

Шафигуллина З.Р., Великанова Л.И., Ворохобина Н.В., Малеваная Е.В., Стрельникова Е.Г., Пальцман Ж.В.

СОЧЕТАНИЕ КЛАССИЧЕСКИХ ТЕСТОВ И МЕТОДОВ ХРОМАТОГРАФИИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМА КУШИНГА РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Для диагностики различных форм синдрома Кушинга (СК) традиционно используются методы иммунохимического анализа. При пограничных значениях гормональных показателей, в сомнительных ситуациях, сочетании изменений, как в гипофизе, так и надпочечниках, возникает необходимость в определении дополнительных дифференциально-диагностических критериев диагностики различных форм СК. Проанализированы стероидные профили мочи (СПМ) методами газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) у 38 женщин с синдромом Кушинга (СК) надпочечникового генеза (СКН), у 42 пациенток с СК гипофизарного генеза (СКГ) и у 25 здоровых женщин (группа контроля). Методом ВЭЖХ получено увеличение соотношения свободного кортизола к свободному кортизолу мочи (UFF/UFE) у больных СКГ в сравнении с СКН. Получена 100% чувствительность и специфичность более 90% снижения экскреции с мочой UFF и UFE более чем на 60% после подавляющего теста с 8 мг дексаметазона для диагностики СКГ. Методом ГХ-МС у больных СКН и СКГ выявлены особенности метаболизма андрогенов, прогестинов и глюкокортикоидов, что определило получение характерных СПМ при СК различного генеза. Повышение ЭМ дегидроэпиандростерона и его метаболитов, метаболитов андростендиона, соотношения суммы тетрагидрометаболитов кортизола и кортизона к тетрагидро-11-дезоксикортизолу (больше 36) у больных СКГ в сравнении с соответствующими показателями у пациентов с СКН являются дополнительными признаками дифференциальной диагностики данных заболеваний. Сочетание классических тестов с исследованием СПМ методами ВЭЖХ и ГХ-МС увеличило чувствительность и специфичность дифференциальной диагностики СКН и СКГ.

Ключевые слова: стероидный профиль мочи; газовая хромато-масс-спектрометрия; синдром Кушинга надпочечникового генеза; синдром Кушинга гипофизарного генеза.

Для цитирования: Шафигуллина З.Р., Великанова Л.И., Ворохобина Н.В., Малеваная Е.В., Стрельникова Е.Г., Пальцман Ж.В. Сочетание классических тестов и методов хроматографии в лабораторной диагностике синдрома Кушинга различного генеза. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (7): 418-423. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-7-418-423>

Shafigullina Z.R., Velikanova L.I., Vorokhobina N.V., Malevanaya E.V., Strelnikova E.G., Pal'man Z.V.

THE COMBINATION OF CLASSICAL TESTS AND METHODS OF CHROMATOGRAPHY FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF CUSHING'S SYNDROME OF DIFFERENT GENESIS

FSBEI HE "North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov" under the Ministry of Public Health of Russian Federation, 191015, Saint-Petersburg, Russia

Immunochemical methods of analysis are traditionally used for diagnosis of various forms of Cushing's syndrome (CS). In the presence of boundary values of hormonal parameters, doubtful situations, a combination of changes both in pituitary and in adrenal glands, it is useful to determine additional differential diagnostic criteria for the diagnosis of various forms of CS. Urinary steroid profiles (USP) were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC) for 38 females with adrenal Cushing's syndrome (CSA), 42 females with pituitary CS (CSP) and 25 healthy females (control group). An increase of free cortisol/free cortisone ratio in the urine (UFF/UFE) for CSP patients in comparison of CSA was obtained by HPLC method. Decreased urinary excretion of UFF and UFE by more than 60% after the 8 mg dexamethasone suppression test had 100% sensitivity and specificity of more than 90% for the diagnosis of CSP. GC-MS method in patients with CSA and CSG revealed the peculiarities of androgens, progestins and glucocorticoids metabolism which led to obtain specific USP for CS of different genesis. Increased urinary excretions of dehydroepiandrosterone and its metabolites, metabolites of androstenedione, the ratio of sum of cortisol and cortisone tetrahydrometabolites to tetrahydro-11-deoxycortisol (more than 36) in CSP patients compared with CSA are additional signs for differential diagnosis of these diseases. The combination of classical tests and USP obtained by HPLC and GC-MS methods increased the sensitivity and specificity of differential diagnosis of CSA and CSP.

Key words: urinary steroid profiles; gas chromatography-mass spectrometry; Cushing's syndrome of adrenal genesis; Cushing's syndrome of pituitary genesis.

For citation: Shafigullina Z.R., Velikanova L.I., Vorokhobina N.V., Malevanaya E.V., Strelnikova E.G., Pal'man Z.V. The combination of classical tests and methods of chromatography for laboratory diagnostics of Cushing's syndrome of different genesis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (7): 418-423 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-7-418-423>

For correspondence: Velikanova L.I., Dr. Sci. Biol., Professor, Head of Research Laboratory of chromatography; e-mail: velikanova46@gmail.com

Information about authors:

Shafigullina Z.R., <https://orcid.org/0000-0001-8292-8504>
Velikanova L.I., <https://orcid.org/0000-0002-9352-4035>
Vorokhobina N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>
Malevanaia E.V., <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>
Strelnikova E.G., <https://orcid.org/0000-0002-1208-8092>

Acknowledgment. *This study had no sponsorship.*

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interests.*

Received 01.03.2020
Accepted 02.04.2020

Введение. Большинство случаев синдрома Кушинга (СК) обусловлено стимуляцией коры надпочечников адренокортикотропным гормоном (АКТГ) опухоли гипофиза (70-75%), эктопическим АКТГ синдромом (10-15%). Оставшиеся 10-15% СК составляют глюкокортикоид-секретирующие аденомы надпочечников и злокачественные кортикостеромы [1,2]. Для диагностики различных форм СК традиционно используются методы иммунохимического анализа с определением уровней АКТГ в плазме крови, кортизола в сыворотке крови после подавляющих дексаметазоновых тестов (ПДТ) с 1 мг, 2 мг и 8 мг, экскреции свободного кортизола с мочой, свободного кортизола в слюне в 23 час (СКС). Специфичность и чувствительность перечисленных тестов составляет 85-90% [2-5]. При пограничных значениях гормональных показателей, в сомнительных ситуациях, сочетании изменений, как в гипофизе, так и надпочечниках, возникает необходимость в дополнительных дифференциально-диагностических тестах с использованием методов хроматографии для выбора оптимальной тактики лечения больного [6-8]. В настоящее время хроматографические методы являются наиболее информативными для изучения метаболизма стероидных гормонов, что особенно важно для диагностики заболеваний надпочечников [9-12]. Особое значение приобретает исследование стероидных профилей в биологических жидкостях хроматографическими методами при субклинических формах гиперкортицизма и для дифференциальной диагностики форм СК, когда традиционные методы оценки функционального состояния коры надпочечников не всегда информативны ввиду ограниченной чувствительности и специфичности, особенно при пограничных уровнях гормонов [13-16]. Исследование стероидных профилей мочи (СПМ) методом ГХ-МС расширяет возможности лабораторной диагностики различных форм СК за счет определения метаболитов промежуточных продуктов адреналового стероидогенеза [9,11]. Результаты исследований, посвященных возможности использования стероидного профилирования методом ГХ-МС для дифференциальной диагностики пациентов с СК и роли метаболизма кортизола в патогенезе гиперкортицизма противоречивы [9-13]. Представляется актуальным применение сочетания классических тестов с исследованием СПМ методами ВЭЖХ и ГХ-МС для увеличения специфичности дифференциальной диагностики СК надпочечникового генеза (СКН) и СК гипофизарного генеза (СКГ).

Материал и методы. Обследовано 38 женщин в возрасте 49,1±3 года с СКН, 42 пациентки в возрасте 42,9±2,7 года с СКГ и 25 здоровых женщин в возрасте 39,7 ± 2,1 лет составили группу контроля (ГК). Пациенты с адренокортикальным раком были исключены из

исследования. Топическая диагностика опухолей проводилась при использовании компьютерной томографии надпочечников и магнитно-резонансной томографии области турецкого седла. Для оценки функционального состояния системы гипофиз-кора надпочечников использовали классические тесты, основанные на методе иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛИА) с определением СКС, уровней АКТГ, дегидроэпиандростерон-сульфата (ДЭА-С), кортизола в 9 ч (Ку) и 20 ч (Кв) в сыворотке крови и уровней кортизола после ПДТ с 1 мг, 2 мг и 8 мг. При отсутствии визуализации очага поражения в гипофизе при МРТ, микроаденоме гипофиза менее 6 мм, неэффективности аденомэктомии или сомнительном диагнозе проводили селективный забор крови из нижних каменных синусов (ССВЗК) с определением уровней АКТГ для дифференциальной диагностики АКТГ-зависимого СК. Методом ГХ-МС с оптимизацией регламента пробоподготовки, исследовали СПМ. Выбран вариант жидкостной экстракции, и установлены оптимальные количества дериватирующих агентов (метоксиамина и триметилсилилимидазола), а также подобраны условия хроматографического анализа [17]. Всего идентифицировано 69 стероидов. СПМ получены на газовом хромато-масс-спектрометре SHIMADZU GCMS – QP2020. Методом ВЭЖХ определяли экскрецию с мочой (ЭМ) свободного кортизола (UFF), свободного кортизона (UFE) и 6β-гидрокортизола (6β-ОНФ) на хроматографе с диодно-матричным детектированием Agilent 1260. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программной системы STATISTICA for WINDOWS (версия 10). Основные количественные характеристики больных представлены в виде медианы (Me), 25-го перцентиля и 75-го перцентиля (Q₂₅–Q₇₅). Для сравнения результатов, полученных в исследуемых группах, использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимым считался критерий достоверности $p < 0,05$. Чувствительность и специфичность была рассчитана по программе Medcalc с использованием метода ROC кривых (receiver operating characteristic) и площади под ROC кривыми (AUC). Для анализа совместного варьирования 35 стероидных показателей, определенных методом ГХ-МС, был использован факторный анализ с экстракцией факторов по методу максимального правдоподобия. Число выделяемых факторов определялось на основе теста Кэттела. Для улучшения интерпретации данных проводилось вращение факторов по методу Varimax. Значимыми для данного фактора переменными признавались переменные, имевшие факторные нагрузки не менее 0,4. Всего было выявлено 5 факторов.

Результаты. У всех больных синдромом Кушинга методом ИХЛИА получено увеличение СКС (более 18

нмоль/л), уровней Ку, Кв в сыворотке крови, соотношения Кв/Ку в сравнении с ГК и эти показатели не отличались в группах с гипофизарной (СКГ) и надпочечниковой (СКН) формой заболевания (табл. 1). В группе пациентов СКН отмечалось снижение в сыворотке крови уровней АКТГ (меньше 9,0 пг/мл) и ДЭА-С (меньше 0,4 мкг/мл). У пациентов с СКГ уровень АКТГ в плазме крови был увеличен, а уровень ДЭА-сульфата не отличался от показателей ГК. При проведении ночного теста с 1 мг дексаметазона у больных как с надпочечниковой, так и гипофизарной формой синдрома Кушинга уровень кортизола в сыворотке крови был больше 250 нмоль/л и значимо не отличался от его уровня после ПДТ с 2 мг ($p=0,06$). После проведения подавляющего теста с 8 мг дексаметазона (ПДТ с 8 мг) у пациентов с СКГ отмечалось снижение уровня кортизола крови по сравнению с больными СКН (табл.1).

В целом, в группе больных с СКГ снижение уровня кортизола после ПДТ с 8 мг составило 70 (52-91)%. Однако, у 6 из них (14,3%) снижение уровня кортизола в сыворотке крови было менее 60%, а уровень АКТГ в плазме крови был меньше верхнего референсного значения. При проведении селективного забора крови на гормоны из нижних каменистых синусов для подтверждения гипофизарной формы СК соотношение уровней АКТГ из нижних каменистых синусов и периферической вены в этой группе с СКГ составило 2,9 (1,3-17,9), а у 5 пациентов было менее 2,0, что меньше диагностического уровня и было сомнительным для установления диагноза. Таким образом, полученные результаты классических тестов не всегда позволяли однозначно дифференцировать надпочечниковую и гипофизарную форму СК и были необходимы дополнительные тесты и критерии для дифференциальной диагностики форм синдрома Кушинга.

Данные по экскреции свободных кортикостероидов с мочой, полученных методом ВЭЖХ у больных СКН и СКГ представлены в табл. 2.

У всех пациентов с синдромом Кушинга получено увеличение UFF, UFE и их соотношения (UFF/UFE), которое

было больше у больных СКГ (больше 0,8,) в сравнении с СКН ($p=0,012$). Также у пациентов с СКГ получено снижение соотношения $6\beta\text{ОНF}/\text{UFF}$ по сравнению с ГК. В группе больных с СКГ при проведении ПДТ с 2 мг отмечалось снижение экскреции метаболитов глюкокортикоидов UFF ($p=0,0006$) и UFE ($p=0,02$) в сравнении с фоновыми показателями (табл. 2). После ПДТ с 8 мг у них получено уменьшение экскреции UFF [88 (74-95) %] более чем на 70% и экскреции UFE [76 (64-79%)] более чем на 60%. У пациентов с СКН значимых изменений в ЭМ кортикостероидов при проведении подавляющих тестов не получено. По данным ROC анализа установлена 100% чувствительность и 95% специфичность снижения экскреции UFF (>70%) и UFE (>60%) после ПДТ с 8 мг для дифференциальной диагностики СКН и СКГ. Площади под кривой (AUC) составили 0,99 для UFF и 1,0 – для UFE.

Методом ГХ-МС у больных с синдромом Кушинга была изучена метаболомика андрогенов, глюкокортикоидов и их предшественников. Основные результаты представлены в табл. 3-6.

Метаболомика андрогенов. У пациентов с СКГ по сравнению с СКН было получено значимое увеличение экскреции многих андрогенов и их метаболитов, а именно DHEA ($p<0,0001$) и его метаболитов (dA2-17 β , $p=0,02$, 16 α -ОН-DHEA-3 α , $p=0,0009$, 16 α -ОН-DHEA-3 β , $p=0,003$, 16-охо-dA2, $p=0,001$, dA3, $p=0,001$), а также ЭМ андростерона (An) ($p=0,003$), Et ($p<0,0001$). В группе больных с СКН уровни этих андрогенов и их метаболитов были снижены по сравнению с показателями ГК. ЭМ метаболитов андростендиона (11-ОН-An, 11-ОН-Et и 11-охо-Et) была повышена как у больных СКН, так и у больных СКГ (табл.3).

Метаболомика прогестиннов. У всех больных с СКГ получено увеличение ЭМ 17-ОН-прегнанолон (17P), 11-охо-прегнандиола (11-охо-P2), 11-охо-прегнантриола (11-охо-P3) и 3 α ,16,20-прегнентриола (3 α ,16,20-dP3). У пациентов с СКГ дополнительно была повышена ЭМ P2, P3, прегнандиола (dP2) и 3 α ,17,20-прегнентриола (dP3) в сравнении с ГК (табл. 3).

Таблица 1

Функциональное состояние гипофизарно-адреналовой системы у больных с синдромом Кушинга надпочечникового генеза и у пациентов с синдромом Кушинга гипофизарного генеза по данным иммунохимического анализа

Показатель	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)		
	Группа контроля, n=25	Пациенты с СКН, n=38	Пациенты с СКГ, n=42
АКТГ, пг/мл	28 (21-39)	3,0 (3,0-8,5)*	54 (38-69)*
Кортизол 9 ч (Ку), нмоль/л	357 (321-426)	628 (496-692)*	663 (465-835)*
Кортизол в 21 ч (Кв), нмоль/л	140 (125-165)	532 (371-628)*	493 (360-557)*
Соотношение Кв/Ку* 100, %	38 (29-45)	87 (73-101)*	79 (63-96)*
Кортизол после пробы с 1 мг дексаметазона, нмоль/л	32 (24-40)	448 (273-563)*	424 (286-506)*
Кортизол после пробы с 2 мг дексаметазона, нмоль/л	38 (30-47)	505 (284-633)*	418 (181-595)*
Кортизол после пробы с 8 мг дексаметазона, нмоль/л		555 (462-651) $p_1=0,78$ $p_2=0,37$	136 (67-343) $p_1=0,0004$ $p_2=0,008$
Свободный кортизол в слюне, нмоль/л	6 (3-9)	29 (18-36)*	27 (19-40)*
ДЭА-сульфат, мкг/мл	1,5 (1,0-1,7)	0,2 (0,1-0,4)*	1,9 (0,7-4,3)

Примечание. * – $p<0,0001$ – достоверность различий показателей пациентов с СКН и СКГ в сравнении с показателями группы контроля. p_1 – достоверность различий уровня кортизола после пробы с 8 мг дексаметазона с уровнем кортизола после пробы с 1 мг дексаметазона, p_2 – достоверность различий уровня кортизола после пробы с 8 мг дексаметазона с уровнем кортизола после пробы с 2 мг дексаметазона.

Таблица 2

Экскреция свободных кортикостероидов с мочой в динамике проведения пробы с дексаметазоном у пациентов с синдромом Кушинга гипофизарного генеза и синдромом Кушинга надпочечникового генеза по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии

Показатели	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)		
	Группа контроля, n=25	Пациенты с СКГ, n=42	Пациенты с СКН, n=38
6β-гидроксикортизол (6βОНФ), мкг/24 ч	110 (65-200)	244 (74-467)**	303 (155,3-603,1)**
Свободный кортизол (UFF), мкг/24 ч	22 (15-24)	170 (89-332)**	96,1 (50,2-281)**
Свободный кортизон (UFE), мкг/24 ч	50 (38-59)	227 (134-277)**	207,4 (131,7-385)**
Соотношение UFF/UFE	0,4 (0,3-0,5)	1,1 (0,8-1,3)**	0,55 (0,4-0,8)*
Соотношение 6βОНФ/UFF	6,3 (4,4-8,9)	1,5 (0,6-2,4)**	2,1 (0,9-6,3)
UFF после пробы с 2 мг дексаметазона, мкг/24 ч	4,2 (3,5-5,5)	72 (32-127)** p=0,0006	47,9 (24,4-99,6)** p=0,81
UFE после пробы с 2 мг дексаметазона, мкг/24 ч	8,5/7,1-9,3	127 (70-193)** p=0,02	128,7 (41,3-290,6)** p=0,87

Примечание. * - p<0,05 ** - p<0,0001 – достоверность различий показателей пациентов с СКН и СКГ в сравнении с показателями группы контроля. p – достоверность различий UFF и UFE после ПДТ с 2 мг в сравнении с фоновыми показателями.

Таблица 3

Экскреция андрогенов и их предшественников с мочой у пациентов с синдромом Кушинга надпочечникового генеза и гипофизарного генеза по данным газовой хромато-масс-спектрометрии

Показатели	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅), мкг/24 ч		
	Группа контроля, n=25	Пациенты с СКГ, n=42	Пациенты с СКН, n=38
Андростерон (An)	773 (561-1154)	747 (365-1268)	213 (86-365)**
Этиохоланолон (Et)	667 (559-1152)	1701 (786-2321)**	341 (220-726)*
Андростендиол-17β (17β-dA2)	97 (62-109)	202 (108-275)**	70 (15-175)
Дегидроэпиандростерон (DHEA)	152 (55-228)	254 (80-524)	10 (9-11)***
16-ОН-DHEA-3α	123 (51-196)	175 (45-308)	9 (9-68)*
16-ОН-DHEA-3β	91 (29-169)	345 (73-698)	9 (9-56)*
11-охо-Et	172 (98-150)	770 (307-1157)***	432 (172-1081)*
11-ОН-андростерон	369 (280-736)	1484 (785-3628)***	1142 (428-1930)*
11-ОН-этиохоланолон	219 (164-277)	1341 (787-2459)***	710 (136-2115)*
16-охо-андростендиол	25 (19-50)	114 (55-143)**	9 (7-55)
Андростентриол	175 (131-288)	629 (207-1042)**	82 (32-392)
17-ОН-прегнанолон (17P)	55 (52-200)	188 (142-361)**	325 (91-412)**
Прегнандиол (P2)	591 (321-789)	1067 (731-1780)*	1020 (349-1780)
Прегнантриол (P3)	415 (360-506)	729 (446-1092)*	640 (301-1193)
11-охо-P2	65 (25-110)	226 (114-468)**	272 (72-627)*
11-охо-P3	15 (12-20)	110 (66-331)***	92 (63-280)*
Прегнендиол (dP2)	264 (200-445)	555 (346-762)**	522 (268-899)
16-ОН-прегнендиол	138 (113-165)	386 (210-658)***	264 (141-430)**
Прегнентриол (dP3)	204 (105-293)	353 (139-460)*	262 (105-354)

Примечание. * - p<0,05, ** - p<0,001, *** - p<0,0001 – достоверность различий показателей пациентов с СКН и СКГ в сравнении с показателями группы контроля.

Метабономика глюкокортикоидов. У всей группы больных синдромом Кушинга выявлено повышение экскреции метаболитов биологически активных глюкокортикоидов, представленных в таблице (табл.4). Отличие при разных формах СК было получено в экскреции метаболитов ТНС и 5α-ТНЕ, которые были, соответственно ниже (p=0,04) и выше (p=0,02) при СКГ в сравнении с показателями пациентов СКН.

При проведении многофакторного анализа достоверные различия показателей СКН и СКГ были получены для фактора 1 (p<0,0001), значимыми переменными которого были DHEA, dA2-17β, 16-ОН-DHEA, Et, 11-охо-Et, 11-ОН-An, 11-ОН-Et, dP3 и ТНЕ с факторными нагрузками 0,70-0,91. Для фактора 3 (p=0,0037) значимыми переменными были P2, dP2 и 3α,16,20-dP3 с факторными

нагрузками 0,58-0,89, а для фактора 4 (p=0,0003) с факторными нагрузками (0,53-0,69) значимыми переменными были глюкокортикоиды (ТНС, сумма α-кортола и β-кортола) и андрогены (16-охо-dA2, An, dA3).

У большинства пациентов с синдромом Кушинга получены отклонения в соотношениях метаболит/субстрат, что может свидетельствовать об изменениях активности ферментов стероидогенеза. Так, уменьшение соотношений An/Et и 5α-ТНФ/5β-ТНФ, полученные у больных с синдромом Кушинга, могут характеризовать увеличение активности 5β-редуктазы (табл. 5). В группе больных СКГ отмечалось увеличение соотношения (5β-ТНФ+5α-ТНФ+α-cortol+β-cortol) / (ТНЕ+5α-ТНЕ+α-cortolon+β-cortolon), что в пользу снижения активности 11β-гидроксистероиддегидрогеназы (ГСДГ)

Таблица 4

Экскреция глюкокортикоидов с мочой у пациентов с синдромом Кушинга надпочечникового генеза и гипофизарного генеза по данным газовой хромато-масс-спектрометрии

Показатели	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅), мкг/24 ч		
	Группа контроля, n=25	Пациенты с СКГ, n=42	Пациенты с СКН, n=38
Тетрагидро-11-дезоксикортизол (ТНС)	59 (30-111)	212 (75-354)**	361 (209-580)**
Тетрагидрокортизон (ТНЕ)	1684 (1193-2087)	4084 (2571-6224)***	4109 (3231-4845)***
allo-ТНЕ	50 (35-88)	271 (100-486)**	100 (55-150)*
Тетрагидрокортикостерон (ТНВ)	63 (35-87)	343 (156-704)***	286 (204-846)***
allo-ТНВ	66 (30-120)	199 (55-670)**	466 (135-759)**
Тетрагидрокортизол (ТНФ)	634 (556-896)	3454 (2020-5477)***	2595 (1800-4086)***
allo-ТНФ	477 (314-764)	1374 (777-2806)***	1195 (533-2116)*
Тетрагидро-11-дегидрокортикостерон (ТНА)	59 (36-107)	39 (20-100)	72 (38-162)
α-кортолон	370 (235-596)	1066 (439-1701)***	1137 (746-1453)***
β-кортолон	225 (148-318)	573 (342-1101)***	831 (491-1037)***
α-кортол+ β-кортол	25 (22-50)	115 (68-230)**	178 (69-394)**

Примечание. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$, *** - $p < 0,0001$ – достоверность различий показателей пациентов с СКН и СКГ в сравнении с показателями группы контроля.

Таблица 5

Метаболизма андрогенов и глюкокортикоидов у пациентов с синдромом Кушинга надпочечникового генеза и гипофизарного генеза по данным газовой хромато-масс-спектрометрии

Показатели	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)		
	Группа контроля, n=25	Пациенты с СКГ, n=42	Пациенты с СКН, n=38
An/Et	1,3 (1,2-1,4)	0,5 (0,3-0,7)***	0,5 (0,3-1,3)**
allo-ТНФ/ ТНФ	0,9 (0,6-1,2)	0,4 (0,2-0,7)***	0,4 (0,2-0,7)***
ТНФ/ТНЕ	0,35 (0,33-0,45)	0,9 (0,7-1,1)***	0,7 (0,5-1,0)***
(ТНФ+allo-ТНФ)/ТНЕ	0,7 (0,6-0,8)	1,2 (1,0-1,6)***	1,0 (0,7-1,5)*
(ТНФ+allo-ТНФ+α-cortol+β-cortol) / (ТНЕ+allo-ТНЕ+α-cortolon+β-cortolon)	0,5 (0,4-0,7)	0,9 (0,7-1,1)**	0,7 (0,5-1,0)
ТНВ/ТНА	0,9 (0,7-1,2)	7,7 (4,1-13,3)***	3,1 (1,4-6,9)***
(ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/ТНС	93 (44-152)	47 (36-76)	22 (19-36)***

Примечание. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$, *** - $p < 0,0001$ – достоверность различий показателей пациентов с СКН и СКГ в сравнении с показателями группы контроля. p – достоверность различий показателей пациентов с СКГ с показателями больных СКН.

Таблица 6

Основные пороговые значения гормональных показателей, полученных различными технологиями, для дифференциальной диагностики синдрома Кушинга надпочечникового генеза и гипофизарного генеза

Показатель	СКН	СКГ
Иммунохемилюминесцентный анализ		
АКТГ в 9 ч, пг/мл	Меньше 9,0	Больше 40
Дегидроэпиандростерон-сульфат, мкг/24 ч	Меньше 0,4	Больше 0,7
Снижение уровня кортизола в сыворотке крови после ПДТ с 8 мг	Меньше 20%	Больше 50%
Высокоэффективная жидкостная хроматография		
Снижение экскреции UFF после ПДТ с 8 мг (ВЭЖХ)	Меньше 40%	Больше 70%
Снижение экскреции UFE после ПДТ с 8 мг (ВЭЖХ)	Меньше 40%	Больше 60%
Соотношение UFF/ UFE	Меньше 0,8	Больше 0,8
Газовая хромато-масс-спектрометрия		
Дегидроэпиандростерон (DHEA), мкг/24 ч	Меньше 15	Больше 80
Метаболиты DHEA, мкг/24 ч	16-ОН-DHEA-3β < 60 16-охо-dA2 < 55	16-ОН-DHEA-3β > 70 16-охо-dA2 > 55
Этиохоланолон, мкг/24 ч	Меньше 700	Больше 700
Соотношение (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ) / ТНС	Меньше 36	Больше 36

2 типа. У пациентов с СКН были получены признаки уменьшения активности 11β-гидроксилазы: увеличение ЭМ ТНС, гексагидро-11-дезоксикортизола [90 (58-

193) мкг/24 ч], снижение соотношения (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/ТНС (< 36) в сравнении с показателями ГК и больными СКГ.

На основании сочетания результатов иммунохимического анализа, исследования СПМ методами ВЭЖХ и ГХМС были получены основные пороговые значения дифференциальной диагностики СКН и СКГ (табл. 6).

Заключение. При диагностике синдрома Кушинга и его форм неоднозначные результаты традиционных тестов нередко требовали поиска дополнительных критериев дифференциальной диагностики. В данной работе мы использовали сочетание тестов, основанных на методе ИХЛА, с исследованием СПМ методами ВЭЖХ и ГХ-МС, что способствовало улучшению ранней и дифференциальной диагностики СКН и СКГ. Методом ГХ-МС у больных выявлена различная метаболика андрогенов, глюкокортикоидов и их предшественников, получены характерные СПМ и дополнительные дифференциально-диагностические признаки синдрома Кушинга гипофизарного и надпочечникового генеза. Полученные нами признаки при СКГ как снижение экскреции UFF и UFE с мочой после ПДТ с 8 мг, увеличение экскреции с мочой метаболитов андростендиона, ДНЕА и его метаболитов, соотношений (5β -ТНФ+ 5α -ТНФ+ТНЕ)/ТНС (>36) и UFF/UFE ($>0,8$) в сравнении с соответствующими показателями у пациентов с СКН в сочетании с классическими тестами повысили специфичность при диагностике различных форм СК до 100%. Полученные методами ВЭЖХ и ГХ-МС пороговые значения гормональных показателей имеют особое значение в лабораторной диагностике СКН и СКГ при пограничных значениях классических тестов и сомнительном диагнозе. Следует подчеркнуть, что точная своевременная диагностика формы заболевания чрезвычайно важна для определения вида хирургического лечения пациента, а именно проведения аденомэктомии при гипофизарной форме или адrenalэктомии при надпочечниковой форме синдрома Кушинга

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 7,8, 10-14, 16, 17 см. REFERENCES)

- Мельниченко Г.А., Дедов И.И., Беляя З.Е., Рожинская Л.Я., Вагапова Г.Р., Волкова Н.И., и др. Болезнь Иценко-Кушинга: клиника, диагностика, дифференциальная диагностика, методы лечения. *Проблемы эндокринологии*. 2015; 61 (2): 55-7.
- Беляя Ж.Е., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., и др. Определение уровня кортизола в слюне на автоматическом иммунохимическом анализаторе COBAS E601 («ROCHE») для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 12: 7-12.
- Григорян К., Шафигуллина З.Р., Кухианидзе Е.А., Ворохобина Н.В., Великанова Л.И., Шустов С.Б., Кузнецова А.В. Сочетание классических тестов и высокоэффективной жидкостной хроматографии кортикостероидов в диагностике субклинического синдрома Кушинга. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2017; 57(1):7-11.
- Шафигуллина З.Р., Великанова Л.И., Ворохобина Н.В., Лисицын А.А., Кухианидзе Е.А., Стрельникова Е.Г. и др. Диагностическое значение стероидных профилей биологических жидкостей у больных синдромом Иценко – Кушинга. *Проблемы эндокринологии*. 2015; 61 (4): 4-8.
- Великанова, Л.И., Шафигуллина З.Р., Ворохобина Н.В., Григорян К., Лисицын А.А., Обедкова Е.В. Дифференциальная диагностика инциденталом коры надпочечников различными лабораторными технологиями. *Вестник СЗГМУ*. 2015; 7 (4): 52-8.

REFERENCES

- Lacroix A., Feelders R.A., Stratakis C.A., Nieman L.K. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2015; 386 (9996):913–27.
- Nieman L.K., Biller B.M.K., Findling J.W., Newell-Price J., Savage M.O., Stewart P.M., Montori V.M. The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(5):1526–40.
- Viardot A., Huber P., Puder J.J., Zulewski H., Keller U., Müller B. Reproducibility of nighttime salivary cortisol and its use in the diagnosis of hypercortisolism compared with urinary free cortisol and overnight dexamethasone suppression test. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90 (10): 5730-6.
- Mel'nichenko G.A., Dedov I.I., Belaya Z.E., Rozhinskaya L.Y., Vagapova G.R., Volkova N.I. et al. Cushing's disease: the clinical features, diagnostics, differential diagnostics, and methods of treatment. *Problemy endokrinologii*. 2015; 61 (2): 55-7. (in Russian)
- Belaya Z.E., Il'in A.V., Melnichenko G.A., Rozhinskaya L.Y., Dragunova N.V., Dzeranova L.K. et al. Determination of cortisol level in saliva on an automatic immunochemical analyzer COBAS E601 ("ROCHE") for the diagnosis of endogenous hypercorticism among obese patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2011; 12: 7-12. (in Russian)
- Grigoryan K., Shafigullina Z.R., Kukhianidze E.A., Vorokhobina N.V., Velikanova L.I., Shustov S.B. et al. Combination of classical tests and high-performance liquid chromatography for glucocorticoids determination in the diagnostic subclinical Cushing's syndrome. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii*. 2017; 57 (1): 7-11. (in Russian)
- Penning T.M., Lee S.H., Jin Y., Gutierrez A., Blair I.A. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) of steroid hormone metabolites and its applications. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2010; 121 (3-5): 546-55.
- McDonald J.G., Matthew S., Auchus R.J. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases. *Horm. Cancer*. 2011; 2 (6): 324–32.
- Shafigullina Z.R., Velikanova L.I., Vorokhobina N.V., Lisitsin A.A., Kukhianidze E.A., Strelnikova E.G. et al. The diagnostic importance of steroid profiles of biological fluids of patients with Cushing's syndrome. *Problemy endokrinologii*. 2015; 61 (4): 4-8. (in Russian)
- Taylor N.F., Chan A.O. New strategies for determining steroid metabolic disorders—panelling vs profiling. *Clin. Chem.* 2012; 58 (8):1262-63.
- Kotlowska A., Puzyn T., Sworzczak K., Stepnowski P., Szefer P. Metabolomic biomarkers in urine of Cushing's syndrome patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 294–308.
- Hines J.M., Bancos I., Bancos C., Singh R.D., Avula A.V., Young W.F. et al. High-Resolution, Accurate-Mass (HRAM) Mass Spectrometry Urine Steroid Profiling in the Diagnosis of Adrenal Disorders. *Clin. Chem.* 2017; 63(12):1824–35.
- Eisenhofer G., Masjkur J., Peitzsch M., Di Dalmazi G., Bidlingmaier M., Grüber M. et al. Plasma steroid metabolome for diagnosis and subtyping patients with Cushing syndrome. *Clin. Chem.* 2018; 64 (3): 1-11.
- Zografos G.N., Perysinakis I., Vassilatou E. Subclinical Cushing's syndrome: current concepts and trends. *Hormones (Athens)*. 2014; 13 (3): 323–37.
- Velikanova L.I., Shafigullina Z.R., Vorokhobina N.V., Grigoryan K., Lisitsin A.A., Obedkova E.V. Differential diagnostics of adrenocortical incidentalomas with different laboratory technologies. *Vestnik Severo-Zapadnogo meditsinskogo universiteta*. 2015; 7 (4): 52-8.
- Kerkhofs T.M., Kerstens M.N., Kema I.P., Willems TP, Haak H.R. Diagnostic value of urinary steroid profiling in the evaluation of adrenal tumors. *Horm. Cancer*. 2015; 6 (4): 168-75.
- Velikanova L.I., Strelnikova E.G., Obedkova E.V., Krivokhizhina N.S., Shafigullina Z.R., Grigoryan K. et al. Generation of urinary steroid profiles in patients with adrenal incidentaloma using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 2016; 71 (7): 748-54.

Поступила 01.03.20

Принята к печати 02.04.20