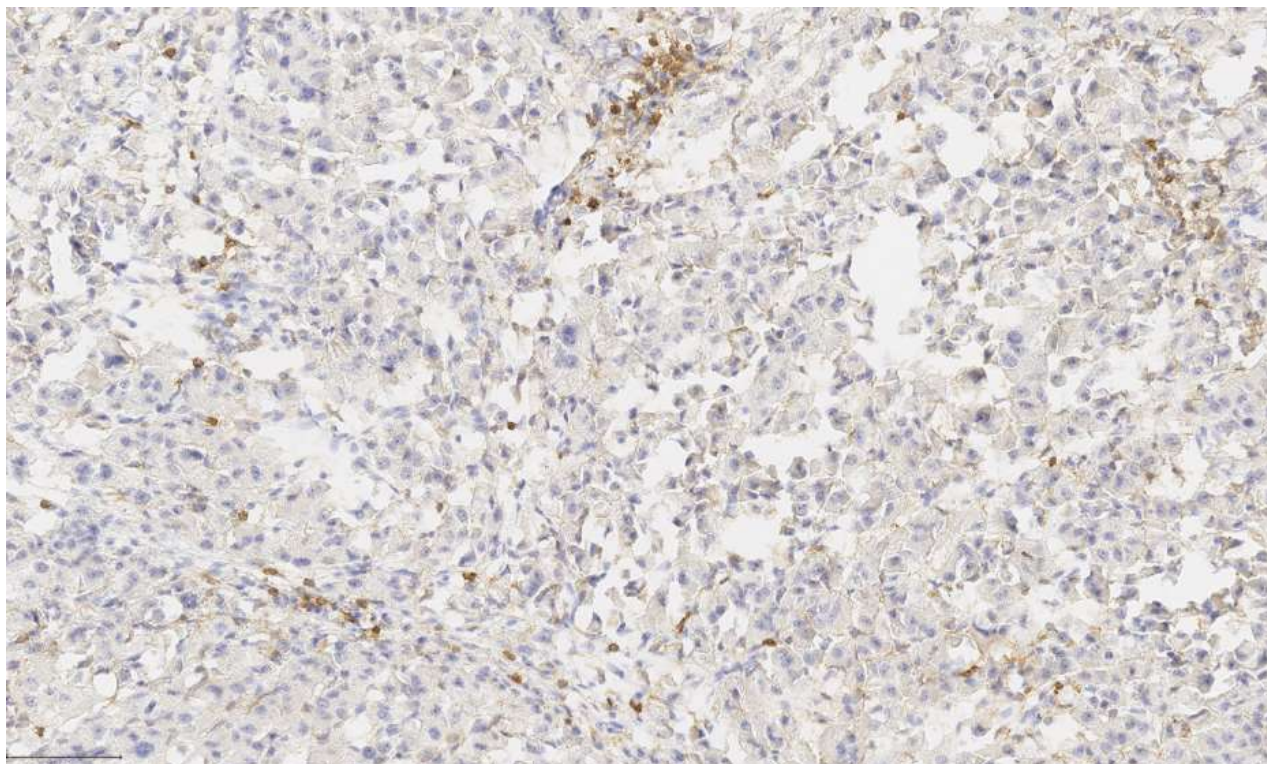


Рисунок 5.33 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD4 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

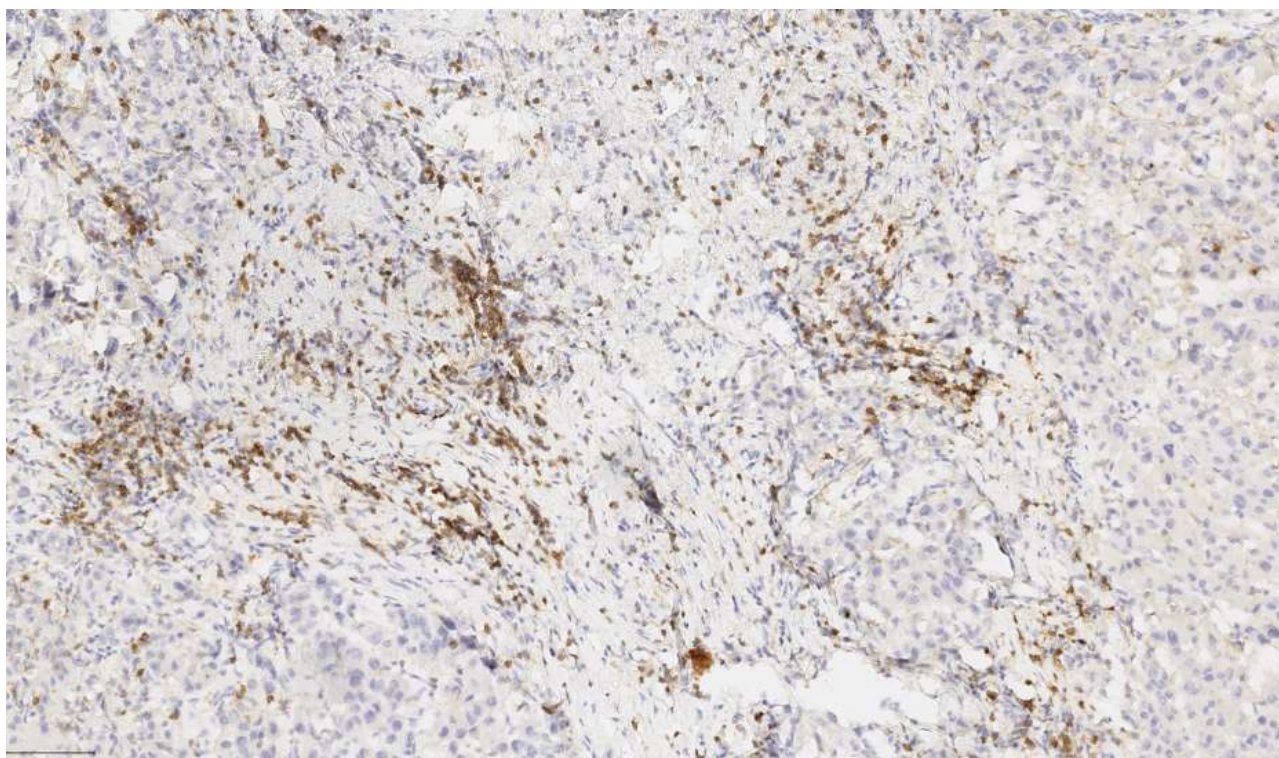


Рисунок 5.34 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD45 в строме опухоли (увеличение x100)

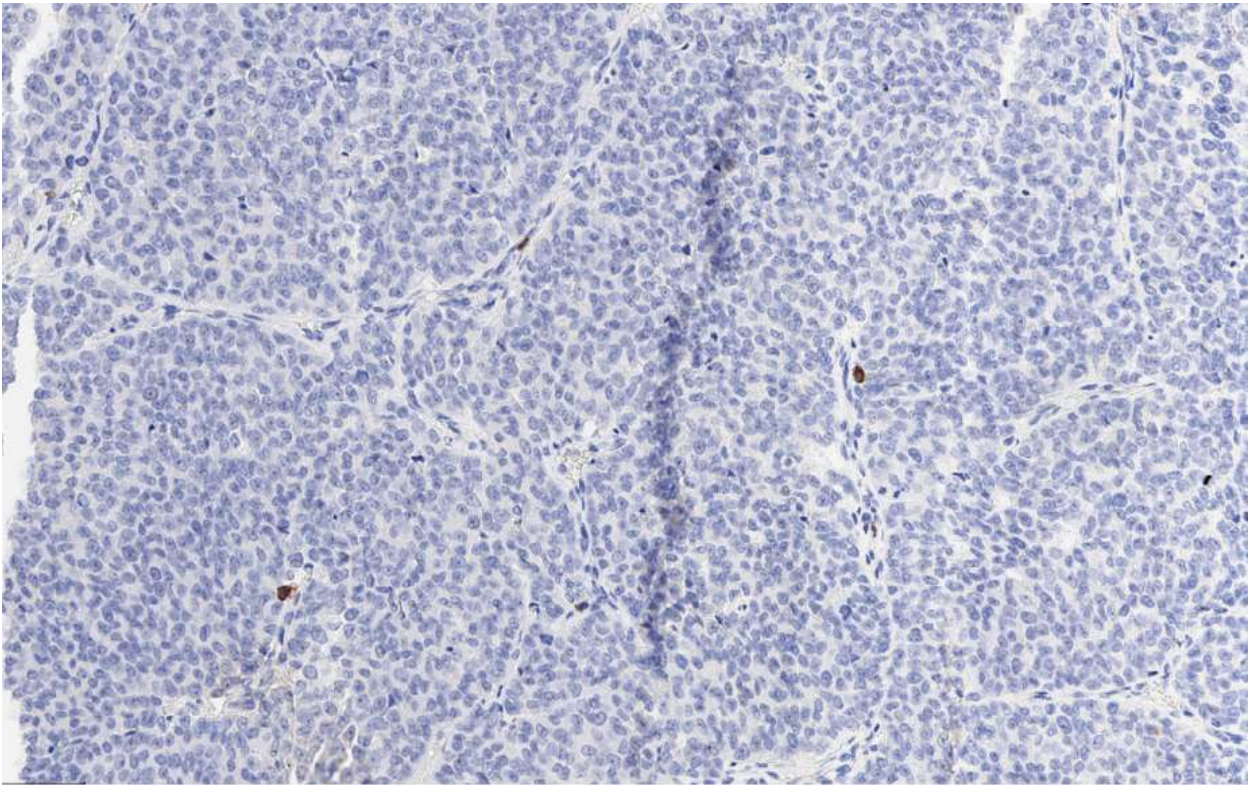


Рисунок 5.35 – Классический вариант аденокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD8 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

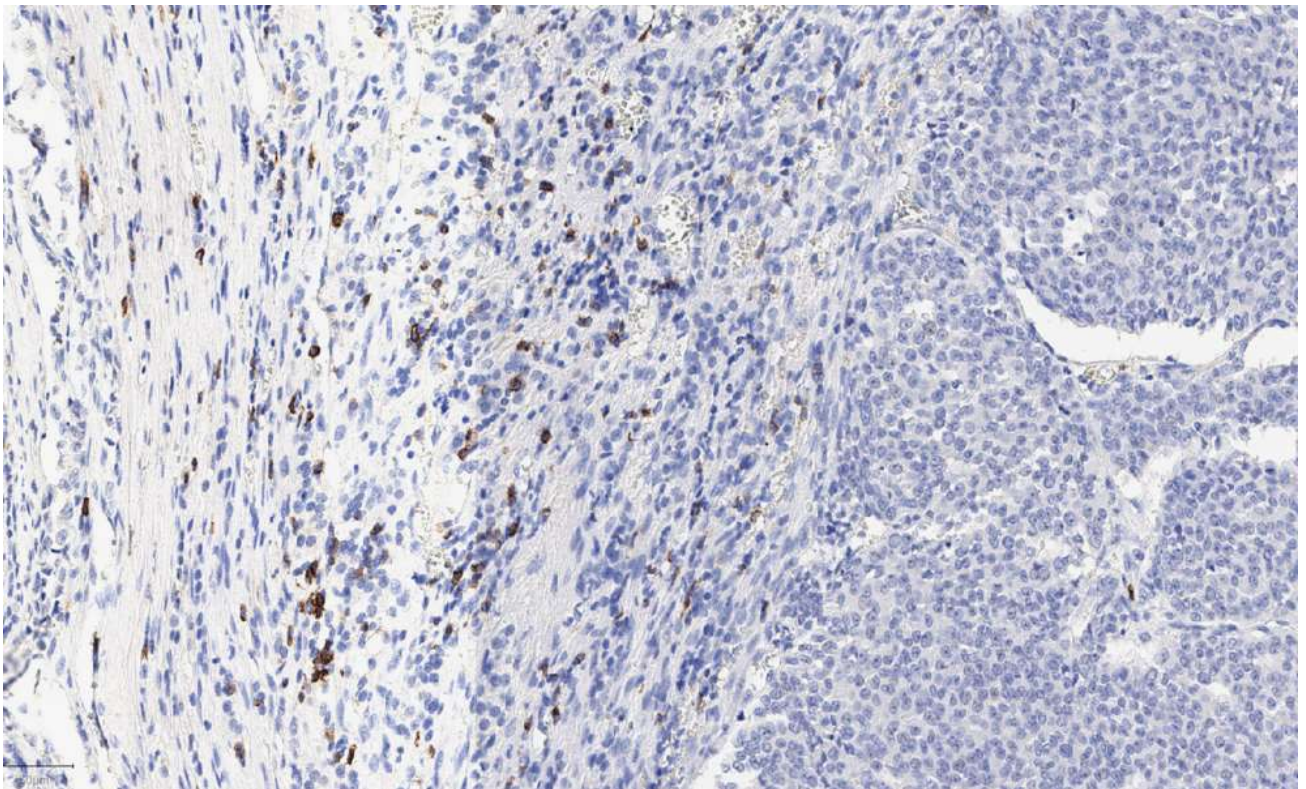


Рисунок 5.36 – Классический вариант аденокортикального рака,
иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD8 в строме опухоли
(увеличение x100)

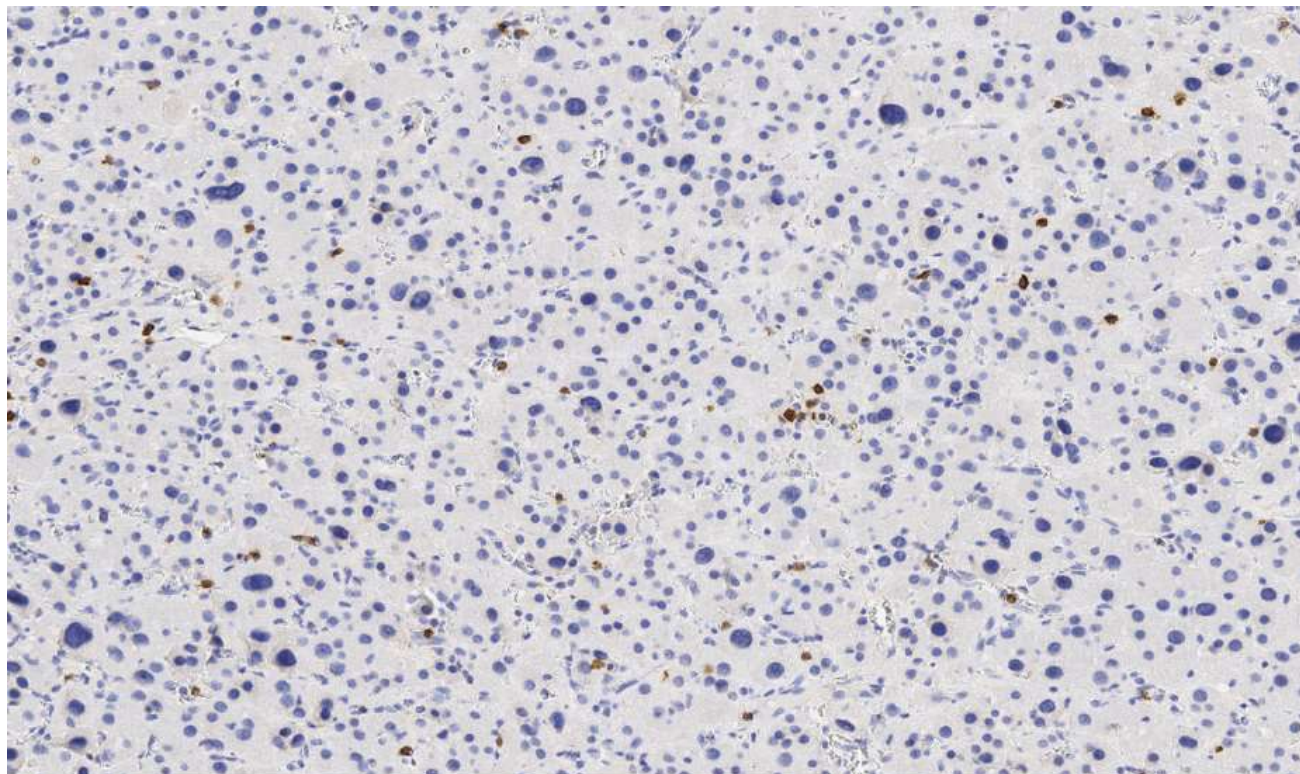


Рисунок 5.37 – Онкоцитарный вариант аденокортикального рака,
иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD8 в паренхиме
опухоли (увеличение x100)

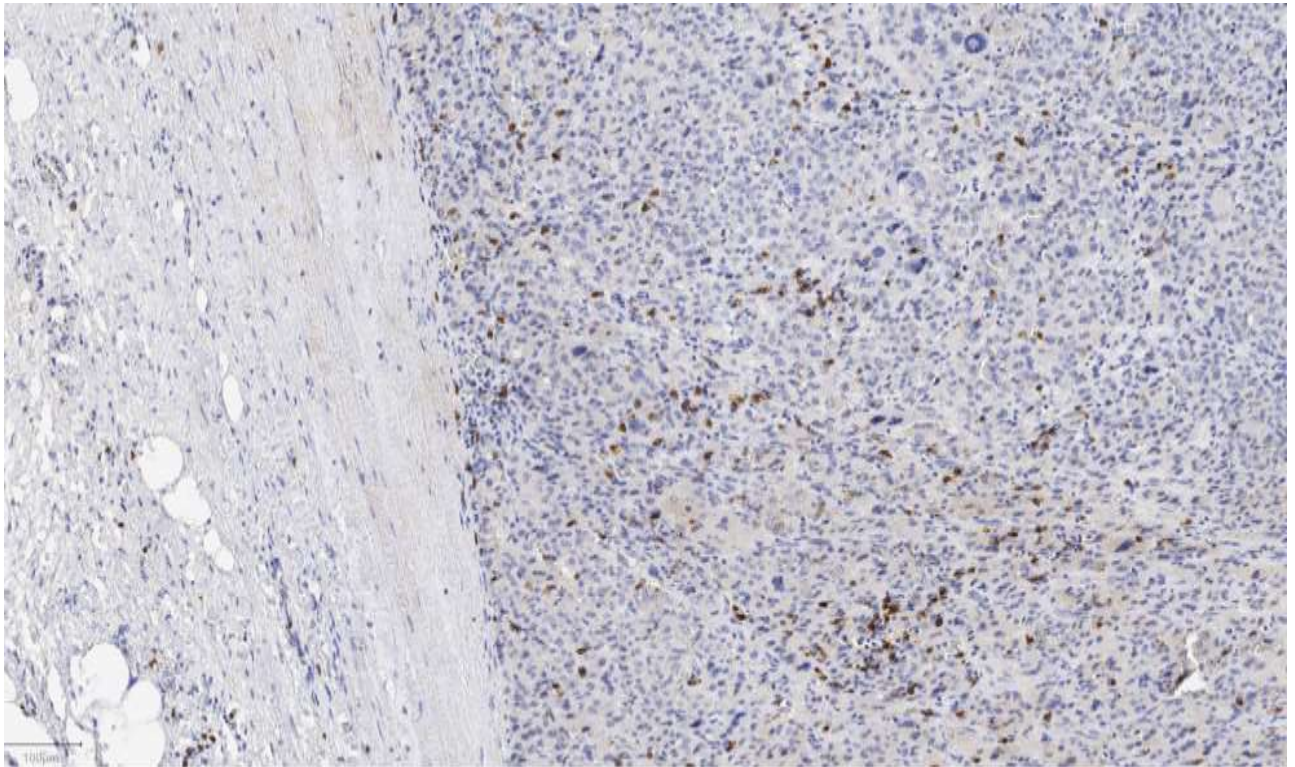


Рисунок 5.38 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD8 в строме опухоли (увеличение x100)

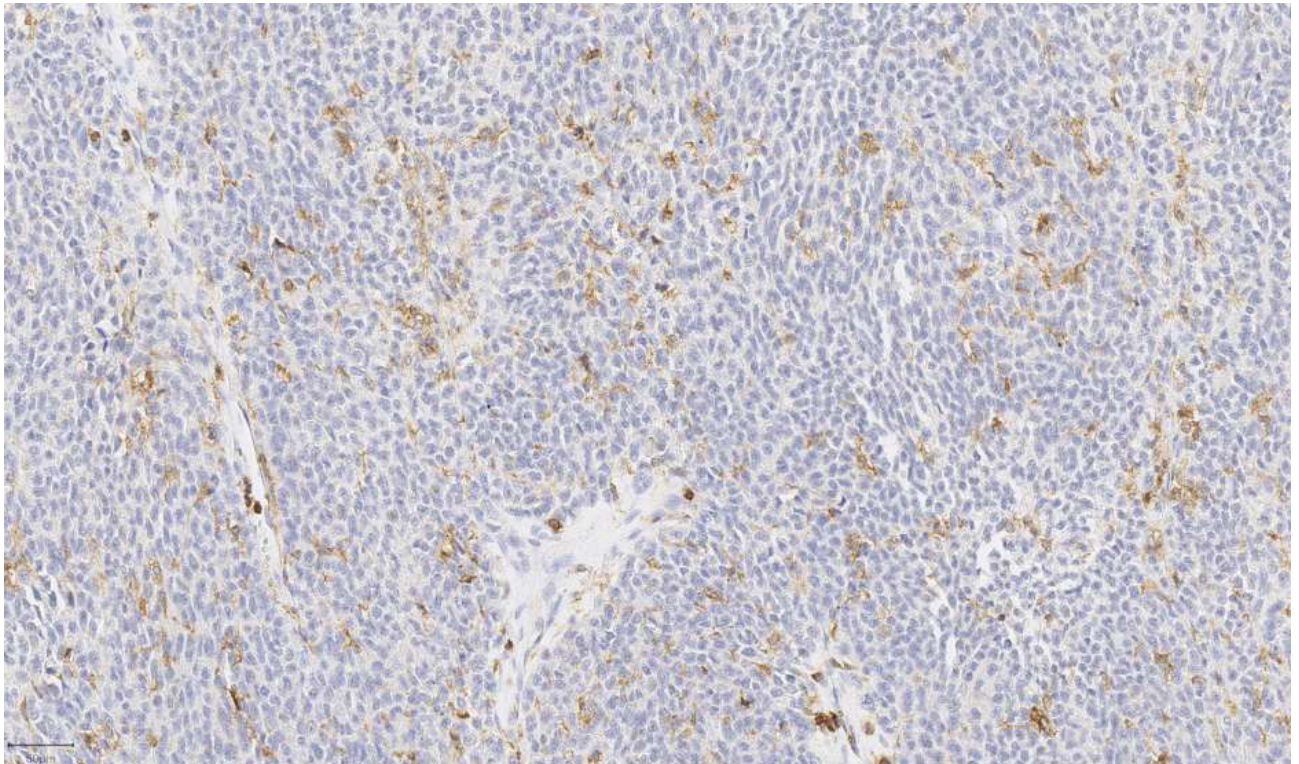


Рисунок 5.39 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD45 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

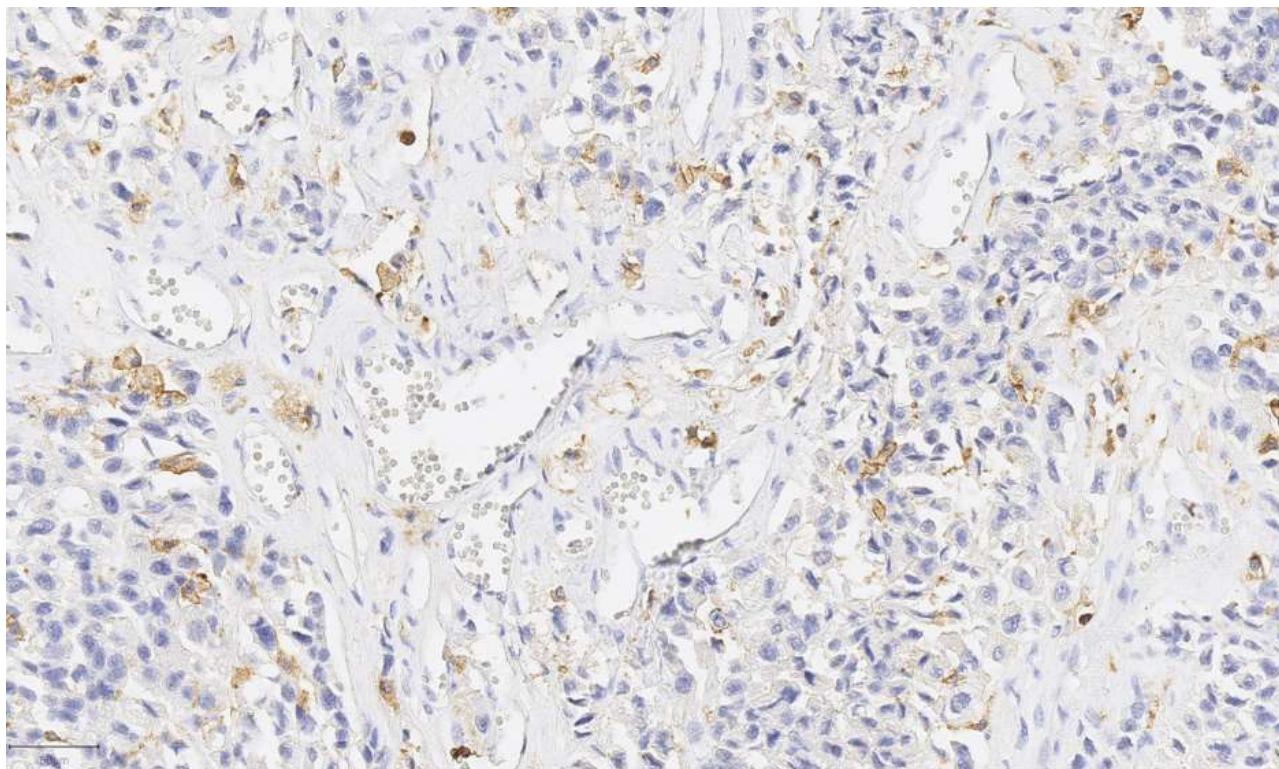


Рисунок 5.40 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD45 в строме опухоли (увеличение x100)

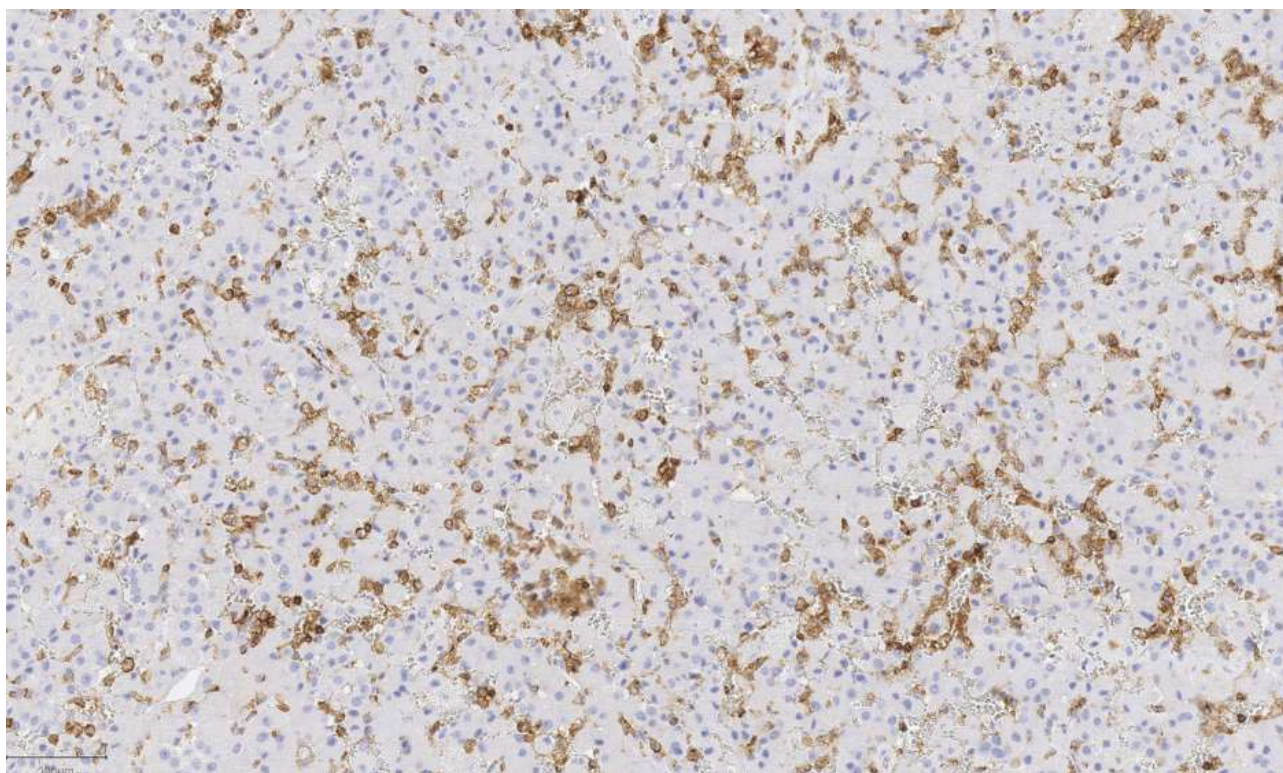


Рисунок 5.41 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD45 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

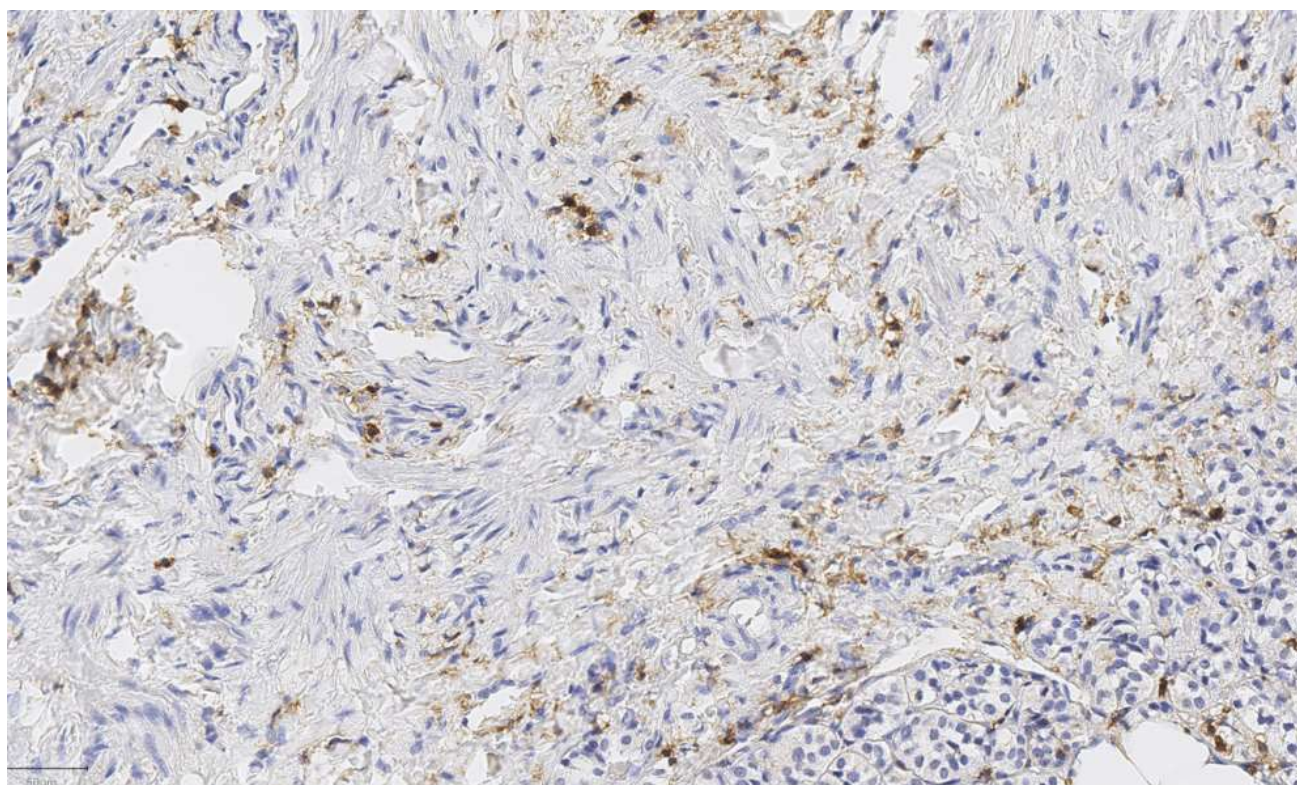


Рисунок 5.42 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD45 в строме опухоли (увеличение x100)

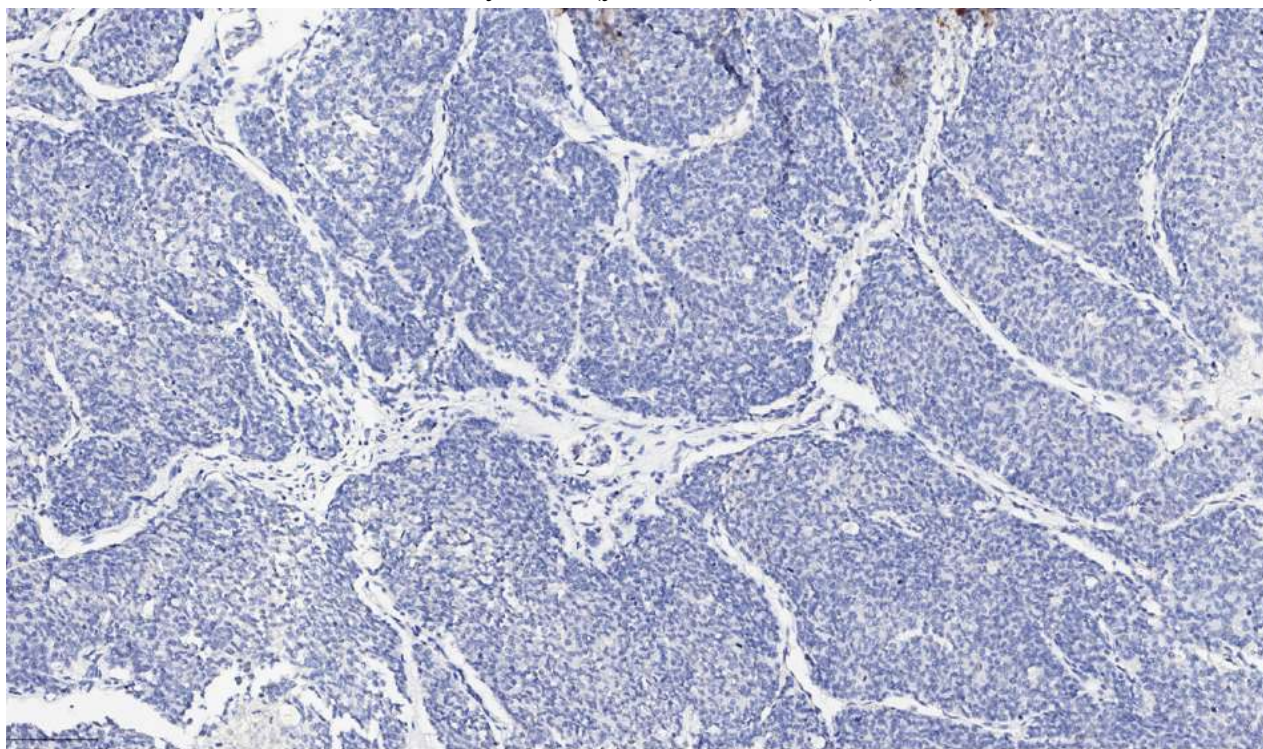


Рисунок 5.43 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

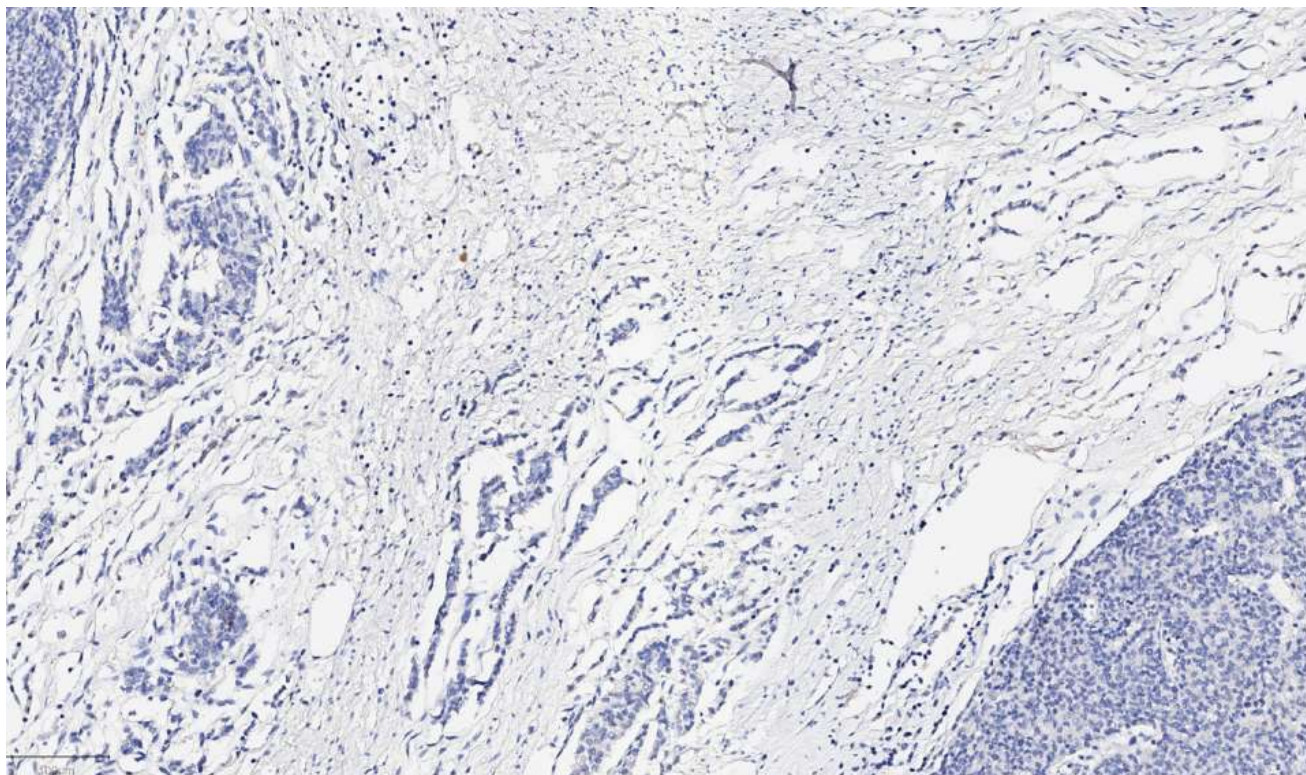


Рисунок 5.44 – Классический вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 в строме опухоли (увеличение x100)

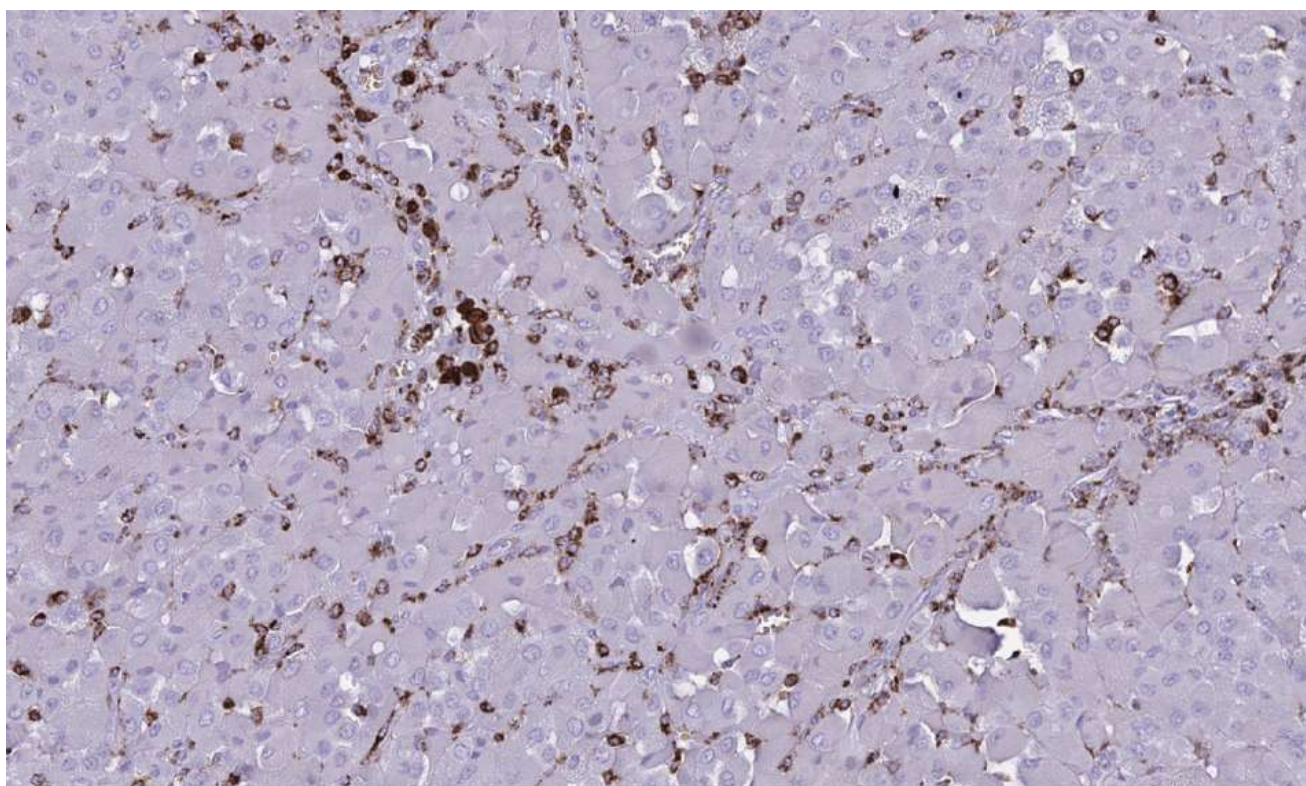


Рисунок 5.45 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 в паренхиме опухоли (увеличение x100)

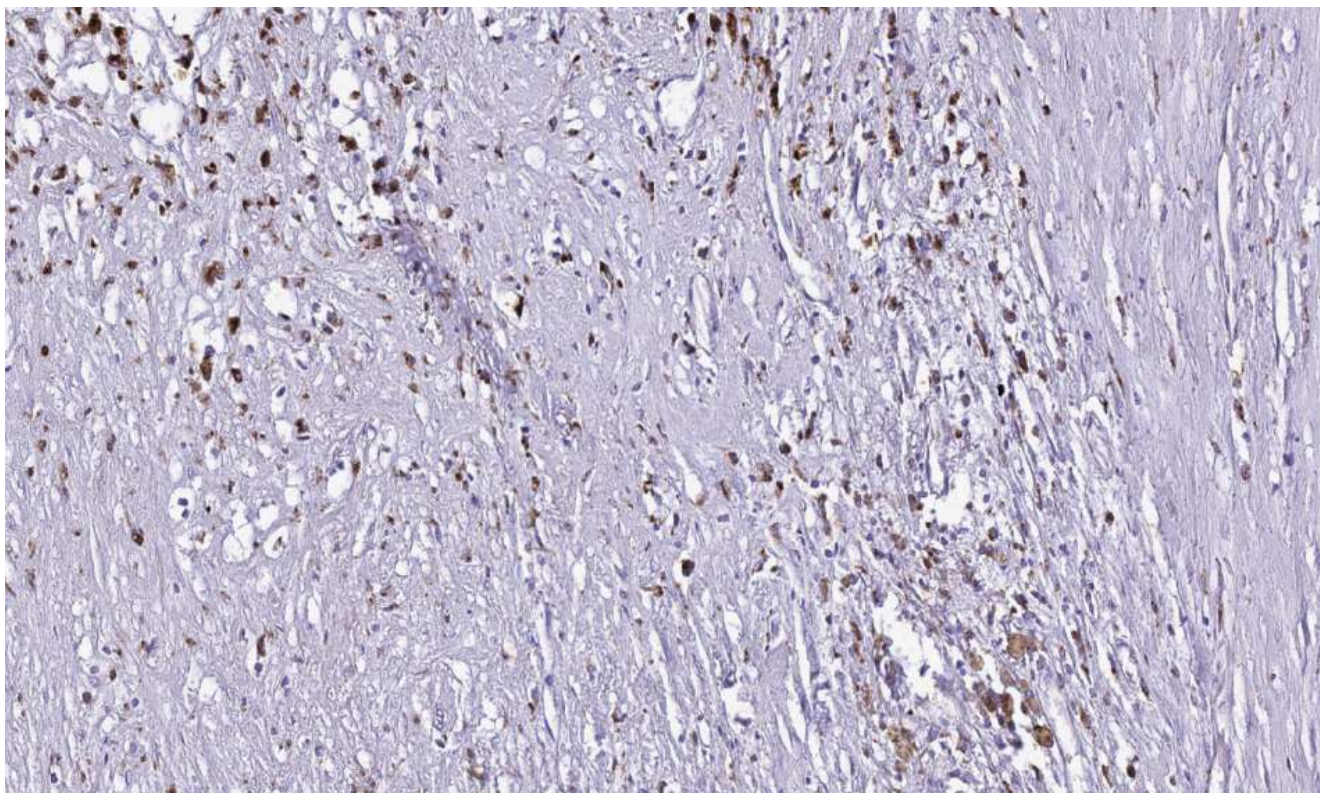


Рисунок 5.46 – Онкоцитарный вариант адренокортикального рака, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 в строме опухоли (увеличение x100)

В соответствии с Таблицей 5.17 количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме и строме опухолей было относительно низким (176 и 225 клеток/мм², соответственно), тогда как в паренхиме онкоцитарного варианта АКР значения этих показателей были выше по сравнению с классическим вариантом опухоли.

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, результаты представлены на

Рисунке 5.47. Как видно, в паренхиме АКР величина этого показателя была значительно выше, чем в строме.

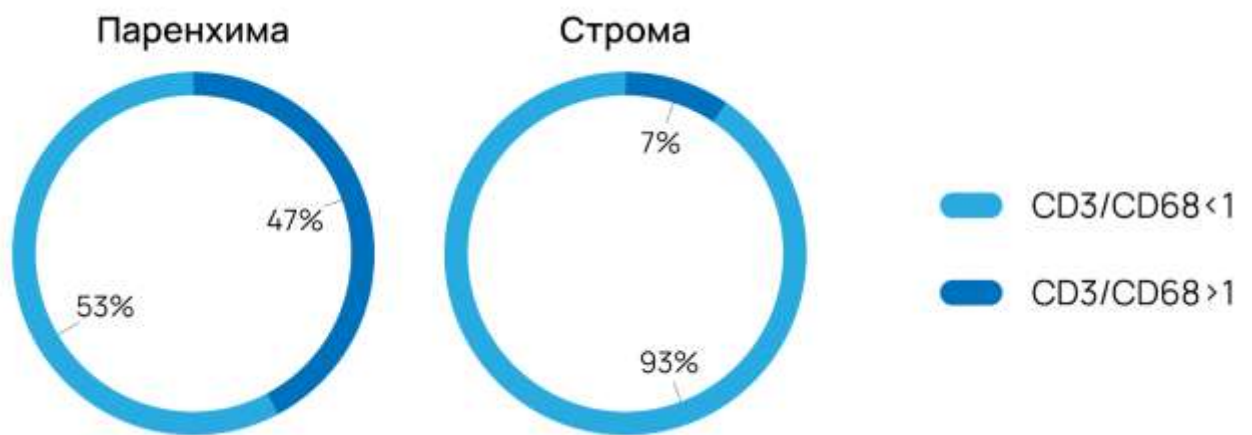


Рисунок 5.47 – Различия в соотношении CD3/CD68 между стромой и паренхимой образцов опухолей АКР

При сравнении выживаемости пациентов данных подгрупп обнаружена тенденция к лучшей выживаемости пациентов со значением этого соотношения >1 , однако выявленные различия не достигали статистической значимости (Рисунок 5.48-5.49).

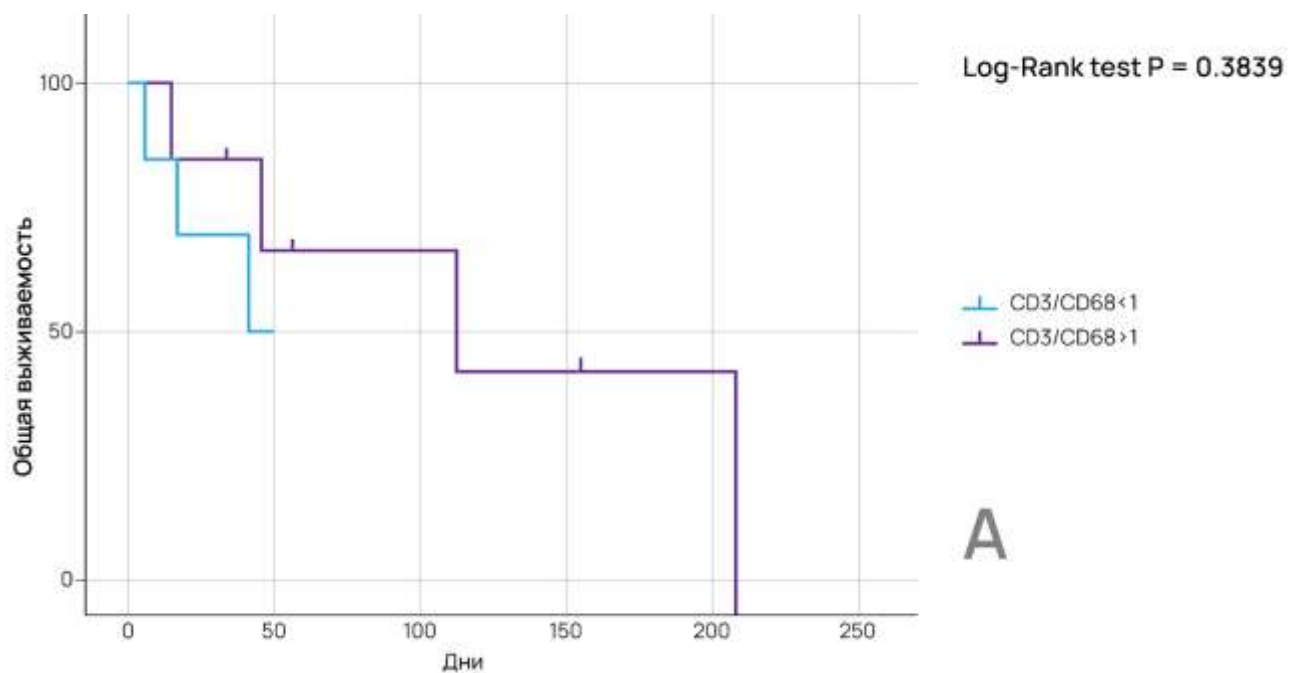


Рисунок 5.48 – Общая выживаемость пациентов с АКР с различным соотношением CD3/CD68 в паренхиме опухоли

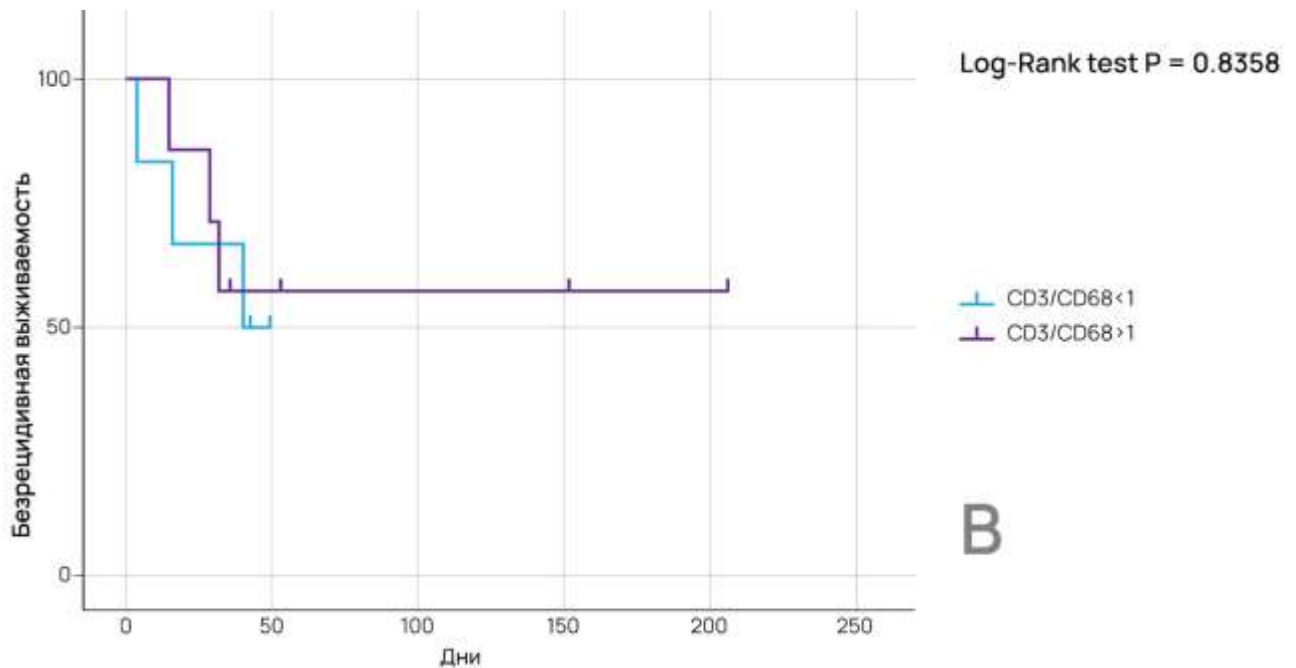


Рисунок 5.49 – Безрецидивная выживаемость пациентов с АКР с различным соотношением CD3/CD68 в паренхиме опухоли

Дальнейший анализ интенсивности иммунного инфильтрата АКР был выполнен в когорте TCGA с использованием данных о наличии опухолеинфильтрирующих иммунных клеток, полученных в результате секвенирования РНК.

В соответствии с алгоритмом Bagaev A. et al. (2021), опухоли из когорты TCGA были разделены на четыре кластера: (1) обогащенный иммунными клетками, фиброзный (immune enriched, fibrotic; IE/F), (2) обогащенный иммунными клетками, нефиброзный (IE), (3) фиброзный (F) и (4) обедненный иммунными клетками (immune depleted; D). На Рисунке 5.50 представлено распределение опухолей когорты TCGA на различные иммунофенотипы в соответствии с вышеуказанным алгоритмом.



Рисунок 5.50 – Распределение опухолей когорты TCGA по иммунофенотипам в соответствии с алгоритмом Bagaev A. et al. (2021): D – обедненный иммунными клетками (immune depleted), F – фиброзный (fibrotic), IE – обогащенный иммунными клетками, нефиброзный (immune enriched), IE/F – обогащенный иммунными клетками, фиброзный (immune enriched, fibrotic)

Примечательно, что в распределении фенотипов между обсуждаемыми вариантами АКР наблюдались различия: в классическом подтипе опухоли преобладали случаи с фенотипом, обедненным иммунными клетками, в то время как в онкоцитарном варианте обнаруживалась противоположная тенденция, а именно, в 43% случаев выявлялся фенотип, обогащенный иммунными клетками.

Когорта TCGA также может быть разделена на кластеры C1b и C1a, первый из которых с низким содержанием стероидов /обогатенный иммунными клетками, второй - с высоким содержанием стероидов, согласно алгоритму Zheng S. et al. (2016). На Рисунке 5.51 показаны различия в распределении двух кластеров между обсуждаемыми морфологическими

вариантами, при этом в онкоцитарном варианте АКР преобладает фенотип, обогащенный иммунными клетками.

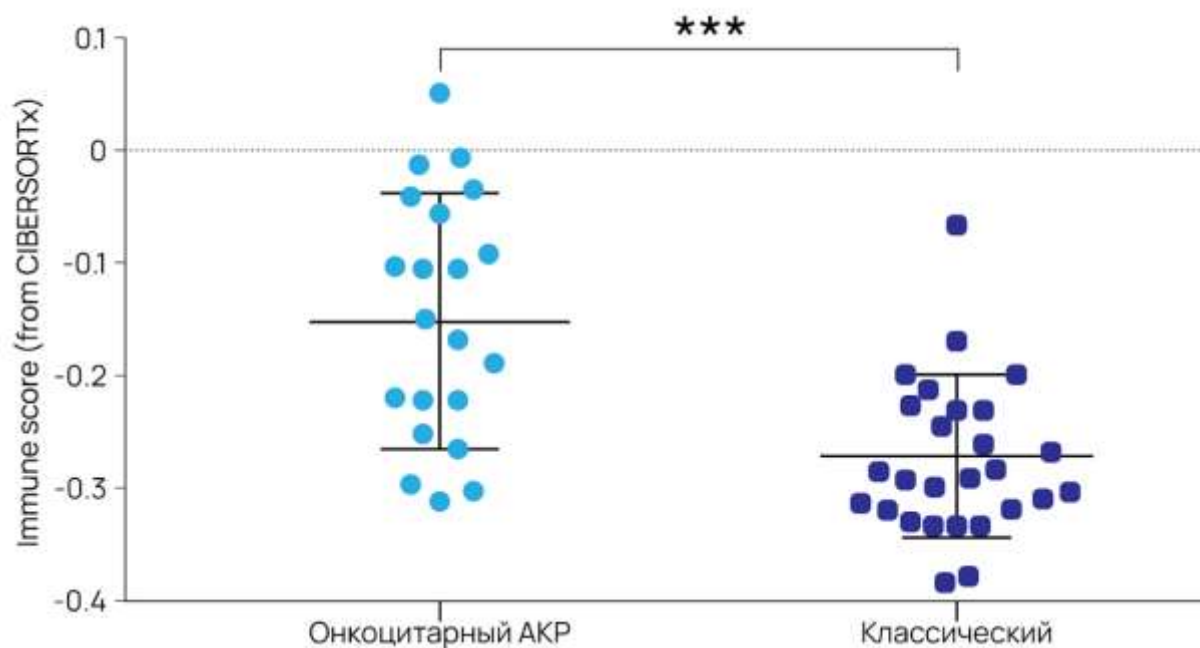


Рисунок 5.51 – Распределение опухолей когорты TCGA по фенотипам в соответствии с алгоритмом Zheng S. et al. (2016): C1a – с высоким содержанием стероидов, C1b – с низким содержанием стероидов/обогащенный иммунными клетками

На Рисунке 5.52 представлены результаты дополнительного анализа интенсивности иммунной инфильтрации в обсуждаемых вариантах АКР с использованием параметра Immune score из алгоритма CIBERSORT

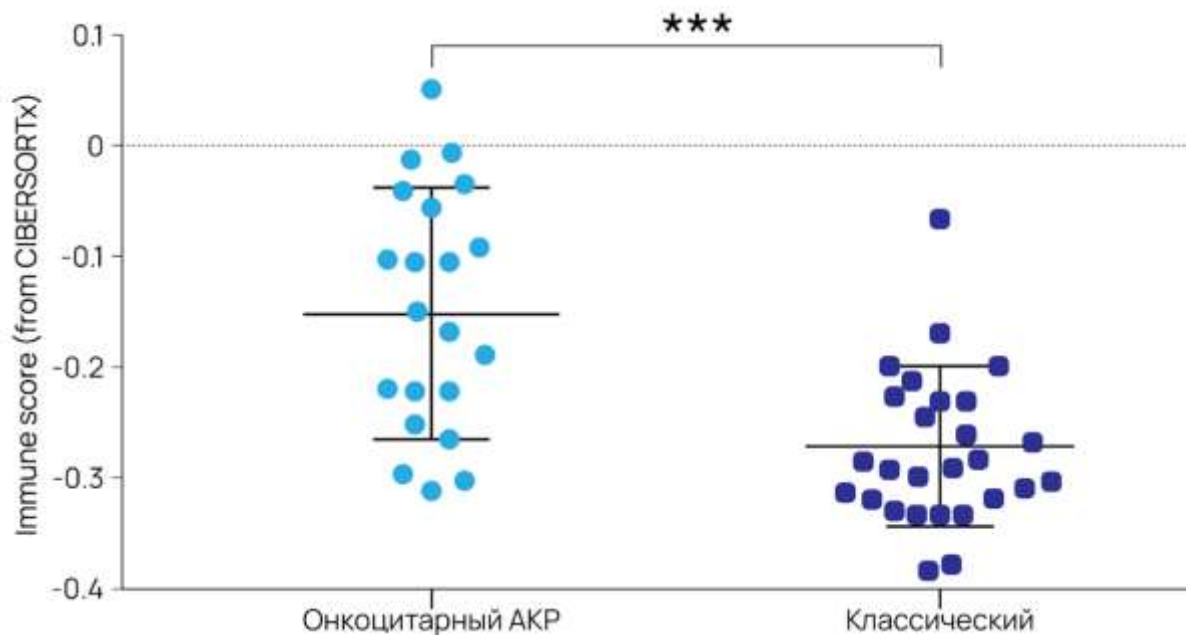


Рисунок 5.52 – Параметр Immune score когорты TCGA, определенный на основании алгоритма CIBERSORTx (** $p=0.0002$)

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

Таким образом, в настоящей работе впервые выполнен анализ иммунного инфильтрата в различных гистологических подтипах обсуждаемого заболевания на основании случаев из базы данных The Cancer Genome Atlas и группы пациентов НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ. Обнаружено, что онкоцитарный морфологический вариант опухоли характеризуется более высокими показателями иммунной инфильтрации по сравнению с классическим вариантом АКР, что ассоциируется с лучшей выживаемостью пациентов с онкоцитарным гистологическим подтипом. Соответственно, для более детального анализа роли различных субпопуляций опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток в прогрессировании АКР крайне важно оценивать показатели иммунной инфильтрации отдельно для каждого гистологического варианта.

Итак, на данном этапе в анализ были включены 2 когорты пациентов с АКР: пациенты из базы данных The Cancer Genome Atlas (TCGA) (n=54) и пациенты, получавшие лечение в НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ (n=21). В результате анализа выживаемости выявлены статистически значимые различия между классическим и онкоцитарным подтипами АКР в обеих когортах пациентов. В соответствии с результатами иммуногистохимического исследования маркеров различных типов иммунных клеток в когорте НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме и строме опухолей было относительно низким (176 и 225 клеток/мм², соответственно), однако количество иммунных клеток анализируемых популяций в паренхиме онкоцитарного варианта было больше по сравнению с классическим. CD3+ Т-лимфоциты были обильно представлены в паренхиме и строме опухолей классического и онкоцитарного вариантов АКР, CD68+ макрофаги также были обнаружены во всех образцах, однако их количество было выше в опухолях онкоцитарного варианта по сравнению с классическим.

Все изученные случаи опухоли были разделены на 2 группы на основании отношения количества CD3+ Т-лимфоцитов к CD68+ моноцитам/макрофагам в паренхиме опухоли. При сравнении выживаемости пациентов данных подгрупп обнаружена тенденция к лучшей выживаемости пациентов величиной этого соотношения более 1, однако выявленные различия не были статистически значимыми.

Дальнейший анализ интенсивности иммунного инфильтрата проводили в когорте TCGA с использованием данных о наличии опухолеинфильтрирующих иммунных клеток, полученных в результате секвенирования РНК. В соответствии с алгоритмом Vagaev A. et al. (2021) опухоли из когорты TCGA были разделены на четыре кластера: (1) обогащенный иммунными клетками, фиброзный (immune enriched, fibrotic; IE/F), (2) обогащенный иммунными клетками, нефиброзный (IE), (3) фиброзный (F) и (4) обедненный иммунными клетками (immune depleted; D).

В распределении фенотипов обсуждаемых вариантов АКР наблюдались следующие различия: в классическом подтипе преобладали случаи с фенотипом, обедненным иммунными клетками, в то время как в онкоцитарном варианте опухоли обнаруживалась противоположная тенденция: в 43% случаев выявлялся фенотип, обогащенный иммунными клетками.

Когорта TCGA также была разделена на кластеры C1b и C1a, первый - с низким содержанием стероидов/обогащенный иммунными клетками, второй - с высоким содержанием стероидов [Zheng S. et al., 2016]. Установлено, что обогащенный иммунными клетками фенотип преобладал в онкоцитарном варианте. Результаты дополнительного анализа интенсивности иммунной инфильтрации в обсуждаемых вариантах АКР с использованием параметра Immune score из алгоритма CIBERSORTx также подтверждают, что ткань онкоцитарного варианта опухоли значительно сильнее инфильтрирована иммунными клетками по сравнению с классическим подтипом АКР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адренокортикальная карцинома – редкое злокачественное новообразование, возникающее в 0,5–2 случаев на 1 млн. населения [Fassnacht M. et al., 2020]. Особенности локализации, изменений гормональной дисрегуляции и склонности к агрессивному росту лечение АКР представляет собой мультидисциплинарную задачу, участвовать в решении которой должны разные специалисты: эндокринологи, хирурги, онкологи, иммунологи, патофизиологи, патологоанатомы.

Прогноз для пациентов с прогрессирующей опухолью несмотря на современные методы лечения АКР остается неоднозначным. Почти у 60% пациентов диагностируется гормонально активная опухоль, что ассоциировано с менее благоприятным прогнозом заболевания [LaFemina J., Brennan M.F., 2012]. Проведение химиотерапии по протоколу FIRM-АСТ является стандартной терапией согласно клиническим рекомендациям. При этом также возможно применение других методов, например, таргетной терапии, методы которой потенциально эффективны в лечении АКР. Тем не менее, сегодня отмечается острая необходимость разработки новых терапевтических стратегий и организации клинических исследований новых лекарственных средств на основе сведений о биохимических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических особенностях профиля АКР.

В связи с вышеизложенным **целью настоящего исследования** явилось повышение эффективности лечения адренокортикального рака на основании данных комплексного анализа клинико-anamнестических, морфологических, иммуногистохимических характеристик опухоли и определения потенциальных мишеней таргетной фармакотерапии.

Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала 73 пациентов с новообразованиями надпочечников, которым выполнялась адреналэктомия в 2005 -2020 гг. Средний возраст

обследованных больных составлял $46,8 \pm 1,7$ лет, при этом для пациентов в возрасте 51-60 лет составила 31,5%, при этом соотношение количества больных старше и младше 50 лет было примерно одинаковым (50,7% и 49,3%, соответственно). Гормональные нарушения были диагностированы у 26 пациентов (35,6%), включенных в исследование. С максимальной частотой (28,8%) у 21 пациента нашей когорты был диагностирован гиперкортицизм, смешанная функциональная активность АКР была выявлена у 3 человек (4,1%), отмечено по одному случаю гиперандрогении (1,4%) и гиперальдостеронизма (1,4%). Чаще всего была диагностирована II стадия АКР по системе ENSAT - у 32 больных (43,8%), у 26 больных (35,6%) была диагностирована III стадия заболевания, первая стадия опухоли - у 12,3% обследованных ($n=9$), четвертая - у 6 (8,2%) пациентов.

Изучение гистологических особенностей различных морфологических вариантов заболевания показало, что АКР представляет собой гетерогенное заболевание: большинство обследованных (67,1%, $n=49$) имели классический морфологический вариант АКР опухоли. Онкоцитарный тип был выявлен у каждого пятого пациента (20,5%) и у 9 больных (12,3%) документирован миксоидный тип опухоли. У пациентов с классическим типом АКР инвазия опухоли в синусоиды наблюдалась достоверно чаще ($p = 0,03$) по сравнению с больными с онкоцитарным типом (20,0%). У пациентов с классическим типом АКР и с миксоидным АКР количество патологических митозов было достоверно выше ($p < 0,0001$), чем у больных с онкоцитарным типом. У пациентов с классическим типом АКР некрозы выявлялись статистически значимо чаще ($p = 0,0073$), чем у пациентов с онкоцитарным и миксоидным типом опухоли.

Был проведен анализ иммуногистохимических характеристик морфологических вариантов АКР. Установлено, что иммуногистохимическая панель маркеров, включающая SF-1, Melan A, Inhibin A, позволяет со 100%-ной чувствительностью подтвердить корковый гистогенез опухоли надпочечника. При для миксоидного варианта АКР характерно было

статистически значимое снижение уровня экспрессии Inhibin, онкоцитарный подтип характеризуется диффузным иммуногистохимическим окрашиванием эозинофильной гранулярной цитоплазмы с АМА. Обнаружены достоверные различия индекса пролиферативной активности Ki-67 в зависимости от исследуемых морфологических вариантов АКР.

Установлено, что значение показателя пролиферативной активности у пациентов с классическим вариантом опухоли составляет 20%, при онкоцитарном варианте АКР – 10%, при миксоидном варианте – 15%. По данным ряда авторов, экспрессия p53 наблюдается при АКР в 15 - 60% случаев. Полученные данные свидетельствуют, что обнаружение иммунореактивности данного маркера подтверждает злокачественный характер исследуемой опухоли надпочечника [Brenna C.T.A. et al., 2021; Manso J., Pezzani R., 2019]. В нашем исследовании экспрессия p53 наблюдалась в 18,6% случаев (n=14), хотя достоверных отличий значений этого показателя у больных с разными морфологическими вариантами опухоли отмечено не было.

Во всех проанализированных образцах доминирующей популяцией были клетки с адренокортикальным типом дифференцировки. Количество перицитов было меньше в образцах опухолевой ткани, что свидетельствовало об агрессивном характере развития опухоли и об ограничении роста нормальных клеток кровеносных сосудов. Эндотелий, гладкомышечные клетки стенки крупных сосудов, VSMC, макрофаги и лимфоидные клетки Т/NK-ряда также были представлены во всех исследованных опухолевых и условно здоровых тканях надпочечников. В то же время в опухолевых тканях АКР не выявлялись нейроэктодермальные клетки, составляющие мозговое вещество нормального надпочечника (хромаффинные клетки и прекурсоры Шванновских клеток SCP).

Таким образом, результаты исследования свидетельствовали о тенденции к более высокой «чистоте» опухолевых суспензий в отношении содержания клеток с адренокортикальным типом дифференцировки по

сравнению с условно здоровой тканью надпочечника, что соответствовало общепризнанной особенности АКР, при котором чаще всего отмечается диффузный характер роста с минимальным количеством стромального компонента.

Изучение транскрипционных профилей нормальных и опухолевых адренокортикальных клеток надпочечника свидетельствовало о наличии ряда отличий. 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.

Анализ CNV единичных клеток показал, что рецидивная опухоль АКР имела значительное число амплификаций, на фоне полного отсутствия делеций.

В рамках изучения факторов прогноза АКР была оценена общая и безрецидивная выживаемость пациентов с различными морфологическими вариантами АКР. Медиана БРВ в исследуемой когорте составила 32,0 мес., у пациентов с классическим вариантом опухоли – 23,0 мес., с миксоидным – 13,0 мес. Установлено, что 5-летняя БРВ была максимальной у пациентов с

онкоцитарным вариантом АКР и составляла 66,8%, у больных с классическим вариантом данный показатель был на уровне 33,3%, с миксоидным – 29,9%. Выявлено, что 5-летняя ОВ у обследованных с онкоцитарным вариантом достигла 100% и сохранялась на таком уровне в течение 17,5 лет наблюдения, у больных с классическим типом - 55,9%, с миксоидным – 75,0%.

Выявлено, что факторами, достоверно влияющими на уровень БРВ у обследованных пациентов, являются: классический морфологический вариант АКР ($W=5,44$ при $p=0,02$); избыточная секреция альдостерона ($W=7,22$ при $p=0,07$); митотическая активность ($W=20,5$, $p<0,001$), наличие атипических митозов ($W=8,0$, $p=0,005$), значение индекса Ki-67 ($W=8,0$, $p=0,005$). Установлено, что увеличение величины Ki-67 на 1% соответствовало повышению риска развития рецидива заболевания на 3,2%, увеличение значения маркера PNH3 на 1,0 соответствовало повышению риска рецидива АКР в 1,1 раза.

Установлено, что к факторами, статистически значимо влияющим на уровень общей выживаемости больных АКР, являются: стадия заболевания по классификации ENSAT ($\chi^2=19,4$, $p<0,001$), при этом выживаемость пациентов с IV стадией опухоли имели достоверно меньшую ОВ по сравнению с соответствующими показателями больных с другими стадиями опухоли ($p = 0,002$, $p < 0,001$, $p = 0,011$ для I, II, III стадий соответственно). Также к значимым факторам, влияющим на ОВ у больных АКР следует отнести митотическую активность ($W=20,8$, $p<0,001$), так как установлено, что увеличение значения PNH3 на 1,0 соответствовало повышению риска летального исхода в 1,1 раза; индекс Ki-67 ($W=8,0$, $p<0,001$), при этом каждое увеличение данного показателя на 1% соответствовало повышению риска летального исхода на 5,8%; морфологический вариант опухоли – классический тип АКР был ассоциирован с более высоким риском смерти, по сравнению с онкоцитарным ($\chi^2=7,8$; $p=0,05$).

На следующей этапе работы в анализ были включены 2 когорты пациентов с АКР: пациенты из базы данных The Cancer Genome Atlas (TCGA)

(n=54) и пациенты, получавшие лечение в НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ (n=21). В результате анализа выживаемости выявлены статистически значимые различия между классическим и онкоцитарным подтипами АКР в обеих когортах пациентов. В соответствии с результатам иммуногистохимического исследования маркеров различных типов иммунных клеток в когорте НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме и строме опухолей было относительно низким (176 и 225 клеток/мм², соответственно), однако количество иммунных клеток анализируемых популяций в паренхиме онкоцитарного варианта было больше по сравнению с классическим. CD3+ Т-лимфоциты были обильно представлены в паренхиме и строме опухолей классического и онкоцитарного вариантов АКР, CD68+ макрофаги также были обнаружены во всех образцах, однако их количество было выше в опухолях онкоцитарного варианта по сравнению с классическим.

Все изученные случаи опухоли были разделены на 2 группы на основании отношения количества CD3+ Т-лимфоцитов к CD68+ моноцитам/макрофагам в паренхиме опухоли. При сравнении выживаемости пациентов данных подгрупп обнаружена тенденция к лучшей выживаемости пациентов величиной этого соотношения более 1, однако выявленные различия не были статистически значимыми.

Дальнейший анализ интенсивности иммунного инфильтрата проводили в когорте TCGA с использованием данных о наличии опухоле-инфильтрирующих иммунных клеток, полученных в результате секвенирования РНК. В соответствии с алгоритмом Vargaev A. et al. (2021) опухоли из когорты TCGA были разделены на четыре кластера: (1) обогащенный иммунными клетками, фиброзный (immune enriched, fibrotic; IE/F), (2) обогащенный иммунными клетками, нефиброзный (IE), (3) фиброзный (F) и (4) обедненный иммунными клетками (immune depleted; D). В распределении фенотипов обсуждаемых вариантов АКР наблюдались следующие различия: в классическом подтипе преобладали случаи с

фенотипом, обедненным иммунными клетками, в то время как в онкоцитарном варианте опухоли обнаруживалась противоположная тенденция: в 43% случаев выявлялся фенотип, обогащенный иммунными клетками.

Когорта TCGA также была разделена на кластеры C1b и C1a, первый - с низким содержанием стероидов/обогащенный иммунными клетками, второй - с высоким содержанием стероидов [Zheng S. et al., 2016]. Установлено, что обогащенный иммунными клетками фенотип преобладал в онкоцитарном варианте. Результаты дополнительного анализа интенсивности иммунной инфильтрации в обсуждаемых вариантах АКР с использованием параметра Immune score из алгоритма CIBERSORTx также подтверждают, что ткань онкоцитарного варианта опухоли значительно сильнее инфильтрирована иммунными клетками по сравнению с классическим подтипом АКР.

Количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме и строме опухолей было относительно низким (176 и 225 клеток/мм², соответственно), однако количество иммунных клеток анализируемых популяций в паренхиме онкоцитарного варианта было больше по сравнению с классическим, что ассоциировалось с лучшей выживаемостью у пациентов с онкоцитарным гистологическим подтипом. CD3+ Т-лимфоциты были обильно представлены в паренхиме и строме опухолей классического и онкоцитарного вариантов, тогда как в миксоидном варианте их количество было значительно ниже. CD68+ макрофаги также были обнаружены во всех образцах, однако их количество было выше в опухолях онкоцитарного варианта по сравнению с классическим. При сравнении выживаемости этих групп мы обнаружили тенденцию к лучшей выживаемости пациентов с CD3+/CD68+ >1, однако различия не являются статистически значимыми.

Таким образом, в настоящей работе впервые выполнен анализ иммунного инфильтрата в различных гистологических подтипах обсуждаемого заболевания на основании случаев из базы данных The Cancer Genome Atlas и группы пациентов НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ. Обнаружено, что онкоцитарный морфологический вариант опухоли имеет

характеризуется более высокими показателями иммунной инфильтрации по сравнению с классическим вариантом АКР, что ассоциируется с лучшей выживаемостью пациентов с онкоцитарным гистологическим подтипом. Соответственно, для более детального анализа роли различных субпопуляций опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток в прогрессировании АКР крайне важно оценивать показатели иммунной инфильтрации отдельно для каждого гистологического варианта.

Заключительный этап работы был посвящен поиску иммуногистохимических предикторов эффективности лечения рассматриваемого заболевания. Был проведен анализ данных 62 пациентов с АКР: 40 (64,5%) женщин и 22 (36,5%) мужчин. Пациенты были отнесены к группе высокого риска рецидива/прогрессирования АКР в соответствии со значением индекса Ki-67 равным 10% и более по результатам иммуногистохимического исследования, им было назначено лечение с использованием митотана.

Были проанализированы уровни экспрессии иммуногистохимических маркеров RRM1, CYP2W1 и SOAT1 в АКР в качестве потенциальных предикторов ответа на проводимое лечение. Установлено, что снижение уровня БРВ в группе пациентов, получающих митотан, при первоначальном анализе без учета профиля экспрессии RRM1, SOAT1, CYP2W1, было, предположительно, обусловлено назначением противоопухолевой терапии пациентам с более тяжелым течением заболевания, в том числе с более продвинутой стадией заболевания по классификации ENSAT, а не отрицательным влиянием применения митотана на величину БРВ.

Анализ уровней БРВ с учетом профиля экспрессии вышеуказанных маркеров показал, что низкая и умеренная экспрессия RRM1, SOAT1 и CYP2W1 в опухоли при отсутствии противоопухолевой терапии с использованием митотана ассоциировалась с более высоким уровнем БРВ по сравнению с пациентами, получающими лечение митотаном. Несмотря на то, что при высокой иммунореактивности RRM1, SOAT1 и CYP2W1 в обеих

группах пациентов не было выявлено статически значимых различий БРВ, кривые их выживаемости были сходными.

Можно предполагать два возможных объяснения данной ситуации. Во-первых, применение митотана может способствовать увеличению БРВ пациентов с высоким уровнем экспрессии обсуждаемых маркеров. То есть у пациентов с низким уровнем экспрессии применение митотана является недостаточно эффективным, в связи с чем значение БРВ соответствует ее уровню во всей выборке пациентов. При этом пациенты с высоким уровнем экспрессии лучше отвечают на лечение, что позволяет «нейтрализовать» негативное влияние на выживаемость других неблагоприятных факторов у пациентов основной группы, величина их БРВ приближается к таковой в группе сравнения. Следовательно, назначение митотана пациентам с теоретически менее благоприятным течением заболевания при высокой экспрессии маркеров приближает уровень БРВ к таковому у пациентов с более благоприятным течением болезни, у которых также отмечается высокая экспрессия этого маркера.

Во-вторых, применение митотана может не оказывать влияния на величину БРВ. Возможно, что митотан в обеих сравниваемых группах не влияет на уровень БРВ: пациенты контрольной группы с низкой экспрессией обсуждаемых маркеров значительно отличаются по набору определенных характеристик от пациентов основной группы, поэтому их БРВ выше. В то же время у пациентов с высокой экспрессией RRM1, SOAT1, CYP2W1 имеет место ряд других характеристик, играющих роль факторов, значимо увеличивающих риск развития рецидива, что приближает их к пациентам основной группы, значения БРВ в обеих группах практически не различаются.

Была выполнена проверка гипотезы о различиях уровней БРВ в зависимости от проведения или не проведения терапии митотаном при разных уровнях экспрессии обсуждаемых маркеров с поправкой на стадию по классификации ENSAT. Предполагается, что митотан не вызывает снижения БРВ в подгруппе с низкой экспрессией этих маркеров. Обнаружено, что при

поправке на стадию заболевания по классификации ENSAT назначение митотана статистически значимо снижает уровень БРВ в трех прогностически благоприятных группах только при СУР 1-2, в остальных случаях статистически значимых различий уже не наблюдается. Во всех трех группах с высокой экспрессией обсуждаемых маркеров при введении поправки на стадию ENSAT обнаруживается, что применение митотана оказывает благоприятный эффект на БРВ (значение ExpV менее 1). Вместе с тем, статическая значимость различий при этом также не достигается, поэтому можно отметить только наличие тенденции увеличению БРВ.

Следует отметить, что полученные результаты не свидетельствуют однозначно о негативном влиянии применения митотана на БРВ пациентов с АКР. По результатам исследования выявлены тенденции взаимосвязи экспрессии потенциальных прогностических маркеров и уровня БРВ этих больных. Следует принимать во внимание, что выборочная совокупность и объем полученных в настоящем исследовании данных ограничены орфанным характером исследуемого заболевания. Изучение непосредственного влияния митотана на выживаемость больных АКР требует увеличения объема выборки пациентов и проведения дальнейших более углубленных исследований, результаты которых позволили бы выработать рекомендации по персонализированному ведению пациентов с АКР. Для повышения клинической значимости результатов такого рода исследований необходимо сравнение выживаемости внутри каждой подгруппы с различным набором прогностических характеристик.

В настоящее время не существует единого гистологического критерия, позволяющего определить опухоли коры надпочечника со злокачественным клиническим течением. Из всей совокупности предложенных диагностических алгоритмов ни один из них не является достаточно чувствительным или специфичным для всех клинических ситуаций. Так, система Weiss, которая до настоящего времени считалась стандартной, не может считаться универсальной. Все это значительно усложняет

диагностический процесс, так как для идентификации специфических гистологических вариантов опухоли требуются дополнительные алгоритмы. Диагностическую ценность шкалы Weiss также снижает проблема субъективности и сложности в интерпретации некоторых из критериев. Такие критерии, как ядерная атипия, митотический индекс, наличие атипичных митозов, оценка цитоплазмы являются наиболее объективными. Неравнозначная диагностическая ценность, субъективизм оценки и интерпретации некоторых критериев Weiss обуславливают существование серой зоны, когда достоверно оценить злокачественный потенциал опухоли не представляется возможным. Известно, что адренокортикальные опухоли, набирающие 2-3 балла по шкале Weiss, могут иметь как доброкачественное, так и злокачественное клиническое течение.

В ходе выполнения исследования нами был разработан алгоритм диагностики, который включает определение комплекса восьми диагностически значимых показателей: размера опухоли (см), массы опухоли (г), индекса пролиферативной активности Ki-67 (%), наличия/отсутствия митозов, ядерного полиморфизма, патологических митозов, инвазии в капсулу, некрозов. Разработанная система представляет диагностически значимый комплекс показателей, учитывающий меньшее количество критериев из используемой в настоящее время шкалы Weiss. Данный диагностический алгоритм является высокоточным (общая точность 100% (95% ДИ: 96%-100%). Его главным преимуществом является универсальность применения для всех морфологических вариантов АКР у взрослых пациентов, что отличает данный способ от известных решений. Данный подход применим в обычных условиях лабораторий патоморфологии медицинских учреждений, т.е., не требует каких-либо показателей, которые не оцениваются при рутинном исследовании гистологического материала.

Следует отметить, что выявлено 3 ложноположительных результата (отнесение к АКР), однако данные 3 пациента имели диагноз «ОНЗП», а не подтвержденный АКА. Считать это ошибкой диагностики неверно, так как

указанная группа пациентов требует динамического мониторинга с целью определения их окончательного диагноза. В одном из этих трех случаев был выявлен локорегионарный рецидив, что подтверждает предполагаемое злокачественное течение заболевания в соответствии с реклассификацией по новой системе. Таким образом, в отношении пациентов с верифицированным гистологическим диагнозом разработанная математическая модель показала 100% точность на обучающей и тестовой выборке. На основании полученных результатов нами был предложен алгоритм морфологической диагностики пациентов с АКР (Схема 1).

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 11-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 миксоидным 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 аденокортикальным раком ($p=0,02$, $p=0,001$, $p=0,037$, соответственно).

8. Количество CD45⁺ иммунных клеток в паренхиме и строме аденокортикальной карциномы является относительно низким (176 и 225 клеток/мм², соответственно), значения этих показателей в паренхиме онкоцитарного подтипа превышают таковые в ткани классического подтипа аденокортикального рака. 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 аденокортикального рака.

9. При анализе вариаций копий генов (CNV) клетки классического подтипа аденокортикального рака 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 аденокортикального рака.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При разработке индивидуальной программы лечения пациентов с аденокортикальным раком следует учитывать факторы, влияющие на общую выживаемость пациентов с аденокортикальным раком (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 аденокортикального рака (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 аденокортикального рака отличается снижением экспрессии Inhibin A, онкоцитарный подтип характеризуется диффузным иммуногистохимическим окрашиванием эозинофильной гранулярной цитоплазмы с антимиохондриальными антителами.

3. При проведении дифференциальной диагностики аденокортикального рака 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 СОКРАЩЕНИЙ

АКА - аденокортикальная аденома

АКР - аденокортикальный рак

АКТГ - аденокортикотропный гормон

БРВ - безрецидивная выживаемость

ГА - гормональная активность

ДС - диагностическая специфичность

ДИ - доверительный интервал

ДМСО - диметилсульфоксид

ДЧ - диагностическая чувствительность

ЗНО - злокачественное новообразование

ИГХ - иммуногистохимическое (исследование)

ИФА - иммуноферментный анализ

ЛС - лекарственное средство

ЛУ - лимфатические узлы

МРТ - резонансная томография

МСКТ - мультиспиральная компьютерная томография

ОВ - общая выживаемость

ОНПЗ - опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом

ОШ - отношение шансов

ПЦОР - прогностическая ценность отрицательного результата

ПЦПР - прогностическая ценность положительного результата

ПЭТ - позитронная эмиссионная томография

ПЭТ-18FDG - позитронная эмиссионная томография

с 18-фтордезоксиглюкозой

РЛ - рак легкого

УЗИ - ультразвуковое исследование

ЭМТ - эпителиально-мезенхимальная трансформация

АСМЕ - метод уксусно-метанольной диссоциации/фиксации

Ad4BP - связывающий протеин

CNV – вариации числа копий

Ig - иммуноглобулин

IGF-2 - инсулиноподобный фактор роста-2

miRNA - микроРНК

РННЗ - фосфогистон H3

RRMA - рибонуклеотидредуктаза M1

SF-1 - стероидогенный фактор 1

SOAT1 - фермент стерол-О-ацилтрансфераза-1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абоян И.А., Березин К.В., Пакус С.М. Робот-ассистированная адреналэктомия и лимфодиссекция у пациентов с аденокортикальным раком // Уральский медицинский журнал. — 2019. — № 1 (169). — С. 85-88.
2. Абоян И.А., Березин К.В., Хасигов А.В. и др. ПЭТ-КТ в диагностике и дифференциальной диагностике аденокортикального рака // Онкоурология. — 2019. — Т. 15, № 4. — С. 113-119.
3. Бастрич А.Н., Петрова Д.А., Алексеев Б.Я. и др. Живая трехмерная модель аденокортикального рака для персонифицированной медицины и тестирования новых препаратов и методов терапии // Гены и Клетки. — 2022. — Т. 17, № 3. — С. 24-25.
4. Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммунотерапия опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов») // Медицинская иммунология. — 2015. — Т. 17, № 5. — С. 395-406.
5. Боян В.Ю., Павловская А.И., Губина Г.И., Стилиди И.С. Клиническая оценка гистологических систем диагностики аденокортикальных опухолей // Архив пат. - 2015. - № 77(3). - С.17–22.
6. Бритвин Т.А., Кривошеев А.В. Отдаленные результаты хирургического лечения аденокортикального рака // Альманах клинической медицины. — 2016. — Т. 44, № 5. — С. 631-634.
7. Бяхова М.М., Воронкова И.А., Кривошеев А.В. Молекулярно-генетические характеристики аденокортикального рака // РМЖ. — 2017. — Т. 25, № 22. — С. 1651-1653.
8. Долгушин М.Б., Мартинович А.А., Мещерякова Н.А., Тулин П.Е. Возможности ПЭТ/КТ с ¹⁸F-ФДГ в диагностике гормонально неактивного аденокортикального рака: клиническое наблюдение // Эндокринная хирургия. — 2018. — Т. 12, № 4. — С. 196-201.

9. Жуликов Я.А., Коваленко Е.И., Бохян В.Ю. и др. Эффективность химиотерапии по схеме EDP±митотан в лечении метастатического адренокортикального рака. предиктивные и прогностические факторы эффективности // Злокачественные опухоли. — 2021. — Т. 11, № 1. — С. 37-46.
10. Жуликов Я.А., Коваленко Е.И., Бохян В.Ю., Артамонова Е.В. Современные опции и перспективы системной терапии местнораспространенного и метастатического адренокортикального рака // Злокачественные опухоли. — 2021. — Т. 11, № 3. — С. 36-44.
11. Карасева Л.Р., Привалова Л.П. Врожденный адренокортикальный рак // Российский журнал детской гематологии и онкологии. — 2019. — Т. 6, № 1. — С. 95-96.
12. Клецкая И.С., Рогожин Д.В., Коновалов Д.М. и др. Особенности морфологической диагностики и определение злокачественного потенциала адренокортикальных опухолей у детей // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2018. — Т. 17, № 3. — С. 111-119.
13. Коломейцева А.А., Делекторская В.В., Орел Н.Ф. и др. Рецепторы соматостатина как потенциальная терапевтическая мишень в лечении распространенного адренокортикального рака. Клинический случай // Сибирский онкологический журнал. - 2018. - № 17(2). - С.111-117.
14. Кривошеев А.В., Бритвин Т.А., Белошицкий М.Е. Лапароскопическая адреналэктомия в хирургическом лечении адренокортикального рака // Вестник Российской Военно-медицинской академии. — 2019. — № 1. — С. 75-78.
15. Мельниченко Г.А., Стилиди И.С., Алексеев Б.Я. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению адренокортикального рака // Проблемы эндокринологии. — 2014. — Т. 60 (2). — С. 2.
16. Меретуков Д.А., Глущенко А.А., Каитова З.С., Журилов Н.В. Правовые проблемы лечения редких заболеваний в Российской Федерации на

примере аденокортикального рака // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. — 2017. — Т. 19, № 3. — С. 75-77.

17. Нуднов Н.В., Черниченко Н.В., Мурзин Я.Ю. и др. Метастатическое поражение легких при аденокортикальном раке (редкое наблюдение) // Медицинская визуализация. — 2018. — Т. 22, № 6. — С. 33-39.

18. Пачуашвили Н.В., Порубаева Э.Э., Урусова Л.С. Поиск новых мишеней для терапии аденокортикального рака // Вопросы онкологии. — 2022. — Т. 68, № 3. — С. 159-160.

19. Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., Ткачук А.В., Урусова Л.С. Прогностическое значение клинико-патологических маркеров аденокортикального рака // Вопросы онкологии. — 2022. — Т. 68, № 3. — С. 120.

20. Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., Урусова Л.С. и др. Мультифакторная оценка прогностических особенностей аденокортикального рака // Архив патологии. — 2022. — Т. 84, № 5. — С. 20–27.

21. Порубаева Э.Э., Пачуашвили Н.В., Урусова Л.С. Мультифакторная оценка прогностических особенностей аденокортикального рака // Архив патологии. — 2022. — Т. 84, № 5. — С. — 20-27.

22. Русаков В.Ф., Щербаков И.Е., Чинчук И.К. и др. Диагностическая значимость компьютерной томографии в комплексном обследовании больных с аденокортикальным раком // Проблемы эндокринологии. — 2022. — Т. 68, № 4. — С. 13-29.

23. Тёмный А.С., Казанцев А.П. Влияние молекулярно-генетических факторов на прогноз локализованного и местно-распространенного аденокортикального рака у детей // Российский журнал детской гематологии и онкологии. — 2022. — Т. 9, № 2. — С. 39-45.

24. Тёмный А.С., Казанцев А.П., Керимов П.А. и др. Результаты хирургического лечения локализованного и местно-распространенного

адренокортикального рака у детей // Российский журнал детской гематологии и онкологии. — 2021. — Т. 8, № 2. — С. 42-49.

25. Тёмный А.С., Казанцев А.П., Керимов П.А. и др. Роль хирургического лечения при IV стадии адренокортикального рака // Российский журнал детской гематологии и онкологии. — 2021. — Т. 8, № 4. — С. 31-38.

26. Ткачук А.В., Бельцевич Д.Г., Порубаева Э.Э., Урсова Л.С. Иммуногистохимическая экспрессия маркеров RRM1, CYP2W1, SOAT1 как фактор, определяющий чувствительность адренокортикального рака к терапии митотаном // Вопросы онкологии. — 2022. — Т. 68, № 3. — С. 129-130.

27. Ткачук А.В., Бельцевич Д.Г., Порубаева Э.Э., Урсова Л.С. Морфологические предикторы эффективности терапии митотаном при адренокортикальном раке // Проблемы эндокринологии. — 2022. — Т. 68, № 6. — С. 76-88.

28. Ткачук А.В., Тертычный А.С., Бельцевич Д.Г. и др. Адренокортикальный рак: морфологические варианты, иммуногистохимическая характеристика // Архив патологии. — 2021. — Т. 83, № 2. — С. 10-18.

29. Abdel-Rahman O. Impact of postoperative radiotherapy on the outcomes of resected adrenocortical carcinoma-a real-world, population-based study // Strahlenther Onkol. — 2022. — Vol. 198 (1). — P. 73-79.

30. Abdel-Rahman O. Revisiting the AJCC staging system of adrenocortical carcinoma // J. Endocrinol. Invest. — 2022. — Vol. 45 (1). — P. 89-94.

31. Ahmed A.A., Elmohr M.M., Fuentes D. et al. Radiomic mapping model for prediction of Ki-67 expression in adrenocortical carcinoma // Clin. Radiol. — 2020. — Vol. 75 (6). — P. 17-22.

32. Ahmed A.A., Thomas A.J., Ganeshan D.M. et al. Adrenal cortical carcinoma: pathology, genomics, prognosis, imaging features, and mimics with

impact on management // *Abdom Radiol* (NY). — 2020. — Vol. 45 (4). — P. 945-963.

33. Allegra S., Puglisi S., Brescia I. et al. Sex differences on mitotane concentration and treatment outcome in patients with adrenocortical carcinoma // *Life* (Basel).- 2021. - Vol.11. -P.266-269.

34. Alshabi A.M., Vastrad B., Shaikh I.A., Vastrad C. Identification of important invasion and proliferation related genes in adrenocortical carcinoma // *Med. Oncol.* — 2019. — Vol. 36 (9). — P. 73.

35. Altieri B., Ronchi C.L., Kroiss M. et al. Nextgeneration therapies for adrenocortical carcinoma // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* - 2020. - Vol. 34.- P.101434.

36. Altieri B., Lalli E., Faggiano A. Mitotane treatment in adrenocortical carcinoma: mechanisms of action and predictive markers of response to therapy // *Minerva Endocrinol.* (Torino). — 2022. — Vol. 47 (2). — P. 203-214.

37. Alyateem G., Nilubol N. Current Status and Future Targeted Therapy in Adrenocortical Cancer // *Front Endocrinol.* (Lausanne). — 2021. — Vol. 12. — 613248.

38. Araújo A.N., Bugalho M.J. Advanced Adrenocortical Carcinoma: Current Perspectives on Medical Treatment // *Horm. Metab. Res.* — 2021. — Vol. 53 (5). — P. 285-292.

39. Araujo-Castro M., Pascual-Corrales E., MolinaCerrillo J. et al. Immunotherapy in adrenocortical carcinoma: predictors of response, efficacy, safety, and mechanisms of resistance // *Biomedicines.* - 2021. - Vol. 9. - P. 304.

40. Ardicli B., User I.R., Ciftci A.O. et al. Adrenocortical tumours in children: a review of surgical management at a tertiary care centre // *ANZ J. Surg.* — 2021. — Vol. 91 (5). — P. 992-999.

41. Ardolino L., Hansen A., Ackland S., Joshua A. Advanced Adrenocortical Carcinoma (ACC): a Review with Focus on Second-Line Therapies // *Horm. Cancer.* — 2020. — Vol. 11 (3-4). — P. 155-169.

42. Armignacco R., Cantini G., Canu L. et al. Adrenocortical carcinoma: the dawn of a new era of genomic and molecular biology analysis // *J. Endocrinol. Invest.* — 2018. — Vol. 41 (5). — P. 499-507.
43. Asari R., Koperek O., Niederle B. Endoscopic adrenalectomy in large adrenal tumors // *Surgery.* - 2012. - Vol.152.- P. 41–49.
44. Assié G., Letouzé E., Fassnacht M. et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma // *Nat. Genet. Nature Publishing Group*, 2014. — Vol. 46 (6). — P. 607–612.
45. Assié G., Jouinot A., Fassnacht M. et al. Value of Molecular Classification for Prognostic Assessment of Adrenocortical Carcinoma // *JAMA Oncol.* — 2019. — Vol. 5 (10). — P. 1440–1447.
46. Aubert S., Wacrenier A., Leroy X. et al. Weiss system revisited: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors // *Am. J. Surg. Pathol.* — 2002. — Vol. 26 (12). — P. 1612–1619.
47. Baechle J.J., Hanna D.N., Sekhar K.R. et al. Integrative computational immunogenomic profiling of cortisol-secreting adrenocortical carcinoma // *J. Cell. Mol. Med.* — 2021. — Vol. 25 (21). — P. 10061-10072.
48. Baechle J.J., Hanna D.N., Sekhar K.R. et al. Multiplatform computational analysis of mast cells in adrenocortical carcinoma tumor microenvironment // *Surgery.* — 2022. — Vol. 171 (1). — P. 111-118.
49. Bagaev A., Kotlov N., Nomie K. et al. Conserved pan-cancer microenvironment subtypes predict response to immunotherapy // *Cancer Cell.* - 2021. - Vol.39(6). - P.845-865.
50. Barreau O., Assié G., Wilmot-Roussel H. et al. Identification of a CpG island methylator phenotype in adrenocortical carcinomas // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2013. — Vol. 98 (1). — P. 174–184.
51. Bellantone R., Ferrante A., Boscherini M. et al. Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma // *Surgery.* - 1997. - Vol.122(6). - P.1212-1218.

52. Berruti A., Baudin E., Gelderblom H. et al. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann. Oncol.* - 2012. - Vol.23(Suppl. 7). - P.131–138.
53. Bertherat J., Bertagna X. Pathogenesis of adrenocortical cancer // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* - 2009. - Vol. 23. - P.261–271.
54. Beuschlein F., Weigel J., Saeger W. et al. Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2015. — Vol. 100 (3). — P. 841–849.
55. Bisceglia M., Ludovico O., Di Mattia A. et al. Adrenocortical oncocytic tumors: Report of 10 cases and review of the literature // *Int. J. Surg. Pathol.* — 2004. — Vol. 12 (3). — P. 231–243.
56. Bluemel C., Hahner S., Heinze B. et al. Investigating the chemokine receptor 4 as potential theranostic target in adrenocortical cancer patients // *Clin Nucl Med.* - 2017. - Vol.42. - P.29–34.
57. Bogolyubova A.V., Pachuashvili N.V., Tkachuk A.V. et al. Interplay between Immune Cell Infiltration and Tumor Histological Subtype: A Case of Adrenocortical Cancer // *Cancers (Basel)*. — 2022. — Vol. 14 (21). — P. 5303.
58. Boland G.W., Dwamena B.A., Jagtiani Sangwaiya M. et al. Characterization of adrenal masses by using FDG PET: A systematic review and meta-analysis of diagnostic test performance // *Radiology*. — 2011. — Vol. 259 (1). — P. 117–126.
59. Bondy S., Tajzler C., Hotte S.J. et al. Genomic and Clinical Correlates of Adrenocortical Carcinoma in an Adult Patient with Li-Fraumeni Syndrome: A Case Report // *Curr. Oncol.* — 2020. — Vol. 28 (1). — P. 226-232.
60. Brabo E.P., Moraes A.B., Neto L.V. The role of immune checkpoint inhibitor therapy in advanced adrenocortical carcinoma revisited: review of literature // *J. Endocrinol. Invest.* — 2020. — Vol. 43 (11). — P. 1531-1542.
61. Brenna C.T.A., Michaeli O., Wasserman J.D., Malkin D. Clinical Outcomes of Children With Adrenocortical Carcinoma in the Context of Germline TP53 Status // *J. Pediatr Hematol. Oncol.* — 2021. — Vol. 43 (5). — P. 635-641.

62. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours* (8th edition). — Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2017. — 274 p.
63. Brondani V.B., Fragoso M.C.B.V. Pediatric adrenocortical tumor — review and management update // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* — 2020. — Vol. 27 (3). — P. 177-186.
64. Brondani V.B., Lacombe A.M.F., Mariani B.M.P. et al. Low Protein Expression of both ATRX and ZNR3 as Novel Negative Prognostic Markers of Adult Adrenocortical Carcinoma // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — Vol. 22 (3). — P. 1238.
65. Brönimann S., Garstka N., Remzi M. Treatment of adrenocortical carcinoma: oncological and endocrine outcomes // *Curr. Opin. Urol.* — 2023. — Vol. 33 (1). — P. 50-58.
66. Bronswijk M.J.H., Laenen A., Bechter O.E. Clinical presentation, treatment modalities and outcome in patients with adrenocortical carcinoma: A single center experience // *Neoplasma.* — 2020. — Vol. 67 (1). — P. 209-213.
67. Buishand F.O., Liu-Chittenden Y., Fan Y. et al. Adrenocortical tumors have a distinct, long, non-coding RNA expression profile and LINC00271 is downregulated in malignancy // *Surgery.* — 2020. — Vol. 167 (1). — P. 224-232.
68. Buishand F.O., Liu-Chittenden Y., Fan, Y. et al. Adrenocortical tumors have a distinct, long, non-coding RNA expression profile and LINC00271 is downregulated in malignancy // *Physiol. Behav.* — 2019. — Vol. 176 (3). — P. 139–148.
69. Buller D.M., Hennessey A.M., Ristau B.T. Open versus minimally invasive surgery for suspected adrenocortical carcinoma // *Transl Androl Urol.* - 2020. - Vol.10. - P.2246–2263.
70. Burotto M., Tajeja N., Rosenberg A. et al. Brain metastasis in patients with adrenocortical carcinoma: a clinical series // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2015. - Vol.100. - P.331–336.

71. Calabrese A., Basile V., Puglisi S. et al. Adjuvant mitotane therapy is beneficial in non-metastatic adrenocortical carcinoma at high risk of recurrence // *Eur J Endocrinol.* - 2019. - Vol. 180. - P.387–396.
72. Carneiro B.A., Konda B., Costa R.B. et al. Nivolumab in metastatic adrenocortical carcinoma: results of a phase 2 trial // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2019. - Vol.104. - P. 6193–6200.
73. Casey R.T., Giger O., Seetho I. et al. Rapid disease progression in a patient with mismatch repairdeficient and cortisol secreting adrenocortical carcinoma treated with pembrolizumab // *Semin Oncol.* - 2018. - Vol. 45. - P. 151–155.
74. Castellanos J.R., Purvis I.J., Labak C.M. et al. B7-H3 role in the immune landscape of cancer // *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* — 2017. — Vol. 6 (4). — P. 66–75.
75. Chabre O., Libé R., Assie G. et al. Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients // *Endocr. Relat. Cancer.* — 2013. — Vol. — 20 (4). — P. 579–594.
76. Chandrasekar T., Goldberg H., Klaassen Z. et al. The who, when, and why of primary adrenal malignancies: Insights into the epidemiology of a rare clinical entity // *Cancer.* — 2019. — Vol. 125 (7). — P. 1050–1059.
77. Chang A., Harawi S.J. Oncocytes, oncocytosis, and oncocytic tumors // *Pathol. Annu.* - 1992. - Vol. 27. - P. 263—304.
78. Chaudhury A., Chander P., Howe P.H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles // *Rna.* — 2010. — Vol. 16 (8). — P. 1449–1462.
79. Chen Q., Ren Z., Liu D. et al. Identification of prognostic metabolic genes in adrenocortical carcinoma and establishment of a prognostic nomogram: A bioinformatic study // *Medicine (Baltimore).* — 2021. — Vol. 100 (50). — e27864.
80. Cheng Y., Kou W., Zhu D. et al. Future Directions in Diagnosis, Prognosis and Disease Monitoring of Adrenocortical Carcinoma: Novel Non-

Invasive Biomarkers // Front Endocrinol. (Lausanne). — 2022. — Vol. 12. — 811293.

81. Chifu I., Heinze B., Fuss C.T. et al. Impact of the Chemokine Receptors CXCR4 and CXCR7 on Clinical Outcome in Adrenocortical Carcinoma // Front Endocrinol. (Lausanne). — 2020. — Vol. 11. — 597878.

82. Clay M.R., Pinto E.M., Fishbein L. et al. Pathological and Genetic Stratification for Management of Adrenocortical Carcinoma // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2022. — Vol. 107 (4). — P. 1159-1169.

83. Creemers S.G., Hofland L.J., Korpershoek E. et al. Future directions in the diagnosis and medical treatment of adrenocortical carcinoma // Endocr. Relat. Cancer. — 2016. — Vol. 23 (1). — P. 43–69.

84. Crona J., Beuschlein F. Adrenocortical carcinoma — towards genomics guided clinical care // Nat. Rev. Endocrinol. — 2019. — Vol. 15 (9). — P. 548-560.

85. Darabi S., Braxton D.R., Eisenberg B.L. et al. Molecular genomic profiling of adrenocortical cancers in clinical practice // Surgery. - 2021. - Vol.169. - P. 138–144.

86. Davis-Marcisak E.F., Deshpande A., Stein-O'Brien G.L. et al. From bench to bedside: Single-cell analysis for cancer immunotherapy // Cancer Cell. Elsevier Inc. - 2021. — Vol. 39 (8). — P. 1062–1080.

87. De Filpo G., Mannelli M., Canu L. Adrenocortical carcinoma: current treatment options // Curr. Opin. Oncol. — 2021. — Vol. 33 (1). — P. 16-22.

88. Decker R.A., Elson P., Hogan T.F. et al. Eastern Cooperative Oncology Group study 1879: mitotane and adriamycin in patients with advanced adrenocortical carcinoma // Surgery. - 1991. - Vol.110. - P. 1006–1013.

89. Delman A.M., Turner K.M., Griffith A. et al. Minimally Invasive Surgery for Resectable Adrenocortical Carcinoma: A Nationwide Analysis // J. Surg. Res. — 2022. — Vol. 279. — P. 200-207.

90. De Martino M.C., van Koetsveld P.M., Feelders R.A. et al. IGF and mTOR pathway expression and in vitro effects of linsitinib and mTOR inhibitors in adrenocortical cancer // Endocrine. - 2019. - Vol. 64. - P. 673–684.

91. De Martino M.C., Feelders R.A., Pivonello C. et al. The role of mTOR pathway as target for treatment in adrenocortical cancer // *Endocr. Connect.* - 2019. - Vol. 8. - P.144–156.
92. de Reyniès A., Assié G., Rickman D.S. et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27 (7). — P. 1108–1115.
93. Doghman M., Karpova T., Rodrigues G.A. et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer // *Mol. Endocrinol.* — 2007. — Vol. 21 (12). — P. 2968–2987.
94. Doghman M., Figueiredo B.C., Volante M. et al. Integrative analysis of SF-1 transcription factor dosage impact on genome-wide binding and gene expression regulation // *Nucleic Acids Res.* — 2013. — Vol. 41 (19). — P. 8896–8907.
95. Duregon E., Fassina A., Volante M. et al. The Reticulin Algorithm for Adrenocortical Tumor Diagnosis // *Am. J. Surg. Pathol.* — 2013. — Vol. 37 (9). — P. 1433–1440.
96. Duregon E., Volante M., Giorcelli J. et al. Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates // *Hum Pathol.* - 2013. - Vol.44.- P. 822–828.
97. Duregon E., Molinaro L., Volante M. et al. Comparative diagnostic and prognostic performances of the hematoxylin-eosin and phospho-histone H3 mitotic count and Ki-67 index in adrenocortical carcinoma // *Mod. Pathol.* Nature Publishing Group. — 2014. — Vol. 27 (9). — P. 1246–1254.
98. Duregon E., Rapa I., Votta A. et al. MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations // *Hum. Pathol.* Elsevier B.V., 2014. — Vol. 45 (8). — P. 1555–1562.

99. Duregon E., Volante M., Rapa I. et al. Dissecting morphological and molecular heterogeneity in adrenocortical carcinoma // *Turk Patoloji Derg.* — 2015. — Vol. 31. — P. 98–104.
100. Duregon E., Cappellesso R., Maffeis V. et al. Validation of the prognostic role of the “Helsinki Score” in 225 cases of adrenocortical carcinoma // *Hum. Pathol.* Elsevier B.V. — 2017. — Vol. 62. — P. 1–7.
101. Erickson L.A. Challenges in surgical pathology of adrenocortical tumours // *Histopathology.* — 2018. — Vol. 72 (1). — P. 82–96.
102. Faron M., Lamartina L., Hescot S. et al. New endpoints in adrenocortical carcinoma studies: a mini review // *Endocrine.* — 2022. — Vol. 77 (3). — P. 419–424.
103. Fassnacht M., Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* Elsevier Ltd, 2009. — Vol. 23 (2). — P. 273–289.
104. Fassnacht M., Terzolo M., Allolio B. et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma // *N Engl J Med.* - 2012. - Vol.366. - P.2189–2197.
105. Fassnacht M., Kroiss M., Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2013. - Vol. 98. - P. 4551–4564.
106. Fassnacht M., Berruti A., Baudin E. et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study // *Lancet Oncol.* - 2015. - Vol. 16. - P. 426–435.
107. Fassnacht M., Arlt W., Bancos I. et al. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European network for the study of adrenal tumors // *Eur J Endocrinol.* - 2016. - Vol.175. - P.1–34.
108. Fassnacht M., Dekkers O.M., Else T. et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical

carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors // *Eur J Endocrinol.* - 2018. - Vol. 179. - P. 1–46.

109. Fassnacht M., Assie G., Baudin E. et al. Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann. Oncol.* Elsevier Ltd. — 2020. — Vol. 31 (11). — P. 1476–1490.

110. Fay A.P., Elfiky A., Teló G.H. et al. Adrenocortical carcinoma: the management of metastatic disease // *Crit Rev Oncol Hematol.* - 2014. - Vol. 92. - P. 123–132.

111. Fay A.P., Signoretti S., Callea M. et al. Programmed death ligand-1 expression in adrenocortical carcinoma: An exploratory biomarker study // *J. Immunother. Cancer.* — 2015. — Vol. 3 (1). — P. 1–8.

112. Filetti S., Durante C., Hartl D. et al. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann Oncol.* - 2019. - Vol.30. - P.1856–1883.

113. Fiori C., Checcucci E., Amparore D. et al. Adrenal tumours: open surgery versus minimally invasive surgery // *Curr Opin Oncol.* - 2020. - Vol.32. - P. 27–34.

114. Fisher S.B., Habra M.A., Chiang Y.J. et al. Comparative Performance of the 7th and 8th Editions of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual for Adrenocortical Carcinoma // *World J. Surg.* — 2020. — Vol. 44 (2). — P. 544-551.

115. Fraenkel M., Gueorguiev M., Barak D. et al. Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer // *Endocrine.* - 2013. - Vol. 44. - P. 187–192.

116. Fridman W.H., Galon J., Dieu-Nosjean M.C. et al. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2011. — Vol. 344. — P. 1–24.

117. Fridman W.H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. // *Nat. Rev. Cancer.* — 2012. — Vol. 12 (4). — P. 298–306.

118. Gagnon N., Boily P., Alguire C. et al. Small adrenal incidentaloma becoming an aggressive adrenocortical carcinoma in a patient carrying a germline APC variant // *Endocrine*. — 2020. — Vol. 68 (1). — P. 203-209.
119. Gaitanidis A., Wiseman D., El Lakis M. et al. Preoperative systemic inflammatory markers are prognostic indicators in recurrent adrenocortical carcinoma // *J. Surg. Oncol.* — 2019. — Vol. 120 (8). — P. 1450-1455.
120. Gambella A., Volante M., Papotti M. Histopathologic Features of Adrenal Cortical Carcinoma // *Adv. Anat. Pathol.* — 2023. — Vol. 30 (1). — P. 34-46.
121. Gara S.K., Lack J., Zhang L. et al. Metastatic adrenocortical carcinoma displays higher mutation rate and tumor heterogeneity than primary tumors // *Nat. Commun.* — 2018. — Vol. 9 (1). — P. 4172.
122. Garay-Lechuga D., Pérez-Soto R.H., Hernández-Acevedo J.D. et al. Computed tomography (CT) scan identified necrosis, but is it a reliable single parameter for discerning between malignant and benign adrenocortical tumors? // *Surgery*. — 2022. — Vol. 171 (1). — P. 104-110.
123. Garinet S., Nectoux J., Neou M. et al. Detection and monitoring of circulating tumor DNA in adrenocortical carcinoma // *Endocr. Relat. Cancer*. — 2018. — Vol. 25 (3). — P. 13-17.
124. Gaujoux S., Weinandt M., Bonnet S. et al. Surgical treatment of adrenal carcinoma // *J. Visc Surg.* — 2017. — Vol. 154 (5). — P. 335-343.
125. Geller J.L., Azer P.C., Weiss L.M., Mertens R.B. Pigmented adrenocortical carcinoma: Case report and review // *Endocr. Pathol.* — 2006. — Vol. 17 (3). — P. 297-304.
126. Georgantzoglou N., Kokkali S., Tsourouflis G. et al. Tumor microenvironment in adrenocortical carcinoma: barrier to immunotherapy success? // *Cancers*. - 2021. - Vol. 13. - P.1798.
127. Germano A., Rapa I., Volante M. et al. RRM1 modulates mitotane activity in adrenal cancer cells interfering with its metabolism // *Mol. Cell. Endocrinol.* Elsevier Ireland Ltd. — 2015. — Vol. 401. — P. 105-110.

128. Germano A., Rapa I., Duregon E. et al. Tissue Expression and Pharmacological In Vitro Analyses of mTOR and SSTR Pathways in Adrenocortical Carcinoma // *Endocr. Pathol. Endocrine Pathology*, 2017. — Vol. 28 (2). — P. 95–102.
129. Gharzai L.A., Green M.D., Griffith K.A. et al. Adjuvant Radiation Improves Recurrence-Free Survival and Overall Survival in Adrenocortical Carcinoma // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2019. — Vol. 104 (9). — P. 3743-3750.
130. Gibellini L., De Biasi S., Porta C. et al. Single-Cell Approaches to Profile the Response to Immune Checkpoint Inhibitors // *Front. Immunol.* — 2020. — Vol. 11. — P. 1–18.
131. Ginsburg K.B., Castro Bigalli A.A., Schober J.P. et al. Association of tumor size and surgical approach with oncological outcomes and overall survival in patients with adrenocortical carcinoma // *Urol. Oncol.* — 2022. — Vol. 40 (10). — P. 19-25.
132. Ginsburg K.B., Chandra A.A., Schober J.P. et al. Identification of oncological characteristics associated with improved overall survival in patients with adrenocortical carcinoma treated with adjuvant radiation therapy: Insights from the National Cancer Database// *Urol. Oncol.* — 2021. — Vol. 39 (11). — P. 1-7.
133. Giordano T.J., Kuick R., Else T. et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — Vol. 15 (2). — P. 668–676.
134. Glenn J.A., Else T., Hughes D.T. et al. Longitudinal patterns of recurrence in patients with adrenocortical carcinoma // *Surgery.* — 2019. — Vol. 165 (1). — P. 186-195.
135. Grisanti S., Filice A., Basile V. et al. Treatment With 90Y/177Lu-DOTATOC in Patients With Metastatic Adrenocortical Carcinoma Expressing Somatostatin Receptors // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2020. — Vol. 105 (3). — dgz09.

136. Grisanti S., Cosentini D., Laganà M. et al. Different management of adrenocortical carcinoma in children compared to adults: is it time to share guidelines? // *Endocrine*. — 2021. — Vol. 74 (3). — P. 475-477.
137. Grisanti S., Cosentini D., Sigala S., Berruti A. Molecular genotyping of adrenocortical carcinoma: a systematic analysis of published literature 2019-2021// *Curr. Opin. Oncol.* — 2022. — Vol. 34 (1). — P. 19-28.
138. Grubbs E., Lee J.E. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: Proposal for a revised TNM classification // *Cancer*. — 2009. — Vol. 115 (24). — P. 5847.
139. Guan Y., Yue S., Chen Y. et al. Molecular Cluster Mining of Adrenocortical Carcinoma via Multi-Omics Data Analysis Aids Precise Clinical Therapy // *Cells*. — 2022. — Vol. 11 (23). — P. 3784.
140. Guo J., Gu Y., Ma X. et al. Identification of hub genes and pathways in adrenocortical carcinoma by integrated bioinformatic analysis // *J. Cell Mol. Med.* — 2020. — Vol. 24 (8). — P. 4428-4438.
141. Gupta N., Rivera M., Novotny P. et al. Adrenocortical Carcinoma in Children: A Clinicopathological Analysis of 41 Patients at the Mayo Clinic from 1950 to 2017 // *Horm. Res. Paediatr.* — 2018. — Vol. 90 (1). — P. 8-18.
142. Haase M., Thiel A., Scholl U.I. et al. Subcellular localization of fibroblast growth factor receptor type 2 and correlation with CTNNB1 genotype in adrenocortical carcinoma // *BMC Res. Notes*. — 2020. — Vol. 13 (1). — P. 282.
143. Habra M.A., Stephen B., Campbell M. et al. Phase II clinical trial of pembrolizumab efficacy and safety in advanced adrenocortical carcinoma // *J. Immunother. Cancer*. — 2019. — Vol. 7 (1). — P. 253.
144. Habra M.A., Sukkari M.A., Hasan A. et al. Epidemiological risk factors for adrenocortical carcinoma: A hospital-based case-control study // *Int. J. Cancer*. — 2020. — Vol. 146 (7). — P. 1836-1840.
145. Hahner S., Kreissl M.C., Fassnacht M. et al. [¹³¹I]Iodometomidate for targeted radionuclide therapy of advanced adrenocortical carcinoma // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2012. - Vol. 97. - P. 914–922.

146. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. - 2011. - Vol.144(5). - P.646-674.
147. Hasebe M., Shibue K., Honjo S., Hamasaki A. Adrenocortical carcinoma // *QJM*. — 2022. — Vol. 115 (1). — P. 43-44.
148. Henning J.E., Deutschbein T., Altieri B. et al. Gemcitabine-based chemotherapy in adrenocortical carcinoma: a multicenter study of efficacy and predictive factors // *J Clin Endocrinol Metab*. - 2017. - Vol.102. - P.4323–4332.
149. Hodgson A., Pakbaz S., Mete O. A Diagnostic Approach to Adrenocortical Tumors // *Surg. Pathol. Clin*. — 2019. — Vol. 12 (4). — P. 967-995.
150. Holoubek S.A., MacKinney E.C., Khokar A.M. et al. Treatment Differences for Adrenocortical Carcinoma by Race and Insurance Status // *J. Surg. Res*. — 2022. — Vol. 280. — P. 169-178.
151. Hough A.J., Hollifield J.W., Page D.L. et al. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data // *Am J Clin Pathol*. - 1979. - Vol.72. - P. 390–399.
152. Hsieh M.-S., Chen J.-H., Lin L.-W. Myxoid adrenal cortical carcinoma presenting as primary hyperaldosteronism: case report and review of the literature // *Int. J. Surg. Pathol*. 2011. - Vol. 19.- P.803–807
153. Huang L., Liao J., Chen Y. et al. Single-cell transcriptomes reveal characteristic features of cell types within the human adrenal microenvironment // *J Cell Physiol* // *J Cell Physiol*. - 2021. - Vol. 236 (11). - P.7308-7321
154. Huang Y.G., Li D., Wang L. et al. CENPF/CDK1 signaling pathway enhances the progression of adrenocortical carcinoma by regulating the G2/M-phase cell cycle // *J. Transl. Med*. — 2022. — Vol. 20 (1). — P. 78.
155. Ichijo T., Ueshiba H., Nawata H., Yanase T. A nationwide survey of adrenal incidentalomas in Japan: The first report of clinical and epidemiological features // *Endocr. J*. — 2020. — Vol. 67 (2). — P. 141–152.
156. Ikeya A., Nakashima M., Yamashita M. et al. CCNB2 and AURKA overexpression may cause atypical mitosis in Japanese cortisol-producing

adrenocortical carcinoma with TP53 somatic variant // PLoS One. - 2020. - Vol.15(4):e0231665.

157. Ilanchezhian M., Varghese D.G., Glod J.W. et al. Pediatric adrenocortical carcinoma // Front Endocrinol. (Lausanne). — 2022. — Vol. 13. — 961650.

158. Ilias I., Sahdev A., Reznick R.H. et al. The optimal imaging of adrenal tumours: A comparison of different methods // Endocr. Relat. Cancer. — 2007. — Vol. 14 (3). — P. 587–599.

159. International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Endocrine and Neuroendocrine tumours. — Lyon (France), 2022.

160. Jasim S., Habra M.A. Management of Adrenocortical Carcinoma // Curr. Oncol. Rep. — 2019. — Vol. 21 (3). — P. 20.

161. Jeong C., Yang Y.S., Shin O.R. et al. Adrenal cortical carcinoma: a natural progress // Korean J. Intern. Med. — 2022. — Vol. 37 (5). — P. 1092-1093.

162. Jeremie G., Lifante J.C., Chazot F.B. et al. Myxoid variant of adrenocortical carcinoma // Ann. Pathol. — 2021. — Vol. 41 (2). — P. 186-191.

163. Ji D., Zhong R., Fan S. Prognosis and Therapeutic Efficacy Prediction of Adrenocortical Carcinoma Based on a Necroptosis-Associated Gene Signature // Biomed. Res. Int. — 2022. — Vol. 2022. — 8740408.

164. Jiang A., Liu N., Bai S. et al. The Construction and Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells and ceRNA Networks in Bladder Cancer // Front. Genet. — 2020. — Vol. 11. — P. 1–16.

165. Jimenez-Sanchez A., Cast O., Miller M.L. Comprehensive benchmarking and integration of tumor microenvironment cell estimation methods // Cancer Res. - 2019. - Vol. 79, № 24. - P. 6238–6246.

166. Jonker P.K.C., Meyer V.M., Kruijff S. Epigenetic dysregulation in adrenocortical carcinoma, a systematic review of the literature // Mol. Cell Endocrinol. — 2018. — Vol. 469. — P. 77-84.

167. Jouinot A., Assie G., Libe R. et al. DNA methylation is an independent prognostic marker of survival in adrenocortical cancer // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2017. — Vol. 102 (3). — P. 923–932.
168. Jouinot A., Bertherat J. Adrenocortical carcinoma: Differentiating the good from the poor prognosis tumors // *Eur. J. Endocrinol.* — 2018. — Vol. 178 (5). — P. 215–230.
169. Kanjilal B., Ghosh M., Mitra A. et al. Cytological diagnosis of adrenocortical carcinoma: A report of 2 cases in children // *Diagn. Cytopathol.* — 2018. — Vol. 46 (12). — P. 1064–1067.
170. Kastelan D., Knezevic N., Zibar Tomsic K. et al. Open vs laparoscopic adrenalectomy for localized adrenocortical carcinoma // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* — 2020. — Vol. 93 (4). — P. 404–408.
171. Khan T.S., Imam H., Juhlin C. et al. Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use // *Ann Oncol.* - 2000. - Vol.11. - P.1281–1287.
172. Kieler M., Müllauer L., Koperek O. et al. Analysis of 10 adrenocortical carcinoma patients in the cohort of the precision medicine platform MONDTI // *Oncology.* - 2018. - Vol. 94. - P. 306–310.
173. Kim E.I., Mamedova E.O., Selivanova L.S. et al. Cushing's syndrome due to bilateral oncocytic adrenal tumor // *Probl. Endokrinol. (Mosk). Endocrinology Research Centre.* — 2020. — Vol. 66 (3). — P. 47–55.
174. Kimpel O., Bedrose S., Megerle F. et al. Adjuvant platinum-based chemotherapy in radically resected adrenocortical carcinoma: a cohort study // *Br. J. Cancer.* — 2021. — Vol. 125 (9). — P. 1233–1238.
175. Kiseljak-Vassiliades K., Bancos I., Hamrahian A. et al. American Association of Clinical Endocrinology Disease State Clinical Review on the Evaluation and Management of Adrenocortical Carcinoma in an Adult: a Practical Approach // *Endocr. Pract.* — 2020. — Vol. 26 (11). — P. 1366–1383.

176. Kiseljak-Vassiliades K., Zhang Y., Bagby S.M. et al. Development of new preclinical models to advance adrenocortical carcinoma research // *Endocr. Relat. Cancer.* — 2018. — Vol. 25 (4). — P. 437-451.
177. Konda B., Kirschner LS. Novel targeted therapies in adrenocortical carcinoma // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* - 2016. - Vol.22. - P.233–241.
178. Kostiainen I., Hakaste L., Kejo P. et al. Adrenocortical carcinoma: presentation and outcome of a contemporary patient series // *Endocrine. Springer US.* — 2019. — Vol. 65 (1). — P. 166–174.
179. Kotoula V., Sozopoulos E., Litsiou H. et al. Mutational analysis of the BRAF, RAS and EGFR genes in human adrenocortical carcinomas // *Endocr Relat Cancer.* - 2009. - Vol.16.- P. 565–572.
180. Kreissl M.C., Bastholt L., Elisei R. et al. Efficacy and safety of vandetanib in progressive and symptomatic medullary thyroid cancer: post hoc analysis from the ZETA trial // *J Clin Oncol.* - 2020. - Vol. 38. - P.2773–2781.
181. Kroiss M., Quinkler M., Lutz W.K. et al. Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma // *Clin Endocrinol (Oxf).* - 2011. - Vol.75. - P.585–591.
182. Kroiss M., Quinkler M., Johanssen S. et al. Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2012. - Vol. 97.- P.3495–3503.
183. Kroiss M., Deutschbein T., Schlötelburg W. et al. Salvage treatment of adrenocortical carcinoma with trofosfamide // *Horm Cancer.* - 2016. - Vol.7. - P. 211–218.
184. Kroiss M., Deutschbein T., Schlötelburg W. et al. Treatment of Refractory Adrenocortical Carcinoma with Thalidomide: Analysis of 27 Patients from the European Network for the Study of Adrenal Tumours Registry // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* — 2019. — Vol. 127 (9). — P. 578-584.
185. Kroiss M., Megerle F., Kurlbaum M. et al. Objective Response and Prolonged Disease Control of Advanced Adrenocortical Carcinoma with

Cabozantinib // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2020. — Vol. 105 (5). — P. 1461-1468.

186. Kwok G.T.Y., Zhao J.T., Glover A.R. et al. microRNA-431 as a Chemosensitizer and Potentiator of Drug Activity in Adrenocortical Carcinoma // Oncologist. — 2019. — Vol. 24 (6). — P. 241-250.

187. Lacombe A.M.F., Soares I.C., Mariani B.M.P. et al. Sterol O-acyl transferase 1 as a prognostic marker of adrenocortical carcinoma // Cancers (Basel). — 2020. — Vol. 12 (1). — P. 247.

188. La Femina J., Brennan M.F. Adrenocortical carcinoma: past, present, and future // J Surg Oncol. - 2012. - Vol.106. - P. 586–594.

189. Lam A.K.Y. Adrenocortical carcinoma: Updates of clinical and pathological features after renewed world health organisation classification and pathology staging // Biomedicines. — 2021. — Vol. 9 (2). — P. 1–25.

190. Ławnicka H. Current Prospects for Adrenocortical Carcinoma Pharmacotherapy // Recent Pat. Anticancer Drug Discov. — 2023. — Vol. 18 (1). — P. 29-37.

191. Lee D., Yun T., Koo Y. et al. 18F-FDG PET/CT image findings of a dog with adrenocortical carcinoma // BMC Vet. Res. — 2022. — Vol. 18 (1). — P. 15.

192. Leong D., Nyantoro M., Shedzad H. et al. Management of adrenocortical carcinoma in Western Australia: a perspective over 14 years // ANZ J. Surg. — 2021. — Vol. 91 (1-2). — P. 62-67.

193. Lerario A.M., Worden F.P., Ramm C.A. et al. The combination of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) antibody cixutumumab and mitotane as a first-line therapy for patients with recurrent/ metastatic adrenocortical carcinoma: a multiinstitutional NCI-sponsored trial // Horm Cancer. - 2014. - Vol.5. - P. 232–239.

194. Lerario A.M., Mohan D.R., Hammer G.D. Update on Biology and Genomics of Adrenocortical Carcinomas: Rationale for Emerging Therapies // Endocr. Rev. — 2022. — Vol. 43 (6). — P. 1051-1073.

195. Le Tourneau C., Hoimes C., Zarwan C. et al. Avelumab in patients with previously treated metastatic adrenocortical carcinoma: phase 1b results from the JAVELIN solid tumor trial // *J Immunother Cancer*. - 2018. - Vol. 6. - P.111-114.
196. Li H., Liu J., Shen S. et al. Pan-cancer analysis of alternative splicing regulator heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) family and their prognostic potential // *J. Cell. Mol. Med.* — 2020. — Vol. 24 (19). — P. 11111–11119.
197. Li X., Gao Y., Xu Z., Zhang Z. et al. Identification of prognostic genes in adrenocortical carcinoma microenvironment based on bioinformatic methods // *Cancer Med.* — 2020. — Vol. 9 (3). — P. 1161–1172.
198. Liang J., Liu Z., Zou Z. et al. The Correlation between the Immune and Epithelial-Mesenchymal Transition Signatures Suggests Potential Therapeutic Targets and Prognosis Prediction Approaches in Kidney Cancer // *Sci. Rep. Springer US*. — 2018. — Vol. 8 (1). — P. 1–9.
199. Liang J., Liu Z., Wei X. et al. Expression of FSCN1 and FOXM1 are associated with poor prognosis of adrenocortical carcinoma patients // *BMC Cancer*. - 2019. - Vol.19. - P.1165.
200. Liang J., Liu Z., Pei T. et al. Clinicopathological and Prognostic Characteristics of CD276 (B7-H3) Expression in Adrenocortical Carcinoma // *Dis. Markers*. — 2020. — Vol. 2020. — 5354825.
201. Liang W., Sun F. Prognostic Alternative mRNA Splicing in Adrenocortical Carcinoma // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. — 2021. — Vol. 12. — 538364.
202. Libé R., Borget I., Ronchi C. et al. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): An European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study // *Ann. Oncol. Elsevier Masson SAS*. — 2015. — Vol. 26 (10). — P. 2119–2125.
203. Libé R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment // *Front Cell Dev Biol.* - 2015. - Vol.3. - P. 45-49.

204. Libé R. Clinical and molecular prognostic factors in adrenocortical carcinoma // *Minerva Endocrinol.* — 2019. — Vol. 44 (1). — P. 58-69.
205. Lippert J., Appenzeller S., Liang R. et al. Targeted molecular analysis in adrenocortical carcinomas: a strategy toward improved personalized prognostication // *J Clin Endocrinol. Metab.* - 2018. - Vol. 103. - P.4511–4523.
206. Liu S., Ding G., Zhou Z. et al. β -Catenin-driven adrenocortical carcinoma is characterized with immune exclusion // *Onco Targets Ther.* - 2018. - Vol. 11. - P. 2029–2036.
207. Lloyd R.V., Osamura R.Y., Klöppel G., Rosai J. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. Fourth Edition. — Lyon: IARC, 2017. — 735 p.
208. Long B., Yang X., Xu X. et al. Long noncoding RNA ASB16-AS1 inhibits adrenocortical carcinoma cell growth by promoting ubiquitination of RNA-binding protein HuR // *Cell Death Dis.* — 2020. — Vol. 11 (11). — P. 995.
209. Long S.E., Miller B.S. Adrenocortical Cancer Treatment // *Surg. Clin. North Am.* — 2019 Aug. — Vol. 99 (4). — P. 759-771.
210. Lorenz K., Langer P., Niederle B. et al. Surgical therapy of adrenal tumors: guidelines from the German Association of Endocrine Surgeons (CAEK) // *Langenbecks Arch Surg.* - 2019. - Vol. 404. - P. 385–401.
211. Lu Q., Nie R., Luo J. et al. Identifying Immune-Specific Subtypes of Adrenocortical Carcinoma Based on Immunogenomic Profiling // *Biomolecules.* — 2023. — Vol. 13 (1). — P. 104.
212. Luo Y., Chen Q., Lin J. Identification and validation of a tumor mutation burden-related signature combined with immune microenvironment infiltration in adrenocortical carcinoma // *Math Biosci. Eng.* — 2022. — Vol. 19 (7). — P. 7055-7075.
213. MacKinney E.C., Holoubek S.A., Khokar A.M. et al. Treatment differences at high volume centers and low volume centers in non-metastatic and metastatic adrenocortical carcinoma // *Am. J. Surg.* — 2022. — Vol. 223 (3). — P. 582-586.

214. Manso J., Pezzani R. New targeted therapies for adrenocortical carcinomas // *Minerva Endocrinol.* — 2019. — Vol. 44 (1). — P. 70-81.
215. Mao J.J., Dages K.N., Suresh M., Bancos I. Presentation, Disease Progression, and Outcomes of Adrenal Gland Metastases // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* — 2020. — Vol. 93 (5). — P. 546–554.
216. Mariniello B., Finco I., Sartorato P. et al. Somatostatin receptor expression in adrenocortical tumors and effect of a new somatostatin analog SOM230 on hormone secretion in vitro and in ex vivo adrenal cells // *J. Endocrinol. Invest.* — 2011. — Vol. 34 (6). — P. 131–138.
217. Martins-Filho S.N., Almeida M.Q., Soares I. et al. Clinical Impact of Pathological Features Including the Ki-67 Labeling Index on Diagnosis and Prognosis of Adult and Pediatric Adrenocortical Tumors // *Endocr. Pathol. Springer US.* — 2021. — Vol. 32 (2). — P. 288–300.
218. Mascioli F., Ossola P., Esposito L. et al. Adrenocortical carcinoma metastasis. A long story. // *Ann. Ital. Chir.* — 2022. — Vol. 11. — S2239253X22038555.
219. Megerle F., Herrmann W., Schloetelburg W. et al. Mitotane Monotherapy in Patients with Advanced Adrenocortical Carcinoma // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2018. — Vol. 103 (4). — P. 1686–1695.
220. Megerle F., Kroiss M., Hahner S., Fassnacht M. Advanced Adrenocortical Carcinoma — What to do when First-Line Therapy Fails? // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* — 2019. — Vol. 127 (2-03). — P. 109-116.
221. Mete O., Gucer H., Kefeli M., Asa S.L. Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Adrenal Cortical Carcinoma // *Am J Surg Pathol.* - 2018. - Vol.42. - P.201–213.
222. Mete O., Erickson L.A., Juhlin C.C. et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Adrenal Cortical Tumors // *Endocr Pathol.* - 2022. - Vol. 33. - P.155–196.

223. Michael N., Nilubol N. Bridging the Scientific Gaps to Identify Effective Treatments in Adrenocortical Cancer // *Cancers* (Basel). — 2022. — Vol. 14 (21). — P. 5245.
224. Minner S., Schreiner J., Saeger W. Adrenal cancer: relevance of different grading systems and subtypes // *Clin Transl Oncol.* - 2021. - Vol. 23. - P. 1350–1357.
225. Mochizuki T., Kawahara T., Takamoto D. et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) predicts adrenocortical carcinoma and is correlated with the prognosis // *BMC Urol.* — 2017. — Vol. 17 (1). — P. 49.
226. Muzzi J.C.D., Magno J.M., Cardoso M.A. et al. Adrenocortical Carcinoma Steroid Profiles: In Silico Pan-Cancer Analysis of TCGA Data Uncovers Immunotherapy Targets for Potential Improved Outcomes // *Front Endocrinol.* (Lausanne). — 2021. — Vol. 12. — 672319.
227. Naffouje S.A., Sabesan A., Hallanger-Johnson J. et al. Adrenal biopsy, as a diagnostic method, is associated with decreased overall survival in patients with T1/T2 adrenocortical carcinoma: A propensity score-matched analysis // *J. Surg. Oncol.* — 2021. — Vol. 124 (8). — P. 1261-1271.
228. Naing A., Lorusso P., Fu S. et al. Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma // *Br J Cancer.* - 2013. - Vol. 108.- P. 826–830.
229. Newman A.M., Liu C.L., Green M.R. et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles // *Nat. Methods.* - 2015. - Vol. 12, № 5. - P. 453–457.
230. Newman A.M., Steen C.B., Liu C.L. et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry // *Nat. Biotechnol.* Springer US. -2019. - Vol. 37, № 7. - P. 773–782.
231. Nicolson N.G., Man J., Carling T. Advances in understanding the molecular underpinnings of adrenocortical tumors // *Curr. Opin. Oncol.* — 2018. — Vol. 30 (1). — P. 16-22.

232. Nosé V., Gill A., Teijeiro J.M.C. et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Familial Endocrine Tumor Syndromes // *Endocrine Pathology*. — 2022. — Vol. 33 (1). — P. 197–227.
233. Nowak K.M., Samsel R., Cichocki A. et al. Prognostic factors in adrenocortical carcinoma: data from a large Polish series // *Pol. Arch. Intern. Med.* — 2018. — Vol. 128 (6). — P. 371-378.
234. Ohmoto A., Shigematsu Y., Fukuda N. et al. Japanese single-institution analysis of mitotane for patients with adrenocortical carcinoma // *Endocr. J.* — 2021. — Vol. 68 (12). — P. 1383-1390.
235. Owen D.H., Patel S., Wei L. et al. Metastatic Adrenocortical Carcinoma: a Single Institutional Experience // *Horm. Cancer*. — 2019 Dec. — Vol. 10 (4-6). — P. 161-167.
236. Padua T.C., Marandino L., Raggi D. et al. A Systematic Review of Published Clinical Trials in the Systemic Treatment of Adrenocortical Carcinoma: An Initiative Led on Behalf of the Global Society of Rare Genitourinary Tumors // *Clin Genitourin Cancer*. - 2023. - Vol.21(1). - P.1-7.
237. Papathomas T.G., Duregon E., Korpershoek E. et al. Sarcomatoid adrenocortical carcinoma: a comprehensive pathological, immunohistochemical, and targeted next-generation sequencing analysis // *Hum. Pathol. Elsevier B.V.* — 2016. — Vol. 58. — P. 113–122.
238. Papotti M., Libè R., Duregon E. et al. The Weiss score and beyond—histopathology for adrenocortical carcinoma // *Horm Cancer*. - 2011. - Vol.2.- P. 333–340.
239. Paragliola R.M., Corsello A., Locantore P. et al. Medical approaches in adrenocortical carcinoma // *Biomedicines*. - 2020. - Vol. 8. - P. 551.
240. Pavel M., Öberg K., Falconi M. et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann Oncol*. - 2020. - Vol.31. - P. 844–860.

241. Pearlstein S.S., Conroy P.C., Menut K.C. et al. Evaluation of Necrosis as a Diagnostic and Prognostic Indicator in Adrenocortical Carcinoma // *JAMA Surg.* — 2021. — Vol. 156 (12). — P. 1173-1174.
242. Pegna G.J., Roper N., Kaplan R.N. et al. The immunotherapy landscape in adrenocortical cancer // *Cancers (Basel).* - 2021. - Vol. 13. - P. 2660.
243. Pellegriti G. Prognostic factors in adrenocortical carcinoma: data from a large Polish series // *Pol. Arch. Intern. Med.* — 2018. — Vol. 128 (6). — P. 330-332.
244. Peng Y., Song Y., Ding J. et al. Identification of immune-related biomarkers in adrenocortical carcinoma: Immune-related biomarkers for ACC // *Int. Immunopharmacol.* — 2020. — Vol. 88. — 106930.
245. Pennanen M., Heiskanen I., Sane T. et al. Helsinki score — A novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas // *Hum. Pathol. Elsevier Inc.* — 2015. — Vol. 46 (3). — P. 404–410.
246. Pereira S.S., Costa M.M., Guerreiro S.G. et al. Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Adrenocortical Tumors // *Pathol. Oncol. Res.* — 2018. — Vol. 24 (3). — P. 689-693.
247. Pereira S.S., Monteiro M.P., Costa M.M. et al. IGF2 role in adrenocortical carcinoma biology // *Endocrine.* — 2019. — Vol. 66 (2). — P. 326-337.
248. Petersenn S., Richter P.A., Broemel T. et al. Computed tomography criteria for discrimination of adrenal adenomas and adrenocortical carcinomas: Analysis of the German ACC registry // *Eur. J. Endocrinol.* — 2015. — Vol. 172 (4). — P. 415–422.
249. Petr E.J., Else T. Adrenocortical carcinoma (ACC): When and why should we consider germline testing? // *Presse. Med.* — 2018. — Vol. 47 (7-8 Pt. 2). — P. 119-125.
250. Pezzani R. Adrenocortical carcinoma: current knowledge // *Minerva Endocrinol.* — 2019 Jun. — Vol. 44 (2). — P. 232.

251. Picard C., Orbach D., Carton M. et al. Revisiting the role of the pathological grading in pediatric adrenal cortical tumors: results from a national cohort study with pathological review // *Mod. Pathol.* Springer US. — 2019. — Vol. 32 (4). — P. 546–559.
252. Pittaway J.F.H., Guasti L. Pathobiology and genetics of adrenocortical carcinoma // *J. Mol. Endocrinol.* — 2019. — Vol. 62 (2). — P. 105-119.
253. Poli G., Ruggiero C., Cantini G. et al. Fascin-1 Is a Novel Prognostic Biomarker Associated With Tumor Invasiveness in Adrenocortical Carcinoma // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2019. — Vol. 104 (5). — P. 1712-1724.
254. Poorman C.E., Ethun C.G., Postlewait L.M. et al. A Novel T-Stage Classification System for Adrenocortical Carcinoma: Proposal from the US Adrenocortical Carcinoma Study Group // *Ann. Surg. Oncol.* — 2018. — Vol. 25 (2). — P. 520-527.
255. Postlewait L.M., Ethun C.G., Tran T.B. et al. Outcomes of adjuvant mitotane after resection of adrenocortical carcinoma: a 13-institution study by the US Adrenocortical Carcinoma Group // *J Am Coll Surg.* - 2016. - Vol. 222. - P. 480–490.
256. Pozdeyev N., Fishbein L. Targeted genomic analysis of 364 adrenocortical carcinomas // *Endocr. Relat. Cancer.* — 2021. — Vol. 28 (10). — P. 671-681.
257. Puglisi S., Perotti P., Cosentini D. et al. Decision-making for adrenocortical carcinoma: surgical, systemic, and endocrine management options // *Expert Rev. Anticancer Ther.* — 2018. — Vol. 18 (11). — P. 1125-1133.
258. Puglisi S., Calabrese A., Basile V. et al. New perspectives for mitotane treatment of adrenocortical carcinoma // *Best Pract Res Clin Endocrinol Meta.* - 2020. - Vol.34. - P. 101415.
259. Rahane C.S., Kutzner A., Heese K. Establishing a human adrenocortical carcinoma (ACC)-specific gene mutation signature // *Cancer Genet.* — 2019. — Vol. 230. — P. 1-12.

260. Raj N., Zheng Y., Kelly V. et al. PD-1 Blockade in advanced adrenocortical carcinoma // *J Clin Oncol.* - 2020. - Vol. 38. - P. 71–80.
261. Ranathunga D.S., Cherpak L.A., Schieda N. et al. Macroscopic Fat in Adrenocortical Carcinoma: A Systematic Review // *AJR Am. J. Roentgenol.* — 2020 Feb. — Vol. 214 (2). — P. 390-394.
262. Ren L., Yang Y., Li W. et al. CDK1 serves as a therapeutic target of adrenocortical carcinoma via regulating epithelial-mesenchymal transition, G2/M phase transition, and PANoptosis // *J. Transl Med.* — 2022. — Vol. 20 (1). — P. 444.
263. Ribas A., Wolchok J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade // *Science.* — 2018. — Vol. 359 (6382). — P. 1350–1355.
264. Romero Arenas M.A., Whitsett T.G., Aronova A. et al. Protein Expression of PTTG1 as a Diagnostic Biomarker in Adrenocortical Carcinoma // *Ann. Surg. Oncol.* — 2018. — Vol. 25 (3). — P. 801-807.
265. Ronchi C.L., Sbiera S., Volante M. et al. CYP2W1 is highly expressed in adrenal glands and is positively associated with the response to mitotane in adrenocortical carcinoma // *PLoS One.* — 2014. — Vol. 9 (8). — e105855.
266. Ruggiero C., Doghman-Bouguerra M., Lalli E. How good are the current models of adrenocortical carcinoma for novel drug discovery? // *Expert Opin. Drug Discov.* — 2022. — Vol. 17 (3). — P. 211-213.
267. Sada A., Asaad M., Bews K.A. et al. Comparison between functional and non-functional adrenocortical carcinoma // *Surgery.* — 2020. — Vol. 167 (1). — P. 216-223.
268. Sbiera S., Leich E., Liebisch G. et al. Mitotane inhibits sterol-o-Acyl transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells // *Endocrinol. (United States).* — 2015. — Vol. 156 (11). — P. 3895–3908.
269. Sbiera S., Sbiera I., Ruggiero C. et al. Assessment of VAV2 expression refines prognostic prediction in adrenocortical carcinoma // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2017. — Vol. 102 (9). — P. 3491–3498.

270. Schimmack S., Strobel O. Resection strategies for adrenocortical carcinoma // *Chirurg.* — 2019. — Vol. 90 (1). — P. 9-14.
271. Schweitzer S., Kunz M., Kurlbaum M. et al. Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma // *Eur. J. Endocrinol.* — 2019. — Vol. 180 (2). — P. 117-125.
272. Sharma E., Dahal S., Sharma P. et al. The characteristics and trends in adrenocortical carcinoma: a United States Population Based Study // *J Clin Med Res.* - 2018. - Vol.10(8). - P.636-640.
273. Shebrain S. Prediction of Survival in Adrenocortical Carcinoma // *J. Invest. Surg.* — 2022 May. — Vol. 35 (5). — P. 1161-1162.
274. Shen C., Wang Y. Ferroptosis Biomarkers for Predicting Prognosis and Immunotherapy Efficacy in Adrenocortical Carcinoma // *Arch. Med. Res.* — 2023. — Vol. 54 (1). — P. 45-55.
275. Shumarova S., Petrov D., Grozdev K. et al. Adrenalectomy for Isolated Metastases // *J. IMAB - Annu. Proceeding.* - 2017. - Vol. 23 (3). - P. 1651–1656.
276. Sinai Khandeparkar S.G., Kulkarni M.M., Solanke S.G., Shinde P.A. Oncocytic variant of adrenocortical carcinoma: A rare entity // *Indian J. Cancer.* — 2022. — Vol. 59 (2). — P. 297-299.
277. Solak M., Kraljević I., Zibar Tomšić K. et al. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Marker in Adrenocortical Carcinoma // *Endocr. Res.* — 2021. — Vol. 46 (2). — P. 74-79.
278. Soon P.S., Gill A.J., Benn D.E. et al. Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas // *Endocr. Relat. Cancer.* — 2009. — Vol. 16 (2). — P. 573–583.
279. Sperone P., Berruti A., Gorzegno G. et al. Long-term disease free survival in a patient with metastatic adreno-cortical carcinoma after complete pathological response to chemotherapy plus mitotane // *J Endocrinol Invest.* - 2006. - Vol.29(6). - P.560-562.

280. Stigliano A., Cerquetti L., Lardo P. et al. New insights and future perspectives in the therapeutic strategy of adrenocortical carcinoma (Review) // *Oncol. Rep.* — 2017 Mar. — Vol. 37 (3). — P. 1301-1311.
281. Stone B.V., Tallman J.E., Moses K.A. Disparate Practice Patterns and Survival Outcomes: The Impact of Centralization of Cancer Care for Adrenocortical Carcinoma in the United States // *J. Urol.* — 2021. — Vol. 206 (4). — P. 866-872.
282. Subramanian C., Cohen M.S. Identification of novel lipid metabolic biomarkers associated with poor adrenocortical carcinoma prognosis using integrated bioinformatics // *Surgery.* — 2022. — Vol. 171 (1). — P. 119-129.
283. Suh W.K., Gajewska B.U., Okada H. et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4 (9). — P. 899-906.
284. Suman P., Calcaterra N., Wang C.H. et al. Preoperative adrenal biopsy does not affect overall survival in adrenocortical carcinoma // *Am. J. Surg.* — 2017. — Vol. 214 (4). — P. 748-751.
285. Sun N., Kunzke T., Sbiera S. et al. Prognostic Relevance of Steroid Sulfation in Adrenocortical Carcinoma Revealed by Molecular Phenotyping Using High-Resolution Mass Spectrometry Imaging // *Clin. Chem.* — 2019. — Vol. 65 (10). — P. 1276-1286.
286. Surakhy M., Wallace M., Bond E. et al. A common polymorphism in the retinoic acid pathway modifies adrenocortical carcinoma age-dependent incidence // *Br. J. Cancer.* — 2020 Apr. — Vol. 122 (8). — P. 1231-1241.
287. Tamburello M., Altieri B., Sbiera I. et al. FGF/FGFR signaling in adrenocortical development and tumorigenesis: novel potential therapeutic targets in adrenocortical carcinoma // *Endocrine.* — 2022. — Vol. 77 (3). — P. 411-418.
288. Tang Y., Liu Z., Zou Z. et al. Benefits of Adjuvant Mitotane after Resection of Adrenocortical Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Biomed. Res. Int.* — 2018. — Vol. 2018. — e9362108.
289. Tella S.H., Kommalapati A., Yaturu S., Kebebew E. Predictors of Survival in Adrenocortical Carcinoma: An Analysis From the National Cancer

Database // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2018 Sep 1. — Vol. 103 (9). — P. 3566-3573.

290. Terzolo M., Baudin A.E., Ardito A. et al. Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection // Eur J Endocrinol. - 2013. - Vol. 169. - P.263–270.

291. Terzolo M., Fassnacht M. Endocrine tumours: Our experience with the management of patients with non-metastatic adrenocortical carcinoma // Yosetsu Gakkai Shi/Journal Japan Weld. Soc. — 2022. — Vol. 187 (3). — P. 27–40.

292. Thomas J.J., Tward J.D. Stage Presentation, Care Patterns, Treatment Outcomes, and Impact of Radiotherapy on Overall Survival for Adrenocortical Carcinoma // Clin. Genitourin. Cancer. — 2021. — Vol. 19 (5). — P. 417-424.

293. Tian X., Xu W., Wang Y. et al. Identification of tumor-infiltrating immune cells and prognostic validation of tumor-infiltrating mast cells in adrenocortical carcinoma: results from bioinformatics and real-world data // Oncoimmunology. — 2020. — Vol. 9 (1). — 1784529.

294. Tian X., Xu W.H., Anwaier A. et al. Construction of a robust prognostic model for adult adrenocortical carcinoma: Results from bioinformatics and real-world data // J. Cell Mol. Med. — 2021. — Vol. 25 (8). — P. 3898-3911.

295. Tierney J.F., Chivukula S.V., Poirier J. et al. National treatment practice for adrenocortical carcinoma: have they changed and have we made any progress? // J Clin Endocrinol Metab. - 2019. - Vol. 104. - P. 5948–5956.

296. Tissier F., Aubert S., Leteurtre E. et al. Adrenocortical tumors: improving the practice of the Weiss system through virtual microscopy: a National Program of the French Network INCa-COMETE // Am. J. Surg. Pathol. - 2012. - Vol.36. - P. 1194–1201.

297. Tkachuk A.V., Tertychnyi A.S., Beltsevich D.G. et al. Adrenocortical cancer: morphological variants, immunohistochemical characteristics // Arkh. Patol. Russia (Federation), 2021. — Vol. 83 (3). — P. 10–18.

298. Tseng J., DiPeri T., Chen Y. et al. Factors Associated with Non-Operative Management of Resectable Adrenocortical Carcinoma // J. Surg. Res. — 2021. — Vol. 267. — P. 651-659.
299. Turco M., Huguet J., Territo A. et al. Outcomes following surgical management of adrenocortical carcinoma: A single-center experience // Arch. Esp. Urol. — 2021. — Vol. 74 (8). — P. 782-789.
300. Vaidya A., Nehs M., Kilbridge K. Treatment of Adrenocortical Carcinoma // Surg. Pathol. Clin. — 2019 Dec. — Vol. 12 (4). — P. 997-1006.
301. van Koetsveld P.M., Creemers S.G., Dogan F. et al. The Efficacy of Mitotane in Human Primary Adrenocortical Carcinoma Cultures // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2020. — Vol. 105 (2). — P. 415–417.
302. van Slooten H., Schaberg A., Smeenk D. et al. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors // Cancer. - 1985. - Vol. 55. - P.766–773.
303. Vanbrabant T., Fassnacht M., Assie G., Dekkers O.M. Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis // Eur. J. Endocrinol. — 2018. — Vol. 179 (6). — P. 429-436.
304. Vatrano S., Volante M., Duregon E. et al. Detailed genomic characterization identifies high heterogeneity and histotype-specific genomic profiles in adrenocortical carcinomas // Mod. Pathol. — 2018. — Vol. 31 (8). — P. 1257–1269.
305. Veronez L.C., das Chagas P.F., Corrêa C.A.P. et al. MSI2 expression in adrenocortical carcinoma: Association with unfavorable prognosis and correlation with steroid and immune-related pathways // J. Cell. Biochem. — 2021. — Vol. 122 (12). — P. 1925-1935.
306. Vezzosi D., Do Cao C., Hescot S. et al. Time until partial response in metastatic adrenocortical carcinoma long-term survivors // Horm Cancer. - 2018. - Vol.9. - P. 62–69.

307. Viani G.A., Viana B.S. Adjuvant radiotherapy after surgical resection for adrenocortical carcinoma: A systematic review of observational studies and meta-analysis // J. Cancer Res. Ther. — 2019. — Vol. 15 (Supl.). — P. 20-26.
308. Volante M., Terzolo M., Fassnacht M. et al. Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) gene expression may predict efficacy of adjuvant mitotane in adrenocortical cancer // Clin. Cancer Res. — 2012. — Vol. 18 (12). — P. 3452–3461.
309. Walz M.K., Metz K.A., Theurer S. et al. Differentiating Benign from Malignant Adrenocortical Tumors by a Single Morphological Parameter — a Clinicopathological Study on 837 Adrenocortical Neoplasias // Indian J. Surg. Oncol. Indian Journal of Surgical Oncology. — 2020. — Vol. 11 (4). — P. 705–710.
310. Wang L., Lyu Y., Li Y. et al. ASXL1 promotes adrenocortical carcinoma and is associated with chemoresistance to EDP regimen // Aging (Albany NY). — 2021. — Vol. 13 (18). — P. 22286-22297.
311. Wang S., Chen S.S., Gao W.C. et al. Prognostic factors of adrenocortical carcinoma: an analysis of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) database // Asian Pac J Cancer Prev. - 2017. - Vol. 18. - P. 2817–2823.
312. Wang W., Chang G., Sun Y. et al. Nomograms for Individualized Evaluation of Prognosis in Adrenocortical Carcinomas for the Elderly: A Population-Based Analysis // J. Invest. Surg. — 2022. — Vol. 35 (5). — P. 1153-1160.
313. Weigand I., Altieri B., Lacombe A.M.F. et al. Expression of SOAT1 in Adrenocortical Carcinoma and Response to Mitotane Monotherapy: An ENSAT Multicenter Study // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2020. — Vol. 105 (8). — P. 2642–2653.
314. Weiss L.M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors // American Journal of Surgical Pathology. - 1984. — Vol. 8 (3). — P. 163–169.

315. Weiss L.M., Medeiros L.J., Vickery A.L. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma // *Am J Surg Pathol.* - 1989. - Vol. 13. - P.202–206.
316. Wieneke J.A., Thompson L.D., Heffess C.S. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients // *Am J Surg Pathol.* - 2003. - Vol.27. - P.867–881.
317. Wong C.L., Fok C.K., Chan Y.K. et al. Was It an Adrenocortical Adenoma or an Adrenocortical Carcinoma? Limitation of the Weiss Scoring System in Determining the Malignant Potential of Adrenocortical Tumor: Report on Two Cases // *Case Rep Endocrinol.* 2022;2022:7395050. Published 2022 Sep 14.
318. Wong D.D., Spagnolo D.V., Bisceglia M. et al. Oncocytic adrenocortical neoplasms-a clinicopathologic study of 13 new cases emphasizing the importance of their recognition // *Hum. Pathol.* Elsevier Inc., 2011. — Vol. 42 (4). — P. 489–499.
319. Wortmann S., Quinkler M., Ritter C. et al. Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma // *Eur J Endocrinol.* - 2010. - Vol.162. - P. 349–356.
320. Wright J.P., Montgomery K.W., Tierney J. et al. Ectopic, retroperitoneal adrenocortical carcinoma in the setting of Lynch syndrome // *Fam. Cancer.* — 2018. — Vol. 17 (3). — P. 381-385.
321. Wu K., Liu Z., Li X., Lu Y. Adrenal Surgery for Synchronously Metastatic Adrenocortical Carcinoma: A Population-Based Analysis // *World J. Surg.* — 2021. — Vol. 45 (5). — P. 1457-1465.
322. Wu K., Liu Z., Li X., Lu Y. Clinical Score Predicting Overall Survival After Surgery for Synchronous Metastatic Adrenocortical Carcinoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Result-Based Study // *Am. Surg.* — 2021. — Vol. 87 (5). — P. 805-811.
323. Wu K., Liu Z., Liang J. et al. Laparoscopic versus open adrenalectomy for localized (stage 1/2) adrenocortical carcinoma: Experience at a single, high-volume center // *Surgery.* — 2018. — Vol. 164 (6). — P. 1325-1329.

324. Xu F., Guan Y., Ma Y. et al. Bioinformatic analyses and experimental validation of the role of m6A RNA methylation regulators in progression and prognosis of adrenocortical carcinoma // *Aging* (Albany NY). — 2021. — Vol. 13 (8). — P. 11919-11941.
325. Xu F., Guan Y., Zhang P. et al. Tumor mutational burden presents limiting effects on predicting the efficacy of immune checkpoint inhibitors and prognostic assessment in adrenocortical carcinoma // *BMC Endocr. Disord.* — 2022. — Vol. 22 (1). — P. 130.
326. Xu N., Ke Z.B., Lin X.D. et al. Identification of survival-associated alternative splicing events and signatures in adrenocortical carcinoma based on TCGA SpliceSeq data // *Aging* (Albany NY). — 2020. — Vol. 12 (6). — P. 4996-5009.
327. Yin A., Ettaieb M.H.T., Swen J.J. et al. Population Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis of Mitotane in Patients with Adrenocortical Carcinoma: Towards Individualized Dosing // *Clin. Pharmacokinet.* — 2021. — Vol. 60 (1). — P. 89-102.
328. Zambaiti E., Duci M., De Corti F. et al. Clinical prognostic factors in pediatric adrenocortical tumors: A meta-analysis // *Pediatr. Blood Cancer.* — 2021. — Vol. 68 (3). — e28836.
329. Zheng S., Cherniack A.D., Dewal N. et al. Comprehensive pan-genomic characterization of adrenocortical carcinoma // *Cancer Cell.* - 2016. - Vol.29. - P. 723–736.
330. Zhu B., Zhi Q., Xie Q. et al. Reduced expression of ferroportin1 and ceruloplasmin predicts poor prognosis in adrenocortical carcinoma // *Trace Elem. Med. Biol.* — 2019. — Vol. 56. — P. 52-59.
331. Zhu J., Zheng Z., Shen J. et al. Efficacy of adjuvant radiotherapy for treatment of adrenocortical carcinoma: a retrospective study and an updated meta-analysis // *Radiat Oncol.* - 2020. - Vol.15. - P. 118.

332. Zlatibor L., Paunovic I., Zivaljevic V. et al. Prognostic significance of immunohistochemical markers in adrenocortical carcinoma // Acta Chir. Belg. — 2020 Feb. — Vol. 120 (1). — P. 23-29.

Алгоритм диагностики опухолей коры надпочечников

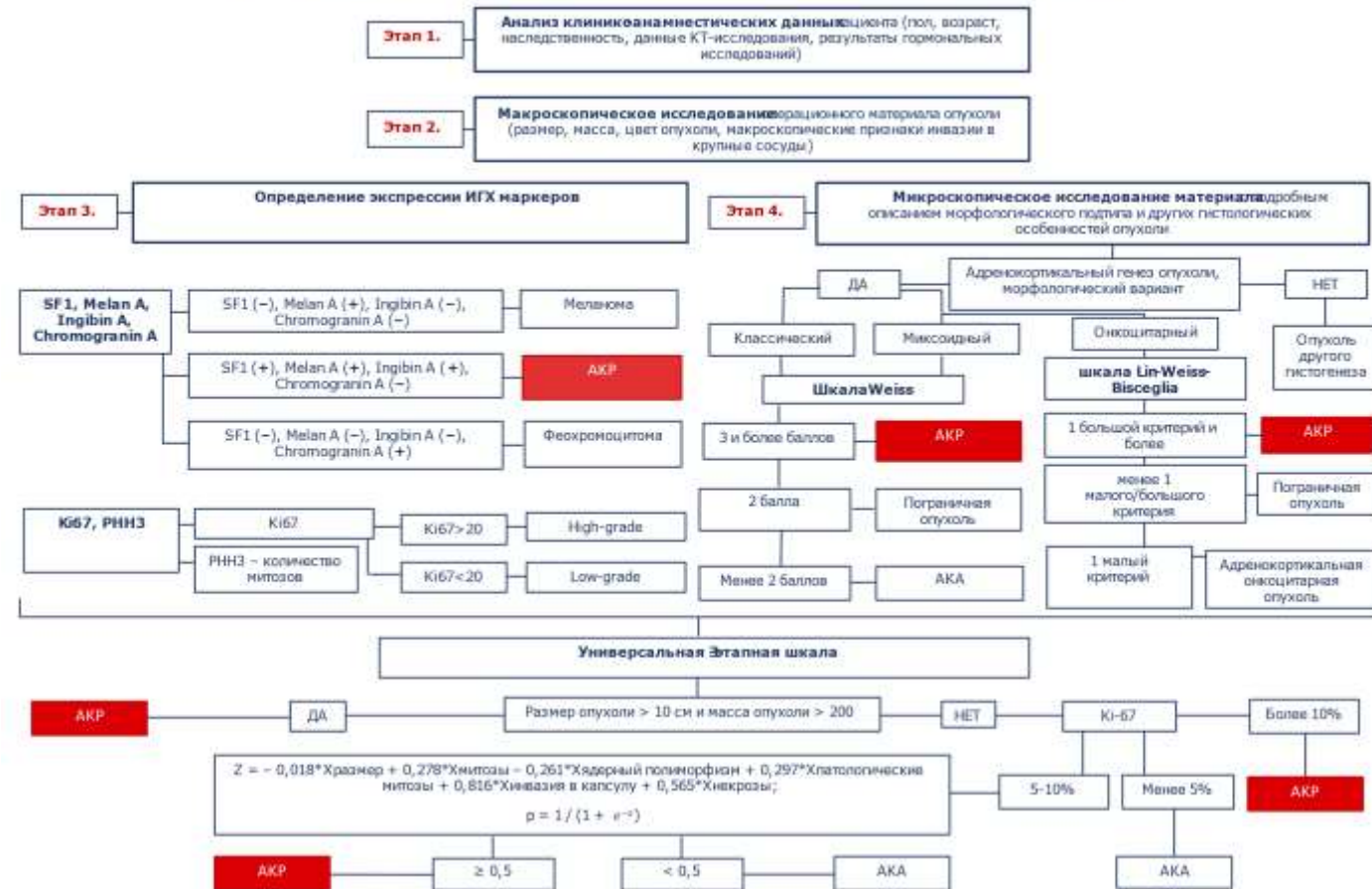


Схема 1. Алгоритм морфологической диагностики опухолей коры надпочечников