



Оригинальная статья

Исследование стероидных профилей мочи методом газовой хромато-масс-спектрометрии у больных аденокортикальным раком в динамике лечения

Великанова Л.И.¹ • Ворохобина Н.В.¹ • Шафигуллина З.Р.¹ • Бохан В.Ю.² • Стилиди И.С.² • Калугина В.В.¹ • Малеваная Е.В.¹ • Стрельникова Е.Г.¹ • Кушлинский Н.Е.²

Актуальность. Аденокортикальный рак (АКР) – редкое и агрессивное заболевание. Диагностические возможности исследования стероидных профилей мочи методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) у больных АКР после проведенного оперативного лечения оцениваются в единичных работах. Необходимо проведение углубленного исследования для поиска наиболее информативных маркеров рецидива заболевания.

Цель – изучить метаболизм стероидов мочи методом ГХМС у больных АКР в динамике лечения для выявления ранних признаков развития метастазов и рецидива заболевания.

Материал и методы. Обследовано 39 пациентов с АКР до операции и после проведения хирургического лечения – в раннем послеоперационном (до 1 года) и позднем послеоперационном (через 2–5 лет после операции) периодах. В период до 1 года после операции у 10 больных АКР метастазы отсутствовали. У 29 больных выявлены метастазы в легких и других органах: у 14 – в течение 1 года после операции, у 15 – через 2–5 лет. Группу контроля составили 25 больных с гормонально-неактивной аденомой коры надпочечников без злокачественного потенциала по данным гистологического исследования. Методом ГХМС исследовали стероидные

профили мочи на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS-QP2020.

Результаты. Методом ГХМС получены 16 основных биомаркеров АКР в дооперационном периоде: этиохоланолон, дегидроэпиандростерон (DHEA) и его метаболиты, прегнадиол, прегнантриол, 5-ene-прегнены и тетрагидро-11-дезоксикортизол (THS), экскреция с мочой которых была увеличена в сравнении с показателями больных с гормонально-неактивной аденомой ($p < 0,002$). Определен неклассический 5-ene-прегнен, 3 β ,16,20-прегнентриол (3 β ,16,20-dP3), экскреция с мочой которого более 500 мкг/сут характерна для больных АКР. Снижение экскреции с мочой THS ($p < 0,0001$) и 3 β ,16,20-dP3 ($p < 0,0001$), увеличение соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 ($p = 0,003$) в сравнении с показателями больных АКР до операции служат признаками отсутствия метастазов после операции. Отсутствие различий экскреции с мочой THS и соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 с соответствующими показателями больных АКР до операции ($p > 0,05$) служат признаками развития метастазов у больных АКР до 1 года после операции, рецидива заболевания через 2–5 лет после операции и проведения химиотерапии. Кроме этого, у больных АКР с метастазами до 1 года после операции повышена экскреция с мочой прогестагенов, а при

рецидиве заболевания после химиотерапии – экскреция с мочой DHEA и его метаболитов, которая не отличалась от показателей больных АКР до оперативного лечения ($p > 0,05$).

Заключение. Определение методом ГХМС экскреции с мочой THS, DHEA и его метаболитов, этиохоланола, 5-ene-прегненов, 3 β ,16,20-dP3 и соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 имеет наибольшее значение в мониторинге лечения АКР и ранней диагностике прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: аденокортикальный рак, послеоперационный период, метастазы, газовая хромато-масс-спектрометрия, метаболизм стероидов

Для цитирования: Великанова ЛИ, Ворохобина НВ, Шафигуллина ЗР, Бохан ВЮ, Стилиди ИС, Калугина ВВ, Малеваная ЕВ, Стрельникова ЕГ, Кушлинский НЕ. Исследование стероидных профилей мочи методом газовой хромато-масс-спектрометрии у больных аденокортикальным раком в динамике лечения. Альманах клинической медицины. 2021;49(4):277–284. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-041.

Поступила 08.07.2021; доработана 19.09.2021; принята к публикации 21.09.2021; опубликована онлайн 01.10.2021

Аденокортикальный рак (АКР) – редкое и агрессивное заболевание [1]. Частота рецидивов высока даже у пациентов после проведения радикального хирургического удаления (R0) опухоли [2, 3]. Современный подход к ведению данной группы пациентов предусматривает проведение компьютерной томографии органов грудной клетки, брюшной полости и малого таза каждые 3 месяца в течение первых 2 лет, затем каждые 3–6 месяцев в течение последующих 3 лет и далее – ежегодное обследование на протяжении не менее 5 лет [4].

Великанова Людмила Иосифовна – д-р биол. наук, профессор, заведующая научно-исследовательской лабораторией хроматографии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9352-4035>
✉ 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41, Российская Федерация.
Тел.: +7 (921) 379 32 95.
E-mail: velikanova46@gmail.com

Протокол наблюдения пациентов, основанный на методах лучевой диагностики, ассоциирован с высокой стоимостью, избыточной дозой ионизирующего излучения, и часто служит источником неточных данных на ранних стадиях рецидива заболевания [5]. Большинство аденокарцином относятся к гормонально-активным опухолям. Для них типично преобладание синтеза метаболитов предшественников стероидных гормонов, а не конечных продуктов стероидогенеза [6]. Эта особенность приписывается относительной дифференцировке опухолевых клеток [6, 7]. Большинство

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России; 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41, Российская Федерация



этих соединений не могут быть детектированы с помощью рутинных биохимических методов.

Анализ стероидных профилей мочи (СПМ) методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) может идентифицировать и количественно определить подавляющее большинство стероидов надпочечникового происхождения [6, 8]. Недавние ретроспективные исследования показали возможности использования СПМ в качестве инструмента дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований коры надпочечников [6–8]. При этом диагностический потенциал определения СПМ для выявления рецидива АКР у пациентов после радикального хирургического удаления первичной опухоли исследовали лишь в единичных работах [9–11]. Так, в 2020 г. V. Chortis и соавт. ретроспективно оценили возможности исследования СПМ у 135 пациентов после полного удаления гистологически подтвержденного АКР с целью раннего выявления рецидива заболевания [11]. Одним из важнейших выводов исследования было подтверждение значительного сходства между стероидным профилем пациента с рецидивом заболевания и стероидным профилем образца суточной мочи, собранной у того же больного в предоперационном периоде. Стероидными маркерами АКР оказались повышенные уровни тетрагидро-11-дезоксикортизола (THS), тетрагидро-11-дезоксикортикостерона (THDOC), прегнендиола (dP2), прегнентриола (dP3), прегнандиола (P2) и прегнантриола (P3). По данным авторов, концентрация вышеперечисленных стероидов в суточной моче на момент рецидива АКР была увеличена в меньшей степени в сравнении с предоперационным периодом. Ретроспективно при оценке серий слепых образцов суточной мочи эксперты могли выявить рецидив заболевания на этапе манифестации процесса, установленного с помощью лучевых методов исследования, с высокой чувствительностью в случаях, когда присутствовал образец мочи, собранный в предоперационном периоде [11]. Это подчеркивает важность получения предоперационного, базового образца мочи и последующих образцов с определенной частотой в динамике после проведенного хирургического вмешательства для персонализированного ведения пациентов. Таким образом, изучение метаболизма стероидов мочи методом ГХМС у больных АКР в динамике хирургического

Ворохобина Наталья Владимировна – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>

Шафигуллина Зульфия Ривгатовна – канд. мед. наук, доцент кафедры эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8292-8504>

Бохян Ваган Юрикович – д-р мед. наук, заведующий хирургическим отделением № 5 (эндокринной онкологии)²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9066-5190>

Стилиди Иван Сократович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

Калугина Валентина Викторовна – аспирант кафедры эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2812-6911>

Малеваная Екатерина Валерьевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории хроматографии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>

Стрельникова Елена Геннадьевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории хроматографии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1208-8092>

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

лечения представляет особую важность для выявления ранних признаков развития локального рецидива заболевания или метастазов.

Материал и методы

Обследовали пациентов в возрасте старше 18 лет с новообразованиями коркового вещества надпочечников – АКР или адренокортикальной аденомой по данным гистологического послеоперационного исследования удаленных опухолей. Мы проанализировали СПМ пациентов методом ГХМС до операции и после хирургического вмешательства. Обследование проводили в раннем послеоперационном (до 1 года) и позднем послеоперационном (от 2 до 5 лет) периодах. Медиана возраста 39 пациентов с АКР после хирургического удаления новообразования (сумма баллов более 3 по шкале L.M. Weiss [12]) составила 47 (41–60) лет. У 10 из них в раннем послеоперационном периоде метастазы обнаружены не были. У 29 больных выявлены метастазы в легких, печени и других органах: в раннем послеоперационном периоде до проведения химиотерапии – у 5, после химиотерапии – у 9, в позднем послеоперационном периоде до проведения химиотерапии – у 9, после химиотерапии с рецидивом заболевания – у 6 больных. Группу контроля составили 25 больных с гормонально-неактивной аденомой коры надпочечников (медиана возраста – 52 (47–61) года) без злокачественного потенциала по данным гистологического исследования.

СПМ исследовали методом ГХМС на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS-QP2020. Определено более 70 стероидов. Процедура пробоподготовки состояла из 3 этапов: проведение гидролиза конъюгатов стероидов с помощью фермента сульфатазы, полученной от *Helix pomatia*, жидкостная экстракция аналитов и их последующая дериватизация. Метоксиамина гидрохлорид и 1-(триметилсилил)имидазол использовали в качестве дериватизирующих агентов [13].

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного пакета STATISTICA for Windows (версия 10). Основные количественные характеристики исследованных показателей больных представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q₂₅–Q₇₅). Для сравнения результатов применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Статистически

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России; 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23, Российская Федерация



значимым считали критерий $p < 0,017$ с учетом поправки Бонферрони. Чувствительность и специфичность рассчитаны по программе MedCalc с использованием метода ROC-кривых (англ. receiver operating characteristic), в том числе площади под ROC-кривыми (англ. area under curve, AUC).

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России (протокол № 7 от 07.10.2020). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

В результате анализа СПМ методом ГХМС у больных АКР до операции определены 15 стероидов, важных для диагностики заболевания: TNS, андрогены (этиохоланолон (Et), дегидроэпиандростерон (DHEA), 16-ОН-DHEA-3 α , 16-ОН-DHEA-3 β , андростендиол-17 β (dA2-17 β), 16-охо-dA2, андростентриол (dA3)), прогестагены и их метаболиты (17-ОН-прегнанолон (17-ОНП), P2, P3, 17-ОН-прегненолон (17-ОН-dP), dP2, dP3, 3 α ,16,20-dP3). Повышение экскреции с мочой каждого показателя в сравнении с данными пациентов с гормонально-неактивной аденомой в сочетании с определением неклассических 5-ene-прегненов (16-ОН-dP, 21-ОН-dP, 21-ОН-dP2, 11-ОН-dP3, 3 β ,16,20-dP3, 3 β ,17,20-dP3) подтверждает наличие злокачественного процесса (табл. 1). У больных АКР экскреция с мочой основного неклассического 5-ene-прегнена, 3 β ,16,20-dP3, не определяемая у пациентов с аденокарциномой, была более 500 мкг/сут, соотношение 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 составило 1,8 (1,5–2,5) (см. табл. 1).

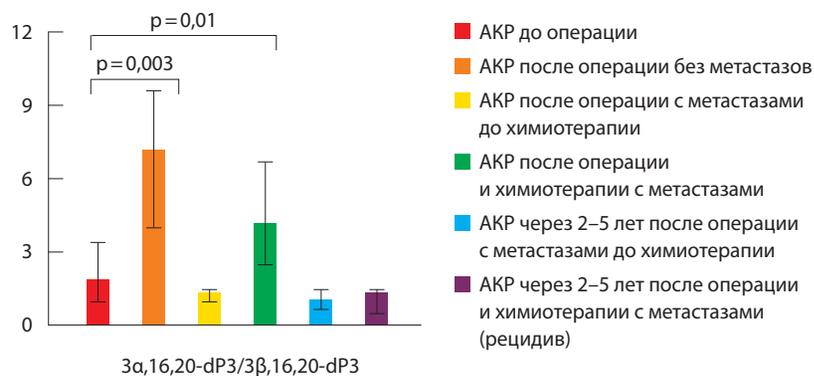
У больных АКР без метастазов до 1 года после операции выявлено повышение в сравнении с показателями группы контроля экскреции с мочой TNS, метаболитов DHEA (16-ОН-DHEA-3 α , 16-ОН-DHEA-3 β), прогестагенов (17-ОНП, 3 α ,16,20-dP3). Однако экскреция андрогенов (Et, DHEA, 16-ОН-DHEA-3 α , dA2-17 β , dA3), 17-ОНП, P2, P3 и 5-ene-прегненов (17-ОН-dP, dP2, 3 α ,16,20-dP3, 3 β ,16,20-dP3, dP3) была снижена в сравнении с показателями больных АКР до операции (см. табл. 1). Экскреция с мочой TNS была уменьшена более чем на 90% (менее 300 мкг/сут) в сравнении с показателями больных АКР до операции. Чувствительность снижения экскреции с мочой 3 β ,16,20-dP3 с критерием менее 194 мкг/сут составила 100%, специфичность – 96%, AUC=0,99. Соотношение 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 было уве-

личено до 7,2 (4,0–9,6) (рисунок). Чувствительность увеличения данного соотношения с критерием более 3,4 составила 85,7%, специфичность – 92%, AUC=0,87. Данные критерии могут использоваться для подтверждения отсутствия метастазов у больных после операции с высокой чувствительностью и специфичностью.

У больных АКР с метастазами до 1 года после операции, до проведения химиотерапии, получено повышение экскреции с мочой P3, 5-ene-прегненов (3 α ,16,20-dP3, dP3) и TNS в сравнении с группой контроля. Экскреция с мочой андрогенов (Et, DHEA, 16-ОН-DHEA-3 α , dA2-17 β , 16-охо-dA2, dA3) и 17-ОНП была снижена в сравнении с исходными показателями у этих больных (см. табл. 1). Экскреция с мочой TNS, P2, P3 и 5-ene-прегненов, соотношение 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 – 1,4 (1,0–1,5), $p = 0,94$, не отличались от показателей пациентов с АКР до операции (см. табл. 1, рисунок).

У больных АКР с метастазами через 2–5 лет после операции до проведения химиотерапии получено увеличение в сравнении с группой контроля экскреции с мочой TNS, андрогенов (Et, DHEA и его метаболитов (16-ОН-DHEA-3 α , 16-ОН-DHEA-3 β , dA2-17 β , 16-охо-dA2 и dA3)), прогестагенов (17-ОНП, P2, P3) и 5-ene-прегненов (17-ОН-dP, dP2, 3 α ,16,20-dP3, 3 α ,17,20-dP3). Экскреция данных стероидов не отличалась от исходных показателей пациентов с АКР ($p > 0,05$). Экскреция с мочой 3 β ,16,20-dP3 и соотношение 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 – 1,1 (0,7–1,5), $p = 0,21$, также не отличались от показателей данных больных до операции (см. табл. 1, рисунок).

В группе больных АКР с метастазами до 1 года после операции и химиотерапии экскреция с мочой TNS, андрогенов (Et, DHEA и его метаболитов), а также их предшественников



Соотношение 3 α ,16,20-прегнентриола/3 β ,16,20-прегнентриола (3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3) у больных аденокарциномой надпочечников (АКР) в динамике послеоперационного лечения; р – статистическая значимость различий с показателями больных АКР до операции

**Таблица 1.** Экскреция с мочой основных биомаркеров аденокортикального рака в дооперационном и послеоперационном периодах у пациентов без метастазов и с метастазами до проведения химиотерапии

Стероид, мкг/сут	Группа обследуемых				
	группа контроля (n=25)	пациенты с АКР до операции (n=26)	пациенты с АКР после операции до 1 года, без метастазов (n=10)	пациенты с АКР после операции до 1 года, с метастазами до химиотерапии (n=5)	пациенты с АКР через 2–5 лет после операции, с метастазами до химиотерапии (n=9)
Этиохоланолон (Et)	588 (360–720)	2203 (1550–6445) p < 0,0001	448* (289–753) p = 0,98	768* (341–1258) p = 0,91	2675 (1429–5575) p = 0,0001
Андростендиол-17β (dA2-17β)	87 (45–117)	1513 (758–2419) p < 0,0001	100** (40–139) p = 0,86	132* (109–200) p = 0,085	1125 (673–1890) p < 0,0001
Дегидроэпиандростерон (DHEA)	57 (47–160)	6417 (1500–9820) p < 0,0001	226** (92–350) p = 0,17	68** (11–213) p = 0,62	8473 (2257–11894) p < 0,0001
16α-ОН-DHEA-3α	56 (23–86)	1358 (396–7542) p < 0,0001	250† (208–392) p = 0,001	56** (31–88) p = 93	310 (118–3812) p = 0,003
16α-ОН-DHEA-3β	142 (36–276)	1398 (718–3000) p < 0,0001	486 (310–1003) p = 0,014	340 (117–1286) p = 0,03	3799 (881–6500) p < 0,0001
16-охо-андростендиол (16-охо-dA2)	22 (15–28)	1227 (239–2022) p = 0,002	381 (99–642) p = 0,03	75* (52–98) p = 0,33	221 (185–239) p = 0,014
Андростенриол (dA3)	142 (96–279)	2000 (874–5226) p < 0,0001	362** (180–870) p = 0,04	409** (380–488) p = 0,03	2220 (346–5800) p = 0,006
17-ОН-прегнанолон (17-ОНP)	197 (104–267)	1363 (619–1834) p < 0,0001	418** (258–608) p = 0,016	532** (235–1216) p = 0,05	1244 (497–1520) p < 0,0001
Прегнандиол (P2)	443 (270–806)	3517 (1982–7281) p < 0,0001	419** (230–1286) p = 0,91	1095 (871–4825) p = 0,035	1996 (904–6936) p = 0,001
Прегнантриол (P3)	635 (553–812)	4035 (1259–5861) p < 0,0001	864** (394–1152) p = 0,49	1569 (1486–1923) p = 0,004	3631 (2130–9252) p < 0,0001
17-гидроксипрегненолон (17-ОН-dP)	11 (10–27)	585 (352–3344) p = 0,002	54† (21–87) p = 0,22	311 (125–2715) p = 0,03	1254 (190–5152) p = 0,01
Прегнендиол (dP2)	516 (236–761)	3741 (2143–6796) p < 0,0001	533† (228–731) p = 0,90	643 (488–8251) p = 0,32	3400 (1695–6818) p < 0,0001
3α,16,20-прегненнтриол (3α,16,20-dP3)	135 (76–210)	1299 (600–5552) p < 0,0001	254** (212–480) p = 0,005	475 (274–3764) p = 0,007	1522 (446–2652) p = 0,0009
3β,16,20-dP3	Не определен	946 (500–2140)	50† (38–55)	244 (232–1234)	1218 (300–2816)
3α,17,20-прегненнтриол (dP3)	167 (131–276)	4423 (1788–13621) p < 0,0001	232† (179–938) p = 0,21	1056 (794–2143) p = 0,002	5491 (3973–20046) p < 0,0001
Тетрагидро-11-дезоксикортизол (THS)	78 (35–111)	1326 (863–3999) p < 0,0001	242† (91–299) p = 0,010	3048 (2278–7290) p < 0,0001	1463 (1060–2370) p < 0,0001

p – статистическая значимость различий показателей больных АКР в сравнении с показателями группы контроля, АКР – аденокортикальный рак

Данные представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q₂₅–Q₇₅)

* p < 0,017, ** p < 0,01, † p < 0,0001 – статистическая значимость различий показателей больных АКР после операции в сравнении с показателями больных АКР до операции

и метаболитов (17-ОНP, P2, P3, 17-ОН-dP, dP2, 3α,16,20-dP3, 3β,16,20-dP3, 3α,17,20-dP3) была снижена в сравнении с показателями этих больных до операции и не отличалась от группы контроля (табл. 2). Чувствительность и специфичность снижения экскреции с мочой 3β,16,20-dP3

с критерием меньше 100 мкг/сут составила 100%, AUC = 1,0, чувствительность увеличения соотношения 3α,16,20-dP3/3β,16,20-dP3 до 4,2 (2,5–6,7) с критерием более 2,7 составила 75%, специфичность – 88%, AUC = 0,81 в сравнении с исходными показателями больных АКР (см. рисунок).



Таблица 2. Экскреция с мочой основных биомаркеров аденокарциномы простаты у пациентов с метастазами после проведения химиотерапии в раннем и позднем послеоперационных периодах

Стероид, мкг/сут	Группа обследуемых			
	группа контроля (n = 25)	пациенты с АКР до операции (n = 26)	пациенты с АКР до 1 года после операции и химиотерапии, с метастазами (n = 9)	пациенты с АКР через 2–5 лет после операции и химиотерапии, с метастазами, с рецидивом заболевания (n = 6)
Этиохоланолон (Et)	588 (360–720)	2203 (1550–6445) p < 0,0001	267 (91–584)** p = 0,54	566 (275–1444)** p = 0,93
Андростендиол-17β (dA2-17β)	87 (45–117)	1513 (758–2419) p < 0,0001	69 (31–282)** p = 0,75	132 (114–242)** p = 0,05
Дегидроэпиандростерон (DHEA)	57 (47–160)	6417 (1500–9820) p < 0,0001	45 (23–188) [†] p = 0,43	1573 (364–1620) p = 0,009
16α-ОН-DHEA-3α	56 (23–86)	1358 (396–7542) p < 0,0001	55 (40–58) [†] p = 0,94	564 (235–564) p = 0,003
16α-ОН-DHEA-3β	142 (36–276)	1398 (718–3000) p < 0,0001	362 (231–495) [†] p = 0,08	1557 (117–2400) p = 0,045
16-охо-андростендиол (16-охо-dA2)	22 (15–28)	1227 (239–2022) p = 0,002	38 (11–92) [†] p = 0,64	214 (124–279) p = 0,016
Андростентриол (dA3)	142 (96–279)	2000 (874–5226) p < 0,0001	139 (76–401)** p = 0,85	978 (190–1659) p = 0,045
17-гидроксипрегненолон (17-ОНP)	197 (104–267)	1363 (619–1834) p < 0,0001	150 (46–210)** p = 0,37	151 (87–154) [†] p = 0,79
Прегнандиол (P2)	443 (270–806)	3517 (1982–7281) p < 0,0001	175 (73–233) [†] p = 0,017	523 (172–1560)** p = 0,97
Прегнантриол (P3)	635 (553–812)	4035 (1259–5861) p < 0,0001	181 (158–650)** p = 0,07	1051 (398–1800) [†] p = 0,53
Прегнендиол (dP2)	516 (236–761)	3741 (2143–6796) p < 0,0001	280 (140–857) [†] p = 0,65	1280 (628–1441)** p = 0,05
17-гидроксипрегненолон (17-ОН-dP)	11 (10–27)	585 (352–3344) p = 0,002	12 (10–75)** p = 0,45	197 (70–268) [†] p = 0,02
3α,16,20-прегнентриол (3α,16,20-dP3)	135 (76–210)	1299 (600–5552) p < 0,0001	118 (87–283) [†] p = 0,76	321 (180–732) [†] p = 0,014
3β,16,20-dP3	Не определен	946 (500–2140)	34 (18–84) [†]	354 (243–378) [†]
3α,17,20-прегнентриол (dP3)	167 (131–276)	4423 (1788–13621) p < 0,0001	383 (174–800) [†] p = 0,039	1202 (600–2426)** p = 0,0002
Тетрагидро-11-дезоксикортизол (THS)	78 (35–111)	1326 (863–3999) p < 0,0001	156 (121–288) [†] p = 0,035	1120 (1010–1200) p = 0,0002

p – статистическая значимость различий показателей больных АКР в сравнении с показателями группы контроля, АКР – аденокарцинома простаты

Данные представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q₂₅–Q₇₅)

[†] p < 0,017, ^{**} p < 0,01, [†] p < 0,0001 – статистическая значимость различий показателей больных АКР после операции в сравнении с показателями больных АКР до операции

Полученные критерии могут быть использованы для подтверждения эффективности лечения.

У больных АКР с метастазами через 2–5 лет после операции и химиотерапии с рецидивом заболевания получено повышение экскреции с мочой THS, DHEA и его метаболитов (16-ОН-DHEA-3α,

16-охо-dA2), 5-ene-прегненов (3α,16,20-dP3, 3α,17,20-dP3) в сравнении с группой контроля (см. табл. 2). Выявлено снижение экскреции с мочой метаболитов андрогенов (Et, dA2-17β), прогестагенов (17-ОНP, P2, P3), 5-ene-прегненов (17-ОН-dP, dP2, dP3, 3α,16,20-dP3, 3β,16,20-dP3)



в сравнении с показателями больных АКР до операции (см. табл. 2). Отметим, что экскреция с мочой основных биомаркеров АКР – THS ($p=0,47$), DHEA ($p=0,04$) и его метаболитов (dA3, $p=0,06$; 16-*охо*-dA2, $p=0,11$; 16-ОН-DHEA-3 α , $p=0,13$; 16-ОН-DHEA-3 β , $p=0,35$), а также соотношение 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3, равное 1,4 (0,5–1,5; $p=0,75$), не отличались от исходных показателей данных больных (см. табл. 2, рисунок).

Обсуждение

В последние годы большую значимость приобретают исследования СПМ методом ГХМС, позволяющие провести дифференциальную диагностику доброкачественных и злокачественных образований надпочечников [6–8]. Выявлению признаков метастазов и рецидива аденокарциномы посвящены единичные работы, авторы которых сделали вывод о важности применения данного метода обследования в дополнение к существующим протоколам наблюдения пациентов с АКР в послеоперационном периоде [11].

В отличие от исследования [11], в представленной нами работе только у 25% обследованных не было выявлено рецидива заболевания, группы исследования были сформированы в зависимости от лечения, оценивали экскреция 16 основных биомаркеров АКР. В результате проведенного исследования методом ГХМС определены биомаркеры, связанные с развитием метастазов у больных АКР после операции, рецидива заболевания у больных после хирургического лечения и химиотерапии. Выявлено 16 основных биомаркеров и дополнительных обнаружены неклассические 5-*ене*-прегнены, которые не определяются у пациентов с доброкачественными образованиями. Показано, что ключевую роль в мониторинге лечения АКР играет определение экскреции с мочой THS, DHEA и его метаболитов, Et, 5-*ене*-прегненов, среди которых особое значение имеет уровень экскреции 3 β ,16,20-dP3 и соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3. Определение данных показателей позволяет на ранних этапах выявить признаки метастазов и диагностировать рецидив заболевания. С высокой чувствительностью и специфичностью получено снижение в сравнении с исходными значениями экскреции с мочой THS и 3 β ,16,20-dP3, увеличение соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 у больных АКР после операции без метастазов, что можно использовать в качестве критериев, подтверждающих отсутствие прогрессирования заболевания. У больных АКР с рецидивом заболевания через

2–5 лет экскреция с мочой основных биомаркеров злокачественного процесса не отличалась от показателей у пациентов до операции.

Полученные данные свидетельствуют о важности изучения СПМ больных АКР для выявления признаков рецидива заболевания и образования метастазов. В настоящее время работа в данном направлении продолжается. Однако полученные результаты уже сейчас дают основание полагать, что исследование СПМ больных АКР в сочетании с данными визуализирующих методов позволит проводить мониторинг состояния пациентов на всех этапах заболевания.

Выводы

1. Увеличение экскреции с мочой андрогенов (этиохоланолон, дегидроэпиандростерон и его метаболитов), прегнандиола, прегнантриола, 5-*ене*-прегненов и тетрагидро-11-дезоксикортизола в сочетании с определением неклассических 5-*ене*-прегненов по данным газовой хромато-масс-спектрометрии свидетельствует о наличии АКР.
2. Основными хроматографическими признаками развития метастазов у больных АКР в послеоперационном периоде служат сохранение увеличения экскреции с мочой THS и 5-*ене*-прегненов в сравнении с показателями пациентов с гормонально-неактивными аденомами и отсутствие отличий данных показателей и соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 от значений у больных АКР до операции.
3. По данным газовой хромато-масс-спектрометрии, снижение экскреции с мочой THS менее 300 мкг/сут, 3 β ,16,20-dP3 менее 194 мкг/сут, увеличение соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 более 3,4 в сравнении с показателями больных АКР до операции служат биомаркерами отсутствия метастазов после оперативного лечения по поводу АКР.
4. Об эффективности химиотерапии у больных АКР свидетельствуют снижение экскреции с мочой 3 β ,16,20-dP3 и увеличение соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 в сравнении с показателями до операции.
5. Признаками рецидива заболевания у больных АКР после проведения химиотерапии служат повышение экскреции с мочой THS, DHEA и его метаболитов (16-ОН-DHEA-3 α , 16-*охо*-dA2), 5-*ене*-прегненов в сравнении с группой контроля и отсутствие отличий основных биомаркеров АКР (DHEA, THS) и соотношения 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 от показателей до операции. ©



Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания 2019–2021 гг. «Исследование метаболизма стероидов методами жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии у больных с различными нарушениями адrenaльного стероидогенеза и формирование кластеров заболеваний надпочечников на основе анализа многомерных данных».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Л.И. Великанова – статистический анализ, оформление таблиц, анализ полученных результатов, написание текста; Н.В. Ворохобина – анализ полученных результатов, написание и редактирование текста; З.Р. Шафигуллина – ведение больных с новообразованиями надпочечников до операции и в послеоперационном периоде; В.Ю. Бохян – проведение операций больным adrenokortikalnym rakom, сбор клинического материала, ведение больных до операции и после операции в динамике лечения; И.С. Стилиди – редактирование текста; В.В. Калугина – ведение

больных, поиск и анализ литературы, написание текста; Е.В. Малеваная – проведение исследований методом газовой хромато-масс-спектрометрии, анализ масс-спектров; Е.Г. Стрельникова – проведение исследований методом газовой хромато-масс-спектрометрии; Н.Е. Кушлинский – анализ полученных результатов, редактирование текста. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Мельниченко ГА, Стилиди ИС, Алексеев БЯ, Горбунова ВА, Бельцевич ДГ, Райхман АО, Кузнецов НС, Жуков НВ, Бохян ВЮ. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению adrenokortikalnogo рака. Проблемы Эндокринологии. 2014;60(2): 51–67. doi: 10.14341/probl201460251-67. [Melnicenko GA, Stilidi IS, Alekseev BYa, Gorbunova VA, Beltsevich DG, Raikhman AO, Kuznetsov NS, Zhukov NV, Bokhyan VYu. [Federal clinical practice guidelines on the diagnostics and treatment of adrenocortical cancer]. Problems of Endocrinology. 2014;60(2):51–67. Russian. doi: 10.14341/probl201460251-67.]
2. Pommier RF, Brennan MF. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. Surgery. 1992;112(6):963–970; discussion 970–971.
3. Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Nissan A, Marshall D, Dudas M, Cordon-Cardo C, Jaques DP, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization. J Clin Oncol. 2002;20(4):941–950. doi: 10.1200/JCO.2002.20.4.941.
4. Fassnacht M, Dekkers OM, Else T, Baudin E, Berutti A, de Krijger R, Haak HR, Mihai R, Assie G, Terzolo M. 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;179(4):G1–G46. doi: 10.1530/EJE-18-0608.
5. Cawood TJ, Hunt PJ, O'Shea D, Cole D, Soule S. Recommended evaluation of adrenal incidentalomas is costly, has high false-positive rates and confers a risk of fatal cancer that is similar to the risk of the adrenal lesion becoming malignant; time for a rethink? Eur J Endocrinol. 2009;161(4):513–527. doi: 10.1530/EJE-09-0234.
6. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H,

Study of urine steroid profiles by gas chromatography-mass spectrometry in patients with adrenocortical cancer in the course of treatment

L.I. Velikanova¹ • N.V. Vorokhobina¹ • Z.R. Shafigullina¹ • V.Yu. Bokhian² • I.S. Stilidi² • V.V. Kalugina¹ • E.V. Malevanaya¹ • E.G. Strelnikova¹ • N.E. Kushlinskii²

Background: Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare and aggressive disease. There are only few studies evaluating the diagnostic value of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for detection of ACC recurrence after surgery. It is necessary to conduct an in-depth study to search for the most informative markers of the disease relapse.

Aim: To study urine steroid metabolism by GC-MS during treatment to identify early signs of metastatic disease and relapse.

Materials and methods: Thirty nine (39) ACC patients were examined before and after surgery, in the early postoperative period (< 1 year) and late postoperative period (at 2 to 5 years). Ten (10) patients were disease-free at less than 1 year after surgery. Twenty nine (29) patients had metastases in lungs and other organs: 14, within 1 year

after surgery, and 15, at 2 to 5 years. The control group included 25 patients with nonfunctioning adrenocortical adenomas (NAA) without malignant characteristics at histological examination. Urine steroid profiles were assessed with a gas chromatograph-mass spectrometer Shimadzu GCMS-QP2020.

Results: As assessed by GC-MS, 16 major ACC biomarkers were found before surgery, including etiocholanolone, dehydroepiandrosterone (DHEA) and its metabolites, pregnanediol, pregnanetriol, 5-ene-pregnanes, and tetrahydro-11-deoxycortisol (THS). Their urine excretion was increased compared to that in the patients with NAA ($p < 0.002$). A non-classic 5-ene-pregnane, 3 β ,16,20-pregnenetriol (3 β ,16,20-dP3), was identified, with its urine excretion of > 500 mcg/day that was typical for ACC patients. After surgery,

decreased urinary excretion of THS ($p < 0.0001$) and 3 β ,16,20-dP3 ($p < 0.0001$), increased 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 ratio ($p = 0.003$), compared to those before surgery, were indicative of the absence of any metastases. No difference of urine THS excretion and 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 ratio from the corresponding values before surgery ($p > 0.05$) is a sign of metastatic diseases in the ACC patients at less than 1 year after the surgery, of the disease relapse at 2 to 5 years, and of the disease relapse after chemotherapy. In addition, in the ACC patients with metastatic disease within 1 year after surgery, increased progesterone urine excretion was found. Urine excretion of DHEA and its metabolites in the patients with the disease relapse after chemotherapy was not different from those in the ACC patients before surgery ($p > 0.05$).



Krone N, Porfiri E, Opocher G, Bertherat J, Mantero F, Allolio B, Terzolo M, Nightingale P, Shackleton CH, Bertagna X, Fassnacht M, Stewart PM. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(12): 3775–3784. doi: 10.1210/jc.2011-1565.

7. Kerkhofs TM, Kerstens MN, Kema IP, Willemis TP, Haak HR. Diagnostic Value of Urinary Steroid Profiling in the Evaluation of Adrenal Tumors. *Horm Cancer.* 2015;6(4):168–175. doi: 10.1007/s12672-015-0224-3.

8. Velikanova LI, Shafigullina ZR, Lisitsin AA, Vorokhobina NV, Grigoryan K, Kukhianidze EA, Strelnikova EG, Krivokhizhina NS, Krasnov LM, Fedorov EA, Sablin IV, Moskvina AL, Bessonova EA. Different Types of Urinary Steroid Profiling Obtained by High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Patients with Adrenocortical Carcinoma. *Horm Cancer.* 2016;7(5–6):327–335. doi: 10.1007/s12672-016-0267-0.

9. Gröndal S, Eriksson B, Hagenäs L, Werner S, Curstedt T. Steroid profile in urine: a useful tool in the diagnosis and follow up of adrenocortical carcinoma. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1990;122(5):656–663. doi: 10.1530/acta.0.1220656.

10. Wängberg B, Khorram-Manesh A, Jansson S, Nilsson B, Nilsson O, Jakobsson CE, Lindstedt S, Odén A, Ahlman H. The long-term survival in adrenocortical carcinoma with active surgical management and use of monitored mitotane. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(1):265–272. doi: 10.1677/ERC-09-0190.

11. Chortis V, Bancos I, Nijman T, Gilligan LC, Taylor AE, Ronchi CL, O'Reilly MW, Schreiner J, Asia M, Riestler A, Perotti P, Libé R, Quinkler M, Canu L, Paiva I, Bugalho MJ, Kastelan D, Denndy MC, Sherlock M, Ambroziak U, Vassiliadi D, Bertherat J, Beuschlein F, Fassnacht M, Deeks JJ, Biehl M, Arlt W. Urine Steroid Metabolomics as a Novel Tool for Detection of Recurrent Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):e307–e318. doi: 10.1210/clinem/dgz141.

12. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1989;13(3):202–206. doi: 10.1097/0000478-198903000-00004.

13. Velikanova LI, Strelnikova EG, Obedkova EV, Krivokhizhina NS, Shafigullina Z, Grigoryan K, Povarov VG, Moskvina AL. Generation of urinary steroid profiles in patients with adrenal incidentaloma using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Chem.* 2016;71(7):748–754. doi: 10.1134/S1061934816070169.

Ludmila I. Velikanova – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Scientific Laboratory of Chromatography¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9352-4035>
 ✉ 41 Kirochnaya ul., Saint Petersburg, 191015, Russian Federation. Tel.: +7 (921) 379 32 95. E-mail: velikanova46@gmail.com

Natalia V. Vorokhobina – MD, PhD, Professor, Head of Chair of Endocrinology named after academician V.G. Baranov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>

Zulfiya R. Shafigullina – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Endocrinology named after academician V.G. Baranov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8292-8504>

Vagan Yu. Bokhian – MD, PhD, Head of Surgical Department No. 5 (Endocrine Oncology)²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9066-5190>

Ivan S. Stilidi – MD, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Director²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

Valentina V. Kalugina – Postgraduate Student, Chair of Endocrinology named after academician V.G. Baranov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2812-6911>

Ekaterina V. Malevanaya – PhD (in Chem.), Senior Research Fellow, Scientific Laboratory of Chromatography¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>

Elena G. Strelnikova – PhD (in Chem.), Senior Research Fellow, Scientific Laboratory of Chromatography¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1208-8092>

Nikolay E. Kushlinskii – MD, PhD, Professor, Member of Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory of Clinical Biochemistry²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Conclusion: Determination of urine excretion of THS, DHEA and its metabolites, etiocholanolone, 5-ene-pregnenes, 3 β ,16,20-dP3, and 3 α ,16,20-dP3/3 β ,16,20-dP3 ratio by GC-MS is of utmost importance in the monitoring of treatment for ACC and early diagnosis of the disease progression.

Key words: adrenocortical carcinoma, postoperative period, metastases, gas chromatography-mass spectrometry, urine steroid metabolomics

For citation: Velikanova LI, Vorokhobina NV, Shafigullina ZR, Bokhian VYu, Stilidi IS, Kalugina VV, Malevanaya EV, Strelnikova EG, Kushlinskii NE. Study of urine steroid profiles by gas chromatography-mass spectrometry in patients with adrenocortical cancer in the course of treatment. *Almanac of Clinical Medicine.* 2021;49(4):277–284. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-041.

Received 8 July 2021; revised 19 September 2021; accepted 21 September 2021; published online 1 October 2021

Funding

The study was conducted as a part of the 2019–2021 State Project “Evaluation of steroid metabolomics by liquid and gas chromatography-mass spectrometry in patients with various abnormalities of adrenal steroidogenesis and differentiation of adrenal disease clusters based on the analysis of multidimensional data”.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

L.I. Velikanova, statistical analysis, preparation of the tables, analysis of the results, text writing; N.V. Vorokhobina, analysis of the results, text writing and editing; Z.R. Shafigullina, pre- and postsurgical management of the patients with adrenal tumors; V.Yu. Bokhian, surgical procedures in the patients with adrenocortical carcinoma, clinical data collection, pre- and postsurgical patient management; I.S. Stilidi, text editing; V.V. Kalugina, patient management, literature search and analysis, text writing; E.V. Malevanaya, gas chromatography-mass spectrometry studies, analysis of the mass spectra; E.G. Strelnikova, gas chromatography-mass spectrometry studies; N.E. Kushlinskii, analysis of the results, text editing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; 41 Kirochnaya ul., Saint Petersburg, 191015, Russian Federation

² N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation