

На правах рукописи

НУРАЛИЕВА НУРАНА ФЕЙЗУЛЛАЕВНА

**ПЕРВИЧНАЯ ХРОНИЧЕСКАЯ НАДПОЧЕЧНИКОВАЯ
НЕДОСТАТОЧНОСТЬ: МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ
ТОЛЕРАНТНОСТИ, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКОВ НА ОСНОВЕ
МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ АНТИТЕЛ И
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ**

3.1.19 Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

МОСКВА – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Трошина Екатерина Анатольевна

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты:

Демидова Татьяна Юльевна

доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой эндокринологии лечебного факультета ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова"

Хайдуков Сергей Валерьевич

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.045.01 на базе ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России www.endocrincentr.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук

Мазурина Наталия Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Первичная надпочечниковая недостаточность (1-НН) – тяжелое жизнеугрожающее заболевание, наиболее частой причиной которого является аутоиммунный адреналит [Charmandari E. et al., 2014; Bornstein SR. Et al., 2016]. Для разработки эффективных методов прогнозирования, диагностики и мишеней для терапевтического воздействия представляется перспективным анализ полиморфизмов генов рецепторов (например, toll-подобных рецепторов (TLR): *TLR2* и *TLR9*) и цитокинов (например, интерферон (ИФН)- λ : *IL28B*), вовлеченных в иммунопатогенез аутоиммунной надпочечниковой недостаточности (АНН), а также содержания регуляторных В-лимфоцитов (Breg), которые участвуют в поддержании периферической иммунной толерантности (ИТ).

Также, ряд зарубежных исследователей [Betterle C. et al., 2002; Younes N. et al., 2021] предлагает классификацию АНН с выделением ранних: потенциальная (пАНН) и латентная (лАНН); и манифестной (мАНН) стадий заболевания (Таблица 1). При этом иммунологическими маркерами ранних стадий, предположительно, являются антитела к 21-гидроксилазе (АТ к P450c21), которые определяются у большинства пациентов с мАНН [Dawoodji A. et al., 2014]. Однако, в связи с отсутствием активного поиска АНН в группах (гр.) риска, представленная классификация в РФ не внедрена.

Для верификации диагноза гипокортицизма применяется небезопасный и инвазивный тест с инсулиновой гипогликемией [Юкина М. Ю. и др., 2020], противопоказанный части пациентов, а также ассоциированный с увеличением время- и трудозатрат. В связи с чем, требуется поиск альтернативных исследований.

Также, у пациентов с АНН важно создание системы прогнозирования компонентов аутоиммунных полигландулярных синдромов (АПС), которые могут манифестировать жизнеугрожающими состояниями [Lebovitz H. E., 2013; Husebye E. S. et al., 2018; Zirilli G. et al., 2017; Karamifar H. et al., 2010]. С этой целью актуальна разработка метода мультиплексного иммуноанализа, позволяющего

одновременно выявлять АТ, характерные для множества аутоиммунных эндокринопатий.

Таблица 1 – Классификация аутоиммунной надпочечниковой недостаточности, предложенная Betterle С. и соавторами [Betterle С. et al., 2002; Younes N. et al., 2021]

Стадия	АКТГ	Кортизол базальный	Кортизол на фоне теста с сАКТГ (на 60 минуте)	Активность ренина плазмы	Альдостерон	Клинические проявления НН
0 (потенциальная)	N	N	N	N	N	-
1 (субклиническая/латентная)	N	N	N	↑	N/↓	-
2 (субклиническая/латентная)	N	N	↓	↑	N/↓	-
3 (субклиническая/латентная)	N/↑	↓	↓	↑	↓	-
4 (клиническая/ манифестная)	↑↑	↓↓	↓	↑↑	↓	+

Примечания: АКТГ – адренкортикотропный гормон; сАКТГ – синтетический аналог АКТГ короткого действия; НН – надпочечниковая недостаточность; N - норма; ↑ - повышен; ↑↑ - значительно повышен; ↓ - снижен; ↓↓ - значительно снижен.

Цель исследования

Изучение механизмов нарушений ИТ и оптимизация алгоритма диагностики и прогнозирования рисков у пациентов с 1-НН.

Задачи исследования

1. Разработать алгоритм диагностики ранних стадий 1-НН на основании исследования АТ к P450c21.
2. Оценить состояние В-регуляторного звена иммунитета при 1-НН.
3. Выявить ассоциации полиморфных маркеров в генах *TLR9*, *IL28B*, *TLR2* с наличием АНН.
4. Определить диагностическую эффективность исследования кортизола утренней слюны при НН.

5. Разработать иммунологическую панель для мультиплексного анализа на основе гидрогелевого биочипа с целью диагностики и прогнозирования развития 1-НН и других (др.) эндокринных аутоиммунных заболеваний (эАИЗ) и определить ее диагностическую эффективность.

Научная новизна

1. Впервые в России на основании исследования АТ к Р450с21 в гр. риска осуществлен скрининг и разработан алгоритм диагностики и лечения ранних стадий АНН.
2. Впервые в России проведен сравнительный анализ уровня дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С) крови у женщин молодого возраста с манифестной АНН, латентной АНН и условно здоровых (УЗ).
3. Впервые в мире проведена оценка качества жизни у пациентов с лАНН до и на фоне лечения.
4. Впервые в мире изучена ассоциация уровня Врег с наличием 1-НН.
5. Впервые в мире изучена ассоциация полиморфизмов генов *IL28B*, *TLR9* и *TLR2* с АНН.
6. Впервые в России определена диагностическая ценность анализа утренней слюны на кортизол при НН и впервые в мире выполнено исследование данного показателя при лАНН.
7. Впервые в России на большой когорте взрослых пациентов с АНН проведен анализ частоты сопутствующей аутоиммунной патологии.
8. Впервые в мире разработана иммунологическая панель для мультиплексного анализа на основе гидрогелевого биочипа для диагностики и прогнозирования развития АНН и др. эАИЗ.

Теоретическая и практическая значимость

Уточнение ассоциации полиморфизмов генов *IL28B*, *TLR9*, *TLR2* и содержания Врег с развитием АНН позволит сформировать новую концепцию о механизмах нарушения ИТ при данном заболевании.

Предложенные изменения в алгоритм диагностики НН позволят значительно улучшить качество медицинской помощи данной гр. пациентов и уменьшить

смертность за счет активного поиска пАНН и лАНН и своевременного лечения, а также проводить расширенное обследование для скрининга и верификации сопутствующих АИЗ с использованием небольшого количества биологического материала:

-рекомендовано исследование кортизола утренней слюны для исключения НН при невозможности проведения пробы с инсулиновой гипогликемией;

-модифицирована классификация и разработан алгоритм диагностики и лечения ранних стадий АНН;

-определение АТ к Р450с21 методом иммуноферментного анализа предложено для регистрации на территории РФ с целью внедрения в клиническую практику при диагностике АНН;

-разработан метод мультиплексного анализа на основе гидрогелевого биочипа для диагностики и прогнозирования развития АНН и др. эАИЗ.

Личное участие автора в получении научных результатов

Автором проанализированы литературные данные по научной проблеме, сформулированы цель и задачи работы, разработан дизайн каждой части исследования. Автор работы лично производил набор участников в исследуемые гр., сбор анамнеза, осмотр пациентов, проводил определение содержания Breg и мультиплексный иммуноанализ. Автор собрал и систематизировал данные пациентов, произвел самостоятельно статистический анализ, подготовил публикации и доклады по теме работы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. АТ к Р450с21 являются высокочувствительным методом диагностики аутоиммунного генеза манифестной НН и могут быть маркерами лАНН.
2. При АНН вследствие нарушения периферической ИТ *in vivo* определяется тенденция к снижению содержания Breg, не связанная с нарушением их дифференцировки и не зависящая от длительности заболевания и уровня АТ к Р450с21.

3. При АНН вследствие нарушения как центральной, так и периферической ИТ определяется тенденция к более частому носительству генотипа СТ полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B*.
4. Определение кортизола утренней слюны является неинвазивным и безопасным дополнительным (доп.) методом исключения НН.
5. Разработан метод мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа для диагностики эАИЗ. Доказана его высокая диагностическая эффективность в выявлении как маркеров АПС-1, так и органо-специфических антител в крови.

Апробация результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 22 ноября 2022 года на расширенной межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ эндокринологии». Основные результаты диссертации доложены на следующих конференциях: III Всероссийский конгресс «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2018), научная конференция молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета (Москва, 2020), школа молодых ученых с международным участием «Аутоиммунные эндокринопатии с полиорганными поражениями» (Москва, 2020), 17th Asia-Oceania Congress of Endocrinology and the 8th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism (онлайн, 2020), 23nd (онлайн, 2021) и 24th (онлайн, 2022) European Congress of Endocrinology, IV (XXVII) Национальный конгресс эндокринологов с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2021), I научно-практическая школа-конференция в области геномных и биомедицинских технологий для молодых ученых «Новые подходы к генетической диагностике, лечению и профилактике частых наследственных заболеваний в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре» (онлайн, 2022).

По теме диссертации опубликована 31 печатная работа, в том числе 1 монография, 2 главы в книгах, 14 статей в рецензируемых научных изданиях,

включенных в перечень рекомендуемых для публикаций основных научных результатов диссертаций, включая 4 зарубежные (1 и 2 квартилей), 7 тезисов в сборниках российских конференций, 5 зарубежных тезисов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 202 страницах, состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложения, содержит 53 таблицы и 31 рисунок. Библиография включает 18 отечественных и 127 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Условия проведения

Пациенты обследованы в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (директор – д.м.н., проф., член-корр. РАН Мокрышева Н. Г.): отделе терапевтической эндокринологии (с 2022 г. – отделении терапии заболеваний щитовидной железы, надпочечников и ожирения; руководитель – д.м.н., проф., член-корр. РАН Трошина Е. А., с 2021 г. – д.м.н. Платонова Н. М., с 2022 г. – к.м.н. Юкина М. Ю.) или в консультативно-диагностическом центре (руководитель – д.м.н., проф. Волеводз Н. Н.) в период с 2018 по 2021 гг. Набор УЗ также осуществлялся в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии». Биохимические, общеклинические, иммунологические (уровень АТ) и гормональные исследования выполнялись в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (руководитель – к.м.н. Никанкина Л. В.). Изучение Врег и анализ полиморфных маркеров проводились в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (директор – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Свитич О. А.): лабораториях биосинтеза иммуноглобулинов (заведующий – к.б.н. Дьяков И. Н.) и клинической иммунологии (заведующий – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Свитич О. А.). Мультиплексный иммуноанализ выполнялся в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной

биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (директор – д.б.н., профессор, академик РАН Георгиева С. Г.): лаборатории технологий молекулярной диагностики (заведующий – д.б.н. Грядунов Д. А.).

Раздел I. Антитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер ранних стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Дизайн: в частях, посвященных оценке диагностической точности анализа крови на АТ к Р450с21 при мАНН, а также скринингу АНН в гр. риска – активное одномоментное сравнительное исследование; в части, посвященной наблюдению за пациентами с ранними стадиями АНН – активное одновыборочное проспективное «до-после». Включены пациенты с АНН (n = 119; гр. 1: в составе АПС-2 (гр. 1a; n = 68), АПС-1 (гр. 1b; n = 22), изолированной (гр. 1c; n = 29)), др. АИЗ (n = 513; гр. 2), носители АТ-маркеров АИЗ щитовидной железы и/или сахарного диабета 1 типа (СД1) без нарушения функции органа-мишени (n = 36; гр. 3), неаутоиммунными эндокринными патологиями (n = 97; гр. 4), и УЗ (n = 70; гр. 5). В гр. 1 в том числе включено n = 5 пациентов с лАНН, у которых диагностическое обследование инициировано, в связи с жалобами. В гр. 2 у n = 236 пациентов диагностированы аутоиммунные тиреопатии (гр. 2a), у n=172 – СД1 (гр. 2b), у n=75 – аутоиммунные тиреопатии в сочетании с СД1 (гр. 2c), у n=30 – другие АИЗ (гр. 2d). Общие (общ.) крит. включения: мужчины (М) и Ж ≥ 18 лет. Доп. крит. включения в гр. 1: верифицированный диагноз 1-НН; отсутствие неаутоиммунных причин 1-НН; в гр. 2: наличие эАИЗ (кроме АНН) или неэндокринного АИЗ; в гр. 3: носительство АТ-маркеров АИЗ щитовидной железы и/или СД1; отсутствие эАИЗ или неэндокринного АИЗ; в гр. 4: наличие неаутоиммунного эндокринного заболевания; отсутствие эАИЗ или неэндокринного АИЗ. Крит. невключения в гр. 1-5: беременность, лактация; иммунодефицитные состояния; приём ИЛ, ИФН, иммуноглобулинов, иммунодепрессантов, цитостатиков; вакцинации перед включением в исследование. Всем участникам определялся уровень АТ к Р450с21 крови. При значениях, превышающих РИ, во всех гр., кроме гр. 1, исследовались АКТГ, кортизол, альдостерон, ренин крови утром, селективно проводилась проба с инсулиновой гипогликемией с целью уточнения стадии АНН. Пациентам с лАНН

назначалась заместительная терапия. Пациентам с ранними стадиями АНН проводилась оценка качества жизни исходно и через 6 месяцев на фоне лечения (при лАНН) или в динамике (при пАНН). Молодым Ж (18-40 лет) гр. 1 и 5, а также всем пациентам с пАНН и лАНН исследован уровень ДГЭА-С крови утром.

Раздел II. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности

Раздел IIa. Оценка состояния В-регуляторного звена иммунитета при первичной надпочечниковой недостаточности

Дизайн: активное одномоментное сравнительное исследование. Включены пациенты с АНН (гр. 1): изолированной АНН и в составе АПС-2 (n = 77; гр. 1a) и АПС-1 (n = 17; гр. 1b); неаутоиммунной 1-НН (n = 23; гр. 2) и УЗ (n = 44; гр. 3). Общ. крит. включения: М и Ж ≥ 18 лет. Доп. крит. включения в гр. 1: повышение АТ к P450c21 и/или мутация гена *AIRE* и/или минимум 2 компонента АПС-1; верифицированный диагноз 1-НН; медикаментозная компенсация 1-НН. Доп. крит. включения в гр. 2: верифицированный диагноз 1-НН в исходе 2-сторонней адреналэктомии по поводу феохромоцитомы или наследственных заболеваний; медикаментозная компенсация 1-НН. Доп. крит. включения в гр. 3: нормальный уровень альдостерона, ренина, АКТГ; кортизол утром (06:00-10:00) или в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией ≥ 500 нмоль/л. Общ. крит. невключения: беременность, лактация; патология иммунной системы; приём ИЛ, ИФН, иммуноглобулинов, иммунодепрессантов, цитостатиков; вакцинации перед включением в исследование. Доп. крит. невключения в гр. 2: эндогенный гиперкортицизм, АИЗ; в гр. 3: эндогенный гиперкортицизм, АИЗ, приём глюкокортикоидов, ферментных ингибиторов, патология надпочечников. Во всех гр. изучалось процентное содержание Breg (от всех В-лимфоцитов) крови.

Раздел IIb. Роль Toll-подобных рецепторов и интерферонов III типа в иммунопатогенезе аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Дизайн: активное одномоментное исследование «случай-контроль». Включены пациенты с изолированной АНН и в составе АПС-2 (n = 54; гр. 1a) и АПС-1 (n = 9; гр. 1b) и УЗ (n = 32; гр. 2). Общ. крит. включения: М и Ж ≥ 18 лет.

Доп. крит. включения в гр. 1: повышение АТ к P450c21 и/или мутация гена *AIRE* и/или минимум 2 компонента АПС-1; верифицированный диагноз 1-НН. Доп. крит. включения в гр. 2: нормальный уровень альдостерона, ренина, АКТГ; кортизол утром (06:00-10:00) или в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией ≥ 500 нмоль/л. Общ. крит. невключения: врождённые иммунодефицитные состояния. Участникам выполнен анализ полиморфизмов в генах *IL28B* (rs12979860 и rs8099917), *TLR9* (rs5743836 и rs352140) и *TLR2* (rs5743708).

Раздел III. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности

Дизайн: активное одновыборочное одномоментное исследование диагностического теста. Включены пациенты с подозрением на НН, которым, по результатам обследования, диагностированы НН (гр.1; n = 25): манифестная 1-НН (n = 15), манифестная вторичная НН (n = 10), пАНН (n = 2), лАНН с сохранной глюкокортикоидной функцией (n = 2), лАНН с глюкокортикоидной недостаточностью (n = 4); или отсутствие НН (УЗ; гр.2; n = 61). Общ. крит. включения: М и Ж ≥ 18 лет; клинические и/или лабораторные признаки НН. Доп. крит. включения в гр. 1: верифицированный диагноз НН. Доп. крит. включения в гр. 2: отсутствие НН и терапии глюкокортикоидами. Общ. крит. невключения: беременность, лактация; острые инфекции; обострение хронических заболеваний; приём оральных контрацептивов, амфетаминов; кровотечения из десен. Участникам определялись утренние (09:00) концентрации кортизола слюны, кортизола, АКТГ, альдостерона и ренина крови. n = 66 участникам с неоднозначными результатами гормонального обследования выполнена проба с инсулиновой гипогликемией.

Раздел IV. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний

Дизайн: активное одномоментное сравнительное исследование. Включены пациенты с АПС-1 (гр. 1; n = 18), АНН (изолированной и в составе АПС-2; гр. 2; n = 30), с эАИЗ (за исключением АНН; гр. 3; n = 59), с неаутоиммунными эндокринными заболеваниями (гр. 4; n = 71); УЗ (гр. 5; n = 28). Общ. крит.

включения: М и Ж ≥ 18 лет. Крит. невключения: беременность, лактация; острые инфекции; др. патология иммунной системы; приём ИЛ, ИФН, иммуноглобулинов, иммунодепрессантов, цитостатиков; вакцинации перед включением в исследование. Участникам проводился мультиплексный иммуноанализ на гидрогелевом биочипе.

Лабораторные методы исследования

Уровни АКТГ (референсный интервал (РИ) 7,2-63,3 пг/мл) и кортизола крови (РИ вне пробы с инсулиновой гипогликемией 171-536 нмоль/л) определялись иммунохимическим методом на системе Cobas 6000 (Roche, Германия), альдостерона (РИ 69,8-1085,8 пмоль/л) и ренина (2,8-39,9 мЕд/л) иммунохемилюминесцентным методом на анализаторе DiaSorin Liaison (DiaSorin S.p.a., Италия), АТ к тиреоидной пероксидазе (ТПО; РИ 0-5,6 МЕ/мл) – иммунохемилюминесцентным методом на анализаторе Architect i2000 (Abbott), ДГЭА-С (РИ 1,65-11 мкмоль/л (Ж 18-39 лет), 0,26-6,68 мкмоль/л (Ж ≥ 40 лет), 1,2-13,4 мкмоль/л (М 18-54 лет), 0,44-6,76 мкмоль/л (М ≥ 55 лет)) и АТ к тиреоглобулину (ТГ; РИ 0-115 МЕ/мл) – электрохемилюминесцентным методом на системе Cobas 6000 (Roche, Германия), АТ к Р450с21 (РИ $< 0,4$ Ед/мл), транспортеру цинка (ZnT8; РИ 0-15 Ед/мл), тирозинфосфатазе (IA2; РИ 0-10 Ед/мл), глутаматдекарбоксилазе (GAD; РИ 0-10 Ед/мл), инсулину (РИ 0-10 Ед/мл), клеткам островков поджелудочной железы (ICA; РИ 0-1 Ед/мл) методом иммуноферментного анализа. Уровень базального кортизола (вне пробы с инсулиновой гипогликемией) крови ≥ 500 нмоль/л исключал манифестную НН; < 140 нмоль/л в сочетании с АКТГ $> 126,6$ пг/мл подтверждал манифестную первичную глюкокортикоидную недостаточность. Кортизол слюны (РИ 6,8-19,1 нмоль/л) определялся электрохемилюминесцентным методом на анализаторе Cobas e 601 фирмы F. Hoffmann-La Roche Ltd при помощи набора Cortisol кат. №11875116 122.

Проба с инсулиновой гипогликемией

Инсулин короткого действия вводился внутривенно в дозе 0,1-0,15 ЕД/кг. На 0, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин выполнялся забор венозной крови для определения

кортизола и глюкозы. НН исключалась при уровне кортизола ≥ 500 нмоль/л на фоне гликемии $\leq 2,2$ ммоль/л. При уровне кортизола < 500 нмоль/л диагностировалась НН.

Иммунологические исследования

Для определения содержания Breg (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) методом проточной цитофлуориметрии на приборе Beckman Coulter EPICS XL клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали, проводили поверхностное окрашивание и добавляли меченые АТ мыши к CD38 (Sony clone HIT2), CD24 (Sony clone ML5) и CD19 (Sony clone H1B19) человека.

Анализ полиморфных маркеров

ДНК выделена при помощи коммерческого набора «РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ). Анализ полиморфизмов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческих наборов: Синтол, (РФ), «Литех» (РФ), «Набор для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ), «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, РФ) и специально синтезированных праймеров и зондов (Синтол, РФ). ПЦР-РВ проводили на приборах фирмы «ДНК-технология» (РФ): «DT-96», «DTprime 4» и «DTprime 5».

Мультиплексный иммуноанализ

Использован биочип низкой плотности на основе гидрогеля, содержащий ячейки с иммобилизованными АГ: ИФН- α (PBL Assay Science, США), ИФН- ω и ИЛ-22 (PeproTech, США), P450c21 и IA2 (Abcam, Великобритания), GAD (RayBiotech, США), островковых клеток поджелудочной железы (LifeSpan BioSciences, США), ТПО и ТГ (Bialexa, Россия) в 4 повторах. После инкубации сывороток (120 мкл) в ячейках добавляли флуоресцентно-меченные антивидовые АТ к IgG (Invitrogen), IgM и IgA (Bethyl, США). Флуоресцентные изображения получали с помощью биочип-анализатора с лазерным возбуждением. Вычисление флуоресцентных сигналов осуществляли с помощью программного обеспечения ImageAssay (Институт молекулярной биологии РАН, Москва).

Статистический анализ результатов исследования

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов программного обеспечения: STATISTICA 13 (StatSoft, США, 2017), Microsoft Excel XLSTAT (Addinsoft, США, 2022). Для количественных признаков указаны медиана (Me) и интерквартильный интервал. Так как распределение признаков было отличным от нормального, применялись непараметрические тесты. Для выявления связи между параметрами определялся коэффициент корреляции Спирмена; сравнения количественных данных 2х независимых выборок – U-крит. Манна-Уитни; зависимых выборок – парный крит. Вилкоксона; ≥ 3 независимых выборок крит. Краскела-Уоллиса; качественных признаков – тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. 95% ДИ рассчитывались с использованием калькулятора <https://statpages.info/confint.html>. Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез был принят равным 0,05. После применения поправки Бонферрони (для коррекции проблемы множественности проверки гипотез) значения p в диапазоне между рассчитанным и 0,05 интерпретировались как статистическая тенденция.

Источники финансирования

Гранты Российского научного фонда №17-75-30035, Фонда научно-технологического развития Югры 2022-05-01/2022.

Этическая экспертиза

Работа одобрена Локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (протокол №8 от 25.04.2018 г.). Пациенты и УЗ подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Раздел I. Антитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер ранних стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Клиническая характеристика обследованных лиц

Me возраста диагностики АНН составила 31,00 [22,00; 44,00] лет, гендерное соотношение (Ж:М) – 4,4:1. Изолированная АНН отмечалась в 24% случаев, АНН

в составе АПС-1 – в 19% случаев, в составе АПС-2 – в 57% случаев. Ме длительности (лет) приема глюкокортикоидов в гр. 1 – 5,75 [1,50; 12,50] (при изолированной АНН – 5,50 [0,58; 10,00]; АПС-1 – 12,13 [5,75; 21,00]; АПС-2 – 3,80 [1,00; 10,50]), уровень АТ к Р450с21 (Ед/мл) в гр. 1 составил 22,99 [4,03; 51,40], 1а – 38,55 [18,30; 63,83], 1b – 1,62 [0,29; 3,69], 1с – 15,05 [6,35; 34,63]. В 24% (n = 29) до постановки правильного диагноза пациенты переносили аддисонические кризы, в 8% случаев (n = 9) – неоднократно. У 46 пациентов (39%, 95% ДИ [30%; 48%]) гр. 1 развитию АНН предшествовала манифестация др. АИЗ (эндокринных и неэндокринных), в т. ч. у n = 18 (15%, 95% ДИ [9%; 23%]) – множественных АИЗ.

Результаты исследования антител к 21-гидроксилазе

В гр. 1 нормальный уровень АТ выявлен у 6% (n = 7) пациентов (n = 5 с генетически верифицированным АПС-1, n = 1 с АПС-2, n=1 с изолированной АНН), в гр. 5 – у 100% УЗ. Таким образом, чувствительность метода в диагностике АНН составила 94%, 95% ДИ [88%; 98%], прогностическая ценность положительного результата (+PV) – 100%, 95% ДИ [97%; 100%]. По результатам ROC-анализа, качество модели является отличным (AUC = 98% [97%; 100%]; стандартная ошибка 0,008, $p < 0,001$), диагностический порог совпадает со значением, указанным производителем набора ($\geq 0,4$ Ед/мл).

При анализе зависимости уровня АТ к Р450с21 от длительности приема препаратов глюкокортикоидов получена отрицательная корреляция в гр.1 ($r = -0,311$, $p = 0,001$, метод Спирмена) и 1b ($r = -0,521$, $p = 0,022$, метод Спирмена).

В гр. 2 повышение АТ к Р450с21 выявлено у 15 пациентов (2%, 95% ДИ [1%; 3%]) от всех пациентов гр. 2-5, 3%, 95% ДИ [2%; 5%] от включенных в гр. 2). При сравнении частоты повышения АТ к Р450с21 в гр. 2а-2d значимые отличия не выявлены ($p = 0,452$; тест Хи-квадрат, пороговый $p_0 = 0,008$ (поправка Бонферрони)): в гр. 2а – в 3% (n = 7) случаев, в гр. 2b – в 2% (n = 4) случаев, в гр. 2с – в 5% (n = 4) случаев, в гр. 2d – в 0% случаев. Клинико-anamнестические и лабораторные данные больных гр. 2, у которых зафиксировано повышение АТ к Р450с21, и пациентов гр. 1 с лАНН, у которых диагностический поиск инициирован, в связи с жалобами, представлены в Таблице 2. N = 3 больным гр. 2,

у которых зафиксировано повышение АТ к Р450с21, выполнено доп. гормональное исследование для уточнения диагноза АНН, в том числе проба с инсулиновой гипогликемией (за исключением №3_р и №8_р, с учётом уровня базального кортизола > 500 нмоль/л). Пациенты №3_р и №8_р жалоб не предъявляли, №1_р отмечал тягу к соленому, эпизоды потери сознания, снижение артериального давления (АД); №2_р – выраженную слабость, снижение АД, тягу к соленому, частые гипогликемии; №4_р – выраженную слабость, тошноту, снижение АД, тягу к соленому; №5_р – повышенную утомляемость, предобморочные состояния, гиперпигментацию кожи; №6_р – гиперпигментацию кожи, снижение массы тела, тягу к соленому; №7_р – одышку, эпизоды потери сознания, гиперпигментацию кожи, слабость, жажду, учащенное мочеиспускание.

Таблица 2 – Характеристика пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

№1 _р	№2 _р	№3 _р	№4 _р	№5 _р	№6 _р	№7 _р	№8 _р
Возраст, лет; пол (Ж/М)							
25; Ж	26; М	19; Ж	50; М	18; М	40; Ж	38; Ж	39; Ж
Аутоиммунные заболевания, носительство АТ							
АИТ, Г, ГГ, А, АГ	АИТ, СД1, АТ к ПКЖ	СД1, АТ к ТПО, ТГ	ICA, АТ к GAD, ZnT8	Г, АтД	-	АИТ, Г, ГГ, А	СД1, АИТ
АТ к 21-гидроксилазе, Ед/мл (РИ < 0,4)							
2,940	92,670	0,604	71,976	12,858	55,623	23,604	35,508
Адренокортикотропный гормон, пг/мл (РИ 7,2-63,3)							
84	79	51	501	81	1077	101	21
Базальный кортизол, нмоль/л (РИ 171-536)							
402,8	477,7	576,4	157,7	482,3	342,7	420,4	560,7
Максимальный уровень кортизола в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией, нмоль/л (РИ ≥ 500)							
481,6	509,4	-	141,4	497,2	350,3	690,4	-

№1 _p	№2 _p	№3 _p	№4 _p	№5 _p	№6 _p	№7 _p	№8 _p
Альдостерон, пмоль/л (РИ 69,8-1085,8)							
121	74	207	73,4	237	350	112	732
Ренин, мЕд/л (РИ 2,8-39,9)							
> 500	125	26	331	164	379	> 500	18
Дегидроэпиандростерон-сульфат, мкмоль/л							
0,1*	1,6**	3,1*	3,0**	2,1**	0,7***	0,5*	3,2*
Стадия аутоиммунной надпочечниковой недостаточности							
л	л	п	л	л	л	л	п
Генетическое исследование (ген, мутация)							
<i>AIRE</i> R257X/ c.821delG	НВ	НВ	НВ	<i>AIRE</i> R257X/ R257X	НВ	<i>AIRE</i> R257X/ R257X	НВ

* РИ 1,65-11; **РИ 1,2-13,4; ***РИ 0,26-6,68

Примечания: Ж – женский пол; М – мужской пол; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; Г – гипопаратиреоз; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; СД1 – сахарный диабет 1 типа; А – алопеция; АГ – аутоиммунный гастрит; АтД – атопический дерматит; АТ – антитела; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; ZnT8 – транспортер цинка 8; ПКЖ – париетальные клетки желудка; л – латентная; п – потенциальная; НВ – не выполнялось.

При интерпретации полученных результатов у пациентов №3_p и №8_p диагностирована пАНН (без прогрессии до лАНН/мАНН при наблюдении через 6 месяцев). Данные др. пациентов (№1_p, №2_p, №4_p-7_p), которые не удовлетворяют крит. как пАНН (в связи с нарушением минералокортикоидной функции и различной степенью нарушения глюкокортикоидной функции), так и мАНН (в связи с отсутствием яркой клинической картины заболевания), не соответствуют также ни одной из стадий лАНН классификации Betterle С. и соавт. В этой связи, мы модифицировали (Таблица 3) классификацию Betterle С. и соавт.:

-стадии 1-3, которые характеризуются различной степенью нарушения секреции гормонов коры надпочечников принципиально отличаются от стадий 0 (сохранная функция коры надпочечников) и 4 (практически полное отсутствие

секреции глюкокортикоидов и минералокортикоидов), объединены в единую стадию латентную стадию с выделением подстадий 1, 2 и 3;

-указана возможность как нормального, так и сниженного базального кортизола при лАНН, в связи с чем, подстадии 2 и 3 лАНН объединены;

-с учётом патогенеза заболевания, а также диагностированных в нашем исследовании случаев лАНН на основании выявленного повышения АТ к P450c21 и результатов гормонального обследования, данный показатель указан в модифицированной классификации;

-указана возможность наличия клинических проявлений и нормального уровня альдостерона на всех подстадиях лАНН (с учётом результатов пациентов №1_р, №2_р, №4_р-7_р);

-указана возможность повышения АКТГ на всех подстадиях лАНН, в том числе при сохранной секреции кортизола (с учётом результатов пациентов №2_р и №7_р);

-для молодых Ж введен доп. диагностический крит. НН – уровень ДГЭА-С. Данный показатель предложен, с учётом результатов анализа гормональных показателей пациентов с ранними стадиями АНН. В частности, у всех лиц с пАНН (n = 2) уровень ДГЭА-С сохранялся в пределах РИ, так же, как и у М с лАНН (n = 3), однако у всех Ж с лАНН (n = 3) был снижен. В связи с чем, предположено, что у пациентов Ж пола данный показатель может применяться в качестве диагностического критерия лАНН, и проведен сравнительный анализ уровня ДГЭА-С у участниц с мАНН, лАНН и УЗ. Принимая во внимание прогрессирующее снижение секреции ДГЭА-С после 40 лет, в данную часть исследования включены исключительно лица ≤ 40 лет. Согласно полученным результатам, уровень ДГЭА-С ниже РИ не встречался ни в одном случае среди здоровых Ж 18-40 лет (0%, 95% ДИ [0%; 11%]). Уровень ДГЭА-С при лАНН (0,512 [0,111; 0,688] мкмоль/л) значимо отличался как от пациентов с мАНН (0,019 [0,003; 0,097] мкмоль/л), p = 0,019 (U-крит. Манна-Уитни), так и от УЗ (7,930 [5,470; 9,810], мкмоль/л), p = 0,005 (U-крит. Манна-Уитни).

Таблица 3 – Модифицированная классификация аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Стадии	АТ к P450c21	АКТГ	Кортизол базальный	Кортизол на фоне пробы с инсулиновой гипогликемией, нмоль/л	Ренин	Альдостерон	ДГЭА-С ¹	Клинические проявления АНН
пАНН	↑	N	N	≥ 500	N	N	N	-
лАНН								
-подстадия 1	↑	N/↑	N/↓ (но ≥ 140 нмоль/л)	≥ 500	↑	N/↓	↓	±
-подстадия 2	↑	N/↑	N/↓ (но ≥ 140 нмоль/л)	< 500	↑	N/↓	↓	±
мАНН	↑ ² /N ³	↑↑	↓↓ (< 140 нмоль/л)	< 500	↑↑ ⁴	N/↓	↓	+ ⁵

Примечания: пАНН – потенциальная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АТ – антитела; P450c21 – 21-гидроксилаза; АКТГ – адренокортикотропный гормон; ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат; N-норма (в пределах референсного интервала лаборатории); ↑ - повышен; ↑↑ - значительно повышен; ↓ - снижен; ↓↓ - значительно снижен.

¹ Доп. диагностический критерий. Исследование целесообразно проводить только у Ж 18-40 лет.

² В дебюте заболевания.

³ При длительном течении заболевания.

⁴ В дебюте заболевания, при отсутствии заместительной терапии.

⁵ В дебюте заболевания, при отсутствии заместительной терапии.

На основании модифицированной классификации у пациентов №2_р и №7_р диагностирована подстадия 1 лАНН, у пациентов №1_р, №4_р-№6_р – подстадия 2 лАНН. Пациентам назначена терапия препаратами минералокортикоидов, больным №1_р, №4_р-6_р также глюкокортикоидами (Таблица 4).

Качество жизни пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

При сравнении качества жизни у пациентов с лАНН исходно и через 6 месяцев после инициации заместительной терапии НН отмечено значимое улучшение как физического (РН: исходно 43,50 [43,33; 46,38] баллов, на фоне лечения 55,35 [53,54; 56,74] баллов), так и психологического (МН: исходно: 38,99 [25,91; 45,93] баллов, на фоне лечения 55,23 [39,10; 56,47] баллов) компонентов, $p = 0,046$ и $p = 0,028$, соответственно (парный крит. Вилкоксона). У пациентов с пАНН значительных изменений РН и МН не выявлено (Таблица 4).

На основании полученных результатов разработан алгоритм диагностики и лечения ранних стадий АНН (Рисунок).

Таблица 4 – Качество жизни на фоне терапии или в динамике пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

№1 _р	№2 _р	№3 _р	№4 _р	№5 _р	№6 _р	№7 _р	№8 _р
Стадия (подстадия) аутоиммунной надпочечниковой недостаточности							
л (2)	л (1)	п	л (2)	л (2)	л (2)	л (1)	п
Суточная доза гидрокортизона/флудрокортизона, мг/мкг							
15/100	-/50	-	25/50	15/25	15/25	-/50	-
Физический компонент качества жизни исходно/ на фоне терапии или в динамике (15,4-62,3)							
43,33/ 56,74	43,56/ 59,26	52,24/ 58,15	43,43/ 51,24	46,38/ 53,54	53,07/ 56,12	36,72/ 54,57	55,87/ 58,28
Психологический компонент качества жизни исходно/ на фоне терапии или в динамике (10,1-64,5)							
45,93/ 56,47	21,57/ 56,89	50,18/ 46,52	25,91/ 33,91	36,74/ 39,10	50,40/ 55,48	41,23/ 54,98	46,25/ 52,06

Примечания: л – латентная; п – потенциальная.

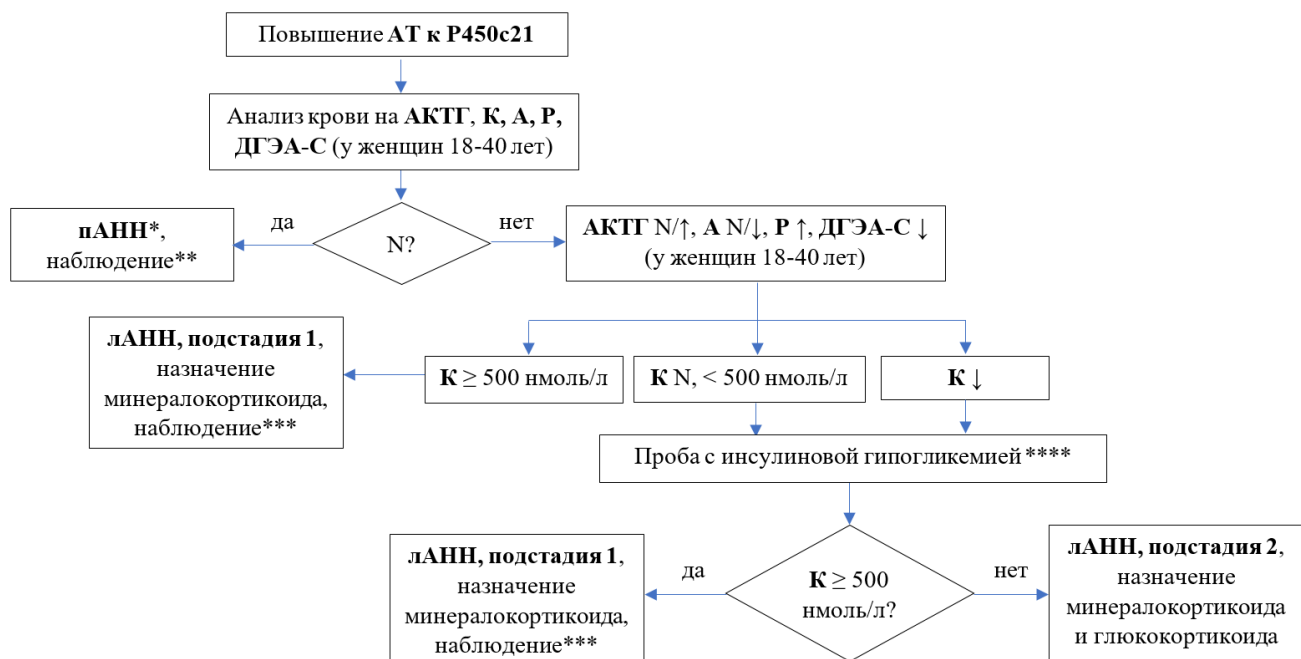


Рисунок – Алгоритм диагностики и лечения ранних стадий аутоиммунной первичной надпочечниковой недостаточности на основании исследования антител к 21-гидроксилазе

Примечания: АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза; АКТГ – адренкортикотропный гормон; К – кортизол; А – альдостерон; Р – ренин; ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат; N – норма; ↑ – повышен; ↓ – снижен; пАНН – потенциальная аутоиммунная недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная недостаточность.

*Проведение пробы с инсулиновой гипогликемией в данном случае (при уровне кортизола < 500 нмоль/л) не рекомендуется, так как 1-НН аутоиммунного генеза манифестирует с дефицита минералокортикоидов.

**Периодическая оценка минералокортикоидной и глюкокортикоидной функций коры надпочечников.

***Периодическая оценка глюкокортикоидной функции коры надпочечников.

****За исключением случаев, когда уровень кортизола < 140 нмоль/л, а АКТГ – более (>) чем в 2 раза относительно верхнего референсного значения.

Раздел II. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности

Раздел IIа. Оценка состояния В-регуляторного звена иммунитета при первичной надпочечниковой недостаточности

Выявлена тенденция к снижению процентного содержания Вreg (от всех В-лимфоцитов) в гр. 1а (2,5% [1,1%; 5,3%]) по сравнению с гр. 3 (3,3% [2,0%; 5,5%]),

$p = 0,034$ (пороговый $p_0 = 0,017$ (поправка Бонферрони)). При оценке содержания Врег и длительности НН / уровня АТ к Р450с21 в гр. 1а и 1б значимых корреляций не обнаружено.

Раздел IIb. Роль Toll-подобных рецепторов и интерферонов III типа в иммунопатогенезе аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Выявлено преобладание на уровне статистической тенденции в группе 1 по сравнению с группой 2 генотипа СТ (комбинация аллелей С и Т) полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B* (частоты 0,492 и 0,219, соответственно, $p = 0,010$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)), а также аллеля Т полиморфизма rs5743836 гена *TLR9* (частоты 0,873 и 0,750, соответственно, $p = 0,032$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)). В группе 2 по сравнению с группой 1 были на уровне статистической тенденции выше частоты генотипа СС полиморфизма rs12979860 гена *IL28B* (0,656 и 0,413, соответственно, $p = 0,025$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)) и аллеля С полиморфизма rs5743836 гена *TLR9* (0,250 и 0,127, соответственно, $p = 0,032$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)). При сравнительном анализе распределения частот гаплотипов по двум локусам гена *IL28B* (rs8099917 и rs12979860) обнаружена более высокая (на уровне статистической тенденции) частота ССТТ в группе 2, по сравнению с группой 1 (0,625 и 0,381, соответственно, $p = 0,024$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)). В отношении прочих генотипов и гаплотипов, а также аллелей значимых различий (или различий на уровне статистической тенденции) между группами 1 и 2 не обнаружено. При сравнении групп 1а и 2 сохранялись отличия на уровне статистической тенденции только в отношении частот генотипа СТ полиморфизма rs12979860 гена *IL28B* (0,463 и 0,219, соответственно, $p = 0,024$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)) и аллелей Т (0,870 и 0,750, соответственно, $p = 0,044$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)) и С (0,130 и 0,250, соответственно, $p = 0,044$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)) полиморфизма rs5743836 гена *TLR9*. В группе 1б по сравнению с группой 2 на уровне статистической тенденции чаще встречались генотип СТ полиморфного

маркера rs12979860 гена *IL28B* (0,667 и 0,219, соответственно, $p = 0,032$; пороговый $p_0 = 0,003$ (поправка Бонферрони)) и гаплотип СТТТ по двум локусам гена *IL28B* (rs8099917 и rs12979860; 0,444 и 0,063, соответственно, $p = 0,020$; пороговый $p_0 = 0,004$ (поправка Бонферрони)).

Раздел III. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности

Ме кортизола слюны у пациентов с манифестной НН (4,88 [2,39; 11,10] нмоль/л) статистически значимо отличалась от Ме кортизола слюны УЗ (13,82 [9,51; 19,70] нмоль/л), $p < 0,001$ (U-крит. Манна-Уитни). По результатам ROC-анализа, максимальная диагностическая точность теста определяется при пороге уровня кортизола утренней слюны: $< 8,4$ нмоль/л (качество модели является очень хорошим: AUC = 82% [73%; 92%]). Точность, чувствительность, специфичность, +PV, прогностическая ценность отрицательного результата (-PV) при выборе данной отрезной точки составили: 78%, 95% ДИ [68%; 86%]; 64%, 95% ДИ [46%; 78%]; 84%, 95% ДИ [76%; 90%]; 62%, 95% ДИ [45%; 75%]; 85%, 95% ДИ [78%; 91%], соответственно.

У $n = 2$ пациентов с пАНН уровень кортизола слюны составил 10,8 и 12,2 нмоль/л, у $n = 2$ пациентов с лАНН и сохранной глюкокортикоидной функцией коры надпочечников – 8,7 и 8,3 нмоль/л, а у $n = 4$ пациентов с лАНН и снижением секреции кортизола – 7,0 [6,2; 7,8] нмоль/л. Таким образом, при ранних стадиях НН чувствительность метода (при пороге уровня кортизола утренней слюны $< 8,4$ нмоль/л) составила 100% [55%; 100%], специфичность – 75%, 95% ДИ [19%; 99%], +PV – 80%, 95% ДИ [28%; 99%], -PV – 100%, 95% ДИ [39%; 100%].

Раздел IV. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний

Операционные характеристики мультиплексного иммуноанализа приведены в Таблице 5. У 16 из 18 пациентов с АПС-1 с помощью биочипа выявлен характерный триплет АТ (ИФН- ω + ИФН- α + ИЛ-22). У $n = 2$ пациентов с АПС-1

определены только АТ к ИФН- ω и ИФН- α . Среди 188 образцов от пациентов из гр. сравнения превышение порогового значения для АТ к ИФН- ω , ИФН- α и/или ИЛ-22 зафиксировано в $n = 3$ образцах. Ни в одном образце от пациентов из гр. сравнения не выявлены триплеты АТ ИФН- ω + ИФН- α + ИЛ-22.

Для определения чувствительности и специфичности мультиплексного анализа в выявлении органо-специфических АТ к Р450с21, ТГ, ТПО, GAD, IA2, ICA за истинноположительные и истинноотрицательные результаты принимались, соответственно, положительные и отрицательные результаты иммуноферментного анализа. Точность мультиплексного иммуноанализа при определении органо-специфических АТ составила от 89% до 98%.

Таблица 5 – Операционные характеристики мультиплексного иммуноанализа

АТ	Se, 95% ДИ	Sp, 95% ДИ	Ac, 95% ДИ
ИФН- α	100% [82%; 100%]	99% [96%; 100%]	99% [97%; 100%]
ИФН- ω	100% [82%; 100%]	100% [98%; 100%]	100% [97%; 100%]
ИЛ-22	89% [71%; 94%]	100% [98%; 100%]	99% [95%; 100%]
2 из 3 АТ (ИФН- ω , ИФН- α , ИЛ-22)	100% [82%; 100%]	100% [98%; 100%]	100% [97%; 100%]
3 из 3 АТ (к ИФН- ω , ИФН- α , ИЛ-22)	89% [71%; 94%]	100% [98%; 100%]	99% [97%; 100%]
АТ к Р450с21	92% [89%; 95%]	77% [64%; 87%]	89% [84%; 93%]
АТ к GAD	98% [96%; 99%]	89% [69%; 98%]	97% [94%; 99%]
IA2	97% [94%; 99%]	100% [81%; 100%]	98% [94%; 99%]
ICA	99% [97%; 100%]	69% [54%; 76%]	95% [91%; 97%]
АТ к ТГ	98% [96%; 100%]	81% [71%; 86%]	95% [90%; 97%]
АТ к ТПО	93% [89%; 96%]	80% [72%; 86%]	89% [83%; 93%]

Общие	97% [96%; 97%]	81% [77%; 85%]	94% [92%; 95%]
-------	----------------	----------------	----------------

Примечания: АТ – антитела; ИФН- α – интерферон- α ; ИФН- ω – интерферон- ω ; ИЛ-22 – интерлейкин-22; P450c21 – 21-гидроксилаза; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IA2 – тирозинфосфатаза; Se – чувствительность; ДИ – доверительный интервал; Sp – специфичность; Ac – точность.

ВЫВОДЫ

1. В когорте взрослых пациентов в России доказана высокая чувствительность (94%, 95% ДИ [88%; 98%]) и +PV (100%, 95% ДИ [97%; 100%]) определения методом иммуноферментного анализа АТ к P450c21 крови в диагностике АНН.
2. Носительство АТ к P450c21 обнаружено исключительно в гр. риска у пациентов с эАИЗ в 3% (95% ДИ [2%; 5%]) случаев. В 39% случаев (95% ДИ [30%; 48%]) развитию АНН предшествует манифестация др. АИЗ (эндокринных и неэндокринных), в том числе в 15% случаев (95% ДИ [9%; 23%]) – множественных.
3. Тенденция к снижению содержания Врег не связана с нарушением их дифференцировки, но может являться предиктором развития или маркером аутоиммунного процесса при АНН вследствие нарушения периферической ИТ.
4. Пациенты с АНН вследствие нарушения как центральной, так и периферической ИТ отличаются от УЗ тенденцией к более частому носительству генотипа СТ полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B*.
5. Исследование кортизола утренней слюны является высокоспецифичным доп. методом исключения НН (специфичность 84%, 95% ДИ [76%; 90%], -PV 85%, 95% ДИ [78%; 91%]).
6. Метод мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа обладает высокой эффективностью в выявлении как маркеров АПС-1 (99%, 95% ДИ [97%; 100%]), так и органо-специфических АТ в крови (94%, 95% ДИ [92%; 95%]).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Анализ крови на ДГЭА-С рекомендовано внедрить в классификацию АНН у Ж молодого возраста.
2. Рекомендовано внедрить в клиническую практику модифицированную классификацию АНН и алгоритм диагностики и лечения ранних стадий заболевания (Таблица 3, Рисунок).
3. Уровень кортизола утренней слюны $\geq 8,4$ нмоль/л рекомендован в качестве доп. диагностического критерия для исключения НН.
4. Метод мультиплексного иммуноанализа на гидрогелевом биочипе рекомендовано применять для верификации диагноза АПС-1, а также для скрининга органо-специфических АТ в крови у пациентов с эАИЗ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Nuralieva, N.** Diagnostic Accuracy of Methods for Detection of Antibodies against Type I Interferons in Patients with Endocrine Disorders / **N. Nuralieva, M. Yukina, L. Sozaeva, M. Donnikov, L. Kovalenko, E. Troshina, E. Orlova, D. Gryadunov, E. Savvateeva, I. Dedov** // *J. Pers. Med.* – 2022. – Vol. 12. – ID 1948. DOI: 10.3390/jpm12121948.
2. **Нуралиева, Н. Ф.** Аутоантитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер первичной надпочечниковой недостаточности аутоиммунного генеза, в том числе на потенциальной и латентной стадиях / **Н. Ф. Нуралиева, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина, Н. М. Малышева, Л. В. Никанкина** // *Альманах клинической медицины.* – 2020. – Т. 48, № 7. – С. 445–458. DOI: 10.18786/2072-0505-2020-48-023.
3. **Нуралиева, Н. Ф.** Дефицит андрогенов у женщин с надпочечниковой недостаточностью. Дегидроэпиандростерон. Обзор литературы / **Н. Ф. Нуралиева, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина, Н. М. Платонова** // *Гинекология.* – 2018. – Т. 20, № 4. – С. 35-39. DOI: 10.26442/2079-5696_2018.4.35-39.
4. **Нуралиева, Н. Ф.** Вторичная надпочечниковая недостаточность – новые аспекты диагностики и лечения / **Н. Ф. Нуралиева, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина**

// Доктор.Ру. – 2021. – Т. 20, № 2. – С. 51–59. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-2-51-59.

5. **Нуралиева, Н. Ф.** Частая ассоциация витилиго с эндокринными аутоиммунными заболеваниями: первичные данные в российской когорте взрослых пациентов / **Н. Ф. Нуралиева**, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина, О. В. Жукова, В. А. Петров, В. А. Волнухин // Вестник РГМУ. – 2022. – № 5. – С. 68-74. DOI: 10.24075/brsmu.2022.055.

6. Savvateeva, E. N. Multiplex Autoantibody Detection in Patients with Autoimmune Polyglandular Syndromes / E. N. Savvateeva, M. Yu. Yukina, **N. F. Nuralieva**, M. A. Filippova, D. A. Gryadunov, E. A. Troshina // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – ID 5502. DOI: 10.3390/ijms22115502.

7. Yukina, M. Novel Gene Mutations Regulating Immune Responses in Autoimmune Polyglandular Syndrome With an Atypical Course / M. Yukina, T. Erofeeva, **N. Nuralieva**, T. Andreeva, E. Savvateeva, N. Dudko, E. Troshina, E. Rogaev, G. Melnichenko // Journal of the Endocrine Society. – 2021. – Vol. 5, № 8. – P. 1-9. DOI: 10.1210/jendso/bvab077.

8. Savvateeva, E. Microarray-Based Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Proteins, Common Respiratory Viruses and Type I Interferons / E. Savvateeva, M. Filippova, V. Valuev-Elliston, **N. Nuralieva**, M. Yukina, E. Troshina, V. Baklaushev, A. Ivanov, D. Gryadunov // Viruses. – 2021. – Vol. 13. – ID 2553. DOI: 10.3390/v13122553.

9. Дедов, И. И. Первичная хроническая надпочечниковая недостаточность: механизмы нарушений иммунной толерантности / И. И. Дедов, Е. А. Трошина, **Н. Ф. Нуралиева**, М. Ю. Юкина // Клин. мед. – 2019. – Т. 97, № 5. – С. 330-336. DOI: 10.34651/0023-2149-2019-97-5-330-336.

10. Трошина, Е. А. Распространенность аутоиммунных эндокринных заболеваний у больных витилиго / Е. А. Трошина, В. А. Волнухин, В. А. Петров, **Н. Ф. Нуралиева**, М. Ю. Юкина, Е. М. Орлова, Н. В. Фриго // Терапевтический архив. – 2020. – Т. 92, № 10. – С. 88–96. DOI: 10.26442/00403660.2020.10.000736.

11. Юкина, М. Ю. Влияние заместительной терапии глюкокортикоидами на костный обмен при надпочечниковой недостаточности. Обзор литературы / М. Ю.

Юкина, М. О. Чернова, **Н. Ф. Нуралиева**, А. К. Еремкина, Е. А. Трошина, Г. А. Мельниченко, Н. Г. Мокрышева // Ожирение и метаболизм. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 357-368. DOI: 10.14341/omet12700.

12. Пигарова, Е. А. Диагностика и лечение эндокринологических осложнений иммунотерапии онкологических заболеваний / Е. А. Пигарова, Л. К. Дзеранова, **Н. Ф. Нуралиева**, Г. А. Мельниченко // Ожирение и метаболизм. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 49-58. DOI: 10.14341/omet9834.

13. **Нуралиева, Н. Ф.** Поражение желез внутренней секреции как осложнение иммунотерапии в практике онколога / **Н. Ф. Нуралиева**, Е. А. Трошина, Г. А. Мельниченко // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2018. – Т. 14, № 4. – С. 174-182. DOI: 10.14341/ket9875.

14. **Нуралиева, Н. Ф.** Основы иммунопатогенеза аутоиммунных тиреопатий и сахарного диабета 1 типа / **Н. Ф. Нуралиева**, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина // Доктор.Ру. – 2019. – Т. 4, № 159. – С. 49–53. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-159-4-49-53.

15. Трошина, Е. А. Алгоритмы обследования и лечения пациентов в эндокринологии (в схемах). Алгоритм диагностики заболеваний надпочечников и гипогликемического синдрома в схемах / Е. А. Трошина, М. Ю. Юкина, Н. М. Платонова, Н. В. Молашенко, Н. Ю. Романова, Д. Г. Бельцевич, **Н. Ф. Нуралиева** // Справочник поликлинического врача. – 2017. – № 6. – С. 7-26.

16. Петров, В. А. Частота встречаемости аутоиммунной патологии у родственников больных витилиго по данным семейного анамнеза / В. А. Петров, В. А. Волнухин, Н. В. Фриго, М. А. Кочетков, Н. В. Торчинский, **Н. Ф. Нуралиева** // Тенденции развития науки и образования. 2021. – Т. 79, № 1. – С. 32-38. DOI: 10.18411/trnio-11-2021-10.

17. Юкина, М. Ю. Надпочечниковая недостаточность / М. Ю. Юкина, **Н. Ф. Нуралиева**, Е. А. Трошина. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2020. – 144 с.

18. Трошина, Е. А. Базовые аспекты функционирования иммунной системы в норме и при патологических состояниях / Е. А. Трошина, М. Ю. Юкина, **Н. Ф.**

Нуралиева // Аутоиммунный полигландулярный синдром взрослых / под ред. И. И. Дедова, Е. А. Трошиной. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 264 с.

19. Юкина, М. Ю. Аутоиммунная недостаточность коры надпочечников / М. Ю. Юкина, **Н. Ф. Нуралиева**, Е. А. Трошина // Аутоиммунный полигландулярный синдром взрослых / под ред. И. И. Дедова, Е. А. Трошиной. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 264 с.

20. **Нуралиева, Н. Ф.** Антитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер первичной надпочечниковой недостаточности аутоиммунного генеза / **Н. Ф. Нуралиева**, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина, Н. М. Малышева, Л. В. Никанкина // Сборник тезисов VIII (XXVI) Национального конгресса эндокринологов с международным участием «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение», 22–25 мая 2019 года. – Москва: ООО «УП ПРИНТ», 2019. – С. 95-96.

21. **Нуралиева, Н. Ф.** Образование регуляторных В-лимфоцитов у пациентов с первичной хронической надпочечниковой недостаточностью / **Н. Ф. Нуралиева**, И. Н. Дьяков, М. Ю. Юкина, М. В. Гаврилова, И. Н. Чернышова, Н. А. Снегирева, Е. А. Трошина // Материалы V Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста», 10-11 октября 2019 года. – Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 2019. – С. 115-117.

22. **Нуралиева, Н. Ф.** Образование регуляторных В-лимфоцитов у пациентов с первичной хронической надпочечниковой недостаточностью / **Н. Ф. Нуралиева**, И. Н. Дьяков, М. Ю. Юкина, М. В. Гаврилова, И. Н. Чернышова, Н. А. Снегирева, Е. А. Трошина // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета, 11-12 марта 2020 года. – Москва: Издательство «Перо», 2020. – С. 22.

23. **Нуралиева, Н. Ф.** Кортизол утренней слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности / **Н. Ф. Нуралиева**, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина, Г. С. Колесникова, Л. В. Никанкина // Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов с международным участием

“Инновационные технологии в эндокринологии”», 22-25 сентября 2021 года. – Москва: ООО "Типография "Печатных Дел Мастер", 2021. – С. 210.

24. Юкина, М. Ю. Клинический случай аутоиммунного полигландулярного синдрома 2 типа с манифестацией в раннем детском возрасте / М. Ю. Юкина, **Н. Ф. Нуралиева**, Е. А. Трошина // Тезисы докладов III Всероссийского конгресса «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» Москва, 16–17 ноября 2018 года. Научно-практическая ревматология. – 2018. – Т. 56, № 3. – прил. 3.

25. Меремьянина, Е. А. Ассоциация полиморфных маркеров в генах *IL28B*, *TLR9* и *TLR2* с риском развития надпочечниковой недостаточности / Е. А. Меремьянина, М. Б. Жаркулова, **Н. Ф. Нуралиева**, И. Н. Дьяков, Е. А. Трошина // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, 30-31 марта 2021 года / под ред. В. В. Зверева. Москва: Издательство "Перо", 2021. – С. 13.

26. Савватеева, Е. Н. Биочипы в диагностике аутоиммунных полигландулярных синдромов / Е. Н. Савватеева, М. Ю. Юкина, **Н. Ф. Нуралиева**, М. А. Филиппова, Д. А. Грядунов, Е. А. Трошина // Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов с международным участием “Инновационные технологии в эндокринологии”, 22-25 сентября 2021 года. – Москва: ООО "Типография "Печатных Дел Мастер", 2021. – С. 332.

27. **Nuralieva, N.** Regulatory B-Lymphocytes Formation in Patients with Primary Adrenal Insufficiency / **N. Nuralieva**, I. Dyakov, M. Yukina, E. Troshina, I. Chernyshova, N. Snegireva, M. Gavrilova, K. Bushkova, N. Abaeva // The abstract book of the 17th Asia-Oceania Congress of Endocrinology and the 8th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism, 28-31 October 2020. – 2020. – P. 342. – ID P-013.

28. **Nuralieva, N.** Morning Saliva Cortisol in the Diagnosis of Adrenal Insufficiency / **N. Nuralieva**, M. Yukina, E. Troshina, G. Kolesnikova, L. Nikankina // The abstract book of the 17th Asia-Oceania Congress of Endocrinology and the 8th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism, 28-31 October 2020. – 2020. – P. 343. – ID P-016.

29. **Nuralieva, N.** The Diagnosis of Potential and Latent Stages of Autoimmune Adrenal Insufficiency / **N. Nuralieva**, M. Yukina, E. Troshina, N. Malysheva, L. Nikankina // The abstract book of the 17th Asia-Oceania Congress of Endocrinology and the 8th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism, 28-31 October 2020. – 2020. – P. 343. – ID P-0164.
30. **Nuralieva, N.** Correction of androgen deficiency in a woman with primary adrenal insufficiency. Clinical case / **N. Nuralieva**, M. Yukina, E. Troshina, Y. Absatarova // Endocrine abstracts. – 2021. – Vol. 73. – ID EP19. DOI: 10.1530/endoabs.73.EP19.
31. **Nuralieva, N.** Prevalence of endocrine autoimmune pathology in adult patients with vitiligo / **N. Nuralieva**, M. Yukina, E. Troshina, V. Petrov, V. Volnukhin // Endocrine abstracts. – 2022. – Vol. 81. – ID EP1165. DOI: 10.1530/endoabs.81.EP1165.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность	АПС – аутоиммунный полигландулярный синдром
AUC – area under the curve	АТ – антитело
Breg – регуляторные В-лимфоциты	Гр. – группа
GAD – глутаматдекарбоксилаза	ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат
IA2 – тирозинфосфатаза	ДИ – доверительный интервал
ICA – АТ к клеткам островков Лангерганса	Др. – другие
МН – психологический компонент качества жизни	Ж – женский/женщины
P450c21 – 21-гидроксилаза	ИЛ – интерлейкин
РН – физический компонент качества жизни	ИТ – иммунная толерантность
-PV – прогностическая ценность отрицательного результата	ИФН – интерферон
+PV – прогностическая ценность положительного результата	лАНН – латентная АНН
TLR – toll-подобный рецептор	М – мужской/мужчины
ZnT8 – транспортер цинка	мАНН – манифестная АНН
АД – артериальное давление	Me – медиана
АИЗ – аутоиммунное заболевание	НН – надпочечниковая недостаточность
АИТ – аутоиммунный тиреоидит	пАНН – потенциальная АНН
АКТГ – адренокортикотропный гормон	ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность	РИ – референсный интервал
	СД1 – сахарный диабет 1 типа
	ТГ – тиреоглобулин
	ТПО – тиреоидная пероксидаза
	эАИЗ – эндокринное АИЗ