



Оригинальная статья

# Особенности метаболизма стероидов по данным газовой хромато-масс-спектрометрии у больных аденокортикальным раком и с инциденталомой надпочечников при врожденной дисфункции коры надпочечников

Шафигуллина З.Р.<sup>1</sup> • Великанова Л.И.<sup>1</sup> • Ворохобина Н.В.<sup>1</sup> • Малеваная Е.В.<sup>1</sup> • Стрельникова Е.Г.<sup>1</sup> • Бохан В.Ю.<sup>2</sup> • Бритвин Т.А.<sup>3</sup> • Стилиди И.С.<sup>2</sup>

**Обоснование.** Установлено, что длительные эпизоды декомпенсации врожденной дисфункции коры надпочечников (ВДКН) приводят к появлению вторичных новообразований в надпочечниках. У пациентов с дефектом 21-гидроксилазы частота выявления инциденталом надпочечников составляет от 11 до 82%. У больных аденокортикальным раком (АКР) по данным газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) установлена повышенная продукция предшественников стероидных гормонов вследствие снижения активности ферментов адреналового стероидогенеза, главным образом, 21-гидроксилазы и 11 $\beta$ -гидроксилазы. Представляется актуальным исследование особенностей метаболизма стероидов методом ГХ-МС у больных АКР и у пациентов с ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы с ИН.

**Цель** – установить общие нарушения метаболизма стероидов и дифференциально-диагностические биомаркеры больных АКР и с ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы с ИН методом ГХ-МС.

**Материал и методы.** Обследован 41 пациент с новообразованиями коры надпочечников в возрасте от 18 до 65 лет без клинических и лабораторных признаков эндогенного гиперкортизолизма: 23 больных АКР без метастазов и 18 пациентов с ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы. Группу контроля составили

26 здоровых доноров в возрасте от 20 до 59 лет. Методом ГХ-МС исследовали стероидные профили мочи на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS-QP2020.

**Результаты.** У больных АКР установлено повышение экскреции с мочой тетрагидро-11-дезоксикортизола, дегидроэпиандростерона, андростендиола-17 $\beta$ , этиохоланола, прегнандиола и 3 $\beta$ ,16,20-прегнентриола (3 $\beta$ ,16,20-dP3), снижение соотношения 3 $\alpha$ ,16,20-dP3/3 $\beta$ ,16,20-dP3 в сравнении с показателями пациентов с ВДКН с дефицитом 21-гидроксилазы; получены признаки уменьшения активности 21-гидроксилазы, 11 $\beta$ -гидроксилазы, 5 $\alpha$ -редуктазы и 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы 2-го типа по сравнению со здоровыми донорами. Для больных ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы характерно увеличение в сравнении с больными АКР экскреции с мочой 11-оксо-прегнантиола (11-охо-P3), 21-дезокситетрагидрокортизола и уменьшение соотношения (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/11-охо-P3 менее 9,0, определение 11-охо-dP3, признаки увеличения активности 5 $\alpha$ -редуктазы и уменьшения активности 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы 1-го типа. У больных АКР и ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы выявлены общие нарушения в метаболизме стероидов: признаки снижения активности 21-гидроксилазы, 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы и 11 $\beta$ -гидроксилазы, отсутствие различий

экскреции с мочой ряда биомаркеров АКР (андрогенов, прегнандиола, 5-епе-прегненов).

**Заключение.** Исследование экскреции с мочой андрогенов, прогестагенов и глюкокортикоидов методом ГХ-МС дало возможность установить общие нарушения в метаболизме стероидов у больных АКР и ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы, что подтверждает роль нарушений стероидогенеза в процессе формирования опухолей коры надпочечников.

**Ключевые слова:** аденокортикальный рак, врожденная дисфункция коры надпочечников, дефект 21-гидроксилазы, газовая хромато-масс-спектрометрия, метаболизм стероидов

**Для цитирования:** Шафигуллина ЗР, Великанова ЛИ, Ворохобина НВ, Малеваная ЕВ, Стрельникова ЕГ, Бохан ВЮ, Бритвин ТА, Стилиди ИС. Особенности метаболизма стероидов по данным газовой хромато-масс-спектрометрии у больных аденокортикальным раком и с инциденталомой надпочечников при врожденной дисфункции коры надпочечников. Альманах клинической медицины. 2022;50. doi: 10.18786/2072-0505-2022-50-007.

Поступила 16.12.2021; доработана 17.02.2022; принята к публикации 18.03.2022; опубликована онлайн 12.04.2022



**П**ричиной развития опухолей коры надпочечников может быть врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) – генетическое заболевание, чаще всего обусловленное дефицитом 21-гидроксилазы, вызванным мутациями гена *CYP21A2*, и влияющее на биосинтез кортизола. Ряд авторов показали, что длительные (не менее 5 лет) эпизоды декомпенсации ВДКН с дефицитом 21-гидроксилазы приводят к появлению вторичных новообразований в надпочечниках у 29% больных [1]. Как установили в 2016 г. на основании анализа 36 публикаций Н. Falhammar и D.J. Torru, у пациентов с новообразованиями в надпочечниках ВДКН обнаруживается в 5,9% случаев при проведении биохимического скрининга и в 0,8% при генетическом анализе. У пациентов с ВДКН частота выявления инциденталом надпочечников (ИН) варьирует от 11 до 82%; кроме того, узловые образования надпочечников обнаруживаются у 45% носителей мутантного гена ВДКН [2].

В обзоре 2021 г. H.L. Claahsen-van der Grinten и соавт. констатируют появление в этой области новой разработки – диагностики с использованием хроматографических методов в сочетании со стероидным профилированием, что дает более полное понимание нарушений путей стероидогенеза и способствует улучшению методов генотипирования [3]. Комплексный 24-часовой анализ стероидного метаболома методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) – самый информативный тест, позволяющий обнаружить различные нарушения в метаболизме андрогенов, прогестагенов и глюкокортикоидов, а также установить новые пути стероидогенеза [4].

Частота встречаемости адренокортикального рака (АКР) среди больных с ИН составляет от 1,2 до 12%. Некоторые авторы отмечают, что больные АКР, не имеющие клинических признаков избыточной секреции стероидов, могут иметь повышенную продукцию предшественников стероидов вследствие ингибирования ферментов адреналового стероидогенеза [5–8]. Ранее мы установили признаки недостаточности 21-гидроксилазы и 11 $\beta$ -гидроксилазы у 79,3% больных АКР по данным ГХ-МС [8]. Представляется актуальным сравнение стероидных профилей мочи (СПМ) на основе метода ГХ-МС у больных с ИН при ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы и у больных АКР для выявления различий и общих нарушений в метаболизме стероидов.

## Материал и методы

Обследован 41 пациент с новообразованиями коры надпочечников в возрасте от 18 до 65 лет

**Шафигуллина Зульфия Ривгатовна** – канд. мед. наук, доцент кафедры эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8292-8504>

**Великанова Людмила Иосифовна** – д-р биол. наук, профессор, заведующая научно-исследовательской лабораторией хроматографии<sup>1</sup>; 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](mailto:velikanova46@gmail.com)

**Ворохобина Наталья Владимировна** – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>

**Малеваная Екатерина Валерьевна** – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории хроматографии<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>

**Стрельникова Елена Геннадьевна** – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории хроматографии<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1208-8092>

без клинических и лабораторных признаков эндогенного гиперкортизолизма: 23 пациента с АКР до лечения в возрасте 46 (39–55) лет, 18 пациентов с ВДКН в возрасте 27 (21–46) лет. Группу контроля составили 26 здоровых доноров в возрасте 33 (27–40) лет. Все пациенты проходили обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Все обследованные пациенты подписали информированное согласие.

По данным компьютерной томографии размер новообразования коры надпочечника у больных АКР составил 85 (70–120) мм, у больных ВДКН – 31 (8,0–38) мм. Диагноз ВДКН подтвержден молекулярно-генетическим исследованием и уровнем 17-ОН-прогестерона в сыворотке крови, который составил 17,8 (8,7–20,4) нг/мл по данным иммуноферментного анализа. Три пациента с ВДКН были прооперированы, патоморфологический диагноз – аденома коры надпочечников. Диагноз АКР подтвержден патоморфологическим исследованием удаленной опухоли (более 3 баллов по шкале L.M. Weiss). Уровень кортизола в сыворотке крови у всех обследованных больных составил менее 50 нмоль/л, что было определено методом иммунохемилюминесцентного анализа.

Методом ГХ-МС исследовали СПМ на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS-QP2020 с использованием жидкостной экстракции [9]. Все гормональные исследования проводили в научно-исследовательской лаборатории хроматографии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России. На проведение данного обсервационного исследования было получено разрешение независимо комитета по этике.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного пакета Statistica for Windows (версия 10). Основные количественные характеристики исследованных показателей больных и здоровых доноров представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q<sub>25</sub>–Q<sub>75</sub>). Для сравнения результатов использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Статистически значимым считали критерий  $p < 0,017$  на основании поправки Бонферрони. Чувствительность и специфичность рассчитали по программе Medcalc с использованием метода ROC-кривых (англ. receiver operating characteristic curve) и площади под ними (англ. area under the curve, AUC).

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



## Результаты

На основании исследования СПМ методом ГХ-МС у больных АКР и ВДКН получены различия метаболизма андрогенов, глюкокортикоидов и их предшественников, а также общие нарушения адrenaлового стероидогенеза.

У всех обследованных больных в сравнении с группой контроля установлено увеличение экскреции с мочой андрогенов: дегидроэпиандростерона (DHEA) и его метаболитов – андростендиола-17 $\beta$  (dA2-17 $\beta$ ), 16-охо-dA2, андростендиола (dA3), метаболитов андростендиона – андростерона (An), этиохоланолона (Et), 11-ОН-An, 11-ОН-Et и 11-охо-Et (табл. 1). У больных АКР в сравнении со здоровыми донорами, кроме перечисленных андрогенов, отмечено повышение экскреции с мочой метаболитов DHEA: 16-ОН-DHEA-3 $\alpha$  и 16-ОН-DHEA-3 $\beta$ . Для больных АКР характерно значительное увеличение экскреции с мочой DHEA ( $p=0,0004$ ), dA2-17 $\beta$  ( $p=0,001$ ), dA3 ( $p=0,016$ ) и Et ( $p=0,011$ ) в сравнении с показателями пациентов с ВДКН (см. табл. 1).

У больных АКР и ВДКН в сравнении с группой контроля получено повышение экскреции с мочой тетрагидрометаболитов глюкокортикоидов: тетрагидро-11-дезоксикортизола (THS) и 5 $\alpha$ -тетрагидрокортикостерона (5 $\alpha$ -ТНВ). У больных АКР в сравнении со здоровыми донорами увеличена экскреция с мочой 5 $\beta$ -ТНВ и 5 $\beta$ -тетрагидрокортизола (5 $\beta$ -ТНФ) (см. табл. 1). Экскреция с мочой THS более 715 мкг/сут с чувствительностью 88,2% и специфичностью 84,6% ( $AUC=0,91$ ,  $p<0,0001$ ), 5 $\beta$ -ТНВ ( $p=0,0007$ ) и 5 $\beta$ -ТНФ ( $p=0,004$ ) была выше у больных АКР в сравнении с показателями пациентов с ВДКН (см. табл. 1). Следует отметить, что у 73,9% больных АКР установлено увеличение экскреции с мочой основных биомаркеров АКР – THS, DHEA и его метаболитов. Для большинства больных ВДКН (78,9%) характерно повышение экскреции с мочой андрогенов при экскреции с мочой THS, находящегося в области референсных значений.

У больных ВДКН установлено 2 признака увеличения активности 5 $\alpha$ -редуктазы: повышение соотношений 5 $\alpha$ -ТНВ/5 $\beta$ -ТНВ и 11-ОН-An/11-ОН-Et. У пациентов с АКР получены 2 признака увеличения активности 5 $\beta$ -редуктазы: снижение соотношений 5 $\alpha$ -ТНФ/5 $\beta$ -ТНФ и An/Et в сравнении с группой контроля, что приводит к повышению экскреции с мочой 5 $\beta$ -ТНФ и этиохоланолона (табл. 2). Следует отметить, что 4 признака активности 5 $\alpha$ -редуктазы у больных АКР были ниже, чем у пациентов с ВДКН ( $p<0,005$ ) (см. табл. 2).

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

**Бритвин Тимур Альбертович** – д-р мед. наук, заведующий отделом хирургии<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6160-1342>. E-mail: [t.britvin@gmail.com](mailto:t.britvin@gmail.com)

**Стилиди Иван Сократович** – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: [ronc@list.ru](mailto:ronc@list.ru)

Признак уменьшения активности 11 $\beta$ -гидроксиesteroиддегидрогеназы (11 $\beta$ -ГСДГ) 1-го типа (снижение соотношения ТНВ/ТНА) в сравнении со здоровыми донорами получен у больных ВДКН. Повышение соотношения 5 $\beta$ -ТНФ/ТНЕ у больных АКР указывает на снижение активности 11 $\beta$ -ГСДГ 2-го типа, что приводит к увеличению ТНФ, метаболита кортизола, наиболее активного глюкокортикоида (см. табл. 1 и 2).

У больных АКР и ВДКН в сравнении с группой контроля выявлен признак уменьшения активности 11 $\beta$ -гидроксилазы – снижение соотношения (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/ТНС (см. табл. 2). Дополнительный признак уменьшения активности 11 $\beta$ -гидроксилазы получен у больных АКР – увеличение экскреции с мочой гексагидро-11-дезоксикортизола (ННС) в сравнении с группой контроля (см. табл. 1). У больных АКР соотношение (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/ТНС менее 7,7 с чувствительностью 93,7% и специфичностью 71,5% ( $AUC=0,83$ ;  $p=0,0001$ ) было меньше, чем аналогичные показатели пациентов с ВДКН (см. табл. 1 и 2).

У больных АКР и пациентов с ВДКН в сравнении с группой контроля обнаружено увеличение экскреции с мочой основных биомаркеров дефекта 21-гидроксилазы: 17-ОН-прегнанолона (17-ОНР) и его метаболитов – прегнантриола (P3) и 11-оксо-прегнантриола (11-охо-P3). Кроме этих стероидов получено повышение экскреции с мочой прегнанолона (P), 6-ОН-P, прегнандиола (P2), 5-ene-прегненов: прегнендиола (dP2), 3 $\alpha$ ,17,20-прегнантриола (dP3) и 3 $\alpha$ ,16,20-dP3 (см. табл. 1). У больных ВДКН установлено увеличение экскреции с мочой 16-ОН-P2 и 11-ОН-P3 по сравнению со здоровыми донорами и больными АКР ( $p=0,008$  и  $p=0,011$  соответственно). У больных АКР в сравнении с показателями пациентов с ВДКН получено повышение экскреции с мочой dP2 ( $p=0,012$ ) (см. табл. 1).

У больных ВДКН установлено увеличение в сравнении с АКР экскреции с мочой 11-охо-P3 и 21-deoxy-ТНФ, снижение соотношений (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/11-охо-P3 и (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/P3 (см. табл. 1 и 2). Экскреция с мочой 11-охо-P3 более 440 мкг/сут с чувствительностью 85,7% и специфичностью 90% ( $AUC=0,95$ ;  $p<0,0001$ ), 21-deoxy-ТНФ более 181 мкг/сут с чувствительностью 100% и специфичностью 80% ( $AUC=0,88$ ;  $p=0,002$ ), снижение соотношений (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/11-охо-P3 менее 9,0 с чувствительностью 93% и специфичностью 100% ( $AUC=0,98$ ;  $p<0,0001$ ) и (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/P3 подтверждают наличие дефекта фермента

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

<sup>3</sup> ФГУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

**Таблица 1.** Показатели экскреции стероидов с мочой, полученные методом газовой хромато-масс-спектрометрии, у больных аденокортикальным раком и врожденной дисфункцией коры надпочечников вследствие дефекта 21-гидроксилазы

Стероиды, Me (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> ), мкг/сут	Группа контроля (n = 26)	Пациенты с аденокортикальным раком (n = 23)	Пациенты с ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы (n = 18)
<b>Андрогены</b>			
Андростерон (An)	898 (637–1162)	1241 (663–4076) p = 0,009	1819 (1085–4158) p = 0,0006
Этиохоланолон (Et)	758 (464–1231)	2159 (1377–6445)* p < 0,0001	1838 (734–2761) p = 0,014
Андростендиол-17β (dA2-17β)	100 (72–117)	1233 (670–2292)* p < 0,0001	305 (144–790) p = 0,008
Дегидроэпиандростерон (DHEA)	250 (69–391)	5570 (1547–27355)** p < 0,0001	522 (295–2004) p = 0,004
16-ОН-DHEA-3α	155 (87–203)	1471 (513–5517)* p = 0,004	199 (93–425) p = 0,29
16-ОН-DHEA-3β	185 (112–417)	1056 (718–1487) p = 0,0002	823 (292–1997) p = 0,022
Андростентириол (dA3)	254 (168–489)	1630 (874–4462)* p < 0,0001	625 (303–1154) p = 0,009
16-охо-dA2	25 (18–53)	596 (183–1943) p = 0,0004	122 (71–274) p = 0,015
11-охо-Et	190 (150–272)	344 (252–640) p = 0,009	498 (317–1911) p = 0,0001
11-ОН-An	434 (331–694)	1241 (563–2846) p = 0,002	1818 (1224–7705) p < 0,0001
11-ОН-Et	253 (210–300)	702 (464–1983) p = 0,0007	559 (334–936) p = 0,004
<b>Прогестагены</b>			
Прегнанолон	25 (20–52)	389 (173–527) p = 0,002	449 (121–1145) p = 0,0009
6-гидроксипрегнанолон (6-ОНР)	13 (11–16)	111 (97–343) p = 0,016	307 (177–434) p = 0,0009
16-гидроксипрегнанолон (16-ОНР)	Не обнаружен	48 (19–76)*	490 (185–2298)
17-гидроксипрегнанолон (17-ОНР)	182 (55–235)	1112 (500–1363) p < 0,0001	3140 (381–7903) p < 0,0001
Прегнандиол (P2)	591 (323–802)	2805 (1100–4754) p < 0,0001	2660 (1704–4508) p < 0,0001
16-гидроксипрегнандиол (16-ОНР2)	60 (48–78)	240 (107–263)* p = 0,075	749 (318–2010) p = 0,003
Прегнантриол (P3)	448 (375–612)	1981 (1086–4967) p < 0,0001	4013 (1722–11432) p < 0,0001
11-ОН-прегнантриол	50 (38–139)	68 (52–156)**	319 (268–616) p = 0,008



11-оксо-пребнантириол (11-охо-Р3)	25 (18–31)	127 (107–227)** p < 0,0001	1094 (538–5297) p < 0,0001
21-дезоксид-тетрагидрокортизол	Не обнаружен	103 (80–181)*	741 (310–2865)
Пребнандиол (dP2)	388 (243–643)	3131 (2143–4984)* p < 0,0001	1141 (665–2824) p = 0,0003
5-пребн-3α,16α,20α-триол (3α,16,20-dP3)	139 (113–173)	1053 (306–1750) p < 0,0001	700 (295–1736) p < 0,0001
5-пребн-3α,17,20-триол (3α-dP3)	248 (170–334)	2026 (1112–3556) p < 0,0001	1048 (446–3648) p < 0,0001
<b>Глюкокортикоиды и минералокортикоиды</b>			
Тетрагидро-11-дезоксидкортизол (ТНС)	34 (13–58)	1441 (1058–3455)* p < 0,0007	201 (25–651) p = 0,004
Гексагидро-11-дезоксидкортизол (ННС)	15 (11–38)	443 (132–2079) p < 0,0001	71 (43–313) p = 0,18
Тетрагидрокортизон (ТНЕ)	1395 (1192–1836)	1560 (904–2431) p = 0,18	1262 (972–1639) p = 0,26
Тетрагидрокортизол (ТНФ)	508 (362–644)	953 (441–1661)* p = 0,009	400 (175–741) p = 0,40
5α-ТНФ	391 (272–743)	361 (212–1043) p = 0,57	450 (314–789) p = 0,91
Тетрагидрокортикостерон (ТНВ)	74 (45–103)	235 (119–476)** p = 0,001	75 (25–101) p = 0,41
5α-ТНВ	99 (35–169)	227 (100–600) p = 0,013	300 (141–400) p = 0,002
Тетрагидро-11-дегидрокортикостерон (ТНА)	63 (38–101)	41 (23–105) p = 0,78	100 (45–514) p = 0,14

АКР – адренокортикальный рак, ВДКН – врожденная дисфункция коры надпочечников,

p – статистическая значимость различий показателей пациентов с АКР и ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы в сравнении с показателями группы контроля

\*p < 0,017, \*\*p < 0,001 – статистическая значимость различий показателей пациентов с АКР с аналогичными показателями у пациентов с ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы

21-гидроксилазы у больных ВДКН по данным ГХ-МС (см. табл. 1, 2). Соотношение (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/17-ОНР, один из биомаркеров 21-гидроксилазы, было уменьшено у больных АКР и ВДКН в сравнении с группой контроля, но не различалось между группами больных (см. табл. 2). Среди больных АКР снижение соотношений (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/11-охо-Р3 и (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/Р3 в сочетании с повышением экскреции с мочой Р3 и 11-охо-Р3 не исключает наличия недостаточности 21-гидроксилазы у ряда пациентов (см. табл. 1 и 2).

Экскреция с мочой 11-охо-Р3 обнаружена только у больных с ВДКН (табл. 3). У больных АКР при сравнении с показателями пациентов с ВДКН экскреция с мочой 3β,16,20-dP3 была выше, а соотношение 3α,16,20-dP3/3β,16,20-dP3

менее 2,5 с чувствительностью 88% и специфичностью 85% (AUC = 0,88; p = 0,0001), что указывает на информативность данных показателей в диагностике АКР (см. табл. 3).

У больных АКР и ВДКН получены признаки недостаточности 3β-ГСДГ-2 (3β-HSD2): уменьшение соотношений (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/DHEA и (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/dP3 в сравнении с группой контроля (см. табл. 2). У пациентов с АКР по сравнению со здоровыми донорами установлен дополнительный признак недостаточности 3β-HSD2 – увеличение соотношения dP3/11-охо-Р3 (см. табл. 2).

У больных АКР и ВДКН получены общие нарушения в метаболизме андрогенов, прогестагенов и глюкокортикоидов. У больных АКР в сравнении с показателями пациентов с ВДКН не различались

**Таблица 2.** Признаки нарушений метаболизма стероидов больных с врожденной дисфункцией коры надпочечников вследствие дефекта 21-гидроксилазы и пациентов с аденокортикальным раком по данным газовой хромато-масс-спектрометрии

Соотношение «продукт/субстрат», Me (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	Группа контроля (n = 26)	Пациенты с ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы (n = 18)	Пациенты с АКР (n = 23)
<b>Признаки дефекта 5α-редуктазы</b>			
An/Et	1,2 (0,8–1,4)	1,3 (1,1–1,8) p = 0,35	0,55 (0,37–0,79)* p < 0,0001
11-OH-An / 11-OH-Et	1,5 (1,4–2,2)	4,5 (3,0–5,6) p < 0,0001	1,1 (0,4–2,6)** p = 0,25
5α-TNB / 5β-TNB	1,3 (0,8–1,9)	4,0 (2,0–12,4) p < 0,0001	0,8 (0,4–2,5)*** p = 0,39
5α-TNF / 5β-TNF	1,0 (0,7–1,2)	1,3 (0,8–2,0) p = 0,17	0,5 (0,2–1,1)** p = 0,016
<b>Признаки дефекта 21-гидроксилазы</b>			
(5β-TNF+5α-TNF+TNE) / 11-охо- прегнентриол	162 (108–210)	2,6 (0,5–4,3) p < 0,0001	25,9 (17,1–40,9)* p = 0,0001
(5β-TNF+5α-TNF+TNE) / прегнентриол	5,3 (3,9–6,9)	0,41 (0,12–1,14) p < 0,0001	1,7 (0,6–3,6)** p < 0,0001
(5β-TNF+5α-TNF+TNE) / 17-гидроксипрегненолон	20,1 (10,2–40,1)	1,0 (0,2–4,6) p < 0,0001	4,7 (1,4–7,6)
<b>Признаки дефекта 11β-гидроксистероиддегидрогеназы</b>			
TNF/TNE	0,35 (0,29–0,38)	0,34 (0,17–0,51) p = 0,81	0,60 (0,34–1,03) p = 0,011
TNB/TNA	1,01 (0,85–1,47)	0,64 (0,19–0,74) p = 0,0003	2,16 (1,0–4,46)*** p = 0,12
<b>Признак дефекта 11β-гидроксилазы</b>			
(TNF+allo-TNF+TNE) / TNS	111 (46–144)	9,7 (3,8–55,6) p = 0,004	2,8 (1,2–6,9)** p < 0,0001
<b>Признаки дефекта 3β-гидроксистероиддегидрогеназы-2</b>			
Прегнентриол / 11-охо-прегнентриол	10,2 (8,3–19,7)	0,66 (0,33–1,63) p < 0,0001	20,3 (16,2–29,7)* p = 0,011
(5β-TNF+5α-TNF+TNE) / дегидроэпиандростерон	13,7 (9,0–24,6)	3,4 (1,4–6,8) p = 0,001	0,58 (0,23–4,07)** p < 0,0001
(5β-TNF+5α-TNF+TNE) / прегнентриол	11,6 (8,2–16,3)	1,6 (0,8–4,1) p < 0,0001	1,5 (1,4–3,1) p < 0,0001

An – андростерон, Et – этиохоланолон, TNA – тетрагидро-11-дегидрокортикостерон, TNB – тетрагидрокортикостерон, TNE – тетрагидрокортизон, TNF – тетрагидрокортизол, TNS – тетрагидро-11-дезоксикортизол, АКР – аденокортикальный рак, ВДКН – врожденная дисфункция коры надпочечников

p – статистическая значимость различий показателей пациентов с АКР и ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы в сравнении с показателями группы контроля

\* p < 0,0001, \*\* p < 0,017, \*\*\* p < 0,001 – статистическая значимость различий показателей пациентов с АКР с показателями пациентов с ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы

экскреция с мочой метаболитов DHEA (16-OH-DHEA-3β, p = 0,29; 16-охо-dA2, p = 0,031), метаболитов андростендиона (An, p = 0,55; 11-OH-An, p = 0,04; 11-OH-Et, p = 0,35; 11-охо-Et, p = 0,27), HNS

(p = 0,036), показатель дефекта 11β-гидроксилазы; биомаркеры дефекта 21-гидроксилазы: экскреция с мочой P3 (p = 0,06) и 17-OHP (p = 0,12), соотношение (5β-TNF+5α-TNF+TNE)/17-OHP (p = 0,02);



**Таблица 3.** Экскреция с мочой 5-ene-прегненов у больных с врожденной дисфункцией коры надпочечников вследствие дефекта 21-гидроксилазы и у пациентов с аденокортикальным раком, не обнаруженных у здоровых доноров, по данным газовой хромато-масс-спектрометрии

Стероид, Me (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> ), мкг/сут	Пациенты с ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы (n = 18)	Пациенты с АКР (n = 23)	Значение p
Прегненолон	105 (77–1067)	354 (194–1312)	0,36
17-гидроксипрегненолон	300 (107–381)	535 (191–1100)	0,17
16-гидроксипрегненолон	228 (61–977)	221 (70–581)	0,95
21-гидроксипрегненолон	418 (134–940)	201 (70–309)	0,40
21-гидроксипрегнендиол	4088 (1229–6948)	971 (329–2195)	0,39
3β,16,20-прегнентриол	176 (94–500)	750 (362–1224)	0,016
3β,17,20-прегнентриол	482 (149–1750)	405 (253–11385)	0,79
11-гидроксипрегнентриол	124 (60–294)	255 (74–879)	0,40
11-охо-прегнентриол	140 (94–247)	Не обнаружен	
Соотношение 3α,16,20-прегнентриола / 3β,16,20-прегнентриола	4,3 (2,5–13,1)	1,4 (1,2–2,1)	0,013

АКР – аденокортикальный рак, ВДКН – врожденная дисфункция коры надпочечников

p – статистическая значимость различий показателей пациентов с ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы с показателями больных АКР

показатель дефекта 3β-HSD2 – соотношение (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/dP3 (p=0,63) (см. табл.1 и 2). Кроме этого, у больных АКР экскреция с мочой 5-ene-прегненов, не определяемых у здоровых людей – прегненолон (dP), 16-ОН-dP, 17-ОН-dP, 21-ОН-dP, 11-ОН-dP3, 21-ОН-dP2 и 3β,17,20-dP3 – также не отличалась от показателей пациентов с ВДКН (см. табл. 3).

## Обсуждение

По мнению многих авторов, исследование СПМ методом ГХ-МС наиболее информативно для изучения особенностей метаболизма стероидов при различных заболеваниях надпочечников [5, 10]. Ряд исследователей отмечают, что больные АКР, не имеющие клинических признаков избыточной секреции стероидов, могут иметь повышенную продукцию предшественников стероидов вследствие ингибирования ферментов адреналового стероидогенеза [5–8]. Опухоли надпочечников у пациентов с ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы диагностируют с частотой от 11 до 82% [2]. Ранее увеличение экскреции с мочой ДНЕА, 17-ОНР и его метаболитов, 5-ene-прегненов установлено у пациентов и с АКР, и с ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы [5, 8, 11].

В представленном нами исследовании проведен сравнительный анализ метабомики стероидов методом ГХ-МС у больных АКР без

клинических и лабораторных признаков гиперкортизолизма и у пациентов с инциденталомой надпочечников при ВДКН. Установлены как различия, так и общие нарушения в метаболизме стероидов при данных заболеваниях надпочечников. Различия в метабомике андрогенов, прогестагенов и глюкокортикоидов у больных АКР и ВДКН дали возможность выявить наиболее информативные биомаркеры этих заболеваний. У больных АКР и ВДКН отсутствовали различия в экскреции с мочой ряда биомаркеров АКР (андрогенов, прогестагенов, неклассических 5-ene-прегненов). Кроме этого, ряд показателей дефекта 21-гидроксилазы – экскреция с мочой P3, 17-ОНР и соотношение (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/17-ОНР, дефекта 3β-HSD2 – соотношение (5β-ТНФ+5α-ТНФ+ТНЕ)/dP3 также не различались у больных АКР и ВДКН. Полученные данные указывают на наличие общих нарушений в метаболизме стероидов у данных пациентов и подтверждают роль нарушений стероидогенеза в процессе формирования опухолей коры надпочечников у больных с ВДКН вследствие дефекта 21-гидроксилазы.

## Заключение

У больных АКР повышение экскреции с мочой ТНС (более 715 мкг/сут), ДНЕА, 17β-андростендиола, этиохоланола, прегнендиола,



3 $\beta$ ,16,20-прегнентриола, снижение соотношения 3 $\alpha$ ,16,20-dP3/3 $\beta$ ,16,20-dP3 (менее 2,5) в сравнении с показателями пациентов с ВДКН, а также признаки снижения активности 5 $\alpha$ -редуктазы и 11 $\beta$ -ГСДГ 2-го типа служат биомаркерами лабораторной диагностики АКР. У больных ВДКН увеличение в сравнении с показателями здоровых доноров и больных АКР экскреции с мочой 11-охо-Р3 (более 440 мкг/сут), 21-деохи-ТНФ (более 180 мкг/сут), 16-ОНР2, снижение соотношения (5 $\beta$ -ТНФ+5 $\alpha$ -ТНФ+ТНЕ)/11-охо-Р3 менее 9,0, определение 11-охо-прегнентриола, не детектируемого у больных АКР, признаки увеличения активности 5 $\alpha$ -редуктазы и уменьшения активности 11 $\beta$ -ГСДГ

1-го типа служат биомаркерами, подтверждающими диагноз ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы по данным ГХ-МС. У больных АКР и ВДКН с дефектом 21-гидроксилазы установлены общие нарушения в метаболизме стероидов: признаки недостаточности 21-гидроксилазы, 11 $\beta$ -гидроксилазы, 3 $\beta$ -HSD2, отсутствие различий в экскреции с мочой ряда биомаркеров АКР (метаболитов ДНЕА и андростендиона, 6-ОН-прегнанолон, прегнандиола, прегнантриола, 17-ОН-прегнанолон и 5-ене-прегненов), ряда показателей дефектов 21-гидроксилазы и 3 $\beta$ -HSD2, что подтверждает роль нарушений стероидогенеза в процессе формирования опухолей коры надпочечников. ©

## Дополнительная информация

### Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Госзадания Минздрава России, рег. № НИОКТР АААА-А19-119053190034-0.

### Конфликт интересов

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

### Участие авторов

З.Р. Шафигуллина – разработка дизайна клинической части исследования, сбор клинического материала, анализ полученных данных, написание текста; Л.И. Великанова – анализ полученных результатов, статистическая обработка данных, написание текста;

Н.В. Ворохобина – анализ клинико-экспериментальных результатов исследования, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи; Е.В. Малеваная и Е.Г. Стрельникова – проведение исследований методом газовой хромато-масс-спектрометрии, анализ полученных результатов; В.Ю. Бохан и Т.А. Бритвин – сбор клинического материала, анализ полученных данных; И.С. Стилиди – редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. 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

- Mallappa A, Merke DP. Congenital Adrenal Hyperplasia. In: Kebebew E, editor. Management of Adrenal Masses in Children and Adults. Springer, Cham; 2017. p. 207–224.
- Falhammar H, Torpy DJ. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency presenting as adrenal incidentaloma: a systematic review and meta-analysis. *Endocr Pract.* 2016;22(6):736–752. doi: 10.4158/EP151085.RA.
- Claahsen-van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, Arlt W, Auchus RJ, Falhammar H, Flück CE, Guasti L, Huebner A, Kortmann BBM, Krone N, Merke DP, Miller WL, Nordenström A, Reisch N, Sandberg DE, Stikkelbroeck NMML, Touraine P, Utari A, Wudy SA, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia – Current Insights in Pathophysiology, Diagnostics, and Management. *Endocr Rev.* 2022;43(1):91–159. doi: 10.1210/edrev/bnab016.
- Storbeck KH, Schiffer L, Baranowski ES, Chorotis V, Prete A, Barnard L, Gilligan LC, Taylor AE, Idkowiak J, Arlt W, Shackleton CHL. Steroid Metabolome Analysis in Disorders of Adrenal Steroid Biosynthesis and Metabolism. *Endocr Rev.* 2019;40(6):1605–1625. doi: 10.1210/er.2018-00262.
- Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H, 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.
- Stigliano A, Chiodini I, Giordano R, Faggiano A, Canu L, Della Casa S, Loli P, Luconi M, Mantero F, Terzolo M. Management of adrenocortical carcinoma: a consensus statement of the Italian Society of Endocrinology (SIE). *J Endocrinol Invest.* 2016;39(1):103–121. doi: 10.1007/s40618-015-0349-9.
- Kerkhofs TM, Kerstens MN, Kema IP, Willems 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.
- Velikanova LI, Shafigullina ZR, Lisitsin AA, Vorokhobina NV, Grigoryan K, Kukhianidze EA, Strel'nikova 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.
- Великанова ЛИ, Стрельникова ЕГ, Обедкова ЕВ, Кривохижина НС, Шафигуллина ЗР, Григорян К, Поваров ВГ, Москвин АЛ. Получение стероидных профилей мочи больных с инциденталомой надпочечников методом газовой хромато-масс-спектрометрии. *Журнал аналитической химии.* 2016;71(7):775–781. doi: 10.7868/S0044450216070161. [Velikanova LI, Strel'nikova EG, Obedkova EV, Krivokhizhina NS, Shafigullina ZR, 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: 10.7868/S0044450216070161.]
- Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, Shackleton CH. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(3–5):496–504. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.04.010.
- Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011;32(1):81–151. doi: 10.1210/er.2010-0013.





## Specific characteristics of metabolomics as assessed by gas chromatography-mass spectrometry in patients with adrenocortical cancer and with adrenal incidentalomas in congenital adrenal hyperplasia

Z.R. Shafigullina<sup>1</sup> • L.I. Velikanova<sup>1</sup> • N.V. Vorokhobina<sup>1</sup> • E.V. Malevanaya<sup>1</sup> • E.G. Strelnikova<sup>1</sup> • V.Yu. Bokhian<sup>2</sup> • T.A. Britvin<sup>3</sup> • I.S. Stilidi<sup>2</sup>

**Background:** Prolonged episodes of uncontrolled congenital adrenal hyperplasia (CAH) have been shown to result in the occurrence of secondary adrenal neoplasms. Prevalence of adrenal incidentalomas in the patients with 21-hydroxylase deficiency ranges from 11% to 82%. As assessed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), patients with adrenocortical cancer (ACC) have increased level of steroid hormone precursors due to decreased activity of adrenal steroidogenesis enzymes, mainly that of 21-hydroxylase and 11 $\beta$ -hydroxylase. It seems relevant to compare the specific characteristics of steroid metabolism by GC-MS in ACC patients and in patients with adrenal incidentalomas and CAH associated with 21-hydroxylase deficiency (21-OHD).

**Aim:** To identify (by GC-MS) common abnormalities in steroid metabolism and differential diagnostic biomarkers in ACC patients and CAH patients with 21-OHD and adrenal masses.

**Materials and methods:** The study included 41 patients with adrenal cortex neoplasms aged 18 to 65 years without clinical and laboratory signs of endogenous hypercortisolism. Twenty three (23) patients had non-metastatic ACC and 18 patients had CAH due to 21-OHD. The control group included 26 healthy blood donors aged 20 to 59 years. Urine steroid profiles were measured by GC-MS with a gas chromatograph-mass spectrometer (Shimadzu GCMS-QP2020).

**Results:** In the ACC patients, there was an increase in urinary excretion of tetrahydro-11-deoxycortisol, dehydroepiandrosterone, androstenediol-17 $\beta$ , etiocholanolone, pregnenediol, and 3 $\beta$ ,16,20-pregnenetriol (3 $\beta$ ,16,20-dP3), as well as a decrease in the 3 $\alpha$ ,16,20-dP3/3 $\beta$ ,16,20-dP3 ratio, compared to the values in the patients with CAH due to 21-OHD. Compared to the healthy control, 21-hydroxylase, 11 $\beta$ -hydroxylase, 5 $\alpha$ -reductase

and 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase (11 $\beta$ -HSDH) type 2 activities were lower. Compared to the ACC patients, those with CAH due to 21-OHD had higher urinary excretion of 11-oxo-pregnenetriol (11-oxo-P3) and 21-deoxy-tetrahydrocortisol and lower 5 $\beta$ -THF+5 $\alpha$ -THF+THE/11-oxo-P3 ratio of < 9.0, determination of 11-oxo-dP3, signs higher 5 $\alpha$ -reductase activity and lower 11 $\beta$ -HSDH type 1 activity. The ACC patients and the patients with CAH due to 21-OHD had common abnormalities of steroid metabolism, such as lower activities of 21-hydroxylase, 3 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase and 11 $\beta$ -hydroxylase, and no differences in urinary excretion of a number of ACC biomarkers (androgens, pregnenediol, and 5-ene-pregnenes).

**Conclusion:** The assessment of urinary excretion of androgens, progestagens, and glucocorticoids by GC-MS made it possible to identify common abnormalities in steroid metabolism in the patients with ACC and CAH due to 21-OHD, which confirms the role of disordered steroidogenesis in the formation of adrenocortical tumors.

**Key words:** adrenocortical cancer, congenital adrenal hyperplasia, 21-hydroxylase deficiency, gas chromatography-mass spectrometry, steroid metabolomics

**For citation:** Shafigullina ZR, Velikanova LI, Vorokhobina NV, Malevanaya EV, Strelnikova EG, Bokhian VYu, Britvin TA, Stilidi IS. Specific characteristics of metabolomics as assessed by gas chromatography-mass spectrometry in patients with adrenocortical cancer and with adrenal incidentalomas in congenital adrenal hyperplasia. *Almanac of Clinical Medicine*. 2022;50. doi: 10.18786/2072-0505-2022-50-007.

Received 16 December 2021; revised 17 February 2022; accepted 18 March 2022; published online 12 April 2022

### Funding

The study was conducted as a part of the State task from the Russian Ministry of Health, registration # NIOCTR AAAA-A19-119053190034-0.

### Conflict of interests

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

### Authors' contributions

Z.R. Shafigullina, design of the clinical part of the study, clinical data collection and analysis, text writing; L.I. Velikanova, analysis of the results, statistical analysis, text writing; N.V. Vorokhobina, analysis of clinical and experimental study results, text editing, approval of the final version of the manuscript; E.V. Malevanaya and E.G. Strelnikova, gas chromatography-mass spectrometry studies, analysis of the results, V.Yu. Bokhian and T.A. Britvin, clinical data collection and analysis; I.S. Stilidi, text editing, approval of the final version of the manuscript. 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.

**Zulfiya R. Shafigullina** – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Endocrinology named after V.G. Baranov<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8292-8504>

**Ludmila I. Velikanova** – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Scientific Laboratory of Chromatography<sup>1</sup>; 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](mailto:velikanova46@gmail.com)

**Natalia V. Vorokhobina** – MD, PhD, Professor, Head of Chair of Endocrinology named after V.G. Baranov<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>

**Ekaterina V. Malevanaya** – PhD (in Chem.), Senior Research Fellow, Scientific Laboratory of Chromatography<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>

**Elena G. Strelnikova** – PhD (in Chem.), Senior Research Fellow, Scientific Laboratory of Chromatography<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1208-8092>

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

**Timur A. Britvin** – MD, PhD, Head of Department of Surgery<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6160-1342>. E-mail: [t.britvin@gmail.com](mailto:t.britvin@gmail.com)

**Ivan S. Stilidi** – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Director<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: [ronc@list.ru](mailto:ronc@list.ru)

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

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

<sup>3</sup>Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation