УДК 616.432-006.55:575.21

ХОЛОВА Д.Ш., ХАЛИМОВА З.Ю., УРМАНОВА Ю.М., АЛИЕВА Д.А., АЛИМУХАМЕДОВА Г.О.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эндокринологии МЗ РУз, г. Ташкент

Педиатрический медицинский институт, г. Ташкент, Узбекистан

СОСТОЯНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА И АНГИОГЕНЕЗА У БОЛЬНЫХ С НЕАКТИВНЫМИ АДЕНОМАМИ ГИПОФИЗА

Резюме. В статье авторы анализируют данные 71 пациента с неактивной аденомой гипофиза (НАГ) в возрасте от 18 до 70 лет. Выявлено отсутствие корреляционной связи между снижением показателя активности фермента eNOS и показателями регуляции про- и антиапоптоза, ангиогенеза, что свидетельствует о независимости этих процессов в механизмах формирования НАГ. У больных с НАГ и неотягощенным семейным анамнезом возрастает показатель корреляционной связи eNOS с VEGFR-2, что свидетельствует об усилении процессов торможения ангиогенеза и пролиферативной активности ткани. Проведенные исследования не позволяют установить зависимость выявленных нарушений у больных с микроаденомой и макроаденомой, различия по полу, длительности заболевания, наследственно-генетическим признакам и т.д. Это подчеркивает необходимость проведения дальнейших исследований в данном направлении.

Ключевые слова: неактивная аденома гипофиза, апоптоз, ангиогенез.

Введение

Гормонально-неактивные аденомы гипофиза (НАГ) представляют собой аденомы гипофиза, протекающие без клинических проявлений гиперсекреции гипофизарных и периферических гормонов. Объединение всех этих отличающихся по этиологии процессов продиктовано тем, что они вызывают сходные клинические проявления и синдромы [1, 2].

В настоящее время развитие как НАГ, так и других аденом гипофиза связывается с моноклональными соматическими мутациями. В качестве факторов инициации клеточной трансформации предполагается влияние гормонов гипоталамуса и нейротрансмиттеров [3, 4]. Многие гормонально-неактивные аденомы гипофиза, которые клинически себя не проявляют гиперпродукцией какого-либо гормона, на самом деле могут продуцировать гликопротеидные гормоны (гонадотропины, α -субъединица гликопротеидных гормонов), выявляемые при иммуногистохимическом исследовании удаленной опухоли. Характер роста НАГ варьирует от весьма медленного, замершего на стадии микроаденомы, до бурного, с быстрым прогрессированием гипофизарной недостаточности и неврологической симптоматикой [5, 6].

На долю НАГ приходится 25 % всех аденом гипофиза (самая частая аденома гипофиза); среди опухолей

с супраселлярной локализацией 70 % всех аденом — гормонально-неактивные аденомы гипофиза [2, 3]. По аутопсийным данным, распространенность микроинцидентальной гипофиза достигает 10–25 %. Частота новых случаев клинически значимых гормонально-неактивных аденом гипофиза ориентировочно составляет 6 на 1 млн населения в год [10].

Генетическая детерминация нейроэндокринных заболеваний, являющихся причиной наследственной предрасположенности к НАГ и его клиническим манифестациям, подтверждается результатами популяционных и генетических исследований. Однако надежные и доступные методы молекулярно-генетической стратификации риска развития НАГ в клинической нейроэндокринологической практике в настоящее время не разработаны и нуждаются в целенаправленном хорошо спланированном изучении [7, 8].

В последние годы появились работы по исследованию взаимосвязи полиморфизмов генов eNOS с

Адрес для переписки с авторами:

Холова Д.Ш.

E-mail: zamnar777@mail.ru

© Холова Д.Ш., Халимова З.Ю., Урманова Ю.М., Алиева Д.А., Алимухамедова Г.О., 2015

© «Международный эндокринологический журнал», 2015

© Заславский А.Ю., 2015

Таблица 1. Распределение больных с НАГ по полу и группам

Признаки	Всего, n = 71		Первая группа, n = 50		Вторая группа, n = 21	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Мужчины	19	26,8	9	18,0	10	47,6
Женщины	52	73,2	41	82,0	11	52,4
Возраст (лет):						
От 18 до 30	13	18,3	5	10,0	8	38,1
До 35	17	23,9	10	20,0	7	33,3
До 40	18	25,4	13	26,0	5	23,8
До 45	11	15,5	10	20,0	1	4,87
До 50	8	11,3	8	16,0	–	–
55 и более	4	5,6	4	8,0	–	–

поражением органов-мишеней [9, 10]. Установлено, что NO, экспрессия которого контролируется NO-синтазами, играет важную роль в эндотелийзависимой вазодилатации и при многих патологических состояниях обнаруживается дисциркуляторная энцефалопатия. В связи с этим интерес исследователей привлекает структурная организация гена NO-синтазы. Мутация в данном гене теоретически может быть одной из детерминант НАГ и его осложнений [11].

В фундаментальных исследованиях установлено, что уровень активности факторов ангиогенеза (ЭТ-1, VEGF, VEGFR-2) во многом определяется степенью активности eNOS, концентрацией в системном кровотоке факторов апоптоза — цитохрома С и p53 [12].

Цель исследования — изучить показатели, характеризующие состояние процессов апоптоза (цитохром С, p53) и ангиогенеза (ЭТ-1, VEGF, VEGFR-2), активность eNOS у больных с неотягощенным семейным анамнезом НАГ.

Материал и методы исследования

В исследование включен 71 больной НАГ с интраклеточной микроаденомой (размер опухоли до 10 мм). Пациенты были в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст $44,50 \pm 3,85$ года). Наибольшее число больных с НАГ приходится на возраст от 35 (23,9 %) до 40 (25,4 %) лет и в меньшей степени — до 30 (18,3 %) и свыше 55 (5,6 %) лет. При этом несколько преобладали женщины — 41 (57,7 %) случаев. Биохимические исследования крови проводили не только у больных с НАГ, но и у здоровых лиц (конт-рольная группа) — 20 добровольцев (10 мужчин и 10 женщин), давших информативное согласие на проведение исследований. Средний возраст пациентов контрольной группы составил $43,6 \pm 4,5$ года.

Согласно поставленной цели и задачам исследования больные с НАГ были разделены на две альтернативные группы: первая группа — 50 (70,4 %) пациентов без отягощенного семейного анамнеза и вторая группа — 21 (29,6 %) больной с отягощенным семейным анамнезом, в том числе с панмиксией — 9 (2,7 %) и инбридингом — 12 (16,9 %).

В табл. 1 приведено распределение больных по полу и группам.

Диагноз НАГ верифицировали на основании тщательно собранного анамнеза, изучения динамики тече-

ния заболевания, результатов магнитно-резонансной томографии (МРТ), а также определения в сыворотке крови содержания гипофизарных гормонов: пролактина (ПРЛ), лютеинизирующего (ЛГ), фолликулостимулирующего (ФСГ), соматотропного (СТГ), аденокортикотропного (АКТГ) и тиреотропного гормона (ТТГ). Концентрацию ПРЛ, ЛГ, ФСГ, СТГ, АКТГ и ТТГ определяли в сыворотке крови на твердофазном иммуноферментном анализаторе.

Одновременно в сыворотке крови проводили оценку генетического полиморфизма eNOS. Геномную ДНК из венозной крови обследованных больных выделяли с помощью хлороформной экстракции. В работе использовали термостабильную ДНК-полимеразу Taq и рестриктазу NcoI, полученную из НПО «Биотех» (Москва), рестриктазу Bst DEJ — из НПО «Сибэнзим» (Новосибирск), олигонуклеидные праймеры — из НПО «Сипол» (Москва).

МРТ-параметры изучали на приборе Siemens-1,5T (Германия).

Статистический анализ проведен в программной среде Microsoft Windows с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2003 и Statistica version 6.0, 2003. Полученные данные отражены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение вариационного ряда, m — стандартная ошибка среднего значения. Достоверность различий между независимыми выборками определялась по методу Манна — Уитни и Стьюдента, в оценке динамики в парных рядах использован критерий Вилкоксона. Критерий t Стьюдента вычисляли с использованием формулы:

$$t = \frac{\bar{M}_1 - \bar{M}_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

где M — среднее, m — стандартная ошибка среднего. Полученную величину выверяли по таблице Стьюдента и определяли критерий достоверности. Достоверность различий между средними принимали при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В наблюдениях установлено, что снижение eNOS на 15,3 % ($p < 0,05$), повышение ЭТ-1 на 8,3 % ($p > 0,05$), VEGF — на 11,6 % ($p > 0,05$), VEGFR-2 — на 7,6 %

($p > 0,05$), цитохрома С — на 9,6 % ($p > 0,05$), p53 — на 4,2 % ($p > 0,1$) у 9 больных с микроаденомой (размером до 10 мм) и неотягощенным семейным анамнезом НАГ коррелировали с такими симптомами заболевания, как половые нарушения, головные боли, вегетативные кризы. С увеличением размеров опухоли у 11 больных эта связь усиливалась. У трех пациентов с макроаденомами (> 10 мм), несмотря на то что показатели маркеров ангиогенеза и апоптоза были нарушенными, клиническая симптоматика НАГ не проявлялась.

Вместе с тем не выявлена четкая закономерность между изменениями уровня активности маркеров дисфункции эндотелия, ангиогенеза и апоптоза и размерами опухолевого процесса у больных с неотягощенным семейным анамнезом НАГ. В то же время установлена четкая зависимость между нарастанием факторов дисфункции эндотелия, ангиогенеза и апоптоза и показателями клинического течения НАГ.

В проведенных исследованиях показано, что у больных с НАГ по сравнению с пациентами контрольной группы отмечается значимое повышение в плазме крови факторов регуляции процесса апоптоза: увеличение уровня проапоптотического белка p53 на 87,5 % ($p < 0,001$), активация на фоне депрессии базального уровня eNOS — на 25,1 % ($p < 0,01$) и отсутствие реакции факторов регуляции процессов ангиогенеза — фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и его растворимого рецептора VEGFR2, параметры которых практически не отличались от таковых в контроле — 3,8 и 4,6 % ($p > 0,05$).

Одновременно нами выявлена прямая слабая корреляционная связь между активностью eNOS и показателями VEGF (0,81; $p < 0,001$), VEGFR2 (0,85; $p < 0,001$) и p53 (0,80; $p < 0,001$). Обнаружена сильная связь между уровнем VEGF и показателями VEGFR-2 и p53 (0,87; $p < 0,001$ и 0,80; $p < 0,001$), VEGFR2 и p53 (0,77; $p < 0,001$) и практически полное отсутствие связи между показателем p53 и уровнем eNOS (0,13; $p > 0,5$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных с НАГ в отличие от контроля показатели связи eNOS с VEGFR2 меняют положительный знак на отрицательный. В контроле эта связь отсутствует, а у пациентов с НАГ она сильна. В контроле также отсутствует связь между VEGF, p53 и VEGFR-2, а у исследованных больных она оказалась сильной.

Таким образом, можно заключить, что у пациентов с НАГ отмечается дисрегуляция продукции NO, так как угнетается активность eNOS. Снижение активности eNOS не зависит от изменяющихся величин VEGF, VEGFR-2, поскольку нами выявлена корреляция между этими показателями. Вместе с тем обращает на себя внимание тот факт, что у больных с НАГ повышение проапоптотического фактора p53 происходит на фоне сохранения высокой корреляционной связи eNOS с p53, который, по-видимому, тормозит прогрессирование опухолевого процесса у больных с НАГ.

Проведенные нами исследования не позволяют установить зависимость выявленных нарушений у больных с микроаденомой и макроаденомой от пола,

длительности заболевания, наследственно-генетических признаков и т.д. Нет данных о связи этих показателей с клиническим течением, показателями гормональной активности гипофиза. Все это подчеркивает необходимость проведения дальнейших исследований в данном направлении.

Выводы

1. У больных с гормонально-неактивными аденомами гипофиза угнетается активность eNOS, что может лежать в основе дисфункции эндотелия.

2. Угнетение активности eNOS происходит на фоне активации про- и антиапоптотических факторов, повышения уровня p53, незначительных изменений факторов, регулирующих процессы ангиогенеза (VEGF, VEGFR-2).

3. Выявлено отсутствие корреляционной связи между снижением показателя активности фермента eNOS и показателями регуляции про- и антиапоптоза, ангиогенеза, что свидетельствует о независимости этих процессов в механизмах формирования гормонально-неактивных аденом гипофиза.

4. У больных с гормонально-неактивными аденомами гипофиза возрастает показатель корреляционной связи eNOS с VEGFR-2, что свидетельствует об усилении процессов торможения ангиогенеза и пролиферативной активности ткани.

5. Установлено наличие высокой связи параметров VEGF и VEGFR-2 с показателями содержания белка апоптоза p53, что свидетельствует об их важности в механизмах торможения опухолевого процесса. Это достигается, по-видимому, за счет сохранения в пределах контрольных значений регуляторов ангиогенеза VEGF и VEGFR-2 в плазме крови больных с гормонально-неактивными аденомами гипофиза.

6. Выявлено, что у пациентов с гормонально-неактивными аденомами гипофиза в плазме крови наблюдается дисбаланс в содержании факторов эндотелиальной функции (eNOS), ангиогенеза (VEGF и VEGFR-2), проапоптоза (p53). Эти данные свидетельствуют о важности их в механизмах формирования болезни и о необходимости учета для мониторинга, дифференциальной диагностики, прогноза и разработки тактики индивидуализированного лечения.

Список литературы

1. Астафьева Л.И., Марова Е.И., Кадашев Б.А. и др. Сравнительное исследование пролактинов и гормонально-неактивных аденом гипофиза с умеренной гиперпролактинемией // Пробл. эндокринологии. — 2006. — № 3. — С. 30-33.
2. Кадашев Б.А. Аденомы гипофиза: клиника, диагностика, лечение / Под ред. проф. Б.А. Кадашева. — М.; Тверь: Триада-Х, 2007. — 368 с.
3. Надь Ю.Г. Особенности течения и клинических проявлений опухолей и инциденталом гипофиза, сопровождающихся гипо- или гиперпролактинемией // Вопр. онколог. — 2008. — № 6. — С. 734-738.
4. Пшеничкова М.Г. Роль генетических особенностей организма в устойчивости к повреждающим воздействиям и в

защитных эффектах адаптации // Пат. физиол. — 2011. — № 4. — С. 7-16.

5. Раевская Т.А., Гончарова С.А., Коновалова Н.П. и др. Влияние донора оксида азота, модулятора лекарственной устойчивости опухолей на гибель клеток и экспрессию белка p53 // Бюл. эксп. биол. и мед. — 2009. — № 4. — С. 401-403.

6. Симоненко В.Б., Дулин П.А., Маканич М.А. Нейроэндокринные опухоли: Руководство. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 240 с.

7. Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Березикова Е.Н. и др. Полиморфизм генов eNOS и iNOS при хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца // Кардиология. — 2010. — № 4. — С. 23-30.

8. Халимова З.Ю., Холова Д.Ш., Урманова Ю.М. и др. Изучение особенностей семейного наследования неактивных аденом гипофиза в Республике Узбекистан // Международ-

ный эндокринологический журнал. — 2013. — № 1 (49). — С. 33-41.

9. Чернова А.А., Никулина С.Ю., Шульман В.А. и др. Полиморфизм генов $\alpha 2\beta$ -адренергического рецептора и эндотелиальной NO-синтазы в генезе наследственного синдрома слабости синусового узла // Кардиология. — 2011. — № 6. — С. 55-59.

10. Чехонин В.П., Шеин С.А., Корчагина А.А. и др. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза // Вестн. РАМН. — 2012. — № 2. — С. 23-33.

11. Чумаков П.М. Белок P53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биол. химии. — 2007. — Т. 47. — С. 3-52.

12. Alexandr J.M., Bikkal B.M., Zervas N.T. Clinical nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin // J. Clin. Invest. — 2009. — Vol. 86, № 1. — P. 336-340.

Получено 18.09.15 ■

Холова Д.Ш., Халимова З.Ю., Урманова Ю.М., Алиева Д.А., Алимухамедова Г.О.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эндокринологии МОЗ РУз, м. Ташкент
Педиатрический медицинский институт, м. Ташкент, Узбекистан

Kholova D.Sh., Khalimova Z.Yu., Urmanova Yu.M., Aliieva D.A., Alimukhamedova H.O.

Republican Specialized Scientific and Practical Medical Centre for Endocrinology of Ministry of Healthcare of the Republic of Uzbekistan, Tashkent
Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan

СТАН ПОКАЗНИКІВ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ ТА АНГІОГЕНЕЗУ У ХВОРИХ ІЗ НЕАКТИВНИМИ АДЕНОМАМИ ГІПОФІЗА

Резюме. У статті автори аналізують дані 71 пацієнта з неактивною аденомою гіпофіза (НАГ) віком від 18 до 70 років. Виявлена відсутність кореляційного зв'язку між зниженням показника активності ферменту eNOS і показниками регуляції про- і антиапоптозу, ангиогенезу, що свідчить про незалежність цих процесів у механізмах формування НАГ. У хворих із НАГ та необтяженим сімейним анамнезом зростає показник кореляційного зв'язку eNOS із VEGFR-2, що свідчить про посилення процесів гальмування ангиогенезу і проліферативної активності тканини. Проведені дослідження не дозволяють установити залежність виявлених порушень у хворих із мікроаденомою і макроаденомою, відмінності за статтю, тривалістю захворювання, спадково-генетичними ознаками. Це підкреслює необхідність проведення подальших досліджень в цьому напрямку.

Ключові слова: неактивна аденома гіпофіза, апоптоз, ангиогенез.

STATE OF INDICATORS OF APOPTOSIS AND ANGIOGENESIS PROCESSES IN PATIENTS WITH INACTIVE PITUITARY ADENOMAS

Summary. In the article, the authors analyze data from 71 patients with inactive pituitary adenomas (IPA) aged 18 to 70 years. The absence of correlation between the decline in eNOS enzyme activity and parameters of pro- and antiapoptosis and angiogenesis regulation was found, indicating the independence of these processes in the mechanisms of IPA formation. In patients with IPA and without burdened family history, the index of eNOS and VEGFR-2 correlation increases that indicates an enhancement in the processes of inhibition of angiogenesis and proliferative activity of tissues. The studies did not establish the dependence of violations in patients with microadenomas and macroadenomas, differences by gender, duration of disease, hereditary genetic traits, etc. This underlines the need for further researches in this direction.

Key words: inactive pituitary adenomas, apoptosis, angiogenesis.