ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭНДОКРИНОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Е. А. Трошина

МОСКВА
2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
Актуальность темы исследования 6
Цель исследования 8
Задачи исследования 9
Научная новизна исследования 9
Теоретическая и практическая значимость 10
Личное участие автора в получении научных результатов 10
Положения, выносимые на защиту 11
Апробация результатов 11
Публикации 12
Объем и структура диссертации 12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
1.1. Общие сведения о первичной надпочечниковой недостаточности 13
1.2. Антитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер ранних стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 19
1.3. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности 23
1.3.1. Иммунопатогенез аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 23
1.3.2. Роль регуляторных В-лимфоцитов в норме и при аутоиммунной патологии 27
1.3.3. Перспективы изучения регуляторных В-лимфоцитов при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 32
1.3.4. Роль Toll-подобных рецепторов и интерферонов III типа в иммунопатогенезе аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 33
1.4. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности 35
1.5. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний 37
1.6. Заключение обзора литературы 40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 41
2.1. Антитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер ранних стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 42
2.1.1. Участники исследования 42
2.1.2. Дизайн исследования 44
2.1.3. Методы исследования 46
2.1.3.1. Клиническое обследование 46
2.1.3.2. Оценка качества жизни 46

2.1.3.3. Лабораторные методы исследования 46
2.1.3.4. Проба с инсулиновой гипогликемией 48
2.2. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности 49
2.2.1. Оценка состояния В-регуляторного звена иммунитета при первичной надпочечниковой недостаточности 49
2.2.1.1. Участники исследования 49
2.2.1.2. Дизайн исследования 54
2.2.1.3. Методы исследования 57
2.2.1.3.1. Лабораторные методы исследования 57
2.2.1.3.2. Иммунологические методы исследования 57
2.2.2. Роль Toll-подобных рецепторов и интерферонов III типа в иммунопатогенезе аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 60
2.2.2.1. Участники исследования 60
2.2.2.2. Дизайн исследования 63
2.2.2.3. Методы исследования 63
2.2.2.3.1. Анализ полиморфных маркеров 64
2.3. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности 65
2.3.1. Участники исследования 65
2.3.2. Дизайн исследования 66
2.3.3. Методы исследования 67
2.3.3.1. Лабораторные методы исследования 67
2.4. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний 69
2.4.1. Участники исследования 69
2.4.2. Дизайн исследования 71
2.4.3. Методы исследования 72
2.4.3.1. Лабораторные методы исследования 72
2.4.3.2. Конструирование биочипов, проведение мультиплексного иммуноанализа 73
2.4.3.3. Определение антител к интерферону-ω с использованием клеточной культуры HEK-blue 76
2.5. Статистический анализ результатов исследования 77
2.6. Источник финансирования 77
2.7. Этическая экспертиза 78
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 79
3.1. Антитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер ранних стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 79

3.1.1. Клиническая характеристика обследованных лиц 79

3.1.2. Исследование диагностической эффективности анализа крови на антитела к 21-гидроксилазе при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 87

3.1.3. Результаты исследования уровня антител к 21-гидроксилазе у пациентов без установленного диагноза аутоиммунной надпочечниковой недостаточности..... 90

3.1.4. Качество жизни пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности исходно и на фоне лечения/в динамике..... 99

3.2. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности..... 102

3.2.1. Оценка состояния В-регуляторного звена иммунитета при первичной надпочечниковой недостаточности 102

3.2.1.1. Клиническая характеристика обследованных лиц..... 102

3.2.1.2. Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro*..... 110

3.2.1.3. Результаты иммунологического исследования пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 125

3.2.2. Роль Toll-подобных рецепторов и интерферонов III типа в иммунопатогенезе аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 131

3.2.2.1. Клиническая характеристика обследованных лиц..... 131

3.2.2.2. Оценка ассоциации полиморфных маркеров генов *TLR9, IL28B, TLR2* с аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью..... 131

3.3. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности 140

3.3.1. Клиническая характеристика обследованных лиц 140

3.3.2. Исследование диагностической точности анализа кортизола утренней слюны при манифестной надпочечниковой недостаточности 141

3.3.3. Результаты исследования уровня кортизола в слюне при ранних стадиях надпочечниковой недостаточности 143

3.4. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний..... 145

3.4.1. Клиническая характеристика обследованных лиц 145

3.4.2. Результаты исследования уровня антител методом иммуноферментного анализа149

3.4.3. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа 154

3.4.3.1. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа в детекции органо-специфических антител..... 154

3.4.3.2. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа в детекции антител к интерферону-ω, интерферону-α-2a и интерлейкину-22..... 155

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 161

4.1. Антитела к 21-гидроксилазе как диагностический маркер ранних стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности..... 161

4.1.1. Клиническая характеристика обследованных лиц 161

4.1.2. Исследование диагностической эффективности анализа крови на антитела к 21-гидроксилазе при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 162

4.1.3. Уровень антител к 21-гидроксилазе у пациентов без установленного диагноза аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 163

4.1.4. Классификация стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности..... 165

4.1.5. Оценка качества жизни при ранних стадиях аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 166

4.1.6. Ограничения исследования 167

4.2. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности..... 168

4.2.1. Оценка состояния В-регуляторного звена иммунитета при первичной надпочечниковой недостаточности 168

4.2.1.1. Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* 168

4.2.1.2. Результаты иммунологического исследования пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 170

4.2.1.3. Ограничения исследования..... 171

4.2.2. Роль Toll-подобных рецепторов и интерферонов III типа в иммунопатогенезе аутоиммунной надпочечниковой недостаточности 172

4.3. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности..... 174

4.3.1. Ограничения исследования..... 175

4.4. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний..... 176

4.4.1. Исследование уровня антител методом иммуноферментного анализа 176

4.4.2. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа в детекции органо-специфических антител и антител к интерферону-ω, интерферону-α-2a и интерлейкину-22..... 177

4.4.3. Ограничения исследования..... 179

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 180

ВЫВОДЫ..... 182

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 183

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 184

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 187

Приложение 199

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Надпочечниковая недостаточность (НН) – клинический синдром, обусловленный недостаточной секрецией гормонов коры надпочечников в результате нарушения функционирования одного или нескольких звеньев гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [1; 2]. Распространенность НН составляет 400:1 000 000 населения. Различают первичную НН (1-НН), развивающуюся вследствие двусторонней деструкции коры надпочечников, и центральные формы: вторичную НН (2-НН), являющуюся результатом нарушения секреции адренокортикотропного гормона (АКТГ), и третичную НН, являющуюся результатом нарушения секреции кортикотропин-рилизинг-гормона [1-3].

1-НН является тяжелым потенциально летальным заболеванием. Распространенность 1-НН составляет 93-144:1 000 000 населения [4]. Наиболее частой (до 90% и более) причиной заболевания является аутоиммунная деструкция коры надпочечников – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность (АНН, аутоиммунный адреналит) [3-5], развивающаяся в результате деструкции клеток коры надпочечников вследствие иммунного воспаления [6; 7].

В настоящее время существует целый ряд нерешенных вопросов в отношении диагностики и лечения 1-НН. К ним относится, в первую очередь, несвоевременная диагностика заболевания. В подавляющем большинстве случаев 1-НН диагностируется только на этапе крайне опасного для жизни состояния – острого аддисонического криза. Вместе с тем, выделяют также ранние стадии заболевания – потенциальная (при которой развиваются реакции иммунной аутоагрессии с формированием антител (АТ) к 21-гидроксилазе (P450c21)) и латентная (при которой инициируется деструкция клеток коры, а симптомы заболевания в основном эпизодические и легкие). Однако в настоящее время представленная классификация не является общепринятой. Соответственно, не проводится скрининг АНН, что значительно увеличивает смертность пациентов, в связи с отсутствием активного поиска потенциальной и латентной форм заболевания и своевременного лечения.

Вместе с тем, далеко не у всех пациентов с носительством АТ к P450c21 развивается АНН [8; 9]. Соответственно, надёжные критерии прогнозирования развития заболевания не определены, что обусловливает необходимость выяснения условий индукции нарушения иммунной толерантности (ИТ) при АНН, а также предикторов развития и прогрессирования заболевания.

Кроме того, в настоящее время отсутствуют перманентные иммунологические маркеры для дифференциальной диагностики форм 1-НН. Так, наличие или отсутствие АТ к P450c21 (в связи с уменьшением их уровня по мере увеличения длительности АНН [8]) не всегда позволяет верифицировать аутоиммунный генез заболевания. Не менее актуальна разработка новых методов лечения, а также мер, направленных на предупреждение развития заболевания. Это обусловлено тем, что несмотря на тщательный подбор доз препаратов для заместительной терапии при 1-НН, воспроизведение физиологического циркадного ритма секреции гормонов представляет большую сложность.

Для решения данных задач также требуется расширение знаний о механизмах нарушения ИТ при АНН. Уточнение механизмов срыва ИТ при латентной и, в большей степени, при потенциальной АНН, позволят определить точные механизмы запуска патологического процесса и разработать эффективные методы для предупреждения прогрессирования заболевания и развития явной клинической картины с жизнеугрожающими осложнениями. Не исключается, что при АНН, как и при целом ряде других аутоиммунных заболеваний (АИЗ), возникают нарушения в системе регуляторных В-лимфоцитов (Breg), которые отвечают за поддержание периферической ИТ. Однако, на современном этапе отсутствуют исследования, оценивающие роль этих клеток в патогенезе АНН, в том числе на ранних стадиях заболевания.

В РФ для диагностики 1-НН применяется проба с инсулиновой гипогликемией, имеющая потенциальный риск развития тяжелых осложнений, в связи с чем клиницисты нуждаются в надежном и более безопасном методе. Многообещающим представляется неинвазивное исследование кортизола утренней слюны. Однако, данных о диагностической значимости метода недостаточно, что диктует необходимость проведения дополнительных исследований.

Примерно в 50% случаев АНН сочетается с аутоиммунным поражением других (одной и более) периферических эндокринных желез и различными органоспецифическими неэндокринными заболеваниями аутоиммунного генеза в рамках аутоиммунных полигландулярных синдромов (АПС) [1-3]. Выделяют АПС 1, 2, 3 и 4 типов (АПС-1, -2, -3 и -4, соответственно).

АПС-1 (распространенность 1:100 000 населения) – моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования вследствие мутации гена аутоиммунного регулятора *AIRE*, которое характеризуется развитием в детском возрасте, по крайней мере, двух из трех основных компонентов – хронического кожно-слизистого кандидоза (КСК), гипопаратиреоза и 1-НН. АПС-2 (распространенность 1:20 000 населения [10]) наиболее часто манифестирует во взрослом возрасте [11; 12] и характеризуется развитием двух и более основных аутоиммунных эндокринопатий: 1-НН, сахарного диабета 1 типа (СД1), аутоиммунных тиреопатий (болезни

Грейвса (БГ) или аутоиммунного тиреоидита (АИТ)) в сочетании с другими АИЗ [11; 13]. АПС-3 (аутоиммунные тиреопатии в сочетании с другими АИЗ (исключая 1-НН и/или гипопаратиреоз)) и -4 (комбинации заболеваний, не включенные в предыдущие группы), по мере появления новых компонентов, могут классифицироваться как АПС-2. Поскольку для АПС-2, -3 и -4 характерны единый патогенез заболевания, полигенный тип наследования, манифестация эндокринопатий в большинстве случаев во взрослом возрасте, некоторые эксперты выделяют единый тип АПС (АПС-2 или АПС взрослых) [11]. Предрасположенность к изолированной АНН и АНН в составе АПС-2 определяется вариантами генов системы HLA (Human Leukocyte Antigens), кодирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, MHC) II класса. Не исключается, что в модулировании риска, определяемого генами *HLA* II класса, играют роль и другие генетические маркеры, в частности, в генах, кодирующих рецепторы (например, toll-подобные рецепторы (TLR): *TLR2* и *TLR9*) и цитокины (например, интерферон (ИФН)-λ: *IL28B*), участвующие в иммунном ответе, а также факторы окружающей среды.

Интервал между клиническим дебютом отдельных компонентов АПС может составить много лет. В связи с чем, у пациентов с АНН и прочими аутоиммунными эндокринными патологиями важно создание многокомпонентной системы прогнозирования развития компонентов АПС с помощью исследования иммунологических маркеров – АТ к тканям органов-мишеней, которые могут быть выявлены в крови пациентов за несколько лет до появления ранних специфических симптомов заболевания. В рутинной клинической практике с этой целью требуется проведение регулярного дорогостоящего скрининга (методом иммуноферментного анализа, ИФА), что сопровождается необходимостью взятия большого количества биоматериала. В связи с чем, в подавляющем большинстве случаев подобные исследования не проводятся вовсе или ограничиваются небольшим спектром АТ (как правило, к ткани щитовидной железы (ЩЖ)). Таким образом, с целью оптимизации алгоритма обследования пациентов с эндокринными аутоиммунными заболеваниями (эАИЗ), актуальна разработка метода мультиплексного иммуноанализа, позволяющего одновременно выявлять АТ, характерные для множества аутоиммунных эндокринопатий.

Цель исследования

Изучение механизмов нарушений иммунной толерантности и оптимизация алгоритма диагностики и прогнозирования рисков у пациентов с первичной надпочечниковой недостаточностью.

Задачи исследования

1. Разработать алгоритм диагностики ранних стадий 1-НН на основании исследования АТ к Р450с21.
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 эАИЗ и определить ее диагностическую эффективность.

Научная новизна исследования

1. Впервые в России на основании исследования АТ к Р450с21 в группе 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 (мАНН), латентной АНН (лАНН) и условно здоровых.
3. Впервые в мире проведена оценка качества жизни у пациентов с лАНН до и на фоне лечения.
4. Впервые в мире изучена ассоциация уровня Breg 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 других эАИЗ.

Теоретическая и практическая значимость

Уточнение ассоциации полиморфизмов генов *IL28B, TLR9, TLR2* и содержания Breg с развитием АНН имеет фундаментальное значение, т.к. позволит сформировать новую концепцию о механизмах дисрегуляции иммунной системы при данном заболевании.

Предложены изменения в алгоритм диагностики НН, что позволит значительно улучшить качество медицинской помощи данной группе пациентов:

-определен диагностический порог уровня кортизола утренней слюны для исключения НН при невозможности проведения пробы с инсулиновой гипогликемией;

-модифицированная и внедренная в России классификация, а также разработанный алгоритм диагностики и лечения ранних стадий АНН позволят значительно уменьшить смертность пациентов за счет активного поиска потенциальной и латентной форм заболевания и своевременного лечения;

-с учётом выявленной высокой чувствительности анализа крови на АТ к P450c21 методом ИФА при диагностике АНН, данное исследование предложено для регистрации на территории РФ и внедрения в клиническую практику;

-разработанная иммунологическая панель для мультиплексного анализа на основе гидрогелевого биочипа позволяет проводить расширенное обследование для скрининга и верификации диагноза АНН и других эАИЗ с использованием небольшого количества биологического материала при невысоких финансовых затратах.

Практическая значимость работы высока, так как внедрение полученных результатов позволит увеличить продолжительность и улучшить качество жизни пациентов.

Личное участие автора в получении научных результатов

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

Положения, выносимые на защиту

1. Антитела к 21-гидроксилазе являются высокочувствительным методом диагностики аутоиммунного генеза манифестной надпочечниковой недостаточности и могут быть маркерами латентной стадии заболевания.
2. При аутоиммунной надпочечниковой недостаточности вследствие нарушения периферической иммунной толерантности *in vivo* определяется тенденция к снижению содержания регуляторных В-лимфоцитов, не связанная с нарушением их дифференцировки и не зависящая от длительности заболевания и уровня антител к 21-гидроксилазе.
3. При аутоиммунной надпочечниковой недостаточности вследствие нарушения как центральной, так и периферической иммунной толерантности определяется тенденция к более частому носительству генотипа CT полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B*.
4. Определение кортизола утренней слюны является неинвазивным и безопасным дополнительным методом исключения надпочечниковой недостаточности.
5. Разработан метод мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа для диагностики эндокринных аутоиммунных заболеваний. Доказана его высокая диагностическая эффективность в выявлении как маркеров аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа, 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» Минздрава России. Основные результаты диссертации были 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 European Congress of Endocrinology (онлайн, 2021), IV (XXVII) Национальный конгресс эндокринологов с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2021), 24th European Congress of Endocrinology (онлайн, 2022), 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).

Публикации

По теме диссертации опубликована 31 печатная работа, в том числе: 1 монография, 2 главы в книгах, 14 полнотекстовых рукописей в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, включая 4 зарубежные (1 и 2 квартилей), 7 тезисов в сборниках российских конференций, 5 зарубежных тезисов. Результаты работы использованы при составлении клинических рекомендаций по 1-НН у взрослых. На основании результатов проведенного исследования получен патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 202 страницах, состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Библиография включает 145 источников литературы (18 отечественных и 127 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 53 таблицами и 31 рисунком.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о первичной надпочечниковой недостаточности

В большинстве случаев 1-НН манифестирует в возрасте от 20 до 50 лет. Заболевание чаще встречается у женщин, а 1-НН туберкулезной этиологии мужчины и женщины болеют с одинаковой частотой.

Как отмечалось выше, наиболее частой причиной 1-НН является аутоиммунный адреналит. У 40–60% больных с изолированной АНН в течение жизни развивается другая аутоиммунная патология в рамках АПС: гипопаратиреоз и КСК (при АПС-1), аутоиммунные тиреопатии, гипергонадотропный гипогонадизм (ГГ), СД1, атрофический гастрит, пернициозная анемия, синдром мальабсорбции, целиакия, миастения gravis, витилиго, алопеция и т.д. [3].

АПС-1 – единственное известное в настоящее время в патологии человека АИЗ с моногенным типом наследования. В подавляющем большинстве случаев первым проявлением является КСК, развивающийся в первые 10 лет жизни, чаще в возрасте около 2 лет. Затем у пациентов появляется гипопаратиреоз, который у 88% больных также развивается в первые 10 лет. НН манифестирует обычно в детском или подростковом возрасте. Кроме того, АПС-1 может сопровождаться дисплазией эмали, синдромом мальабсорбции, кератитами [14].

АПС-2 – наиболее распространенный, но менее изученный вариант АПС. Сочетание 1-НН и аутоиммунных тиреопатий (АИТ или БГ) называется синдромом Шмидта, реже встречается синдром Карпентера – сочетание 1-НН с СД1. В большинстве случаев АПС-2 встречается спорадически, однако описано немало семейных форм, при которых заболевание наблюдается у членов семьи в нескольких поколениях [15].

К другим причинам 1-НН относятся: врожденная дисфункция коры надпочечников (вследствие дефекта одного из ферментов или транспортных белков, принимающих участие в синтезе кортизола), адренолейкодистрофия (характеризуется избыточным накоплением предельных длинноцепочечных жирных кислот), семейный изолированный дефицит глюкокортикоидов (обусловлен резистентностью коры надпочечников к действию АКТГ), синдром Олгроува, синдром Смита-Лемли-Опица, врожденная Х-сцепленная гипоплазия надпочечника, IMAGe-синдром, синдром Кернса-Сейра и другие. Помимо наследственной патологии, поражение надпочечников может развиваться в результате воздействия внешних факторов: инфекции (туберкулез; инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)), инфильтративные заболевания, метастазы (рака молочной железы, бронхогенного рака легкого, меланомы), кровоизлияние в надпочечники, двусторонняя адреналэктомия (при

двусторонней феохромоцитоме, тяжелых случаях болезни Кушинга, АКТГ-эктопированного синдрома), прием медикаментов (например, ингибирующих биосинтез или ускоряющих метаболизм кортизола) [1-3]. 1-НН туберкулезной и аутоиммунной этиологии обозначается как болезнь Аддисона (в честь английского врача Томаса Аддисона, который впервые описал клиническую и гистологическую картину заболевания) [3].

В основе 1-НН лежит абсолютный дефицит кортикостероидов. Дефицит альдостерона приводит к потере через почки и желудочно-кишечный тракт натрия и воды с развитием дегидратации, гиповолемии, гипотонии, а также прогрессирующей гиперкалиемии. Дефицит кортизола – основного адаптогенного гормона человеческого организма – приводит к снижению сопротивляемости к различным эндо- и экзогенным стрессорам, на фоне которых (чаще всего во время инфекций) и происходит декомпенсация НН. Таким образом, в патогенезе гипокортицизма основную роль играют недостаточность кровообращения и дегидратация.

Подавляющее большинство симптомов НН (Таблица 1) являются неспецифичными, в связи с чем, достаточно часто болезнь диагностируется только на этапе острого аддисонического (адреналового) криза (острая надпочечниковая недостаточность или острый гипокортицизм). Это угрожающее жизни больного состояние, когда уровень кортизола не соответствует увеличенной потребности в нём. Острая надпочечниковая недостаточность является критическим состоянием, следовательно, требует быстрого распознавания и экстренного лечения, даже если диагноз еще не подтвержден лабораторными методами исследования [14].

Первым диагностическим шагом при подозрении на НН является определение уровня базального кортизола и АКТГ в крови в 6-10 часов утра. При наличии НН приблизительно у 15% пациентов может определяться нормальный уровень утреннего кортизола крови, однако повышение ≥ 500 нмоль/л исключает НН, и такие пациенты в дальнейшем обследовании не нуждаются. Если уровень кортизола < 140 нмоль/л, а плазменная концентрация АКТГ повышена более (>) чем в 2 раза относительно верхнего референсного значения, диагностируется 1-НН [16].

Лабораторным подтверждением минералокортикоидной недостаточности является повышение активности ренина плазмы (или прямого ренина) и неадекватно нормальный или низкий уровень альдостерона (при единовременном исследовании), а дефицита андрогенов – низкий уровень ДГЭА-С. Однако, в связи с тем, что уровень ДГЭА-С может быть снижен и у здоровых, особенно у лиц старшего возраста (прогрессирующее уменьшение секреции данного гормона после 40 лет отмечается как у мужчин, так и у женщин [17; 18]), рутинный контроль и изолированное исследование этого показателя нецелесообразны [5; 14]. Важно также отметить, что у женщин надпочечники являются основным источником продукции дегидроэпиандростерона (ДГЭА; который конвертируется в ДГЭА-С), в связи с чем, при

развитии НН имеет место значительное снижение уровня ДГЭА-С, вплоть до неопределяемого [18]. В то же время, у мужчин даже при развитии НН сохраняется продукция ДГЭА гонадами [19].

Таблица 1 – Клинические проявления надпочечниковой недостаточности [14]

Жалобы/симптомы	Клинические признаки	Лабораторные изменения
Надпочечниковая недостаточность		
1. Усталость, слабость 2. Снижение веса 3. Постуральное головокружение 4. Анорексия, абдоминальный дискомфорт 5. Тяга к соленому 6. Депрессия, чувство тревоги 7. Тяжелое течение интеркуррентных заболеваний	1. Гиперпигментация складок кожи, слизистых, рубцовых изменений, сосков; кожных покровов, подвергшихся инсоляции 2. Гипотония с выраженным постуральным снижением 3. Иногда отсутствие лобкового и подмышечного оволосения у женщин	1. Гипонатриемия 2. Гиперкалиемия
Аддисонический криз		
1. Выраженная слабость 2. Синкопальные состояния 3. Боли в животе, тошнота, рвота; клинические симптомы, идентичные «острому животу» 4. Резкие боли в поясничной области 5. Спутанность сознания, сопор	1. Выраженная гипотензия 2. Болезненная пальпация живота/напряженность мышц передней брюшной стенки 3. Лихорадка 4. Спутанность сознания, делирий 5. Олигурия с исходом в острую почечную недостаточность	1. Гипонатриемия 2. Гиперкалиемия 3. Гипогликемия 4. Гиперкальциемия 5. Повышение мочевины
Выраженный положительный эффект от терапии глюкокортикоидами		

Если на начальном (первом) этапе не удалось однозначно лабораторно подтвердить наличие НН, используют стимуляционные пробы (второй этап, подтверждающие тесты).

«Золотым» международным стандартом диагностики 1-НН является проба с синтетическим аналогом АКТГ короткого действия (тетракозактид, сАКТГ) [1; 2; 5; 20], который при нормальном функциональном состоянии коры надпочечников стимулирует синтез зависимых кортикостероидов. Если сАКТГ короткого действия не доступен, допускается применение модифицированного теста с сАКТГ пролонгированного действия (сАКТГп). 1-НН может быть исключена, если после введения сАКТГ или сАКТГп уровень кортизола плазмы превышает 500 нмоль/л [5; 15].

В РФ, в связи с недоступностью сАКТГ и сАКТГп, для диагностики НН проводится проба с инсулиновой гипогликемией. В ходе данного теста инсулин короткого действия вводится внутривенно в дозе 0,1–0,15 ЕД/кг. Исходно и после введения инсулина через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минут [21] (в настоящее время общепринятый протокол исследования отсутствует) производят забор венозной крови и в каждом образце определяют уровень кортизола и глюкозы. Если пиковый уровень кортизола крови превысит 500 нмоль/л, можно говорить об отсутствии НН. В ином случае уровень кортизола имеет диагностическое значение только, если на фоне пробы достигнута гипогликемия ≤2,2 ммоль/л [15].

После установления диагноза 1-НН необходимо сразу исключить ее туберкулезную этиологию. С этой целью проводят рентгенографию грудной клетки; также выполняют компьютерную томографию надпочечников для определения инфильтративного или метастатического процесса. При туберкулезном поражении надпочечников выявляется гиперплазия на ранних стадиях и кальцификаты на поздних стадиях. При двустороннем поражении, в некоторых случаях, может быть рассмотрена генетическая причина заболевания, при которых происходит хроническая стимуляция надпочечников АКТГ.

При отсутствии данных о туберкулезном процессе и других редких причинах 1-НН, в большинстве случаев, диагностируется АНН. Как указано выше, специфическим маркером аутоиммунного адреналита являются АТ к надпочечниковому ферменту Р450с21. В настоящее время на территории Российской Федерации исследование АТ к Р450с21 крови не получило широкого клинического распространения и диагноз устанавливается путем исключения другой патологии. Веским аргументом в пользу аутоиммунного генеза 1-НН является наличие у пациента сопутствующей аутоиммунной патологии, в том числе эндокринных органов, т.е. фактически АПС [8].

Лабораторным маркером адренолейкодистрофии является высокий уровень длинноцепочечных жирных кислот. При 1-НН это исследование показано пациентам мужского пола (молодым, а также старшей возрастной категории с отрицательным анализом на АТ к Р450с21), особенно, при сочетании заболевания с различного рода неврологической симптоматикой [22].

Для исключения моногенных патологий, необходимо рассмотрение вопроса о генетическом обследовании. Установление генетического дефекта при наследственных формах гипокортицизма дает возможность определить риск рождения больных детей в семье пациента, проводить пренатальную и предимплантационную диагностику, а в некоторых случаях и пренатальное лечение плода.

Всем пациентам с НН показана терапия глюкокортикоидами. Чтобы воспроизвести циркадный ритм, данные препараты обычно назначаются в 2 или 3 (в редких случаях в 4) приема, приблизительно через каждые 5–6 часов, с перераспределением самой высокой дозы (приблизительно ½ или 2/3) на утро, сразу после пробуждения, и самой низкой в последний прием. Наиболее часто для заместительной терапии НН назначается таблетированный гидрокортизон, реже кортизона ацетат. У взрослых физиологическая суточная секреция кортизола зависит от возраста и состава тела и, в среднем, составляет 5–8 мг/м^2/сутки. Таким образом, с учетом метаболизма препарата гидрокортизона, эквивалентная суточная доза должна составлять 15-25 мг (для кортизона ацетата 20-35 мг). Как альтернатива гидрокортизону, особенно в тех случаях, когда у пациента нет улучшения с точки зрения качества жизни и работоспособности или тяжело придерживаться многократного режима дозирования, возможно назначение преднизолона (3-5 мг/сутки) перорально однократно или дважды в день [5; 23; 24].

Подбор заместительной терапии глюкокортикоидами базируется практически исключительно на данных клинической картины и опыте врача, так как надежные лабораторные критерии ее адекватности отсутствуют.

Выделяют следующие критерии адекватности глюкокортикоидной терапии НН:

- минимально выраженные жалобы на слабость, дневную сонливость, снижение работоспособности и концентрации внимания;
- отсутствие жалоб на снижение аппетита, тошноту, признаков передозировки (нарастание веса и отеков, кушингоидизация, остеопения, остеопороз, нарушение углеводного и липидного обменов, бессонница) и выраженной гиперпигментации кожи (или ее нарастания);
- поддержание нормальной массы тела и АД.

Заместительная терапия 1-НН подразумевает обязательное комбинированное назначение препаратов глюко- и минералокортикоидов. Для заместительной терапии минералокортикоидами назначается флудрокортизон утром, стартовая суточная доза обычно составляет 50-100 мкг, поддерживающая суточная доза – 50-200 мкг. Пациентам рекомендуется не ограничивать потребление соли. При чрезмерном потоотделении, например, в условиях жаркого климата, необходимо временное увеличение дозы на 50-100% и увеличение потребления соленых продуктов. На фоне терапии преднизолоном с менее выраженной минералокортикоидной активностью может потребоваться доза флудрокортизона больше, чем на фоне лечения гидрокортизоном [25]. Компенсация минералокортикоидной недостаточности оценивается по клинико-лабораторным показателям:

- нормальные уровни калия и натрия крови;

- в верхнем референсном диапазоне или умеренно повышенный уровень активности ренина плазмы (или прямого ренина);
- нормальное артериальное давление (АД);
- отсутствие отеков, ортостатической гипотензии (измеряется АД сидя и стоя), головокружений, тяги к соленым продуктам.

Передозировка минералокортикоидными препаратами приводит к развитию отеков, повышению АД и гипокалиемии [5].

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

Согласно данным зарубежных исследователей, высокочувствительным и высокоспецифичным методом дифференциальной диагностики АНН от других форм 1-НН является определение в крови уровня АТ к Р450с21, экспрессирующейся исключительно в клетках коры надпочечников [26-28]. На частоту обнаружения АТ оказывает влияние продолжительность заболевания: так, при манифестации АНН они выявляются у 100% пациентов [26], в то время как через 35 лет – только у 60% [29]. С другой стороны, АТ к Р450с21 могут циркулировать за несколько лет (и даже десятилетий [30]) до развития АНН [29]. При этом формирование АТ к Р450с21 происходит у генетически предрасположенных пациентов при воздействии триггерных факторов [4; 6] на потенциальной стадии АНН (пАНН). Клинические проявления на данной стадии отсутствуют. Далее, на субклинических (латентных) стадиях 1-3 происходит деструкция клеток клубочковой и затем пучковой зоны коры [26]. При этом заболевание длительное время имеет субклинический характер: симптомы в основном эпизодические и легкие. Вместе с тем, при воздействии значимых провоцирующих факторов (травмы, инфекции, операции, родоразрешение) латентная 1-НН может манифестировать развитием адреналового криза с летальным исходом [31; 32]. Клиническая стадия развивается при разрушении 90% клеток коры надпочечников [6] и проявляется яркой клинической картиной [26; 33] (Рисунок 1). Как правило, диагноз устанавливается только на данной стадии, нередко при развитии адреналового криза. Описанная классификация предложена Betterle C. и соавторами (соавт.) [26]. Лабораторные изменения на каждой стадии представлены в Таблице П1 (приложение).

В настоящее время, представленная классификация в РФ не принята, что не позволяет осуществлять активный скрининг ранних стадий АНН и, соответственно, своевременно инициировать лечение и существенно уменьшить смертность пациентов. Также, необходимо отметить, что представленная классификация требует модификации, так как не содержит четких критериев диагностики (прежде всего, уровня гормонов, отражающих функцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы) для каждой стадии заболевания.

Кроме того, актуально проведение исследований, направленных на определение точных механизмов запуска патологического процесса на потенциальной стадии АНН, что

позволит разработать эффективные методы для предупреждения прогрессирования заболевания и развития явной клинической картины с жизнеугрожающими осложнениями.

Рисунок 1 – Стадии аутоиммунной надпочечниковой недостаточности, в соответствии с классификацией Betterle C. и соавторами *(адаптировано из [26])*

Примечания: НН – надпочечниковая недостаточность; P450c21 – 21-гидроксилаза.

В настоящее время предметом дискуссии является вопрос о наличии ассоциации между уровнем АТ к P450c21 и функцией коры надпочечников [27], а также о риске прогрессирования до клинической АНН при носительстве этих АТ [8]. Кроме того, отсутствует алгоритм динамического наблюдения пациентов с повышенными АТ [34].

В одном из исследований [27] выявлена значимая корреляция уровня АТ к P450c21 и степени адреналовой дисфункции. Более того, авторы описывают случаи спонтанной ремиссии заболевания (т.е. восстановления функции коры надпочечников и снижения уровня АТ к P450c21 до нормы) на ранних стадиях АНН.

В другом исследовании при наблюдении 54 пациентов с АИЗ (без АНН) и носительством АТ к P450c21 в течение 45 месяцев развитие клинической стадии АНН зафиксировано в 21 случае: ежегодная заболеваемость у детей составила 35%, а у взрослых – 5% [26]. Для своевременной диагностики заболевания Eisenbarth G. S. и соавт. (2004) [34] рекомендуют проведение ежегодного обследования у носителей АТ с нормальной исходной функцией коры надпочечников: определение показателей АКТГ и кортизола и проведение пробы с тетракозактидом.

Coco G. и соавт. (2006) [8] в своей работе оценивали риск развития мАНН в зависимости от пола, возраста, наличия сопутствующих заболеваний, уровня АТ и

исходной функции коры надпочечников у 100 носителей АТ к АСА[1] (86 из них имели также повышенные АТ к Р450с21; медиана длительности наблюдения – 4,8 лет). Обнаружено, что риск развития заболевания выше у детей, лиц мужского пола, пациентов с исходно нарушенной функцией коры надпочечников, больных с гипопаратиреозом и/или КСК (по сравнению с больными с другими аутоиммунными или неаутоиммунными заболеваниями), носителей с более высоким уровнем АСА. На основании полученных данных была разработана шкала риска развития АНН, учитывающая все вышеупомянутые параметры. При этом в каждой группе пациентов рекомендовано динамическое наблюдение с определенной частотой: при низком риске – 1 раз в 24-36 месяцев, при умеренном – 1 раз в 12-18 месяцев, при высоком – 1 раз в 6-12 месяцев.

Благодаря проведению скрининга, в ряде случаев удалось предупредить развитие клинической стадии заболевания [26]. Так, De Bellis A. и соавт. (2001) [35] описывают больную с БГ, эндокринной офтальмопатией (ЭОП), повышением АТ к Р450с21 и лАНН (диагноз был поставлен на основании недостаточного выброса кортизола на фоне теста с тетракозактидом). Через 6 месяцев лечения преднизолоном (назначенным, в связи с наличием ЭОП), выявлено снижение уровня АТ до референсных значений и адекватный выброс кортизола в ходе провокационной пробы с тетракозактидом. При последующем наблюдении в течение 94 месяцев сохранялся нормальный уровень АТ. По мнению авторов, эффект краткосрочной терапии кортикостероидами обусловлен их иммуносупрессивным действием за счет снижения функции В-лимфоцитов и продукции ими АТ к Р450с21. В то же время, восстановление адренокортикальной функции, наиболее вероятно, связано с обратным развитием процесса Т-клеточной деструкции под действием глюкокортикоидов. Также, предполагается, что, в связи со снижением функции коры надпочечников на фоне приема кортикостероидов (по принципу обратной отрицательной связи), происходит уменьшение экспозиции аутоантигенов клеткам иммунной системы и снижение иммунной аутоагрессии. Однако, вместе с тем, не исключается и «волнообразное» течение заболевания, которое описано, например, при АИТ [36].

В настоящее время на территории РФ исследование АТ к Р450с21 не получило широкого распространения и диагноз АНН устанавливается путем исключения другой патологии, а скрининг заболевания и вовсе не внедрен [3]. Также, отсутствуют данные по выявлению пАНН и лАНН в группе риска и оценке зависимости выраженности

---

[1] До недавнего времени наряду с АТ к Р450с21 в качестве серологического маркера АНН рассматривались также АТ к митохондриальным/микросомальным антигенам клеток коры надпочечников (АСА). Однако, согласно данным Coco G. и соавт. (2006) [8], более точным показателем являются АТ к Р450с21. Так, в данном исследовании ни у одного из 14 носителей АСА с нормальным уровнем АТ к Р450с21 не развилась АНН в течение периода наблюдения 6 лет.

клинических проявлений и степени нарушения функции коры надпочечников от уровня АТ на всех стадиях заболевания во взрослой когорте (подобные исследования проводились исключительно на детской когорте пациентов преимущественно с АПС-1 [37]).

1.3. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности

1.3.1. Иммунопатогенез аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Предрасположенность к АНН в большинстве случаев (за исключением АПС-1) определяется генами *HLA*, кодирующими молекулы главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, MHC) II класса. Молекулы MHC обеспечивают взаимодействие антигенов (АГ) с рецептором Т-лимфоцитов (TCR), то есть их презентацию (представление). При этом молекулы MHC I класса экспрессируются на всех ядросодержащих клетках организма. В случае злокачественной трансформации клетки или инфицирования вирусом они обеспечивают презентацию АГ (например, вируса) $CD8^+$ Т-лимфоцитам, которые вызывает ее апоптоз (запрограммированную смерть). Таким образом, реализуется клеточный иммунный ответ. Молекулы MHC II класса экспрессируются исключительно на антигенпрезентирующих клетках (АПК): лимфоцитах, дендритных клетках (ДК), макрофагах. Данные клетки поглощают АГ, расщепляют их и связывают образовавшиеся пептиды с молекулами MHC II класса, которые презентируют их $CD4^+$ Т-лимфоцитам. АПК также экспрессируют так называемые ко-стимуляторные молекулы (CD80, CD86), которые необходимы для полноценной активации $CD4^+$ Т-лимфоцитов [38]. После взаимодействия с АПК $CD4^+$ Т-лимфоциты активируются и конвертируются в Т-хелперы (Th1 и др.), обеспечивающие дальнейшее развитие клеточного (благодаря стимуляции $CD8^+$ Т-лимфоцитов) или гуморального (благодаря стимуляции В-лимфоцитов) иммунного ответа [39].

В норме адренокортикальные клетки экспрессируют молекулы MHC II класса, однако ко-стимуляторные молекулы на их поверхности отсутствуют, поэтому активация $CD4^+$ Т-лимфоцитов невозможна. Тем не менее, кора надпочечников активно взаимодействует с иммунной системой: в ее ткани постоянно присутствуют макрофаги и ДК, а также Т- и В-лимфоциты. Кроме того, в адренокортикальной ткани могут циркулировать цитокины – молекулы, регулирующие межклеточное взаимодействие и, согласно некоторым данным, оказывающие влияние на продукцию стероидных гормонов [6].

Глюкокортикоиды также оказывают влияние на иммунную систему, включая тимус, посредством воздействия на внутриклеточные рецепторы. Хорошо известно, что данные гормоны стимулируют апоптоз лимфоцитов и подавляют экспрессию генов рецепторов к цитокинам данных клеток. Супрафизиологические дозы экзогенных глюкокортикоидов (100 или

400 мг гидрокортизона или 60 мг преднизолона), вызывают обратимое снижение числа циркулирующих лимфоцитов (в большей степени Т-клеток) через 4-6 часов, что, предположительно, обусловлено их перераспределением из сосудистого русла в периферические лимфоидные органы. Важно отметить, что ответ оставшихся циркулирующих Т-лимфоцитов на митоген не меняется, тогда как В-лимфоцитов – снижается [40].

Однако эффекты глюкокортикоидов этим не ограничиваются. Так, в экспериментах *in vitro* показано, что глюкокортикоиды в физиологических концентрациях или стандартных терапевтических дозах могут стимулировать некоторые функции В-лимфоцитов, в частности, синтез АТ. Кроме того, данные гормоны опосредуют индукцию экспрессии лиганда CD40 (CD40L) на поверхности В-лимфоцитов, что приводит к увеличению синтеза и секреции IgE. В другом исследовании обнаружено, что *in vitro* глюкокортикоиды могут поддерживать выживание и развитие В-лимфоцитов. Также предположено потенциальное влияние глюкокортикоидов на поздние стадии созревания В-лимфоцитов, в частности, предотвращение появления аутореактивных клонов [40].

Иммунопатогенез АНН представлен на Рисунке 2. Развитие АНН происходит при срыве ИТ, обеспечивающей отсутствие реакции иммунной системы на молекулы собственного организма в норме. Существуют центральные и периферические механизмы поддержания ИТ. К центральным механизмам относится устранение аутореактивных клонов Т- и В-лимфоцитов во время их развития в костном мозге и тимусе. Однако, данный процесс не является совершенным, и аутореактивные клетки всё же могут попадать в периферический кровоток. В этом случае включаются механизмы периферической ИТ [38].

В поддержании периферической ИТ участвуют регуляторные Т- и В-лимфоциты (Treg и Breg, соответственно), которые обладают иммуносупрессивными свойствами. Механизмы действия Treg, которые дифференцирутся из $CD4^+$ Т-лимфоцитов под действием интерлейкина (ИЛ)-10 и трансформирующего фактора роста (ТФР)-β [38], хорошо изучены: они подавляют активацию, пролиферацию и эффекторную функцию АПК и аутореактивных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Кроме того, Treg экспрессируют фактор транскрипции FOXP3 [41] (Forkhead winged helix box3, скурфин), который блокирует синтез провоспалительных цитокинов [42]. Известно, что нарушения в системе Treg имеют место при ряде АИЗ, в том числе при АПС-2 [43]. В то же время, роль Breg в поддержании ИТ изучена недостаточно [44-47].

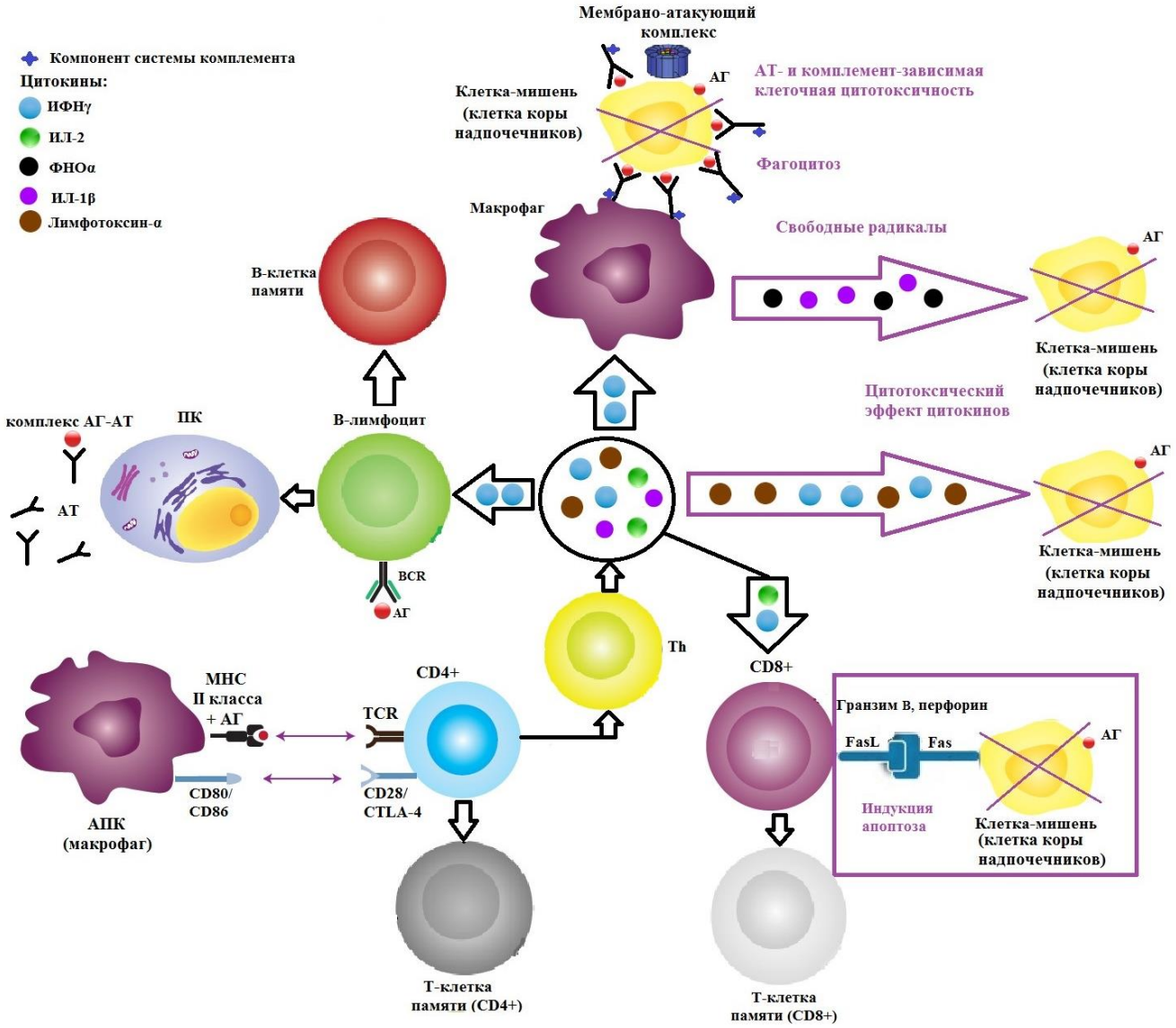


Рисунок 2 – Иммунологические основы патогенеза аутоиммунной надпочечниковой недостаточности [14]

Примечания: АГ-антиген; АТ-антитело; ИФНγ – интерферон-γ; ИЛ-2 – интерлейкин-2; ФНОα – фактор некроза опухоли-α; ИЛ-1β – интерлейкин-1β; ПК – плазматическая клетка; BCR – B-cell receptor (В-клеточный рецептор); Th – Т-хелпер; АПК – антиген-презентирующая клетка; MHC – Major Histocompatibility Complex (главный комплекс гистосовместимости); TCR – T-cell receptor (Т-клеточный рецептор); FasL – Fas-лиганд; Fas – Fas-рецептор; CD4+ – Т-лимфоцит, содержащий поверхностный маркер CD4; CD8+ – Т-лимфоцит, содержащий поверхностный маркер CD8; CD80, CD86 – ко-стимуляторные молекулы; CD28, CTLA-4 – рецепторы ко-стимуляторных молекул CD80 и CD86.

АНН в составе АПС-1 и АНН в составе АПС-2 (а также изолированная АНН) принципиально отличаются по патогенезу: в первом случае нарушается центральная ИТ, а во втором – периферическая ИТ. Ключевым моментом в инициации аутоиммунного адреналита у предрасположенных лиц является воздействие триггерных факторов: инфекционный процесс,

стресс [4; 6]. Индуцировать развитие АНН может также терапия злокачественных новообразований препаратами-блокаторами иммунологических контрольных «точек» (immune checkpoint inhibitors), которые не позволяют иммунной системе воздействовать на опухолевые клетки: CTLA4[2], PD-1 и PD-L1[3] [48; 49].

При разрушении клеток надпочечников их содержимое (в том числе фермент стероидогенеза P450c21) становится доступным иммунной системе и воспринимается ею как АГ [4; 6]. Далее происходит поглощение АГ надпочечников АПК, их процессинг и презентация Т-лимфоцитам (а именно – $CD4^+$, Th) в комплексе с молекулами MHC II класса. После получения дополнительного сигнала от ко-стимулирующих молекул, экспрессируемых на поверхности АПК (CD80 и CD86) [38; 50], CD4+ Т-лимфоциты активируются и дифференцируются для участия в последующих стадиях иммунного ответа [39]. Затем происходит разрушение коры надпочечников преимущественно механизмами клеточного иммунного ответа (цитотоксическое действие цитокинов и фагоцитоза), а также вследствие АТ- и комплемент-зависимой клеточной цитотоксичности.

В частности, предполагается, что в развитии аутоиммунного адреналита могут играть роль цитокины ИФН-α, BAFF (B-cell activating factor) и ИЛ-21 [29]. Важную роль в патогенезе АНН играет ИФН-γ, активирующий макрофаги [6], которые оказывают цитотоксическое действие на клетки-мишени посредством цитокинов (фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) и ИЛ-1β [4]), активных форм кислорода и азота, фагоцитоза [7]. Кроме того, ИФН-γ (совместно с ИЛ-2) участвует в активации цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$), которые индуцируют апоптоз клеток-мишеней за счет:

-высвобождения белков перфорин и гранзим B, которые оказывают протеолитическое действие;

-экспрессии Fas-лиганда (FasL) [51] и других механизмов.

Также, ИФН-γ (как и лимфотоксин-α) оказывает прямое цитотоксическое действие на клетку-мишень [4] и является дополнительным стимулом для активации В-лимфоцитов [6] (помимо основного – связывание рецепторов этих клеток (BCR) с АГ) [39]. В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки (ПК), продуцирующие АТ [8; 35]. АТ к P450c21 относятся к подтипу IgG1 [52] и могут модулировать процесс презентации АГ (P450c21) Т-лимфоцитам [53].

---

[2] Рецептор CTLA4 экспрессируется на поверхности активированных $CD4^+$, $CD8^+$, Treg и подавляет клеточный иммунный ответ в лимфоидных тканях [49].

[3] Рецептор программированной смерти PD-1 экспрессируется на активированных $CD4^+$, $CD8^+$, В-лимфоцитах и других клетках и подавляет клеточный иммунный ответ в периферических тканях при взаимодействии с лигандами: PD-L1 и PD-L2 [49].

АТ опсонируют поверхность клетки, связываясь с АГ на ее поверхности, и запускают реакции АТ-зависимой клеточной цитотоксичности посредством системы комплемента (каскад сывороточных белков) и фагоцитов. Так, комплекс АГ-АТ активирует систему комплемента с формированием мембрано-атакующего комплекса, вызывающего цитолиз клетки-мишени. Кроме того, компоненты комплемента участвуют в процессе опсонизации, связываясь с АТ (комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность [37]). В последующем макрофаги (и другие фагоциты) поглощают (фагоцитируют) и разрушают клетки-мишени, опсонированные АТ и комплементом [39; 54; 55].

Необходимо отметить, что при иммунном ответе на белковые АГ формируются Т- ($CD4^+$ и $CD8^+$) и В-клетки памяти, а также долгоживущие ПК, которые поддерживают длительно существующий (в некоторых случаях – в течение всей жизни человека) защитный уровень АТ. Клетки памяти обеспечивают более быструю индукцию иммунного ответа при повторной встрече с АГ – вторичный иммунный ответ [38; 56].

В ответ на инициацию аутоиммунных реакций активируются механизмы иммуносупрессии. В норме между данными процессами поддерживается баланс, однако, нередко имеет место нарушение регуляторных механизмов, приводящее к развитию тех или иных иммунопатологических состояний, в частности аутоиммунных.

1.3.2. Роль регуляторных В-лимфоцитов в норме и при аутоиммунной патологии

В норме Breg составляют менее 10% циркулирующих В-лимфоцитов [57]. Ежедневно в периферический кровоток попадают вновь образованные В-лимфоциты, которые составляют до 5-10% от общего пула периферических В-клеток. В отличие от Т-лимфоцитов, которые существуют 1 000-10 000 дней, продолжительность жизни В-лимфоцитов, в большинстве случаев (90%), составляет несколько недель. Но, вместе с тем, существуют и другие популяции В-лимфоцитов, которые обновляются каждые несколько дней и даже чаще [54; 58].

Принадлежность клеток к В-лимфоцитарному ряду определяет поверхностный маркер CD19. Однако в процессе дифференцировки В-лимфоциты экспрессируют и множество других маркеров [59]. Среди Breg наиболее изучена субпопуляция, ингибирующая иммунный ответ за счёт продукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (В10-лимфоциты (В10) [60]) и включающая множество клеток с различным фенотипом [61]. Однако большинство В10 имеет фенотип $CD24^{hi}CD38^{hi}$ (с высоким уровнем экспрессии поверхностных маркеров CD24 и CD38) [62].

К субпопуляции B10 относятся: предшественники B10 (B10pro), B10 и B10 эффекторные клетки (B10eff). Активная секреция ИЛ-10 осуществляется B10eff – малочисленной группой клеток, которая существует непродолжительное время (в течение 24-48 часов), что затрудняет их идентификацию *in vivo*. *Ex vivo* ИЛ-10-компетентность определяется по способности экспрессировать данный цитокин при стимуляции митогенами: форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) и йономицином [60]. Показано, что В-лимфоциты могут приобретать регуляторные свойства практически на любом этапе дифференцировки [60], начиная с ранней незрелой стадии и заканчивая поздней стадией ПК. Предполагается, что развитие и функционирование B10 индуцируется взаимодействием BCR с АГ, которое приводит к запуску функциональной программы, позволяющей В-лимфоцитам стать ИЛ-10-компетентными (Рисунок 3). После получения антигенного стимула В-лимфоциты превращаются в B10pro, которые не продуцируют ИЛ-10 под действием митогенов, несмотря на доступность локуса гена ИЛ-10 (*il10*) для транскрипции. При воздействии агонистичных моноклональных АТ (мАТ) к CD40 B10pro индуцируются в функционально зрелые ИЛ-10-компетентные B10 с транскрипционно активным локусом *il10*, экспрессирующие ИЛ-10 при стимуляции PMA и йономицином. B10 могут трансформироваться в B10eff, которые активно секретируют ИЛ-10 в течение 24-48 часов. Далее небольшая часть B10eff (< 1%) дифференцируется в АТ-секретирующие ПК, которые не синтезируют ИЛ-10, предположительно, вследствие недоступности локуса *il10* [60].

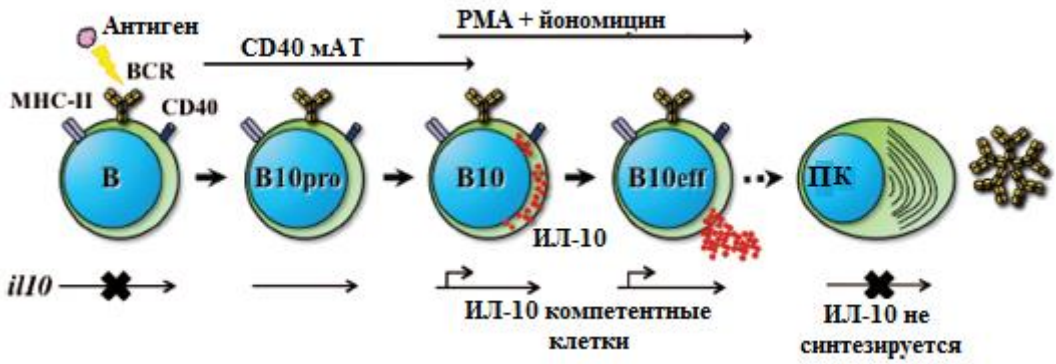


Рисунок 3 – Приобретение интерлейкин-10-компетентности В-лимфоцитами *(адаптировано из [60])*

Примечания: ИЛ-10 – интерлейкин-10; MHC-II – главный комплекс гистосовместимости II класса; BCR – B-cell receptor (В-клеточный рецептор); B10pro – предшественник B10; B10eff – B10 эффекторная клетка; ПК – плазматическая клетка; PMA – форбол-12-миристат-13-ацетат; CD40 – рецептор В-лимфоцитов; CD40 мАТ – моноклональное антитело к CD40.

Ключевую роль в регуляции развития и активности Breg играют специфичность BCR и интенсивность антигенных сигналов. В частности, дифференцировке В-лимфоцитов в ИЛ-10-компетентные клетки способствуют низкая аффинность BCR или хроническая антигенная стимуляция. Кроме того, необходимо отметить, что супрессивная функция В-лимфоцитов зависит от последовательности стимулов. Так, В-лимфоциты, стимулированные через рецептор CD40, секретируют в основном ИЛ-10 и лишь в незначительном количестве провоспалительные цитокины, тогда как при стимуляции через BCR и затем через CD40 наблюдается обратное соотношение продукции цитокинов [44]. Важно учитывать, что BCR и CD40 не являются специфичными маркерами Breg, т.к. обеспечивают регуляцию функций и других субпопуляций В-лимфоцитов [61].

70% ИЛ-10 продуцирующих В-лимфоцитов экспрессируют Т-клеточный иммуноглобулин-муцин 1 типа (TIM-1) [61] – трансмембранный гликопротеин, обеспечивающий поглощение апоптотических клеток [63]. Показано, что взаимодействие с Т-лимфоцитами через TIM-1 приводит к усилению сигнала, передаваемого BCR, и индукции ИЛ-10-компетентности. Существует и обратная связь: активация BCR индуцирует TIM-1 в В-лимфоцитах [44]. Кроме того, воздействие TIM-1-агонистичного АТ индуцирует экспансию Breg, а дефект TIM-1 приводит к уменьшению продукции ИЛ-10 и увеличению синтеза провоспалительных цитокинов В-лимфоцитами. Таким образом, данная молекула обеспечивает баланс между провоспалительными и противовоспалительными свойствами В-лимфоцитов.

Экспансия Breg может также стимулироваться бактериями-комменсалами. Так, на животной модели артрита, индуцированном микробиотой кишечника, продукция цитокинов напрямую способствует дифференцировке Breg и продукции ИЛ-10. При этом животные, получавшие антибиотики, имели меньшее число Breg по сравнению с группой контроля [44; 57]. Также, в экспериментах *in vitro* доказано, что продукцию ИЛ-10 В-лимфоцитами может стимулировать витамин D [44].

Таким образом, супрессивная функция В-лимфоцитов индуцируется после специфического сигнала на фоне определенного иммунологического контекста и ограничена во времени [44]. Предполагается, что триггером дифференцировки и/или активации Breg служит воспаление, как часть обратной отрицательной связи для предупреждения избыточного повреждения вследствие иммунного ответа [61; 63]. После окончания воспалительной фазы Breg подвергаются дальнейшей дифференцировке [45].

Известны следующие механизмы иммунной супрессии ИЛ-10 (Рисунок 4) [60; 64; 65]:

-ингибирование дифференцировки $CD4^+$ в Th [57; 61];

-индукция Treg [38; 45; 57; 60; 61];

-супрессия пролиферации [61] и продукции цитокинов Т-лимфоцитами [38; 61] и ДК (на мышиной модели рассеянного склероза) [61];

-уменьшение экспрессии молекул МНС II класса [38];

-аутокринный механизм: ИЛ-10, продуцируемый Breg, усиливает экспансию В10 [44].

Существуют и другие механизмы действия Breg:

-продукция ТФР-β [61; 66; 67], который усиливает действие Treg (*in vitro*), а также вызывает анергию $CD8^+$ и ингибирует ответ Th посредством супрессии функции ДК (на мышиной модели рассеянного склероза) [61];

-продукция ИЛ-35, который ингибирует Th и способствует экспансии Treg (на мышиной модели увеита) [61]. ИЛ-35 может действовать по аутокринному принципу, индуцируя Breg, продуцирующие ИЛ-35 и ИЛ-10 [44];

-экспрессия гранзима В и FasL, которые способствуют уменьшению пролиферации $CD4^+$ и их апоптозу [61; 66];

-экспрессия PD-L1, который ингибирует активацию Т-лимфоцитов и способствует индукции и поддержанию Treg [61].

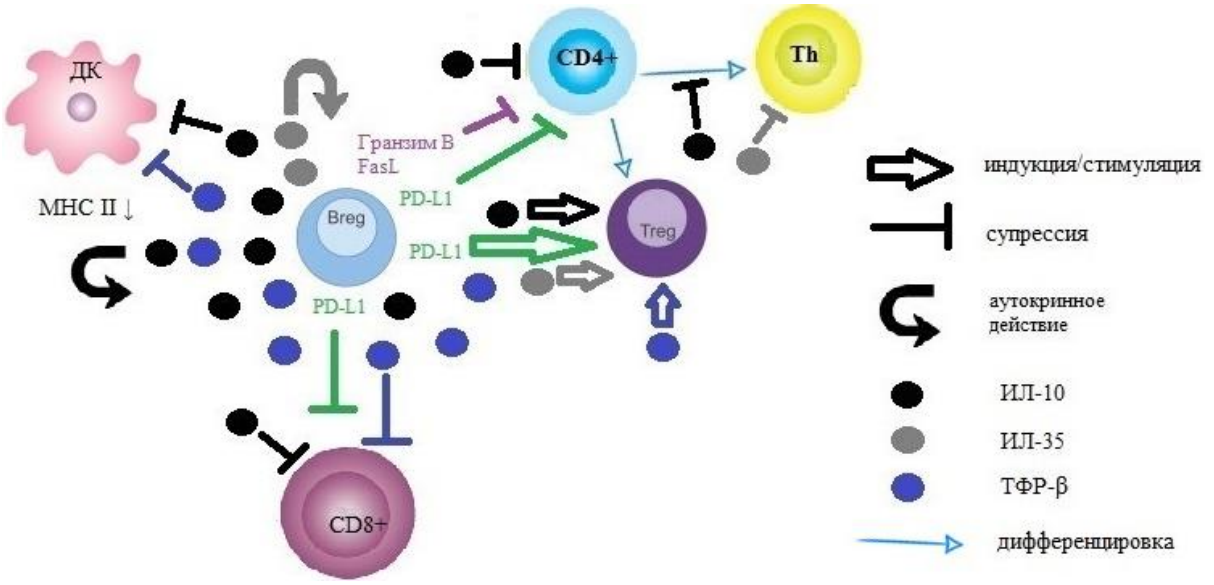


Рисунок 4 – Механизмы действия регуляторных В-лимфоцитов [14]

Примечания: ИЛ-10 – интерлейкин-10; ИЛ-35 – интерлейкин-35; ТФР-β – трансформирующий фактор роста β; ДК – дендритная клетка; МНС II – главный комплекс гистосовместимости II класса; Breg – регуляторный В-лимфоцит; Treg – регуляторный Т-лимфоцит; FasL – Fas-лиганд; Th – Т-хелпер; CD4+ – Т-лимфоцит, содержащий поверхностный маркер CD4; CD8+ – Т-лимфоцит, содержащий поверхностный маркер CD8; PD-L1 – лиганд рецептора программированной смерти.

В немногочисленных исследованиях Breg у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями получены противоречивые данные, которые не позволяют оценить роль этих клеток в патогенезе заболеваний и возможность их использования в качестве мишеней для терапевтического воздействия. В частности, Zha и др. выявили снижение способности В-лимфоцитов дифференцироваться в В10 у больных с БГ на фоне отсутствия лечения по сравнению со здоровыми лицами при неспецифической поликлональной стимуляции митогенами. Однако, Kristensen B и др., которые применяли идентичные стимулы, не обнаружили статистически значимой разницы в содержании В10 в группах пациентов и здоровых. Полученные результаты необходимо интерпретировать с осторожностью, т.к. больные во втором исследовании получали метимазол, который может ингибировать функцию лимфоцитов. Кроме того, эти данные не позволяют исключить наличие других нарушений регуляторных механизмов Breg [66].

Согласно данным Kristensen B. и др., индукция В10 при АИТ на фоне неспецифической стимуляции не нарушена (по сравнению со здоровыми лицами), однако, при этом не исключается дисфункция данных клеток [66]. Напротив, Santaguida M. G. и соавт. обнаружили увеличение числа В10 в группе пациентов. Полученные противоречивые результаты можно объяснить тем, что в первое исследование включались пациенты в состоянии манифестного гипотиреоза, тогда как во второе – с медикаментозной компенсацией заболевания. Кроме того, Santaguida M. G. и соавт. также выявили, что наличие сопутствующих неэндокринных АИЗ у пациентов с АИТ (атрофический гастрит, витилиго, целиакия) влияет на процентное содержание, фенотипические особенности и/или продукцию цитокинов Breg, приводя к увеличению содержания клеток с низкой функциональной активностью [45].

Также, необходимо отметить, что в исследованиях, включающих как пациентов с БГ, так и пациентов с АИТ, получены неоднозначные результаты в отношении фенотипических особенностей В10 [45; 66] и не уточнены фазы течения заболеваний (гипо-, гипер- или эутиреоза).

Kleffel S. и соавт. исследовали особенности В-клеточного ответа при СД1. Примечательно, что полученные результаты сравнивались не только с группой здоровых лиц, но и с членами семей больных СД1 первой степени родства, у которых определялись АТ к глутаматдекарбоксилазе (GAD) и тирозинфосфатазе (IA2). При этом у здоровых содержание В10 было достоверно выше, чем у больных и носителей АТ [68]. Особое внимание заслуживает исследование Di Caro V. и соавт. [69], которые сообщили о ремиссии СД1 под действием В10. Так, введение толерогенных ДК, которые индуцировали В10, в отличие от контрольных ДК, позволяло достичь нормогликемии. При этом долгосрочный эффект достигался при многократных инъекциях.

1.3.3. Перспективы изучения регуляторных В-лимфоцитов при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Не исключается, что изменение функциональных и фенотипических свойств данных клеток является пусковым фактором развития АНН. Таким образом, уточнение роли Breg имеет фундаментальное значение, т.к. позволит сформировать новую концепцию о молекулярных механизмах дисрегуляции иммунной системы в патогенезе данного заболевания. Кроме того, подобное исследование имеет важное практическое значение, так как полученные данные могут применяться с целью прогнозирования развития АНН и достоверного определения аутоиммунного генеза гипокортицизма.

Кроме того, способность регулировать иммунный ответ делает Breg перспективной терапевтической мишенью для предупреждения развития и лечения АИЗ [60; 70]. Такая возможность интенсивно изучается на животных моделях [63]: так, перенос B10 значительно уменьшал выраженность клинических проявлений ревматоидного артрита у мышей [71]. Некоторые авторы [44] предполагают, что данный подход в перспективе может применяться у человека.

Подчеркивается, что продукция ИЛ-10 является временным свойством B10, кроме того, субпопуляция данных клеток гетерогенна по степени выраженности иммуносупрессивных свойств [61]. Таким образом, для разработки новых фармакологических подходов актуален поиск факторов, способствующих длительному поддержанию регуляторных функций B10. В частности, перспективно уточнение механизмов регуляции транскрипции гена *il10* [60]. Кроме того, необходимо изучение других субпопуляций Breg [44; 61].

Следующим направлением должно стать изучение стимулов, способствующих экспансии Breg. С учётом вышесказанного, существуют эндогенные физиологические сигналы (в частности, цитокины), которые являются индукторами этих клеток, однако, системное введение цитокинов имеет риски развития серьезных неблагоприятных эффектов вследствие потенциальной возможности спровоцировать нежелательный провоспалительный ответ других типов клеток. Таким образом, важно создать длительное благоприятное окружение для дифференцировки именно Breg, не вызывая при этом побочного действия [44].

Кроме того, необходимо учитывать, что высокий уровень Breg может привести к избыточной иммуносупрессии и развитию онкологических и инфекционных заболеваний [44], что требует определения оптимального содержания данных клеток для эффективной терапии с минимальным риском побочных эффектов.

Таким образом, изучение функциональных и фенотипических особенностей Breg является многообещающим направлением в разработке методов профилактики и лечения АИЗ. Однако, исследований, посвященных роли данных клеток в патогенезе АНН у человека, ранее не проводилось. Более того, на животных моделях АНН Breg также не изучались.

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

TLR (рецепторы распознавания) экспрессируются клетками врожденного иммунитета и обеспечивают защиту от бактериальных инфекций посредством быстрой индукции воспалительной реакции. При активации, т.е. в процессе инфекции, TLR индуцируют синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые обеспечивают быстрое поступление лейкоцитов в инфицированные ткани. С целью элиминации патогенов, лейкоциты высвобождают токсические элементы гранул, включая активные формы кислорода, соединения азота или, например, протеиназы. В случае, если острый воспалительный ответ не может элиминировать патоген, или в случае аутоиммунной реакции, воспалительный процесс персистирует и приводит к сопутствующему повреждению тканей хозяина. Экспериментально доказана гиперактивация определенных TLR, в частности TLR9 (кодируется геном *TLR9* [72]), в патогенезе инсульта, СД, ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний, АИТ [73; 74].

Индукция воспаления в ткани надпочечников во время острой или хронической бактериальной или вирусной инфекции часто сопровождается увеличением экспрессии TLR, которые могут быть вовлечены в патогенез АНН. Так, TLR2 (кодируется геном *TLR2* [75]) и TLR9 опосредуют выраженный системный или локальный цитокиновый ответ с выбросом таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО-α. Также, лиганды TLR напрямую вызывают апоптоз адренокортикальных клеток и способствуют геморрагиям в надпочечниках в животных моделях [73].

Согласно данным ряда исследований, TLR обладают способностью связываться не только с экзогенными АГ, но и с эндогенными аутоантигенами, которые могут быть презентированы при вторичном некрозе клеток или высвобождаться при противовирусном иммунном ответе. Так, показано, что TLR2 и TLR9 вызывают активацию АПК и индукцию продукции ими ФНО-α при связывании с продуктами апоптоза β-клеток поджелудочной железы, и таким образом, способствуя активации аутоиммунного ответа с развитием СД1 [74].

С другой стороны, сигнальные пути TLR могут способствовать иммунорегуляторным механизмам для предотвращения аутоиммунного процесса, если β-клетки сохранны. Так,

активация TLR2 и TLR9 в отсутствии АГ β-клеток, за счет стимуляции Treg имеет превентивный эффект в отношении аутоиммунного СД. Кроме того, TLR2 стимулируют высвобождение не только провоспалительных, но и противовоспалительных/иммунорегуляторных цитокинов, таких как ИЛ-10. Таким образом, TLR2 может стимулировать как аутоиммунные процессы, так и иммунорегуляцию; при этом развитие СД1 определяется преобладанием того или иного процесса [74].

Кроме того, в патогенез АНН может быть вовлечен цитокин ИФН-λ, который относится к ИФН III типа и реализует ответ на вирусные инфекции. Сигнальный путь ИФН-λ осуществляется через гетеродимерный рецепторный комплекс (ИФН-λR), состоящий из ИФН-λR1 (ИЛ-28Rα; экспрессируется корой надпочечников) и ИФН-λR2 (ИЛ-10Rβ) цепей [76]. ИФН-λ кодируется геном *IL28B* [77].

С учётом ассоциации ряда АИЗ, в том числе системной красной волчанки (СКВ), СД1, АИТ, с вирусными инфекциями, а также возможной индукцией аутоиммунного процесса на фоне терапии ИФН, предполагается участие ИФН-λ в патогенезе АНН. Возможные иммунопатологические эффекты ИФН-λ на клетки коры надпочечников изучались при адренокортикальной карциноме. В частности, доказано, что ИФН оказывают цитотоксический эффект на клетки адренокортикальной карциномы и усиливают индуцированную ИФН-γ секрецию хемокинов. Кроме того, известно, что ИФН-λ опосредует увеличение экспрессии молекул МНС I класса, что усиливает презентацию вирусных пептидов и уничтожение инфицированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. Подобный механизм может способствовать развитию аутоиммунного процесса у предрасположенных лиц. Так, ИФН-λ увеличивает презентацию пептидов P450c21 на молекулах МНС I класса адренокортикальных клеток, тем самым способствуя инициации реакций иммунной аутоагрессии. Подобный механизм описан в отношении аутоиммунного процесса при СД1 и АИТ [76].

Учитывая вовлеченность TLR2, TLR9 и ИФН-λ в патогенез АНН, представляется целесообразным изучение ассоциации соответствующих генов с риском развития заболевания. Согласно данным литературы, обнаружена ассоциация полиморфизма rs352140 гена *TLR9* с риском развития СКВ [78] и полиморфизма rs5743708 гена *TLR2* с атопическим дерматитом [79]. Роль полиморфизмов гена *IL28B* при АИЗ изучалась у пациентов с аутоиммунным гепатитом (ассоциации не обнаружено) [80] и при волчаночном нефрите (с риском развития заболевания ассоциированы аллель T полиморфизма rs8099917, аллель C полиморфизма rs12979860 и другие генетические маркеры) [81]. Однако, подобные исследования в отношении АНН ранее не проводились.

1.4. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности

«Золотым» международным стандартом диагностики 1-НН является проба с сАКТГ (тетракозактид). В настоящее время препарат на российском фармацевтическом рынке не доступен. В связи с чем, для диагностики 1-НН применяется проба с инсулиновой гипогликемией, имеющая потенциальный риск развития осложнений, в том числе тяжелой гипогликемии, которая, в свою очередь, может спровоцировать развитие аддисонического криза. Более того, проба противопоказана пожилым пациентам, при эпилепсии, тяжелых сердечно-сосудистых и других заболеваниях [14]. Таким образом, клиницисты нуждаются в надежном и более безопасном методе диагностики НН.

Кроме того, выявлены ограничения, связанные с исследованием кортизола крови. Так, известно, что более 90% циркулирующего кортизола связано с протеинами (85% с транскортином и 10% с альбумином), а биологическая активность данного гормона определяется исключительно свободной (св.) фракцией. При этом в клинической практике, в том числе при диагностике НН, определяется общая концентрация кортизола (св. и связанного с протеинами), что не отражает уровень активного кортизола [82-84].

С учётом вышесказанного, многообещающим при обследовании пациентов с подозрением на НН представляется неинвазивное исследование кортизола слюны. Исследование кортизола в слюне обладает целым рядом преимуществ. Так, в слюне содержится только биологически активная форма гормона. Кроме того, забор образца слюны является неинвазивным и может быть выполнен пациентом дома, что имеет большое значение, с учётом быстрого изменения концентрации кортизола примерно в течение часа после пробуждения. Образцы можно хранить при комнатной температуре в течение не менее недели без риска значительного снижения уровня кортизола. Более того, для выполнения забора образца слюны требуется всего несколько минут, тогда как для проведения пробы с инсулиновой гипогликемией – более двух часов. Стоимость обследования пациента на основании исследования кортизола слюны меньше, по сравнению с пробой с инсулиновой гипогликемией [82-84].

Исследование кортизола слюны широко применяется в диагностике эндогенного гиперкортицизма. Отметим, что, с учётом циркадного ритма секреции гормона (пиковый уровень в 06:00-08:00 и минимальный – вечером), с целью диагностики гиперкортицизма целесообразно проводить анализ вечерней слюны, а НН – утреннего образца [83].

В работе Restituto P. и соавт. исследование кортизола слюны при НН продемонстрировало сопоставимое с исследованием кортизола крови качество модели. В связи с чем, авторы

допускают возможность анализа слюны на кортизол как альтернативного скринингового теста для диагностики НН. Однако результаты данного теста необходимо интерпретировать с осторожностью, с учётом относительно низкой специфичности метода [83].

Langelaan M. L. P. и соавт. также провели исследование с целью оценки возможности применения анализа слюны на кортизол для диагностики НН. При этом у лиц без НН минимальный уровень кортизола слюны составил 1,0 нмоль/л, тогда как максимальный уровень у пациентов с НН – 5,9 нмоль/л. Согласно полученным результатам, показатель > 5,9 нмоль/л отмечался в 28% случаев, а < 1,0 нмоль/л – в 6% случаев. Таким образом, при использовании данных критериев диагноз НН может быть уточнен без проведения дополнительных исследований у 35% пациентов [82]. В другом исследовании определено отсутствие необходимости в подтверждающем тестировании в 26% случаев при диагностических критериях 3,2 нмоль/л и 13,2 нмоль/л, соответственно [84].

Несмотря на множество преимуществ, исследование кортизола слюны не используется так же широко, как и исследование кортизола крови, в клинической практике. Это связано с небольшим количеством публикаций и отсутствием стандартизированных отрезных точек для первичного скрининга [83].

1.5. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний

Как известно, маркерами аутоиммунного генеза эндокринных заболеваний, а также предикторами их развития, являются АТ к молекулам-мишеням. Так, при АИТ в крови пациентов более чем в 90% случаев обнаруживаются АТ к тиреоидной пероксидазе (ТПО) и в 50-90% случаев – к тиреоглобулину (ТГ) [38]. ТГ секретируется и накапливается в коллоиде ЩЖ и является высокомолекулярным предшественником тиреоидных гормонов [85]. ТПО является ключевым ферментом биосинтеза тиреоидных гормонов, отвечающим за йодирование остатков тирозина ТГ [86].

Основным иммунологическим маркером БГ являются АТ к рецептору тиреотропного гормона (АТ-рТТГ), которые могут быть обнаружены в 90% случаев [38]. Более того, АТ-рТТГ играют ключевую роль в патогенезе заболевания, стимулируя синтез тиреоидных гормонов посредством активации рТТГ у большинства пациентов [87]. Необходимо отметить, что на фоне лечения БГ тиреостатиками уровень АТ-рТТГ уменьшается [88].

Несмотря на то, что СД1 и латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA) являются Т-клеточно-опосредованными заболеваниями, важную роль в аутоиммунной деструкции островков поджелудочной железы играют β-клетки, продуцирующие АТ. Наиболее изучены АТ к GAD (ферменту β-клеток поджелудочной железы, обеспечивающему синтез γ-аминомасляной кислоты [89]), инсулину (IAA), IA2 (предположительно участвующей в аутокринном сигнальном пути инсулина [90]), транспортеру цинка (ZnT8; предположительно участвующему в накоплении и секреции инсулина [91]), клеткам островков Лангерганса (ICA). АТ как минимум одного вида определяются у более чем 90% больных с впервые выявленным СД1 [38].

Результаты последних исследований [26] выявили, что высокочувствительным методом подтверждения аутоиммунного генеза НН является определение АТ к P450c21 – ферменту стероидогенеза, который экспрессируется исключительно в коре надпочечников [92]. АТ к P450c21 определяются у 80-100% пациентов с АНН на момент манифестации заболевания [26].

У большинства пациентов с АПС-1, вне зависимости от числа основных компонентов заболевания и положения мутации в гене *AIRE*, определяются АТ к ИФН-ω (в 99% случаев) и -α2 (в 95% случаев). При этом данные АТ не определяются при изолированном гипопаратиреозе, КСК, АНН, АПС-2 и у здоровых лиц. Таким образом, исследование АТ к ИФН -ω и -α-2 является высокочувствительным и высокоспецифичным (АТ-ИФН-ω: 100%; АТ-ИФН-α-2: 99,9%) методом диагностики АПС-1. Учитывая простоту выполнения данного исследования (по

сравнению с генетическим анализом), предлагается внедрить определение АТ к ИФН -ω и -α-2 при диагностически трудных случаях. Так, исследование АТ к ИФН возможно при наличии только одного основного компонента АПС-1 или нетипичной манифестации заболевания, например, у пациентов с необъяснимым гепатитом, кератопатией и т.д [93].

В России исследование АТ-ИФН проводится методом качественного определения с использованием клеточной культуры HEK-blue (HEK-blue cells assay). В основе метода лежит способность клеток синтезировать щелочную фосфатазу в присутствии ИФН и подавление данной способности при высоком титре нейтрализующих АТ-ИФН в сыворотке пациента. Наличие секретированной щелочной фосфатазы определяется при помощи спектрометра; ингибирование ИФН представляется в виде процента нейтрализации (индекс АТ).

Согласно данным Орловой Е. М. и соавт. [94], внедривших метод качественного определения АТ-ИФН-ω и -α-2 с использованием клеточной культуры HEK-blue в РФ, подтверждена его высокая чувствительность и специфичность. Однако данный метод является трудоемким, в связи с необходимостью культивирования клеток. Еще одним недостатком метода является большая длительность самого исследования – около суток.

Kisand K. и соавт. обнаружили, что у пациентов с КСК в составе АПС-1 значительно снижен интерлейкиновый (ИЛ-22) ответ как на АГ *Candida albicans*, так и на поликлональную стимуляцию, что обусловлено действием нейтрализующих АТ к данным цитокинам. В частности, АТ-ИЛ-22 были выявлены в 91% случаев. Авторы подчеркивают, что нарушение интерлейкинового ответа и повышение уровня АТ ассоциировано именно с КСК в составе АПС-1. При этом при КСК без мутации в гене *AIRE*; изолированном гипопаратиреозе, изолированной АНН, АПС-2, псориазе, ревматоидном артрите и других АИЗ АТ-ИЛ-22 не определялись или определялись на минимальном уровне. Предполагается, что нормальный уровень АТ-ИЛ-22 у пациентов с КСК в составе АПС-1 может быть обусловлен длительной ремиссией заболевания [95].

Как при АПС-1, так и при АПС-2 интервал между клиническим дебютом отдельных компонентов может составить много лет. В связи с чем, у пациентов с аутоиммунными эндокринными патологиями важно создание многокомпонентной системы прогнозирования развития других эАИЗ с помощью исследования иммунологических маркеров – АТ к тканям органов-мишеней, которые могут быть выявлены в крови пациентов за несколько лет до появления ранних специфических симптомов заболевания. В рутинной клинической практике с этой целью требуется проведение регулярного дорогостоящего скрининга (методом ИФА), что сопровождается необходимостью взятия большого количества биоматериала. В подавляющем

большинстве случаев подобные исследования не проводятся вовсе или ограничиваются небольшим спектром АТ (как правило, к ткани ЩЖ).

С целью оптимизации алгоритма обследования пациентов с эАИЗ, рядом исследователей [95-99] рекомендовано применение мультиплексного анализа на основе биочипов. Мультиплексный анализ разработан несколько десятков лет назад для детекции и количественного измерения нуклеиновых кислот и протеинов (мультиплексный иммуноанализ) в биологических жидкостях [100]. Выделяют следующие преимущества метода мультиплексного иммуноанализа:

1) в одном анализе можно получить за короткий промежуток времени информацию о наличии/отсутствии большого числа АТ, специфичных для эАИЗ;

2) для проведения исследования достаточно небольшого объема исследуемого материала – не более 60 мкл сыворотки крови.

3) точность метода сопоставима или даже превышает таковую моноплексных методов [100].

В настоящее время метод внедрен для определения антибиотикорезистентности при туберкулезе и может применяться при обследовании пациентов с другими инфекционными, а также онкологическими [101] и аллергическими [102] заболеваниями. Также, метод мультиплексного иммуноанализа активно применяется для диагностики и скрининга как неэндокринных (антифосфолипидный синдром, целиакия [103; 104]), так и эндокринных АИЗ. Так Amoroso M. и соавт. разработали систему «3 Screen» – метод, основанный на ИФА-анализе, предназначенный для комбинированного измерения АТ к GAD-65, IA2 и ZnT8 [96]. В патенте CN1448724A «Type 1 diabetes related antigen-antibody simultaneous detection egg white slice» [105], заявлен способ одновременного обнаружения с помощью биочипа АТ, характерных для СД1, в том числе к GAD, IA2, ICA, IAA и др. Однако описанные методы предназначены для выявления СД1 и не содержат аутоантигенов, специфичных для других аутоиммунных эндокринопатий. Вместе с тем, Gu Y. и соавт. разработан мультиплексный анализ IAA, АТ к GAD, IA2, тканевой трансглутаминазе, ТПО, ТГ, ИФН-α-А на основе электрохемилюминисценции [98].

Также опубликованы работы по применению биочипов для исследования анти-цитокиновых АТ. Так, Rosenberg J. M. и соавт. создан планарный биочип с 102 белками, который апробировали на 58 образцах сывороток крови, включая 7 образцов пациентов с АПС-1 [97].

В то же время, в РФ метод мультиплексного иммуноанализа для диагностики аутоиммунных эндокринопатий при АНН не разработан. Это обусловлено в том числе отсутствием иммунологической панели АТ для данного исследования, так как спектр и частота встречаемости сопутствующих эАИЗ при АНН в российской популяции не определены.

1.6. Заключение обзора литературы

Суммируя вышесказанное, можно сделать следующие выводы:

-оценка иммунореактивности у пациентов на разных стадиях АНН может способствовать пониманию патогенеза и особенностей клинического течения заболевания, разработки методов прогнозирования его развития и стратегий профилактики;

-идентификация новых иммунологических маркеров АНН позволит оптимизировать алгоритм этиологического поиска при 1-НН;

-изучение фенотипических и функциональных особенностей Breg при АНН, определение роли этих клеток в патогенезе заболевания позволит предложить новую модель инициации аутоиммунного поражения и возможные клеточные и гуморальные мишени для персонифицированного лечения;

-анализ кортизола утренней слюны представляется многообещающим методом диагностики НН ввиду неинвазивности, отсутствия риска тяжелых осложнений, возможности определения изолированно биологически активной формы гормона, выполнения забора образца без участия медицинского персонала, хранения в течение длительного времени. Кроме того, в отличие от пробы с инсулиновой гипогликемией, забор слюны на кортизол не является времязатратным;

-в настоящее время требуется внедрение в клиническую практику классификации АНН, предусматривающей доклинические стадии заболевания, и проведение эпидемиологических исследований, посвящённых изучению их распространённости;

-в российской когорте пациентов, анализ крови на АТ к P450c21 не получил широкого распространения и не применяется для диагностики ранних стадий АНН;

-повышенный уровень АТ к P450c21 может быть предиктором развития АНН, однако в настоящее время отсутствует алгоритм динамического наблюдения данной когорты пациентов;

-исследование АТ к ИФН -ω и -α-2 является надежным методом диагностики АПС-1, особенно в сложных диагностических случаях. Однако, доступный в РФ метод качественного определения АТ-ИФН-ω и -α-2 с использованием клеточной культуры HEK-blue является трудоемким и длительным в исполнении;

-применение мультиплексного иммуноанализа позволит оптимизировать алгоритм обследования пациентов с АПС-1, АПС-2 и изолированными аутоиммунными эндокринопатиями, однако данный метод в РФ не разработан.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа состоит из четырех исследований, представленных в соответствующих разделах глав и включающих разных пациентов и здоровых участников. В первом исследовании изучается уровень АТ к Р450с21 при ранних стадиях АНН; во втором – исследуются механизмы нарушений ИТ при 1-НН: роль Breg, а также генетические предикторы при данном заболевании; в третьем – оценивается возможность применения анализа утренней слюны на кортизол в диагностике НН; в четвертом – определяется диагностическая эффективность мультиплексного анализа на основе гидрогелевого биочипа в диагностике 1-НН и других АИЗ.

Все пациенты проходили обследование в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (директор – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Мокрышева Н. Г.): отделе терапевтической эндокринологии (с 2022г. – отделении терапии заболеваний щитовидной железы, надпочечников и ожирения; руководитель – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Трошина Е. А., с 2021г. – д.м.н. Платонова Н. М., с 2022г. – к.м.н. Юкина М. Ю.) или обращались за медицинской консультацией в консультативно-диагностический центр (руководитель – д.м.н., профессор Волеводз Н. Н.) в период с 2018 по 2021 гг. Набор группы здоровых участников также осуществлялся в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Использован сплошной способ формирования выборок. Выборки пациентов могут считаться репрезентативными по полу и возрасту манифестации заболевания. Выборка пациентов в разделе «Оценка состояния В-регуляторного звена иммунитета при 1-НН» является ограниченно репрезентативной, что связано со строгими критериями включения и невключения, диктуемыми желанием исследователя минимизировать количество факторов, потенциально влияющих на содержание Breg. Репрезентативность выборок обеспечена тем, что прием амбулаторных пациентов и оказание медицинской помощи в стационарных условиях в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России осуществляется для пациентов всех регионов страны.

Биохимические, общеклинические, иммунологические (определение уровня АТ) и гормональные исследования проводились в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (заведующий – к.м.н. Никанкина Л. В.).

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

2.1.1. Участники исследования

В исследование включены пациенты с изолированной АНН и в составе АПС-1 и -2, с 1-НН неаутоиммунного генеза, прочими аутоиммунными (АИТ, БГ, СД1, LADA, ГГ, гипопаратиреоз, инсулиновый аутоиммунный синдром, алопеция, витилиго, ревматоидный артрит, псориаз, ЭОП) и неаутоиммунными (СД2, тиреопатии, ГГ, заболевания околощитовидных желез (ОЩЖ), объемные образования надпочечников) заболеваниями, пациенты-носители АТ-маркеров АИЗ ЩЖ (АЗЩЖ) и/или СД1, но без нарушения функции органа-мишени, и условно здоровые лица.

Набор пациентов в группы проводился на основании соответствия критериям включения и при отсутствии критериев невключения.

Общие критерии включения в группы[4] 1-5:

1. мужской и женский пол;
2. возраст 18 лет и старше.

Дополнительные критерии включения в группу 1:

1. верифицированный, в соответствии с международными клиническими рекомендациями, диагноз 1-НН (согласно данным предоставленной медицинской документации);
2. отсутствие неаутоиммунных причин 1-НН (согласно данным предоставленной медицинской документации).

Дополнительный критерий включения в группу 2: наличие аутоиммунного эндокринного (кроме АНН) или неэндокринного заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации, результатам скринингового обследования).

Дополнительные критерии включения в группу 3:

1. носительство АТ-маркеров АЗЩЖ и/или СД1 (согласно данным предоставленной медицинской документации, результатам скринингового обследования);
2. отсутствие субклинического/манифестного аутоиммунного эндокринного или неэндокринного заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации, результатам скринингового обследования).

Дополнительные критерии включения в группу 4:

---

[4] Определение групп приведено ниже.

1. наличие неаутоиммунного эндокринного заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации);
2. отсутствие субклинического/манифестного аутоиммунного эндокринного или неэндокринного заболевания и носительства АТ-маркеров АЗЩЖ и/или СД1 (согласно данным предоставленной медицинской документации, результатам скринингового обследования);

Дополнительный критерий включения в группу 5: отсутствие субклинического/манифестного аутоиммунного эндокринного или неэндокринного заболевания и носительства АТ-маркеров АЗЩЖ и/или СД1 и неаутоиммунного эндокринного заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации, результатам скринингового обследования).

Критерии невключения в группы 1-5:

1. беременность, период лактации (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
2. острые инфекции (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
3. обострение хронических заболеваний (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
4. тяжелые, угрожающие жизни состояния: декомпенсация хронической сердечной недостаточности (ХСН), хронической болезни почек (ХБП) С3б и более, лёгочная и печёночная недостаточности (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
5. тяжелые психические заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации);
6. патология иммунной системы (включая врождённые и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании; согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
7. приём препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (ИЛ, ИФН, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики), в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
8. проведение вакцинаций/ревакцинаций в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации).

Список исследований при лабораторном скрининге включал: анализ крови на гликированный гемоглобин, глюкозу, IAA, ICA, АТ к GAD, IA2 и ZnT8, кальций (Ca) общий, Ca ионизированный, фосфор (P), паратиреоидный гормон (ПТГ; при изменении уровня Ca), ТТГ, АТ

к ТПО, ТГ, рТТГ (при снижении уровня ТТГ), у мужчин: лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тестостерон; у женщин с нерегулярным менструальным циклом: ЛГ, ФСГ, эстрадиол.

2.1.2. Дизайн исследования

Дизайн (схема представлена на Рисунке 5): в частях, посвященных оценке диагностической точности анализа крови на АТ к Р450с21 при мАНН, а также скринингу АНН в группе риска – активное одномоментное сравнительное исследование; в части, посвященной наблюдению за пациентами с ранними стадиями АНН – активное одновыборочное проспективное несравнительное неконтролируемое «до-после». Исследование включало 835 участников.

Были выделены следующие группы:

-1: пациенты с АНН (n = 119):

-1a: пациенты с мАНН в рамках АПС-2 (n = 67) + пациент с лАНН в рамках АПС-2 (n = 1),

-1b: пациенты с мАНН в рамках АПС-1 (n = 20) + пациенты с лАНН в рамках АПС-1 (n = 2),

-1c: пациенты с изолированной мАНН (n = 27) + пациенты с изолированной лАНН (n = 2),

-2-4: пациенты без установленного диагноза АНН (n = 646):

-2: пациенты с АИЗ (n = 513):

-2a: пациенты с аутоиммунными тиреопатиями (n = 236),

-2b: пациенты с СД1 или LADA (n = 172),

-2c: пациенты с аутоиммунными тиреопатиями в сочетании с СД1 или LADA (n = 75),

-2d: пациенты с другими АИЗ (n = 30): витилиго (n = 11), ГГ (n = 5), алопецией (n = 3), инсулиновым аутоиммунным синдромом (n = 3), гипопаратиреозом (n = 4), др. (n = 4) без АЗЩЖ, СД1 и носительства АТ-маркеров АЗЩЖ и СД1,

-3: пациенты-носители АТ-маркеров АЗЩЖ и/или СД1, но без нарушения функции органа-мишени (n = 36),

-4: пациенты с неаутоиммунной эндокринной патологией (n = 97): НН неаутоиммунного генеза (n = 36), заболеваниями ЩЖ (n = 6), заболеваниями ОЩЖ (n = 6), СД2 (n = 7), ГГ (n = 5), сочетанной (n = 37).

-5: условно здоровые лица без НН, АИЗ, носительства АТ-маркеров АЗЩЖ и СД1 (n = 70).

У пациентов с лАНН, включенных в группу 1, диагностическое обследование инициировано, в связи с жалобами. У пациентов группы 1b диагноз доказан данными генетического тестирования в 77% случаев (n = 17).

Всем включенным в исследование выполнялся иммунологический анализ крови с определением уровня АТ к P450c21 (при этом в группах 1 и 4 проводимая заместительная терапия НН не отменялась). Далее, на основании оценки результатов участников групп 1 и 5 проводился расчет операционных характеристик индексного теста (анализ крови на АТ к P450c21). В качестве референсного теста, подтверждающего аутоиммунный генез 1-НН, принят факт отсутствия прочих причин заболевания (на основании анализа данных медицинской документации).

Рисунок 5 – Дизайн исследования

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АИЗ – аутоиммунные заболевания; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; УЗ – условно здоровые; НН – надпочечниковая недостаточность.

Возможные нежелательные последствия индексного теста ограничены осложнениями, которые могут возникнуть при заборе венозной крови: гематома, боль, покраснение. Данные последствия могут возникнуть и при проведении некоторых исследований, относящихся к референсному тесту. К нежелательным последствиям визуализирующих исследований,

необходимых для уточнения этиологии 1-НН (референсные тесты), относятся: аллергические и аллергоподобные реакции, повреждение нерва, артерии или вены, инфекционные осложнения, тошнота, рвота, высыпания на коже, жар.

Во всех группах, кроме группы 1, при выявлении значений, превышающих РИ, проводилось гормональное обследование (анализы крови на АКТГ, кортизол, альдостерон, ренин утром) с целью уточнения стадии АНН. n = 1 пациенту с неоднозначными результатами гормональных анализов крови выполнена проба с инсулиновой гипогликемией. Пациентам с лАНН назначалась заместительная терапия. Всем пациентам с ранними стадиями АНН исследовались АТ к GAD, ZnT8, IA2, IAA, ICA; проводилась оценка качества жизни исходно и через 6 месяцев на фоне лечения (при лАНН) или в динамике (при пАНН). Кроме того, всем женщинам молодого возраста (18-40 лет) групп 1 и 5, а также всем пациентам с пАНН и лАНН исследован уровень ДГЭА-С крови утром.

2.1.3. Методы исследования

2.1.3.1. Клиническое обследование

Все участники осматривались врачом-исследователем на соответствие критериям включения и выявление возможного попадания под критерии невключения. Схема первичного обследования включала сбор жалоб, анамнестических данных, измерения роста и веса, оценку АД и частоты пульса. При опросе уточнялось наличие острых и хронических заболеваний, прием лекарственных препаратов и биодобавок, вредные привычки, у женщин – гинекологический анамнез.

2.1.3.2. Оценка качества жизни

Оценка качества жизни проводилась с помощью заполнения пациентами форм неспецифического опросника качества жизни (Short Form Medical Outcomes Study, SF-36). SF-36: показатели каждой шкалы варьируют между 0 и 100, где 100 представляет полное здоровье. Для расчета результатов по субшкалам и шкалам SF-36 использовался автоматический подсчет с помощью калькулятора (http://www.sf-36.org/nbscalc/index.shtml).

2.1.3.3. Лабораторные методы исследования

Забор крови производился в вакуумные пробирки с инертным гелем и этилендиаминтетрауксусной кислотой из кубитальной вены утром в период с 08:00 до 10:00 в состоянии натощак (голодание в течение не менее 8 и не более 14 часов до забора). Полученные пробы центрифугировались не позднее чем через 15 минут после забора с использованием центрифуги Eppendorf 5810R при температуре 4°C на скорости 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут и затем поступали в работу. Биохимический, гормональный и иммунологический (за исключением АТ к P450c21) анализы крови, а также определение гликированного гемоглобина проводились в день взятия крови. Образцы сыворотки для последующего определения уровней АТ к P450c21, GAD, IA2, ZnT8, ICA и IAA подлежали временной заморозке в микропробирках при температуре -80 °C.

Биохимическое исследование крови выполнялось на анализаторе Architect plus C 4000 (Abbott Diagnostics, США). Определение уровня ТТГ (стандартными наборами (Abbott Diagnostics, США)) проводилось методом иммунохемилюминесценции на анализаторе Architect 2000. Уровни ЛГ, ФСГ, эстрадиола, тестостерона определялись методом хемилюминесцентного иммуноанализа на автоматическом анализаторе Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics). Измерение уровней альдостерона и ренина проводилось иммунохемилюминесцентным методом на анализаторе DiaSorin Liaison (DiaSorin S.p.a., Италия). АКТГ и кортизол в крови определялись иммунохимическим методом на автоматизированной системе Cobas 6000 (Roche, Германия). Определение ДГЭА-С, ПТГ, АТ к рТТГ и ТГ проводилось на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas 6000 (Roche, Германия), АТ к ТПО – методом хемилюминесцентного иммуноанализа на автоматическом анализаторе Architect i2000 (Abbott). Определение АТ к P450c21, ZnT8, IA-2, GAD, ICA, IAA осуществлялось методом ИФА с использованием коммерческих наборов: BioVendor, Чехия (АТ к P450c21), Medipan, Германия (АТ к ZnT8, IA-2, ICA), EUROIMMUN, Германия (АТ к GAD), Orgentec Diagnostika, Германия (IAA).

РИ для биохимических показателей крови составляли: глюкоза – 3,1-6,1 ммоль/л, Са общий – 2,15-2,55 ммоль/л, Са ионизированный – 1,03-1,29 ммоль/л, Р – 0,74-1,52 ммоль/л.

Референсные интервалы (РИ) для гормональных показателей крови составляли: альдостерон – 69,8-1085,8 пмоль/л, ренин – 2,8-39,9 мЕд/л, АКТГ – 7,2-63,3 пг/мл, ДГЭА-С – 1,65-11 мкмоль/л (для женщин 18-39 лет), 0,26-6,68 мкмоль/л (для женщин ≥ 40 лет), 1,2-13,4 мкмоль/л (для мужчин 18-54 лет), 0,44-6,76 мкмоль/л (для мужчин ≥ 55 лет), ТТГ – 0,25-3,5 мМЕ/л, ПТГ – 15-65 пг/мл, ЛГ – 2,6-12,1 Ед/л (для женщин), 2,5-11 Ед/л (для мужчин), ФСГ – 1,9-11,7 Ед/л (для женщин), 1,6-9,7 Ед/л (для мужчин), эстрадиол – 97-592 пмоль/л (для женщин), тестостерон – 11-28,2 ммоль/л (для мужчин). РИ анализа крови на кортизол (вне пробы с инсулиновой гипогликемией), принятый в лаборатории, составлял 171-536 нмоль/л. Уровень базального

кортизола (вне пробы с инсулиновой гипогликемией) крови ≥ 500 нмоль/л исключал манифестную НН (как 1-, так и 2-). Уровень базального кортизола < 140 нмоль/л в сочетании с АКТГ > 126,6 пг/мл подтверждал манифестную первичную глюкокортикоидную недостаточность.

РИ иммунологических показателей крови составляли: АТ к Р450с21 < 0,4 Ед/мл, ТПО – 0-5,6 МЕ/мл, ТГ – 0-115 МЕ/мл, рТТГ 0-1,75 МЕ/л, GAD – 0-10 Ед/мл, IA2 – 0-10 Ед/мл, ZnT8 – 0-15 Ед/мл, ICA – 0-1 Ед/мл, IAA – 0-10 Ед/мл.

Определение гликированного гемоглобина осуществлялось в капиллярной крови с использованием автоматического биохимического анализатора D10 (BioRad Laboratories, США) и набора того же производителя по стандартной методике. Метод сертифицирован в соответствии с National Glycohemoglobin Standardization Program. Нормальным считался уровень HbA1c до 6%.

2.1.3.4. Проба с инсулиновой гипогликемией

Инсулин короткого действия вводился внутривенно в дозе 0,1-0,15 ЕД/кг (в зависимости от наличия или отсутствия инсулинорезистентности). Исходно и через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минут производился забор венозной крови и в каждом образце определялся уровень кортизола и глюкозы. Если на фоне гликемии ≤ 2,2 ммоль/л уровень кортизола крови превышал 500 нмоль/л, НН исключалась. При уровне кортизола крови < 500 нмоль/л устанавливался диагноз НН. В случае, если не удавалось достичь уровня гликемии ≤ 2,2 ммоль/л, проба расценивалась как неинформативная и выполнялась повторно.

2.2. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности

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

2.2.1.1. Участники исследования

В исследование включены пациенты с изолированной АНН и в составе АПС-1 и -2, с 1-НН неаутоиммунного генеза и условно здоровые лица. Набор пациентов в группы проводился на основании соответствия критериям включения и при отсутствии критериев невключения (Таблицы 2; 3).

Таблица 2 – Критерии включения и невключения

Критерии включения и невключения	**Группа с АНН**	**Группа с 1-НН неаутоиммунного генеза**	**Группа здоровых лиц**
Критерии включения[5]			
Мужской и женский пол	+	+	+
Возраст 18 лет и старше	+	+	+
Повышенный уровень антител к 21-гидроксилазе и/или мутация гена *AIRE* и/или наличие, по крайней мере, двух компонентов АПС-1	+	-	-
Верифицированный, в соответствии с международными клиническими рекомендациями, диагноз 1-НН	+	+	-

[5] «+» – наличие критерия является основанием для включения в исследование, «-» – отсутствие критерия является основанием для включения в исследование.

Продолжение Таблицы 2

Критерии включения и невключения	Группа с АНН	Группа с 1-НН неаутоиммунного генеза	Группа здоровых лиц
Критерии включения[6]			
Двусторонняя адреналэктомия по поводу феохромоцитомы в анамнезе[7] или наследственные формы неаутоиммунной 1-НН	-	+	-
Медикаментозная компенсация 1-НН и сопутствующей эндокринной патологии	+	+	НП
Нормальный уровень альдостерона, ренина, АКТГ; кортизол утром (06:00-10:00) или в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией ≥ 500 нмоль/л[8]	-	-	+
Критерии невключения[9]			
Беременность, период лактации (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	+	+	+
Наличие родственника с неаутоиммунной наследственной 1-НН (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	-	+
Острые инфекции (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	+	+	+
Обострение хронических заболеваний (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	+	+	+
Тяжелые, угрожающие жизни состояния: декомпенсация ХСН, ХБП С3б и более, лёгочная и печёночная недостаточности (согласно данным физикального исследования и результатов лабораторного тестирования)	+	+	+
Тяжелые психические заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации)	+	+	+

[6] «+» – наличие критерия является основанием для включения в исследование, «-» – отсутствие критерия является основанием для включения в исследование.
[7] Пациенты включены в исследование не ранее чем через 6 месяцев после оперативного лечения.
[8] При уровне кортизола утром < 500 нмоль/л (n = 21 участнику) проводилась проба с инсулиновой гипогликемией.
[9] «+» – наличие критерия является основанием для невключения в исследование, «-» – наличие критерия не является основанием для невключения в исследование.

Продолжение Таблицы 2

Критерии включения и невключения	**Группа с АНН**	**Группа с 1-НН неаутоиммунного генеза**	**Группа здоровых лиц**
Критерии невключения[10]			
Патология иммунной системы (включая врождённые и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании; согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	+	+	+
Приём препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (ИЛ, ИФН, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики), в том числе в анамнезе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	+	+	+
Проведение вакцинаций/ревакцинаций в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	+	+	+
Эндогенный (манифестный и субклинический) гиперкортицизм, в том числе в анамнезе (по результатам клинико-лабораторного обследования, данным предоставленной медицинской документации)	-	+	+
Наличие АИЗ, в том числе потенциальных и латентных форм (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации, скринингового обследования)	-	+	+
Наличие злокачественных онкологических заболеваний, в том числе в анамнезе (согласно данным предоставленной медицинской документации)	-	-	+
Индекс массы тела ≥ 25 кг/м^2 (согласно данным физикального исследования)	-	-	+
Сахарный диабет 2 типа (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации, скринингового обследования)	-	-	+
Оперативные вмешательства на гипофизе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	-	+
Гипопитуитаризм (в том числе парциальный) любого генеза (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	-	+
Лечение глюкокортикоидами, в том числе в анамнезе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	-	+

[10] «+» – наличие критерия является основанием для невключения в исследование, «-» – наличие критерия не является основанием для невключения в исследование.

Продолжение Таблицы 2

Критерии включения и невключения	**Группа с АНН**	**Группа с 1-НН неаутоиммунного генеза**	**Группа здоровых лиц**
Критерии невключения[11]			
Приём ферментных ингибиторов (митотан, кетоконазол, метирапон, этомидат, аминоглютетимид, рифампицин, фенитоин), в том числе в анамнезе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	-	+
Наличие объемных образований и/или повреждение ткани надпочечников, в том числе в анамнезе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации): оперативные вмешательства; кровоизлияние; на фоне инфильтративных заболеваний (гемохроматоз, амилоидоз, саркоидоз); инфекций (туберкулез, микозы, гистоплазмоз, цитомегаловирус, сифилис, африканский трипаносомоз)	-	-	+

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АКТГ – адренокортикотропный гормон; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ХБП – хроническая болезнь почек; ИЛ – интерлейкины; ИФН – интерфероны; НП – не применимо.

[11] «+» – наличие критерия является основанием для невключения в исследование, «-» – наличие критерия не является основанием для невключения в исследование.

Таблица 3 – Список исследований при лабораторном скрининге

Оцениваемые параметры	**Скрининговые группы**		
	Пациенты с предположительно АНН	**Пациенты с предположительно неаутоиммунной 1-НН**	**Лица предположительно без АИЗ и НН**
Оценка критериев включения			
Определение уровня АТ к P450c21			
Анализ крови на АТ к P450c21	+	+	+
Диагностика 1-НН/оценка компенсации 1-НН			
Анализ крови на кортизол, альдостерон, АКТГ	-	-	+
Анализ крови на ренин	+	+	+
Анализ крови на Na, K, Cl	+	+	+
Проба с инсулиновой гипогликемией (селективно)	-	-	+
Диагностика АИЗ (и предрасположенности к ним): ЩЖ, СД1/LADA, ГГ аутоиммунного генеза, гипопаратиреоза			
Анализ крови на гликированный гемоглобин, глюкозу, IAA, ICA, АТ к GAD, IA2 и ZnT8	-	+	+
Анализ крови на Ca общий, Ca ионизированный, P, ПТГ (при изменении уровня Ca)	-	+	+
Анализ крови на ТТГ, АТ к ТПО, ТГ	-	+	+
Анализ крови на ЛГ, ФСГ, тестостерон – у мужчин	-	+	+
Анализ крови на ЛГ, ФСГ, эстрадиол – у женщин с нерегулярным менструальным циклом	-	+	+
Оценка критериев невключения			
Исключение других нарушений иммунной системы			
Общеклинический анализ крови	+	+	+
Анализ крови на АТ к ВИЧ[12]	+	+	+
Исключение тяжёлой органной патологии			
Анализ крови на АСТ, АЛТ, общий белок, креатинин	+	+	+

[12] При подписании информированного добровольного согласия на проведение данного исследования.

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; АТ – антитела; P450c21 – 21-гидроксилаза; АКТГ – адренокортикотропный гормон; НН – надпочечниковая недостаточность; Na – натрий; K – калий; Cl – хлор; АИЗ – аутоиммунное заболевание; ЩЖ – щитовидная железа; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IAA – антитела к инсулину; IA2 – тирозинфосфатаза; ZnT8 – транспортер цинка 8; Ca – кальций; P – фосфор; ПТГ – паратгормон; ТТГ – тиреотропный гормон; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; АСТ – аспартатаминотрансфераза; АЛТ – аланинаминотрансфераза.

2.2.1.2. Дизайн исследования

Данное исследование является активным одномоментным сравнительным (схема представлена на Рисунке 6). Для определения возможности включения в исследование проведено скрининговое обследование 199 пациентов (n = 100 с 1-НН предположительно аутоиммунного генеза и n = 23 с 1-НН неаутоиммунного генеза) и условно здоровых (n = 76). На основании результатов скрининга, критериям включения соответствовали 117 пациентов и 44 условно здоровых, которые были распределены в следующие группы:

-1: пациенты с АНН (n = 94):

-1a: пациенты с изолированной АНН и АНН в составе АПС-2 (n = 77),

-1b: пациенты с АНН в составе АПС-1 (n = 17),

-2: пациенты с 1-НН неаутоиммунного генеза (n = 23),

-3: условно здоровые лица без НН и АИЗ (n = 44).

Необходимо отметить, что в группу 1a были в том числе включены пациенты с латентным АПС-2, т.е. с манифестной АНН и каким-либо другим эндокринным АИЗ на субклинической стадии или носительством АТ, предрасполагающих к развитию другого эндокринного АИЗ. У пациентов группы 1b диагноз доказан данными генетического тестирования в 88% случаев (n = 15).

Из 23 пациентов группы 2 у n = 17 1-НН развилась в исходе двусторонней адреналэктомии по поводу феохромоцитомы, у n = 3 – в рамках адренолейкодистрофии, у n = 2 – в рамках Х-сцепленной врожденной гипоплазии надпочечников, у n = 1 – в рамках синдрома Олгрова.

Также, дополнительно в исследование включено 6 пациентов с ранними стадиями АНН: n = 1 – с пАНН; n = 5 – с лАНН, из них n = 1 – с изолированной АНН, n = 1 – в составе АПС-2, n = 3 – в составе АПС-1.

У пациентов с АНН проводились исследования для диагностики возможных сопутствующих АИЗ (ЩЖ, СД/LADA, ГГ аутоиммунного генеза, гипопаратиреоза). Во всех группах также оценивалась продукция надпочечниковых андрогенов. Список исследований представлен в Таблице 4.

Таблица 4 – Список оцениваемых параметров после включения в исследование

Оцениваемые параметры	**Группа 1**	**Пациенты с ранними стадиями АНН**	**Группа 2**	**Группа 3**
Оценка продукции надпочечниковых андрогенов				
Анализ крови на ДГЭА-С	+	+	+	+
Диагностика других АИЗ (и предрасположенности к ним): ЩЖ, СД1/LADA, ГГ аутоиммунного генеза, гипопаратиреоза				
Анализ крови на гликированный гемоглобин, глюкозу, АТ к GAD, ZnT8, IA2, IAA, ICA	+	+	-	-
Анализ крови на Са общий, Са ионизированный, Р, ПТГ (при изменении уровня Са)	+	+	-	-
Анализ крови на ТТГ, АТ к ТПО, ТГ, рТТГ (при снижении уровня ТТГ)	+	+	-	-
Анализ крови на ЛГ, ФСГ, тестостерон у мужчин	+	+	-	-
Анализ крови на ЛГ, ФСГ, эстрадиол у женщин при нерегулярном менструальном цикле	+	+	-	-

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат; АИЗ – аутоиммунное заболевание; ЩЖ – щитовидная железа; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; АТ – антитела; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IAA – антитела к инсулину; IA2 – тирозинфосфатаза; ZnT8 – транспортер цинка 8; Са – кальций; Р – фосфор; ПТГ – паратгормон; ТТГ – тиреотропный гормон; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; рТТГ – рецептор тиреотропного гормона; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон.

Во всех группах изучалось содержание Breg *in vivo* среди всех мононуклеаров периферической крови (PBMC), а также способность В-клеток периферической крови дифференцироваться в Breg *in vitro*. Также, проводилась оценка иммунореактивности пациентов на ранних стадиях АНН и сопоставление выявленных нарушений с основными гормональными показателями функции коры надпочечников.

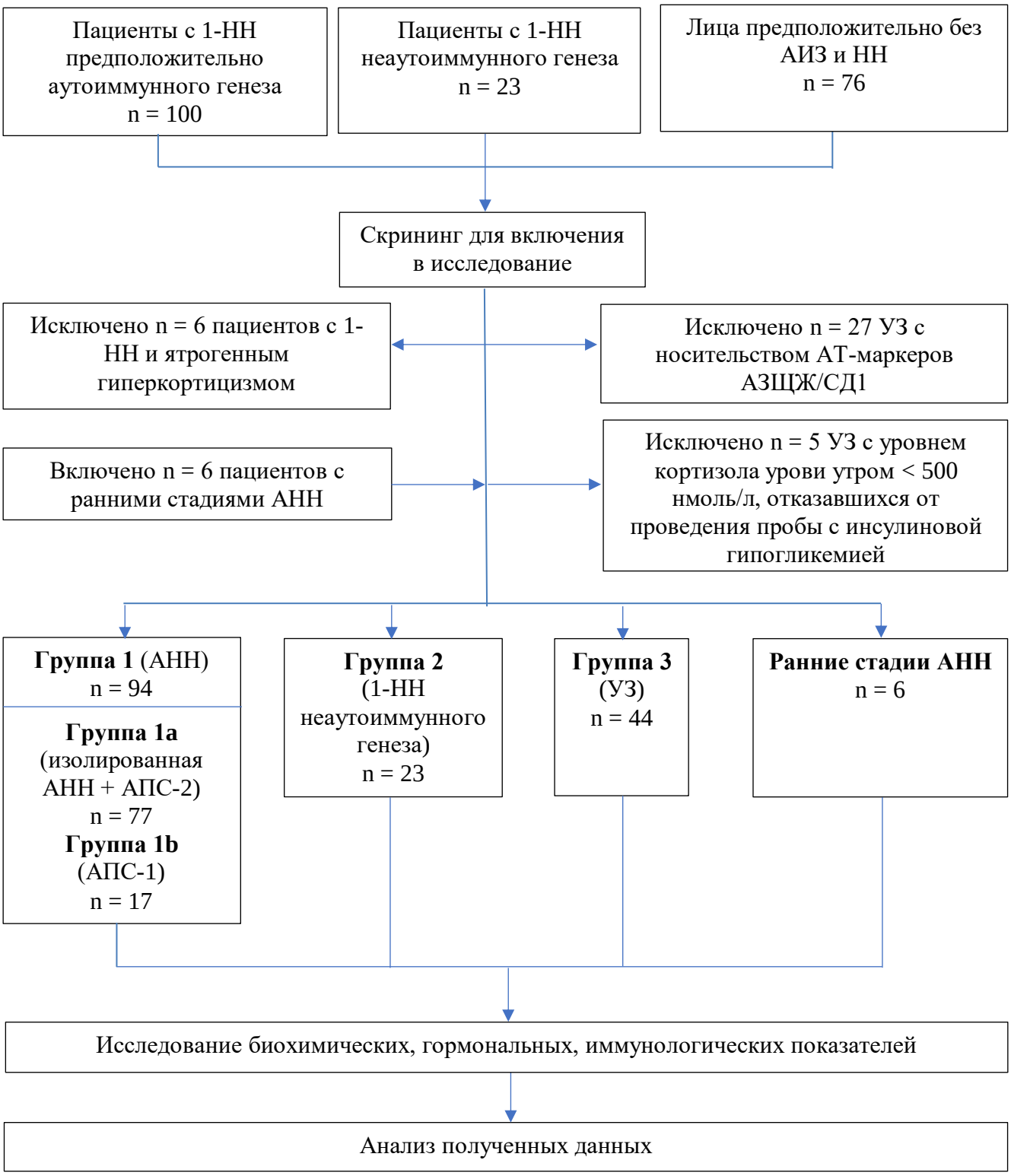


Рисунок 6 – Дизайн исследования

Примечания: 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; НН – первичная надпочечниковая недостаточность; АИЗ – аутоиммунные заболевания; УЗ – условно здоровые; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; АЗЩЖ – аутоиммунные заболевания щитовидной железы; СД1 – сахарный диабет 1 типа.

N = 3 пациентам с ранними стадиями АНН иммунологическое исследование выполнялось неоднократно в динамике: n = 2 пациентам – двукратно, n = 1 пациенту – трёхкратно. Проводимая заместительная терапия 1-НН у пациентов групп 1 и 2 не отменялась.

2.2.1.3. Методы исследования

Клиническое обследование проводилось в соответствии с разделом 2.1.3.1., проба с инсулиновой гипогликемией – в соответствии с разделом 2.1.3.4.

2.2.1.3.1. Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования выполнялись в соответствии с разделом 2.1.3.3. Дополнительно в день взятия крови проводились расширенный биохимический и общеклинический анализы, определение уровня АТ к ВИЧ.

Биохимическое исследование крови выполнялось на анализаторе Architect plus C 4000 (Abbott Diagnostics, США), общий анализ крови (с обязательной оценкой уровня лейкоцитов, тромбоцитов) – на автоматическом анализаторе Sysmex XE-2100 D, Sysmex, Япония. Определение уровня АТ к ВИЧ проводилось методом иммунохемилюминесценции на анализаторе Architect 2000.

РИ для биохимических показателей крови составляли: аланинаминотрансфераза (АЛТ) – 0,0-55,0 Ед/л, аспартатаминотраснфераза (АСТ) – 5,0-34,0 Ед/л, креатинин – 50-98 мкмоль/л, калий – 3,5-5,1 ммоль/л, натрий – 136-145 ммоль/л.

РИ для АТ к ВИЧ составлял 0-1 (коэффициент позитивности).

РИ для показателей общего анализа крови составляли: эритроциты – 3,8-5,2*10^{12} кл/л (для женщин), 4,3-5,8*10^{12} кл/л (для мужчин), лейкоциты – 3,4-10,8*10^{9} кл/л (для женщин), 3,9-10*10^{9} кл/л (для мужчин), гемоглобин – 112-153 г/л (для женщин), 132-172 г/л (для мужчин), тромбоциты – 152-372*10^{9} кл/л.

2.2.1.3.2. Иммунологические методы исследования

Данная часть работы выполнялась 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.): лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов (заведующий – к.б.н. Дьяков И. Н.).

Осуществлялся забор крови из кубитальной вены в вакуумные пробирки с Li-гепарином и активатором свертывания в период с 08:00 до 10:00 в состоянии натощак (голодание в течение не менее 8 и не более 14 часов до забора).

Оценку В-регуляторного компонента иммунной системы проводили, определяя процентное содержание $CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg в PBMC пациентов и условно здоровых сразу после выделения и после инкубации *in vitro*. Способность В-клеток дифференцироваться в $CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg под действием активаторов оценивали по индукции *in vitro*.

Выделение PBMC: для получения PBMC 7,0-7,5 мл цельной крови наслаивали на среду для сепарации лимфоцитов на основе фиколла с плотностью 1,077 г/мл (Capricorn; Sigma, США) и центрифугировали при 1200 g в течение 25 минут. PBMC собирали микропипеткой и разбавляли фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS; Пан-ЭКО, Россия) минимум в 3 раза. Затем клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 минут, ресуспендировали в 10 мл DPBS и снова осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 минут. Полученные клетки взвешивали в полной среде, содержащей 10% ЭТС (сыворотка крови эмбриональная телячья), глутамин, антибиотики и буфер HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) и подсчитывали число.

Определение содержания в PBMC В-лимфоцитов, имеющих фенотип Breg: клетки осаждали центрифугированием при 1500 оборотов/минут в течение 5 минут, после чего удаляли среду, ресуспендировали осадок, отмывали 2 раза 1 мл буфера для окрашивания (1% ЭТС, DPBS, 0,1% NaN3), ресуспендировали в 1 мл буфера для окрашивания. Переносили пробы в микроцентрифужные пробирки типа Eppendorf объемом 0,5 мл по 0,3-0,7 млн, добавляли буфер для окрашивания до 0,5 мл, осаждали центрифугированием при 1500 оборотов/минуту в течение 5 минут, ресуспендировали. Проводили поверхностное окрашивание. К ресуспендированным клеткам добавляли 30 мкл буфера для окрашивания и по 1 мкл на пробу: FITC[13]-меченые АТ мыши к CD38 человека (Sony clone HIT2), PE[14]-меченые АТ мыши к CD24 человека (Sony clone ML5) и PECY7[15]-АТ мыши к CD19 человека (Sony clone HIB19). Инкубировали 30 минут при +4 ºС. В качестве изотипического контроля использовали клетки, инкубированные с мышиными FITC-IgG1 (Sony clone MOPS21), PE-IgG1 (Sony clone MOPS21), APCCY7-IgG1 (Sony clone MOPS21) и PECY7-IgG1 (Sony clone MOPS21). Отмывали 1 раз 1 мл буфера для окрашивания.

Индукция Breg *in vitro:* PBMC отмывали 2 раза DPBS (Пан-ЭКО, Россия) с 2% ЭТС, центрифугируя в течение 5 минут при 400 g. Выделенные клетки вносили по 1,5 млн в 1 мл полной среды (RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute medium; Gibco, США) с 10% ЭТС

[13] Краситель изотиоцианат флуоресцеина.
[14] Краситель фикоэритрин.
[15] Краситель фикоэритрин-Cy7.

(Capricorn, Германия), 2мМ глутамина (Gibco, США), 1мМ пирувата (Gibco, США), 100 Ед/мл пенициллина (Gibco), 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США)) в лунки 24-луночных планшет и инкубировали *in vitro* в течение 72 ч при +37 ºС в CO2 инкубаторе при содержании 5% CO2 в атмосфере. Для индукции Breg к части суспензии PBMC в момент внесения *in vitro* добавляли смесь активаторов CpG[16] типа B (0,7 мкг/мл; Miltenyi Biotec, Германия) и CD40L (0,1 мкг/мл; Miltenyi Biotec, Германия). За 5 часов до окончания культивирования добавляли вторую группу активаторов: PMA (50нг/мл; Sigma, США) и йономицин (500 нг/мл; Sigma, США); и антибиотик Брефельдин А (BD Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit, BD Biosciences, США). По окончании 72-часовой инкубации собирали клетки, которые отмывали и окрашивали флуоресцентными красителями к поверхностным маркерам CD38, CD24, CD19, как описано выше.

Определение содержания $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ клеток в PBMC проводилось методом проточной цитофлуориметрии на приборе Beckman Coulter EPICS XL; результаты анализировали с помощью SYSTEM II (Beckman COULTER, США).

[16] Дезоксицитидин-фосфат-дезоксигуанозин.

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

2.2.2.1. Участники исследования

В исследование включены пациенты с изолированной АНН и в составе АПС-1 и -2 и условно здоровые лица. Набор пациентов в группы проводился на основании соответствия критериям включения и при отсутствии критериев невключения (Таблицы 5; 6).

Таблица 5 – Критерии включения и невключения

Критерии включения и невключения	Группа с АНН	Группа здоровых лиц
Критерии включения[17]		
Мужской и женский пол	+	+
Возраст 18 лет и старше	+	+
Повышенный уровень антител к 21-гидроксилазе и/или мутация гена *AIRE* и/или наличие, по крайней мере, двух компонентов АПС-1	+	-
Верифицированный, в соответствии с международными клиническими рекомендациями, диагноз 1-НН	+	-
Нормальный уровень альдостерона, ренина, АКТГ; кортизол утром (06:00-10:00) или в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией ≥ 500 нмоль/л[18]	-	+
Критерии невключения[19]		
Наличие родственника с неаутоиммунной наследственной 1-НН	-	+

[17] «+» – наличие критерия является обязательным для включения в исследование, «-» – отсутствие критерия является обязательным для включения в исследование.
[18] При уровне кортизола утром < 500 нмоль/л (n = 17 участникам) проводилась проба с инсулиновой гипогликемией.
[19] «+» – наличие критерия является основанием для невключения в исследование, «-» – наличие критерия не является основанием для невключения в исследование.

Продолжение Таблицы 5

Критерии включения и невключения	**Группа с АНН**	**Группа здоровых лиц**
Критерии невключения[20]		
Тяжелые, угрожающие жизни состояния: декомпенсация ХСН, ХБП С3б и более, лёгочная и печёночная недостаточности (согласно данным физикального исследования и результатов лабораторного тестирования)	+	+
Патология иммунной системы (врождённые иммунодефицитные состояния; согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	+	+
Наличие аутоиммунных заболеваний, в том числе потенциальных и латентных форм (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации, скринингового обследования)	-	+
Наличие злокачественных онкологических заболеваний, в том числе в анамнезе (согласно данным предоставленной медицинской документации)	-	+
СД2 (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации, скринингового обследования)	-	+
Оперативные вмешательства на гипофизе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	+
Гипопитуитаризм (в том числе парциальный) любого генеза (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	+
Лечение глюкокортикоидами, в том числе в анамнезе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	+
Приём ферментных ингибиторов (митотан, кетоконазол, метирапон, этомидат, аминоглютетимид, рифампицин, фенитоин), в том числе в анамнезе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации)	-	+
Повреждение ткани надпочечников, в том числе в анамнезе (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации): оперативные вмешательства; кровоизлияние; на фоне инфильтративных заболеваний (гемохроматоз, амилоидоз, саркоидоз); инфекций (туберкулез, микозы, гистоплазмоз, цитомегаловирус, сифилис, африканский трипаносомоз); наличие объемных образований	-	+

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АКТГ – адренокортикотропный гормон; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ХБП – хроническая болезнь почек; СД2 – сахарный диабет 2 типа.

[20] «+» – наличие критерия является основанием для невключения в исследование, «-» – наличие критерия не является основанием для невключения в исследование.

Таблица 6 – Список исследований при лабораторном скрининге

Оцениваемые параметры	**Пациенты с предположительно АНН**	**Лица предположительно без АИЗ и НН**
Оценка критериев включения		
Определение уровня АТ к Р450с21		
Анализ крови на АТ к Р450с21	+	+
Диагностика 1-НН		
Анализ крови на кортизол, альдостерон, ренин, АКТГ	-	+
Анализ крови на Na, K, Cl	-	+
Проба с инсулиновой гипогликемией (селективно)[21]	-	+
Диагностика АИЗ (и предрасположенности к ним): ЩЖ, СД1/LADA, ГГ аутоиммунного генеза, гипопаратиреоза		
Анализ крови на гликированный гемоглобин, глюкозу, IAA, ICA, АТ к GAD, IA2 и ZnT8	-	+
Анализ крови на Са общий, Са ионизированный, Р, ПТГ (при изменении уровня Са)	-	+
Анализ крови на ТТГ, АТ к ТПО, ТГ, рТТГ (при снижении уровня ТТГ)	-	+
Анализ крови на ЛГ, ФСГ, тестостерон – у мужчин	-	+
Анализ крови на ЛГ, ФСГ, эстрадиол – у женщин с нерегулярным менструальным циклом	-	+
Оценка критериев невключения		
Исключение других нарушений иммунной системы		
Общеклинический анализ крови	+	+
Исключение тяжёлой органной патологии		
Анализ крови на АСТ, АЛТ, общий белок, креатинин	+	+

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза; АКТГ – адренокортикотропный гормон; Na – натрий; K – калий; Cl – хлор; АИЗ – аутоиммунное заболевание; ЩЖ – щитовидная железа; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный

[21] При уровне кортизола утром < 500 нмоль/л (n = 15 участникам).

аутоиммунный диабет взрослых; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IAA – антитела к инсулину; IA2 – тирозинфосфатаза; ZnT8 – транспортер цинка 8; Ca – кальций; P – фосфор; ПТГ – паратгормон; ТТГ – тиреотропный гормон; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; рТТГ – рецептор тиреотропного гормона; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; АСТ – аспартатаминотрансфераза; АЛТ – аланинаминотрансфераза.

2.2.2.2. Дизайн исследования

Активное одномоментное исследование «случай-контроль». В исследование включено 95 участников, которые были распределены в следующие группы:

-1: пациенты с манифестной АНН (n = 63), в том числе:

-1a: в составе АПС-2 и с изолированной АНН (n = 54);

-1b: в составе АПС-1 (n = 9);

-2: условно здоровые без НН и АИЗ (n = 32).

Участникам выполнен анализ полиморфных маркеров в генах *IL28B* (rs12979860 и rs8099917), *TLR9* (rs5743836 и rs352140) и *TLR2* (rs5743708).

Схема дизайна исследования представлена на Рисунке 7.

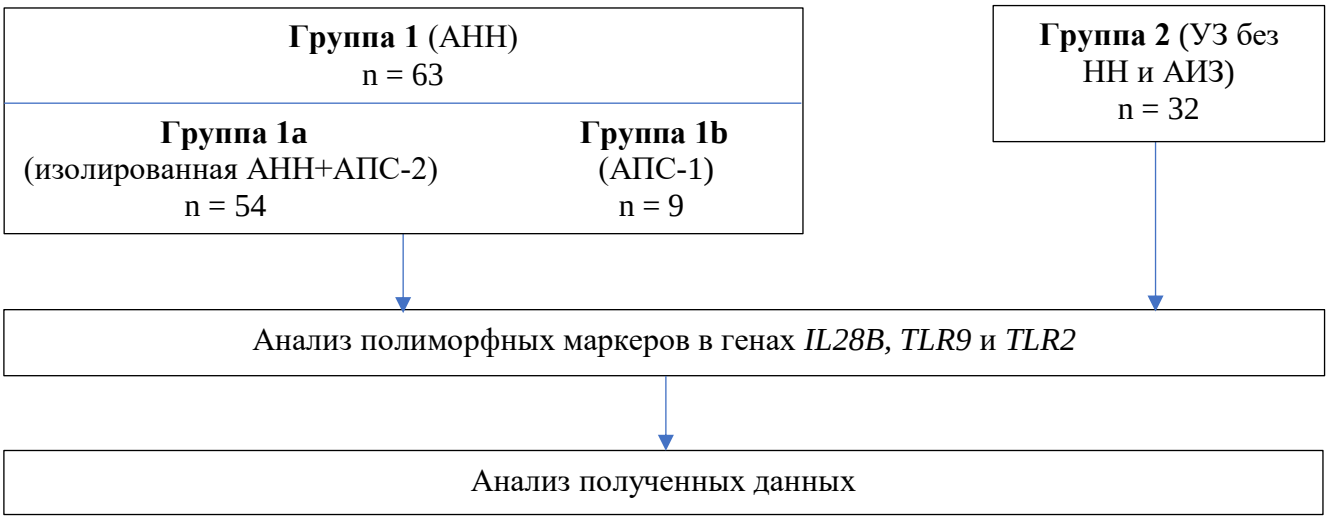


Рисунок 7 – Дизайн исследования

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; УЗ – условно здоровые; НН – надпочечниковая недостаточность; АИЗ – аутоиммунные заболевания.

2.2.2.3. Методы исследования

Клиническое обследование проводилось в соответствии с разделом 2.1.3.1., лабораторное обследование – в соответствии с разделом 2.2.1.3.1. (за исключением определения уровня АТ к ВИЧ).

2.2.2.3.1. Анализ полиморфных маркеров

Данная часть работы выполнялась 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.): лаборатории клинической иммунологии (заведующий – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Свитич О. А.).

ДНК была выделена при помощи коммерческого набора «РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ). Далее методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) исследованы следующие полиморфные маркеры: rs12979860 и rs8099917 в гене *IL28B*, rs5743708 в гене *TLR2,* rs5743836 и rs352140 в гене *TLR9.* Анализ полиморфных маркеров в гене *IL28B* проводили с использованием коммерческих наборов, согласно приложенной инструкции (Синтол, РФ). Для оценки полиморфных маркеров rs5743836 в гене *TLR9* и rs5743708 в гене *TLR2* использовали адаптированную методику с коммерческими наборами фирмы «Литех» (РФ) и «Набор для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Полиморфный маркер rs352140 в гене *TLR9* был исследован при помощи реактивов из «Набора 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».

2.3. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности

2.3.1. Участники исследования

В исследование включены пациенты с подозрением на НН, которым, по результатам обследования, диагностированы 1-НН, 2-НН или сохранная функция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (условно здоровые участники). Набор участников в группы проводился на основании соответствия критериям включения и при отсутствии критериев невключения.

Общие критерии включения в группы[22] 1-2:

1. мужской и женский пол;
2. возраст 18 лет и старше;
3. жалобы/симптомы и/или клинические проявления и/или лабораторные признаки, подозрительные в отношении НН (в соответствии с Таблицей 1).

Дополнительный критерий включения в группу 1: верифицированный, в соответствии с международными клиническими рекомендациями, диагноз НН.

Дополнительные критерии включения в группу 2:

1. отсутствие НН, доказанное в соответствии с международными клиническими рекомендациями;
2. отсутствие терапии пероральными и парентеральными глюкокортикоидами в течение, по крайней мере, месяца до включения в исследование.

Критерии невключения в группы 1-2:

1. беременность, период лактации (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
2. острые инфекции (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
3. обострение хронических заболеваний (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
4. тяжелые, угрожающие жизни состояния: декомпенсация ХСН, ХБП С3б и более, лёгочная и печёночная недостаточности (согласно данным физикального исследования и результатов лабораторного тестирования);
5. тяжелые психические заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации);

[22] Определение групп приведено ниже.

6. приём препаратов, влияющих на уровень кортизола (оральные контрацептивы, амфетамины), в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
7. обострение патологии полости рта, сопровождающейся кровотечениями из десен (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
8. курение в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным опроса).

2.3.2. Дизайн исследования

Активное одновыборочное одномоментное исследование диагностического теста, включающее 94 участников. Включено 25 пациентов с манифестной НН (группа 1): 60% (n = 15) с манифестной 1-НН, 40% (n = 10) с манифестной 2-НН. Кроме того, включено 2 пациента с потенциальной 1-НН и 6 пациентов с латентной 1-НН: 2 пациента с сохранной глюкокортикоидной функцией (уровень кортизола базального или на фоне пробы с инсулиновой гипогликемией ≥ 500 нмоль/л) и 4 пациента с глюкокортикоидной недостаточностью (уровень кортизола на фоне пробы с инсулиновой гипогликемией < 500 нмоль/л). Также включен 61 условно здоровый участник без НН в группу 2.

Схема дизайна исследования представлена на Рисунке 8.

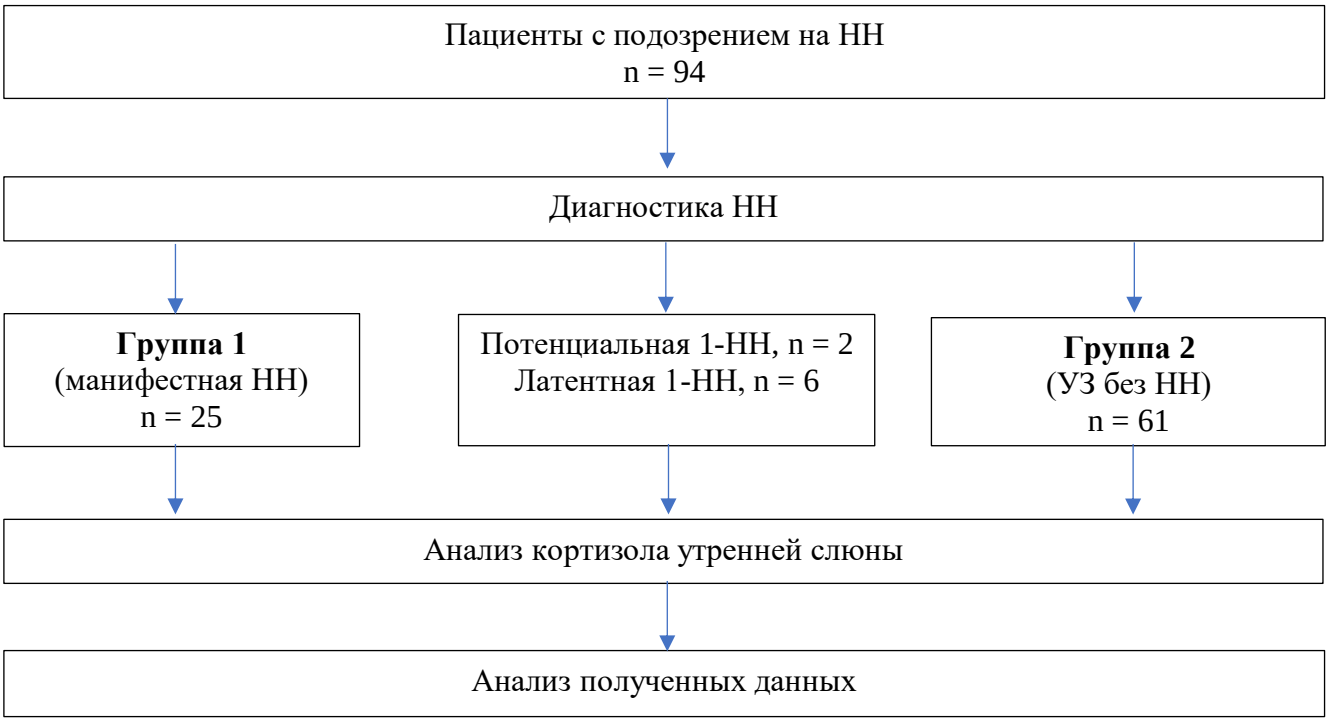


Рисунок 8 – Дизайн исследования

Примечания: НН – надпочечниковая недостаточность; 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; УЗ – условно здоровые.

Всем участникам проводились определение утренних (09:00) концентраций кортизола слюны, кортизола, АКТГ, альдостерона и ренина крови. n = 66 пациентам, у которых НН не могла быть подтверждена или исключена по результатам анализов крови на кортизол, АКТГ, альдостерон и ренин, выполнялась проба с инсулиновой гипогликемией. Исходя из дизайна исследования, все пациенты с подтвержденной НН на момент включения не получали заместительную терапию кортикостероидами.

На основании оценки результатов исследования проводился расчет операционных характеристик индексного теста (анализ утренней слюны на кортизол). В качестве референсного теста, уточняющего диагноз НН, приняты анализы утренних (09:00) концентраций кортизола, АКТГ, альдостерона и ренина крови или (если НН не могла быть подтверждена или исключена по результатам этих исследований) проба с инсулиновой гипогликемией. Все лабораторные исследования, составляющие индексный и референсный тест, осуществлялись в один день.

Нежелательные последствия индексного теста не предусмотрены, а референсного теста обусловлены осложнениями, которые могут возникнуть при заборе венозной крови (гематома, боль, покраснение) или проведении пробы с инсулиновой гипогликемией (развитие тяжелой гипогликемии и аддисонического криза).

2.3.3. Методы исследования

Клиническое обследование проводилось в соответствии с разделом 2.1.3.1., проба с инсулиновой гипогликемией – в соответствии с разделом 2.1.3.4.

2.3.3.1. Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования уровня АКТГ, кортизола, альдостерона и ренина крови проводились в соответствии с разделом 2.1.3.3.

Сбор слюны осуществлялся минимум через час после чистки зубов, при которых возможна травматизация и кровоточивость десен. Забор материала проводился при помощи контейнера Salivette посредством жевания тампона в ротовой полости в течение 2-3 минут. Минимальное содержание слюны, необходимое для проведения анализа – 120 мкл.

Определение концентрации кортизола в слюне проводилось электрохемилюминесцентным методом на анализаторе Cobas e 601 фирмы F. Hoffmann-La Roche Ltd при помощи диагностического набора Cortisol кат. №11875116 122. Образцы подвергались

центрифугированию 5 минут при 2000 оборотов, и жидкий остаток образца слюны поступал в работу.

РИ для анализа слюны на кортизол составлял 6,8-19,1 нмоль/л.

2.4. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний

2.4.1. Участники исследования

В исследование были включены пациенты с изолированной АНН и в составе АПС-1 и -2, другими эАИЗ (тиреопатиями (АИТ или БГ), аутоиммунным СД (1 типа или LADA), ГГ аутоиммунного генеза, аутоиммунным гипопаратиреозом), с неаутоиммунными эндокринными заболеваниями (1-НН, тиреопатиями, СД, ГГ, заболеваниями ОЩЖ) и условно здоровые лица. Набор пациентов в группы проводился на основании соответствия критериям включения и при отсутствии критериев невключения.

Общие критерии включения в группы[23] 1-5:

1. мужской и женский пол;
2. возраст 18 лет и старше.

Дополнительный критерий включения в группу 1: классическая клиническая триада АПС-1 и/или мутация в гене *AIRE*.

Дополнительные критерии включения в группу 2:

1. верифицированный, в соответствии с международными клиническими рекомендациями, диагноз 1-НН (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
2. повышенный уровень АТ к P450c21.

Дополнительные критерии включения в группу 3:

1. отсутствие критериев включения в группы 1-2;
2. наличие минимум одного из следующих эАИЗ (согласно данным предоставленной медицинской документации, результатам скринингового обследования):

-АИТ/БГ: повышенные уровни АТ к ТПО и/или ТГ и/или рТТГ и/или признаки аутоиммунного поражения по данным ультразвукового исследования ЩЖ;

-аутоиммунный СД: с молодого возраста и/или повышенный уровень АТ к GAD и/или ZnT8 и/или IA2 и/или IAA и/или ICA;

-ГГ аутоиммунного генеза: исключена приобретенная форма.

Дополнительные критерии включения в группу 4:

1. отсутствие критериев включения в группы 1-3 (по данным опроса, предоставленной медицинской документации);

---

[23] Определение групп приведено ниже.

2. наличие минимум одного из следующих неаутоиммунных эндокринных заболеваний (согласно данным предоставленной медицинской документации, результатам скринингового обследования):

-неаутоиммунное ЗЩЖ (с интактным органом);

-неаутоиммунный СД (с интактной поджелудочной железой);

-неаутоиммунный ГГ (с интактными яичниками, яичками);

-неаутоиммунная НН (с интактными надпочечниками);

-неаутоиммунное заболевание ОЩЖ (с интактным органом).

Дополнительный критерий включения в группу 5: отсутствие эндокринной (аутоиммунной и неаутоиммунной) патологии, согласно критериям включения в группы 1-4 (по данным опроса).

Критерии невключения (все группы):

1. беременность, период лактации (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
2. острые инфекции (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
3. тяжелые, угрожающие жизни состояния: декомпенсация ХСН, ХБП С3б и более, лёгочная и печёночная недостаточности, психические заболевания (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
4. другая патология иммунной системы (включая врождённые и приобретенные иммунодефицитные состояния, реакции гиперчувствительности в период проведения исследования; согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
5. приём препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (ИЛ, ИФН, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики) в течение 6 недель перед включением в исследование (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации);
6. проведение вакцинаций/ревакцинаций в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации).

Список исследований при лабораторном скрининге включал: анализы крови на ТТГ, св.Т4, св.Т3, глюкозу, гликированный гемоглобин, кальций ионизированный, ЛГ, ФСГ, эстрадиол (у женщин), тестостерон (у мужчин), кортизол, АКТГ, альдостерон, ренин, ДГЭА-С, АТ к ТПО, ТГ, рТТГ, GAD, IA2, ZnT8, P450c21, IAA, ICA. N = 6 пациентам, у которых НН не могла быть подтверждена или исключена по результатам анализов крови на кортизол, АКТГ, альдостерон и ренин, выполнялась проба с инсулиновой гипогликемией.

2.4.2. Дизайн исследования

Активное одномоментное сравнительное исследование. Для определения возможности включения в исследования проводилось скрининговое обследование 250 пациентов и условно здоровых. На основании результатов скрининга в исследование включено 206 участников: в группу 1 – 18 пациентов с АПС-1, в группу 2 – 30 пациентов с АНН (изолированной и в составе АПС-2), в группу 3 – 59 пациентов с эАИЗ (за исключением АНН), в группу 4 – 71 пациент с неаутоиммунной эндокринной патологией и в группу 5 – 28 условно здоровых лиц без АИЗ и неаутоиммунной эндокринной патологии.

В группе 1 диагноз АПС-1 был доказан на основании данных генетического исследования (обнаружены мутации гена *AIRE*) у 14 пациентов и выставлен на основании клинической картины (наличие минимум 2 основных компонентов синдрома) у 4 пациентов.

Проводимая заместительная терапия 1-НН у пациентов групп 1, 2 и 4 не отменялась.

В группу 5 были включены в том числе условно здоровые лица, которые являлись носителями АТ-маркеров аутоиммунного поражения островкового аппарата поджелудочной железы без нарушений углеводного обмена.

Всем включенным в исследование проводился мультиплексный иммуноанализ на гидрогелевом биочипе и определение АТ к ИФН-ω с использованием клеточной культуры HEK-blue.

На основании оценки результатов исследования проводился расчет операционных характеристик индексного теста (мультиплексный иммуноанализ). В качестве референсного теста приняты ИФА (для АТ к ТПО, ТГ, GAD, IA2, ZnT8, P450c21, IAA, ICA) и диагноз АПС-1, подтвержденный результатами генетического тестирования или клинически (для АТ к ИФН-ω, ИФН-α, ИЛ-22). Забор крови для выполнения лабораторных исследований, составляющих индексный и референсный тест, осуществлялся одновременно. В отношении АТ к ИФН-ω проведен сравнительный анализ операционных характеристик мультиплексного иммуноанализа и HEK-blue cells assay.

Возможные нежелательные последствия индексного и референсного тестов ограничены осложнениями, которые могут возникнуть при заборе венозной крови: гематома, боль, покраснение.

Схема дизайна исследования представлена на Рисунке 9.

Рисунок 9 – Дизайн исследования

Примечания: эАИЗ – эндокринные аутоиммунные заболевания; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; АТ – антитела; ИФА – иммуноферментный анализ.

2.4.3. Методы исследования

Клиническое обследование проводилось в соответствии с разделом 2.1.3.1.

2.4.3.1. Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования проводились в соответствии с разделом 2.1.3.3. Дополнительно исследованы св. Т4 и св. Т3 крови методом хемилюминесцентного иммуноанализа на автоматическом анализаторе Architect i2000 (Abbott).

РИ для гормональных показателей крови составляли: св. Т4 – 9-20 пмоль/л, св. Т3 – 2,5-5,5 пмоль/л.

2.4.3.2. Конструирование биочипов, проведение мультиплексного иммуноанализа

Данная часть работы выполнялась в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной биологии (ИМБ) 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.).

Конструирование и изготовление биочипов. Молекулярное профилирование АТ в образцах сыворотки проводилось с использованием биочипа низкой плотности на основе гидрогеля [106]. Данная технология разработана в ИМБ им. В. А. Энгельгардта РАН и основана на одновременном формировании гидрогелевых ячеек с иммобилизацией молекулярных зондов [101]. При этом молекулярные зонды равномерно распределены по всему объему ячейки. За счет развитой поверхности гидрогеля молекулярные зонды иммобилизованы с достаточной плотностью иммобилизации, однако, на значительном удалении друг от друга для нивелирования стерических эффектов. Структура геля предотвращает контакт соединений с гидрофобной подложкой, и обеспечивает нативное водное окружение биологических молекул. Таким образом, иммобилизация белков в геле стабилизирует их нативную структуру и биологическую активность, в противоположность двумерным носителям, которые не обеспечивают водное окружение для молекул белков. Данный метод подходит для иммобилизации белковых молекул и по своим характеристикам выгодно отличается от классических методов планарной иммобилизации [107].

Диаметр гелевых ячеек биочипа составлял 150 ± 20 мкм, расстояние между ячейками – 300 мкм. Каждый АГ был иммобилизован в 4 повторах для повышения воспроизводимости результатов анализа (Рисунок 10). Кроме того, в структуру биочипа были включены пустые ячейки, не содержащие иммобилизованных белков, в 8 повторах, маркерные ячейки и контрольные ячейки для детектирующих АТ. Перечень иммобилизованных АГ и их концентрации приведены в Таблице 7. Выбор данных АГ осуществлен на основании анализа наиболее частых сопутствующих эАИЗ при АНН (раздел 3.1.1. результатов).

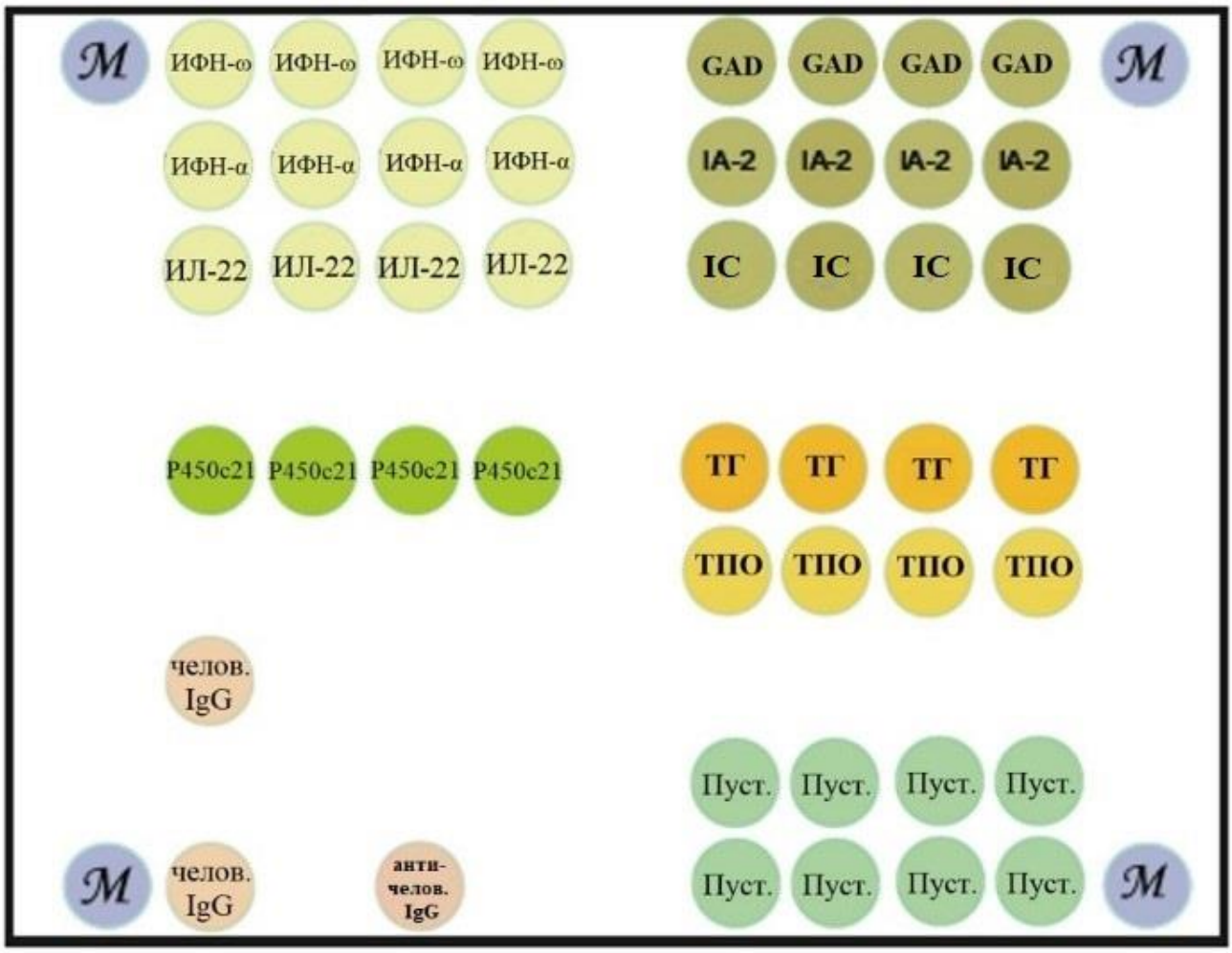


Рисунок 10 – Конфигурация биочипа

Примечания: ИФН-ω – интерфрон-ω; ИФН-α – интерфрон-α; ИЛ-22 – интерлейкин-22; P450c21 – 21-гидроксилаза; GAD – глутаматдекарбоксилаза; IA2 – тирозинфосфатаза; IC – антиген островковых клеток поджелудочной железы; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; M – маркер; челов. IgG – человеческий иммуноглобулин класса G; анти-челов. IgG – мышиные античеловеческие антитела класса G; Пуст. – референсные элементы геля без иммобилизованного протеина.

Таблица 7 – Иммобилизированные на биочипе антигены

АИЗ	Белок	Каталожный номер	Концентрация белка, мкг в 1 мл геля	Производитель
АПС-1	ИФН-ω	300-02J	300	PeproTech, США
	ИФН-α	11100-1	300	PBL Assay Science, США
	ИЛ-22	200-22	300	PeproTech, США
АНН	P450c21	ab225641	600	Abcam, Великобритания

Продолжение Таблицы 7

АИЗ	Белок	Каталожный номер	Концентрация белка, мкг в 1 мл геля	Производитель
СД1/ LADA	GAD	228-20881-2	111	RayBiotech, США
	IA2	ab42590	60	Abcam, Великобритания
	IC	ls-g57192	100	LifeSpan BioSciences, США
АИТ	ТПО	TPO rec	300	Bialexa, Россия
	ТГ	TG naiv	300	Bialexa, Россия

Примечания: АИЗ – аутоиммунное заболевание; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; ИФН-ω – интерфрон-ω; ИФН-α – интерфрон-α; ИЛ-22 – интерлейкин-22; P450c21 – 21-гидроксилаза; GAD – глутаматдекарбоксилаза; IA2 – тирозинфосфатаза; IC – антиген островковых клеток поджелудочной железы; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; США – Соединенные Штаты Америки.

Детекция ауто-АТ: использованы цианиновые красители Cy5 для антивидовых АТ против IgG человека (F(ab')2-Goat anti-Human IgG Fc gamma Secondary Antibody, 31163, Invitrogen) и Cy3 для АТ против IgM и IgA человека (#A80-100A и #A80-102A, соответственно (Bethyl, США)). Для флуоресцентной маркировки АТ к 50 мкл раствора АТ в бикарбонатном буфере (1 мг/мл) добавляли 1 мкг N-гидроксисукцинимидного эфира соответствующего красителя в N,N-диметилформамиде (10 мг/мл). АТ с красителем инубировали 1 ч (22 ºС; 550 оборотов/минуту). Целевой продукт выделяли гель-фильтрацией на спин-колонке, содержащей Сефадекс G-25 Coarse в фосфатно-солевом буфере (PBS).

Гибридизация и отмывка биочипов: образцы сывороток крови пациентов разводили 1:100 буфером 100 мМ Трис-HCl с 0,1% Triton X-100 и наносили на ячейки биочипа (120 мкл). После инкубации (как правило, в течение ночи, 37 ºС), промежуточной отмывки (фосфатно-солевой промывочный буфер с Твин-20, 0,01%, 20 минут), споласкивания и высушивания, биочипы проявляли флуоресцентно-меченными антивидовыми АТ (5 мкг/мл; F(ab')2-Goat anti-Human IgG-Cy5; 50 мкл) в буфере PBS с 0,14% поливинилового спирта (50 кДа) и 0,14% поливинилпирролидона (360 кДа). После инкубации (30 минут, 37 ºС) биочипы отмывали (фосфатно-солевой промывочный буфер с Твин-20, 0,01%, 30 минут), споласкивали, высушивали центрифугированием.

Анализ флуоресценции и интерпретация результатов: флуоресцентные изображения биочипов получали с помощью биочип-анализатора с лазерным возбуждением, разработанного в ИМБ РАН, Москва [108]. Вычисление флуоресцентных сигналов осуществляли с помощью

программного обеспечения ImageAssay (ИМБ РАН, Москва). Для каждой группы ячеек n, содержащих одинаковые АГ, результирующее значение сигнала I_n рассчитывали, как медиану значений от 4 соответствующих сигналов флуоресценции. В группе из 8 ячеек, не содержащих иммобилизованных белков, результирующее значение флуоресцентного сигнала I_{ref} рассчитывали, как медиану значений от 8 соответствующих сигналов флуоресценции. Пороговые значения для отбора положительных результатов составляли $I_n/_{Iref} \geq 5{,}0$ для АТ к ИФН-ω, ИФН-α-2a, ИЛ-22 и $I_n/_{Iref} \geq 2{,}0$ для АТ к ТГ, ТПО, P450c21, GAD, IA2, ICA. Согласно экспериментальным данным, положительный сигнал должен быть, по крайней мере, в 2 раза интенсивнее, по сравнению с фоновым сигналом I_{ref} со стандартным отклонением 0,2. Таким образом, 2,0-кратное отличие в интенсивности было принято за отрезную точку для определения положительного сигнала. Также установлено, что повышение порогового уровня для АТ к ИФН-ω, ИФН-α-2a и ИЛ-22 до значений $I_n/I_{ref} \geq 5{,}0$ позволяет отсечь ложноположительные результаты, без потери чувствительности.

2.4.3.3. Определение антител к интерферону-ω с использованием клеточной культуры HEK-blue

Исследование выполнено научным коллективом: Орлова Е. М., Созаева Л. С., Карева М. А. [94]. В основе метода лежит способность клеток синтезировать щелочную фосфатазу в присутствии ИФН. При высоком титре нейтрализующих АТ-ИФН в сыворотке пациента способность клетки синтезировать щелочную фосфатазу подавляется, что, в свою очередь, фиксируется при помощи исследования оптической плотности. Наличие секретированной щелочной фосфатазы определялось при помощи спектрометра с определением оптической плотности исследуемой жидкости на длине волны 650 нм (Abs650). Ингибирование ИФН представлялось в виде процента нейтрализации (индекс АТ) и высчитывалось по формуле:

$$\text{Индекс АТ} = \frac{Abs650\ \text{негативный контроль} - Abs650\ \text{образец}}{Abs650\ \text{негативный контроль} - Abs650\ \text{позитивный контроль}}$$

2.5. Статистический анализ результатов исследования

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием пакета программного обеспечения: STATISTICA 13 (StatSoft, США, 2017). Для анализа распределения количественных признаков использованы критерии Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Для количественных признаков указаны медиана и интерквартильный интервал. Так как распределение признаков было отличным от нормального, применялись непараметрические тесты. Для выявления связи между параметрами определялся коэффициент корреляции Спирмена. С целью сравнения количественных данных двух независимых выборок применялся U-критерий Манна-Уитни; зависимых выборок – парный критерий Вилкоксона; трех и более независимых выборок – критерий Краскела-Уоллиса; качественных признаков – тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. 95% ДИ для чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного (+PV) и отрицательного (-PV) результатов, точности рассчитывались с использованием интернет-калькулятора https://statpages.info/confint.html. ROC-анализ осуществлялся при помощи программного обеспечения Microsoft Excel XLSTAT (Addinsoft, США, 2022). Имеющиеся пропуски в данных не заполнялись, с целью избежать статистического смещения результатов. Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез был принят равным 0,05. Для коррекции проблемы множественности проверки гипотез применялась поправка Бонферрони. После применения поправки значения p в диапазоне между расчитанным и 0,05 интерпретировались как статистическая тенденция.

2.6. Источник финансирования

Грант Российского научного фонда №17-75-30035 «Аутоиммунные эндокринопатии с полиорганными поражениями: геномные, постгеномные и метаболомные маркёры. Генетическое прогнозирование рисков, мониторинг, ранние предикторы, персонализированная коррекция и реабилитация» (2017-2020 гг.).

Часть исследования, посвященная мультиплексному профилированию сывороточных антител, выполнена при поддержке гранта Фонда научно-технологического развития Югры 2022-05-01/2022.

2.7. Этическая экспертиза

Локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, согласно протоколу №8 заседания от 25.04.2018 г., постановлено, что все части планируемой научной работы соответствуют этическим стандартам добросовестной клинической практики и могут быть проведены на базе отдела терапевтической эндокринологии и консультативно-диагностического центра. Все пациенты и условно здоровые лица подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

3.1.1. Клиническая характеристика обследованных лиц

Характеристика больных группы 1 представлена в Таблице 8, групп 2-5 – в Таблице 9.

Таблица 8 – Характеристика больных группы 1

№	Группа	Пациенты				
		n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)		
				n	%	Соотношение
1	АНН	119	18-72	97/22	82/18	4,4:1
1a	АНН в рамках АПС-2	68	22-72	61/7	90/10	8,7:1
1b	АНН в рамках АПС-1	22	18-49	15/7	68/32	2,1:1
1c	Изолированная АНН	29	20-60	21/8	72/28	2,6:1

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Таблица 9 – Характеристика больных групп 2-5

№	Группа	Участники			
		n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)	
				n	%
2	АИЗ	513	18-82	375/138	73/27
2a	Аутоиммунные тиреопатии	236	18-82	195/41	83/17
2b	СД1/LADA	172	18-71	101/71	59/41
2c	Аутоиммунные тиреопатии + СД1/LADA	75	18-73	61/14	81/19
2d	Другие АИЗ	30	16-72	18/12	60/40
3	Носители АТ	36	18-73	26/10	72/28
4	Неаутоиммунные эндокринопатии	97	18-88	62/35	64/36

Продолжение Таблицы 9

№	Группа	Участники			
		n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)	
				n	%
5	Условно здоровые	70	18-64	56/14	80/20

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АИЗ – аутоиммунные заболевания; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; АТ – антитела; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Анализ клинических и анамнестических данных пациентов с АНН (диагностированной на момент включения в исследование) представлен в Таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика больных группы 1

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 1c**	**p****
	n = 119	**n = 68**	**n = 22**	**n = 29**	
Возраст диагностики АНН, лет*	31,00 [22,00; 44,00]	33,00 [26,00; 45,50]	13,50 [9,00; 22,00]	33,00 [28,00; 45,00]	***< 0,001*** ($p_{1a-1b} = p_{1b-1c}$ ***< 0,001***)
Длительность приема препаратов глюкокортикоидов, лет*	5,75 [1,50; 12,50]	3,80 [1,00; 10,50]	12,13 [5,75; 21,00]	5,50 [0,58; 10,00]	0,067
Сопутствующие эндокринные аутоиммунные заболевания, n (%)	АИТ – 57 (48)	АИТ – 53 (78)	Гипопаратиреоз – 20 (91)	0	-
	ГГ – 24 (20)	СД1 – 15 (22)	ГГ – 14 (64)		
	БГ – 9 (8)	ГГ – 10 (15)	АИТ – 4 (18)		
	СД1 – 19 (16)	БГ – 9 (13)	СД1 – 4 (18)		
	Гипопаратиреоз – 20 (17)	ЭОП – 1 (1,5)			
	ЭОП – 1 (1)				
Сопутствующие неэндокринные аутоиммунные заболевания, n (%)	Кожно-слизистый кандидоз – 21 (18)	Атрофический гастрит/гастродуоденит – 5 (7)	Кожно-слизистый кандидоз – 21 (96)	Алопеция – 2 (7)	-
	Атрофический гастрит/гастродуоденит – 15 (13)	Витилиго – 5 (7)	Атрофический гастрит/ гастродуоденит – 9 (41)	Атопический дерматит/ дерматомиозит/ экзема – 2 (7)	
	Витилиго – 11 (9)	Бронхиальная астма – 2 (3)	Алопеция – 8 (36)	Атрофический гастрит/ гастродуоденит – 1 (3)	

Продолжение Таблицы 10

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 1c**	**p****
	n = 119	**n = 68**	**n = 22**	**n = 29**	
Сопутствующие неэндокринные аутоиммунные заболевания, n (%)	Алопеция – 10 (8)	Невус Сеттона – 1 (1,5)	Витилиго – 5 (23)	Бронхиальная астма – 1 (3)	
	Дистрофия роговицы – 4 (3)	Дерматит/ дерматомиозит/ экзема – 1 (2)	Синдром мальабсорбции – 4 (18)	Аутоиммунный гепатит – 1 (3)	
	Бронхиальная астма – 4 (3)	Аутоиммунный гепатит – 1 (2)	Дистрофия роговицы – 4 (18)	Витилиго – 1 (3)	
	Синдром мальабсорбции – 4 (3)	Ревматоидный артрит – 1 (2)	Гипоплазия зубной эмали – 4 (18)		
	Гипоплазия зубной эмали – 4 (3)		Гипоплазия селезенки – 2 (9)		
	Атопический дерматит/дерматомиозит/ экзема – 3 (3)		Пигментный ретинит – 1 (5)		
	Аутоиммунный гепатит – 2 (2)		Аутоиммунный гепатит – 1 (5)		
	Гипоплазия селезенки – 2 (2)		Бронхиальная астма – 1 (5)		
	Ревматоидный артрит – 1 (1)		Псориаз – 1 (5)		
	Пигментный ретинит – 1 (1)				
	Псориаз – 1 (1)				

Продолжение Таблицы 10

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 1c**	**p****
	n = 119	**n = 68**	**n = 22**	**n = 29**	
Носительство антител-маркеров аутоиммунных форм нарушений углеводного обмена/к ткани щитовидной железы, n, %	ТПО – 63 (53)	ТПО – 41 (60)	ТПО – 7 (32)	ТПО – 15 (52)	-
	ТГ – 19 (16)	ТГ – 14 (21)	ТГ – 3 (14)	ТГ – 2 (7)	
	GAD – 10 (8)	GAD – 3 (4)	GAD – 6 (27)	GAD – 1 (3)	
	ICA – 13 (11)	ICA – 5 (7)	ICA – 6 (27)	ICA – 2 (7)	
	IAA – 5 (4)	IAA – 3 (4)	IAA – 1 (5)	IAA – 1 (3)	
	ZnT8 – 17 (14)	ZnT8 – 9 (13)	ZnT8 – 4 (18)	ZnT8 – 4 (14)	
	IA2 – 14 (12)	IA2 – 10 (15)	IA2 – 3 (14)	IA2 – 1 (3)	
Носительство антител-маркеров аутоиммунных форм нарушений углеводного обмена/к ткани щитовидной железы без манифестного заболевания, n, %	**Без АИТ/БГ и СД1: n = 50**	**Без АИТ/БГ и СД1: n = 5**	**Без АИТ/БГ и СД1: n = 16**	**Без АИТ/БГ и СД1: n = 29**	-
	31 (62)	4 (80)	8 (50)	19 (66)	
	ТПО – 23 (46)	ТПО – 2 (40)	ТПО – 5 (31)	ТПО – 15 (52)	
	ТГ – 6 (12)	ТГ – 2 (40)	ТГ – 2 (13)	ТГ – 2 (7)	
	GAD – 6 (12)	GAD – 0	GAD – 5 (31)	GAD – 1 (3)	
	ICA – 7 (14)	ICA – 0	ICA – 5 (31)	ICA – 2 (7)	
	IAA – 2 (4)	IAA – 0	IAA – 1 (6)	IAA – 1 (3)	
	ZnT8 – 6 (12)	ZnT8 – 0	ZnT8 – 2 (13)	ZnT8 – 4 (14)	
	IA2 – 3 (6)	IA2 – 1 (20)	IA2 – 1 (6)	IA2 – 1 (3)	

Продолжение Таблицы 10

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 1c**	**p****
	n = 119	**n = 68**	**n = 22**	**n = 29**	
Носительство антител-маркеров аутоиммунных форм нарушений углеводного обмена/к ткани щитовидной железы без манифестного заболевания, n, %	**Без АИТ/БГ: n = 53**	**Без АИТ/БГ: n = 6**	**Без АИТ/БГ: n = 18**	**Без АИТ/БГ: n = 29**	-
	ТПО – 23 (43)	ТПО – 3 (50)	ТПО – 5 (28)	ТПО – 15 (52)	
	ТГ – 6 (11)	ТГ – 2 (33)	ТГ – 2 (11)	ТГ – 2 (7)	
	Без СД1: n = 100	**Без СД1: n = 53**	**Без СД1: n = 18**	**Без СД1: n = 29**	
	GAD – 7 (7)	GAD – 1 (2)	GAD – 5 (28)	GAD – 1 (3)	
	ICA – 8 (8)	ICA – 1 (2)	ICA – 5 (28)	ICA – 2 (7)	
	IAA – 4 (4)	IAA – 2 (4)	IAA – 1 (6)	IAA – 1 (3)	
	ZnT8 – 11 (11)	ZnT8 – 4 (8)	ZnT8 – 3 (17)	ZnT8 – 4 (14)	
	IA2 – 8 (8)	IA2 – 6 (11)	IA2 – 1 (6)	IA2 – 1 (3)	
Уровень антител к 21-гидроксилазе, Ед/мл (РИ < 0,4)*	22,99 [4,03; 51,40]	38,55 [18,30; 63,83]	1,62 [0,29; 3,69]	15,05 [6,35; 34,63]	***< 0,001*** ($p_{1a\text{-}1b} = p_{1b\text{-}1c}$ ***< 0,001***)

* Me [Q1; Q3]

** Сравнение групп 1a, 1b и 1c; в скобках приведены значимые различия, выявленные при анализе post hoc. Критерий Краскела-Уоллиса. Пороговый $p_0 = 0{,}017$ (после применения поправки Бонферрони: 3 гипотезы). Для попарных сравнений: U-критерий Манна-Уитни. Пороговый $p_0 = 0{,}006$ (после применения поправки Бонферрони: сравнение 3 групп). Полужирным и курсивным шрифтами выделены статистически значимые различия.

Примечания: Me – медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; БГ – болезнь Грейвса; СД1 – сахарный диабет 1 типа; ЭОП – эндокринная офтальмопатия; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IAA – антитела к инсулину; IA2 – тирозинфосфатаза; ZnT8 – транспортер цинка 8; РИ – референсный интервал.

Согласно полученным данным, изолированная АНН отмечается только в 24% случаев. В 19% случаев АНН развивается в рамках АПС-1, и в 57% - в рамках АПС-2. В составе АПС-1 наиболее частыми сопутствующими АИЗ ожидаемо являются гипопаратиреоз и кожно-слизистый гипопаратиреоз, реже из эАИЗ – ГГ, а из неэндокринных АИЗ – аутоиммунный гастрит/гастродуоденит и алопеция (Рисунки 11; 12). В составе АПС взрослых (АПС-2-4) наиболее частой сопутствующей эндокринной аутоиммунной патологией является первичный гипотиреоз в исходе АИТ, реже СД1; неэндокринной – аутоиммунный гастрит/гастродуоденит и витилиго. Первичный гипотиреоз в исходе АИТ являлся наиболее частой сопутствующей эндокринной аутоиммунной патологией и в общей когорте пациентов. При исключении КСК, наиболее частой неэндокринной аутоиммунной патологией в общей когорте является аутоиммунный гастрит/гастродуоденит.

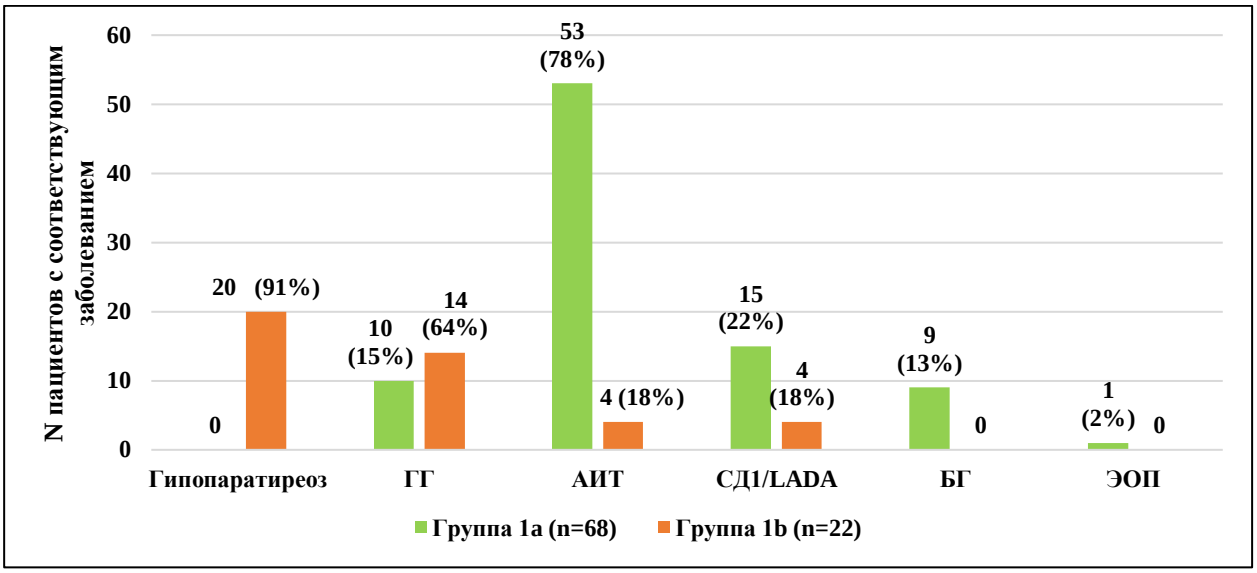


Рисунок 11 – Сопутствующие эндокринные аутоиммунные заболевания в группе 1

Примечания: N – число; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; БГ – болезнь Грейвса; ЭОП – эндокринная офтальмопатия.

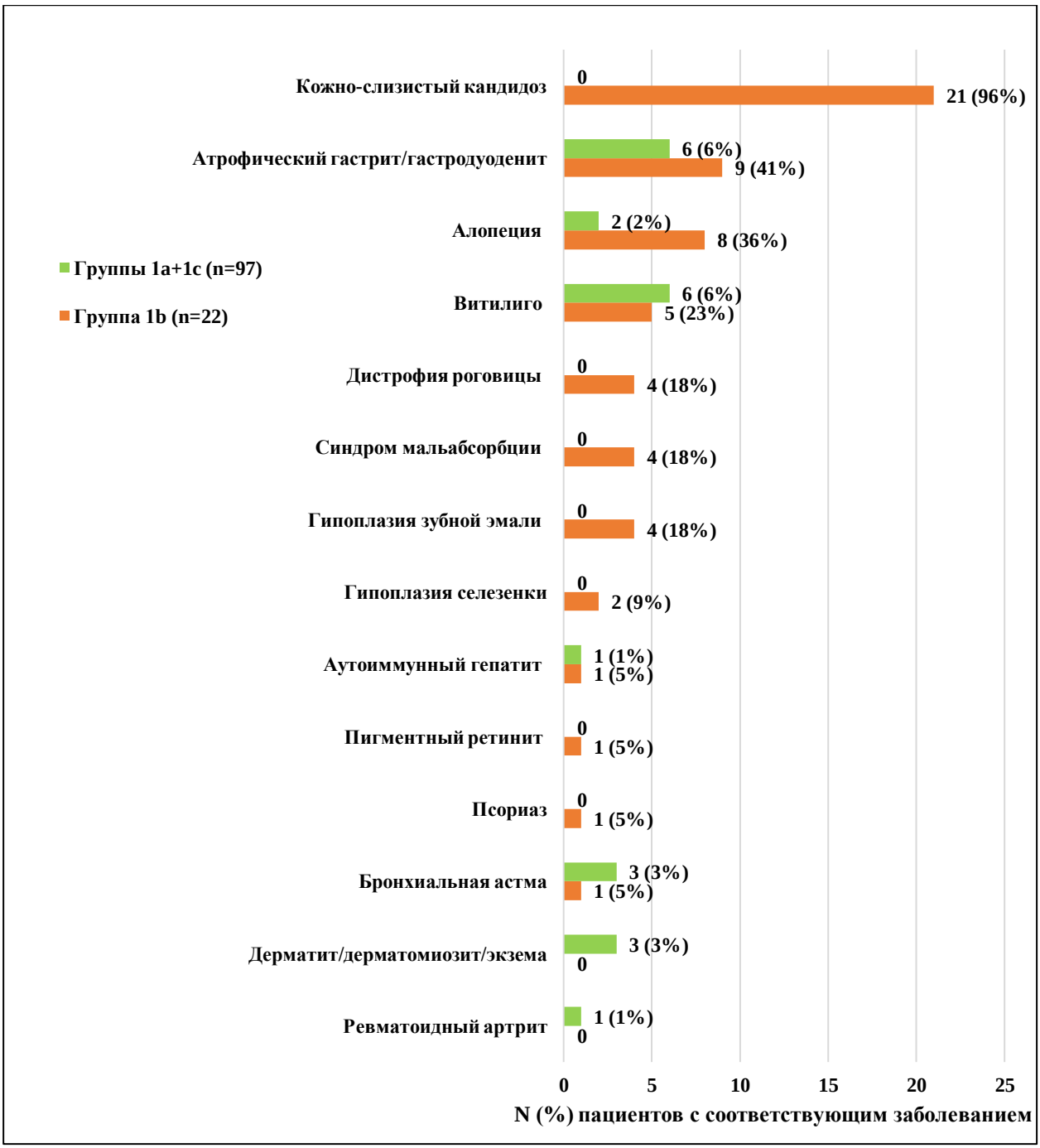


Рисунок 12 – Сопутствующие неэндокринные аутоиммунные заболевания в группе 1[24]

Примечание: N – число.

Длительность постановки правильного диагноза АНН (от момента возникновения клинических проявлений; Me [Q1; Q3]) составила 0,8 [0,0; 2,0] лет. В 24% (n = 29) до постановки правильного диагноза пациенты переносили аддисонические кризы, в 8% случаев (n = 9) – неоднократно. 14% пациентов (n = 17) получали патогенетически необоснованное лечение, в

[24] Группы 1a и 1c объединены, так как изолированная АНН и АНН в рамках АПС-2 имеют общий патогенез (нарушение периферической ИТ). Кроме того, пациент с изолированной АНН при появлении сопутствующих эАИЗ будет отнесен к АПС взрослых (АПС-2-4).

связи с подозрением на острые инфекции, патологию органов пищеварения и центральной нервной системы. Медиана возраста на момент подтверждения диагноза АНН составила 33 [22; 45] года. Получена значимая отрицательная корреляция средней силы между возрастом пациентов на момент постановки диагноза и выявлением новых случаев АНН (r = -0,412, p < 0,001, Рисунок 13).

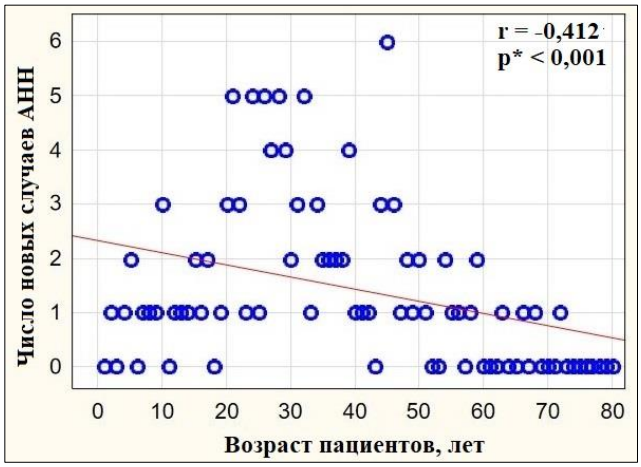


Рисунок 13 – Корреляция между выявлением новых случаев аутоиммунной надпочечниковой недостаточности и возрастом пациентов на момент постановки диагноза группы 1 (n = 119) *Корреляция Спирмена. Пороговый p = 0,05.

Примечание: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность.

У n = 46 пациентов (39% (95% ДИ [30%; 48%]) всех случаев) группы 1 развитию АНН предшествовала манифестация других АИЗ (эндокринных и неэндокринных), в том числе у n = 18 (15%, 95% ДИ [9%; 23%]) зафиксирована множественная аутоиммунная патология.

3.1.2. Исследование диагностической эффективности анализа крови на антитела к 21-гидроксилазе при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Частота повышенного уровня АТ к P450c21 у пациентов с манифестной АНН составила 94% (n = 112). Длительность (Me [Q1; Q3]) приема препаратов глюкокортикоидов у пациентов с повышенными АТ составила 5 [1; 12] лет, уровень (Me [Q1; Q3]) АТ – 29,73 [7,73; 53,78] Ед/мл. Нормальный уровень АТ выявлен у n = 7 (6%) пациентов: n = 5 с генетически верифицированным АПС-1, n = 1 с АПС-2, n = 1 с изолированной АНН. Длительность (Me [Q1; Q3]) приема препаратов глюкокортикоидов у данных пациентов составила 20 [8; 25] лет, уровень АТ (Me [Q1; Q3]) – 0,09 [0,03; 0,21] Ед/мл.

В группе 5 нормальный уровень АТ выявлен у 100% условно здоровых (*см. ниже*). Таким образом, чувствительность метода в диагностике АНН составила 94%, 95% ДИ [88%; 98%], специфичность – 100%, 95% ДИ [95%; 100%], +PV – 100%, 95% ДИ [97%; 100%], -PV – 91%, 95% ДИ [82%; 96%] (кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик теста представлены в Таблице 11). По результатам ROC-анализа, качество модели является отличным (Рисунок 14; AUC = 98% [97%; 100%]; стандартная ошибка 0,008, $p < 0,001$), диагностический порог совпадает с референсным значением, указанным производителем набора (≥ 0,4 Ед/мл). Нежелательные последствия выполнения индексного или референсного тестов отсутствовали.

Таблица 11 – Кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик анализа крови на антитела к 21-гидроксилазе в диагностике аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Уровень АТ к P450c21	**АНН +**[25]	**АНН -**[26]
АТ к P450c21 повышены (≥ 0,4 Ед/мл)	112 ИП	0 ЛП
АТ к P450c21 не повышены (< 0,4 Ед/мл)	7 ЛО	70 ИО

Примечания: АТ – антитела; P450c21 – 21-гидроксилаза; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; ИП – истинноположительный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ИО – истинноотрицательный результат.

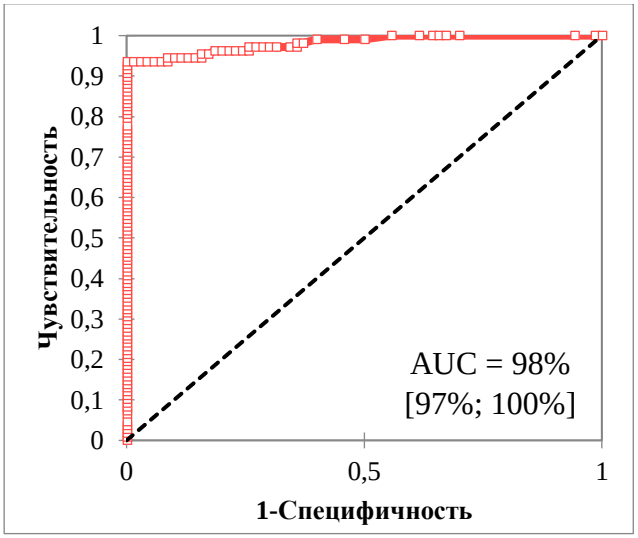


Рисунок 14 – ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность определения антител к 21-гидроксилазе у пациентов с аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью (n = 119) и условно здоровых лиц (n = 70)

Примечание: AUC – area under the curve.

[25] «+» – наличие заболевания.
[26] «-» – отсутствие заболевания.

При анализе зависимости уровня АТ к Р450с21 от длительности приема препаратов глюкокортикоидов у пациентов с мАНН в группе 1 получена значимая отрицательная корреляция средней силы: r = -0,311, p = 0,001 (Рисунок 15). Также получена значимая отрицательная корреляция средней силы у пациентов с мАНН в группе 1b: r = -0,521, p = 0,022 (Рисунок 16).

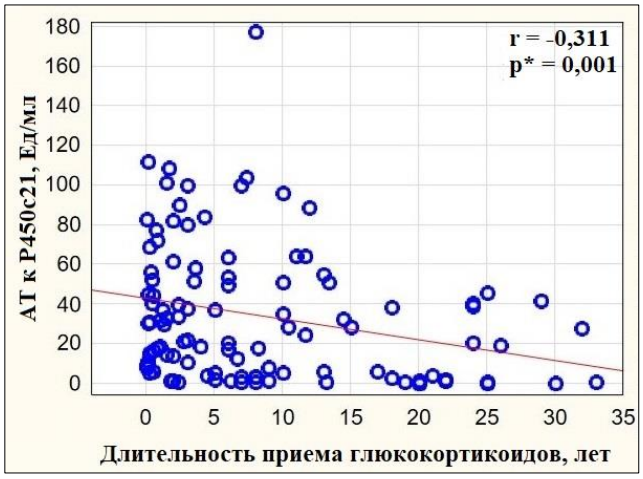


Рисунок 15 – Корреляция уровня антител к 21-гидроксилазе и длительности приема препаратов глюкокортикоидов у пациентов с манифестной аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью группы 1 (n = 114)

*Корреляция Спирмена. Пороговый p = 0,05.

Примечания: АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза.

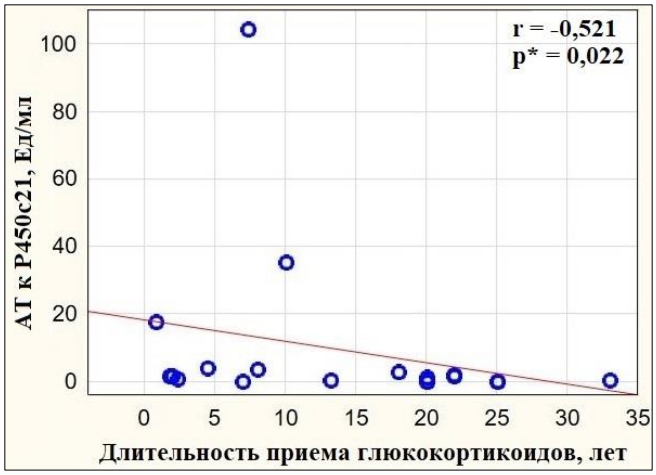


Рисунок 16 – Корреляция уровня антител к 21-гидроксилазе и длительности приема препаратов глюкокортикоидов у пациентов с манифестной аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью группы 1b (n = 20)

*Корреляция Спирмена. Пороговый p = 0,05.

Примечания: АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза.

3.1.3. Результаты исследования уровня антител к 21-гидроксилазе у пациентов без установленного диагноза аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Результаты иммунологического анализа крови, а также анализ клинических и анамнестических данных пациентов групп 2-5 представлены в Таблице 12.

Повышенный уровень АТ к P450c21 выявлен у 15 пациентов группы 2 (2% (95% ДИ [1%; 3%]) от всех участников групп 2-5, 3% (95% ДИ [2%; 5%]) от включенных в группу 2). При сравнении частоты повышения АТ к P450c21 в группах 2a-2d значимые отличия не выявлены ($p = 0,452$; тест Хи-квадрат, пороговый $p_0 = 0,008$ после применения поправки Бонферрони: 6 сравнений).

n = 3 больным с повышенным уровнем АТ к P450c21 выполнено дополнительное гормональное исследование для уточнения диагноза АНН, в т.ч. проба с инсулиновой гипогликемией. На основании полученных результатов у каждого пациента диагностирована та или иная стадия ранней АНН. Клинико-анамнестические и лабораторные данные этих больных, а также пациентов группы 1 с лАНН, у которых диагностический поиск был инициирован, в связи с жалобами (n = 5), представлены в Таблице 13.

Таблица 12 – Характеристика пациентов групп 2-5

Показатель	**Группа 2**				**Группа 3**	**Группа 4**	**Группа 5**	**p****
	Группа 2a	**Группа 2b**	**Группа 2c**	**Группа 2d**				
	n = 236	**n = 172**	**n = 75**	**n = 30**	**n = 36**	**n = 97**	**n = 70**	
Сопутствующие эндокринные аутоиммунные заболевания, n (%)	Эндокринная офтальмопатия – 88 (37)	-	Эндокринная офтальмопатия – 2 (3)	0	0	0	0	-
	ГГ – 2 (1)							
	Гипопаратиреоз – 1 (0,4)							
	Центральный несахарный диабет – 1 (0,4)							
Сопутствующие неэндокринные аутоиммунные заболевания, n (%)	Витилиго – 18 (8)	Псориаз/ПА – 3 (2)	Витилиго – 5 (7)					
	Алопеция – 9 (4)	Витилиго – 2 (1)	Ревматоидный артрит – 2 (3)					
	Псориаз/ПА – 6 (3)	Бронхиальная астма – 2 (1)	Бронхиальная астма – 1 (1)					
	Ревматоидный артрит – 5 (2)	Аутоиммунный гастрит – 1 (0,6)	Алопеция – 1 (1)					
	Аутоиммунный гастрит – 3 (1)	Ревматоидный артрит – 1 (0,6)	Аутоиммунный гастрит – 1 (1)					
	Экзема[27]/АК – 2 (1)	Экзема/АК – 1 (0,6)	Экзема/АК – 1 (1)					

[27] По мнению ряда специалистов, данное заболевание не является аутоиммунным.

Продолжение Таблицы 12

Показатель	**Группа 2**				**Группа 3**	**Группа 4**	**Группа 5**	**p****
	Группа 2a	**Группа 2b**	**Группа 2c**	**Группа 2d**				
	n = 236	**n = 172**	**n = 75**	**n = 30**	**n = 36**	**n = 97**	**n = 70**	
Сопутствующие неэндокринные аутоиммунные заболевания, n (%)	НЯК – 1 (0,4) Системная красная волчанка – 1 (0,4) Бронхиальная астма – 1 (0,4)	Синдром Шегрена – 1 (0,6)		0	0	0	0	-
Уровень антител к 21-гидроксилазе, Ед/мл (РИ < 0,4)*	0,03 [0,01; 0,08]	0,02 [0,01; 0,05]	0,03 [0,01; 0,12]	0,04 [0,03; 0,11]	0,03 [0,01; 0,04]	0,04 [0,01; 0,23]	0,03 [0,01; 0,10]	***0,018***
Частота встречаемости повышенного уровня антител, n (%)	7 (3)	4 (2)	4 (5)	0	0	0	0	0,136

*Me [Q1; Q3]

** Сравнение групп 2a, 2b, 2c, 2d, 3, 4 и 5. Для количественных признаков: критерий Краскела-Уоллиса. Для качественных признаков – тест Хи-квадрат. Пороговый $p_0 = 0,025$ (после применения поправки Бонферрони: 2 гипотезы). Полужирным и курсивным шрифтами выделено значимое различие.

Примечания: АТ – антитела; Me – медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; НЯК – неспецифический язвенный колит; ПА – псориатический артрит; АК – аутоиммунная крапивница.

Таблица 13 – Характеристика пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности при первичном обследовании

Характеристика	**Пациенты**							
	№1$_р$	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№6$_р$**	**№7$_р$**	**№8$_р$**
Группа	2a	1a	2b	1c	1b	1c	1b	2c
Пол (Ж/М)	Ж	М	Ж	М	М	Ж	Ж	Ж
Возраст, лет	25	26	19	50	18	40	38	39
Эндокринные АИЗ (возраст диагностики, лет)	АИТ (21), гипопаратиреоз (24), ГГ (25)	АИТ (7), СД1 (9)	СД1 (8)	-	Гипопаратиреоз (17)	-	АИТ (35), гипопаратиреоз (17), ГГ (первичная аменорея)	СД1 (12), АИТ (23)
Неэндокринные АИЗ (возраст диагностики, лет)	Алопеция (14) аутоиммунный гастрит (15)	-	-	-	Атопический дерматит (5)	-	Алопеция (5)	-
Носительство других АТ	-	К ПКЖ	К ТПО, ТГ	ICA, к GAD, ZnT8	-	-	-	-
Симптомы АНН								
Слабость	-	+	-	+	+	-	+	-
Тяга к соленому	+	+	-	+	-	+	-	-
Гиперпигментация кожи	-	-	-	-	+	+	+	-
Снижение веса	-	-	-	-	-	+	-	-
Головокружение, гипотензия, потеря сознания	+	+	-	+	+	-	+	-

Продолжение Таблицы 13

Характеристика	**Пациенты**							
	№1$_р$	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№6$_р$**	**№7$_р$**	**№8$_р$**
Прочие	-	частые гипогликемии	-	тошнота	чувство тревоги	-	-	-
АТ к Р450с21, Ед/мл (РИ < 0,4)	2,940	92,670	0,604	71,976	12,858	55,623	23,604	35,508
АКТГ, 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[28], нмоль/л (РИ ≥ 500)	481,6	509,4	-	141,4	497,2	350,3	690,4	-
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
ДГЭА-С, мкмоль/л	0,1*	1,6**	3,1*	3,0**	2,1**	0,7***	0,5*	3,2*
Стадия АНН	лАНН	лАНН	пАНН	лАНН	лАНН	лАНН	лАНН	пАНН
Генетическое исследование	Мутация *AIRE* R257X/c.821delG	НВ	НВ	НВ	Мутация *AIRE* R257X/ R257X	НВ	Мутация *AIRE* R257X/ R257X	НВ

* РИ 1,65-11

[28] Не выполнялся пациентам №3$_р$ и №8$_р$, с учётом уровня базального кортизола > 500 нмоль/л.

**РИ 1,2-13,4

***РИ 0,26-6,68

Примечания: Ж – женский пол; М – мужской пол; АИЗ – аутоиммунное заболевание; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; СД1 – сахарный диабет 1 типа; АТ – антитела; ПКЖ – париетальные клетки желудка; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; ZnT8 – транспортер цинка 8; P450c21 – 21-гидроксилаза; АКТГ – адренокортикотропный гормон; ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат; РИ – референсный интервал; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; пАНН – потенциальная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; НВ – не выполнялось.

При интерпретации полученных результатов у пациентов №$3_р$ и №$8_р$ диагностирована пАНН. Отмечено, что данные остальных пациентов (№$1_р$, №$2_р$, №№$4_р$-$7_р$), которые не удовлетворяют критериям 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 C. и соавт.

В этой связи, мы модифицировали классификацию Betterle C. и соавт.:

-стадии 1-3, которые характеризуются различной степенью нарушения секреции гормонов коры надпочечников, что принципиально отличает их от стадий 0 (сохранная функция коры надпочечников) и 4 (практически полное отсутствие секреции глюкокортикоидов и минералокортикоидов), объединены в единую латентную стадию с выделением подстадий 1, 2 и 3;

-классификация Betterle C. и соавт. не предусматривает возможность сниженного базального кортизола при адекватном его выбросе в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией, в то время как такие пациенты описаны в литературе [109]. Мы указали на возможность выявления как нормального, так и сниженного базального кортизола при лАНН, в связи с чем, целесообразно объединение подстадий 2 и 3 лАНН;

-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;

-классификация Betterle C. и соавт. предусматривает возможность клинических проявлений НН только на манифестной стадии заболевания, в то же время, в нашей когорте все пациенты с лАНН предъявляли жалобы, характерные для 1-НН. В модифицированной классификации мы указали данный критерий на всех подстадиях лАНН;

-учитывая сохранение минимальной секреции альдостерона в ряде случаев на манифестной стадии АНН (в соответствии с диагностическими критериями, утвержденными Endocrine Society [3]), а также нормальный показатель данного гормона у пациентов №$1_р$, №$2_р$, №№$4_р$-$7_р$, мы указали на такую возможность на всех подстадиях лАНН;

-учитывая повышение АКТГ у всех пациентов с лАНН, в т.ч. с сохранной секрецией кортизола (пациенты №$2_р$ и №$7_р$), мы указали на такую возможность на всех подстадиях лАНН;

-приведены показатели кортизола на фоне пробы с инсулиновой гипогликемией (с учётом отсутствия тетракозактида на российском фармацевтическом рынке): < 500 нмоль/л или ≥ 500 нмоль/л;

-для пациентов женского пола молодого возраста введен дополнительный диагностический критерий НН – уровень ДГЭА-С. Данный показатель предложен, с учётом результатов анализа гормональных показателей пациентов с ранними стадиями АНН. В частности, отмечено, что у всех лиц с пАНН (n = 2) уровень ДГЭА-С сохранялся в пределах референсных значений, так же, как и у мужчин с лАНН (n = 3), однако у всех женщин с лАНН (n = 3) был снижен. В связи с чем, предположено, что у пациентов женского пола данный показатель может применяться в качестве диагностического критерия лАНН, и проведен сравнительный анализ уровня ДГЭА-С у участниц с мАНН, лАНН и условно здоровых. 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 женщин 18-40 лет (0%, 95% ДИ [0%; 11%]). При этом 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), так и от условно здоровых (7,930 [5,470; 9,810], мкмоль/л), Рисунок 17. На основании этих данных введен дополнительный диагностический критерий НН – уровень ДГЭА-С, который целесообразно оценивать только у молодых женщин (18-40 лет).

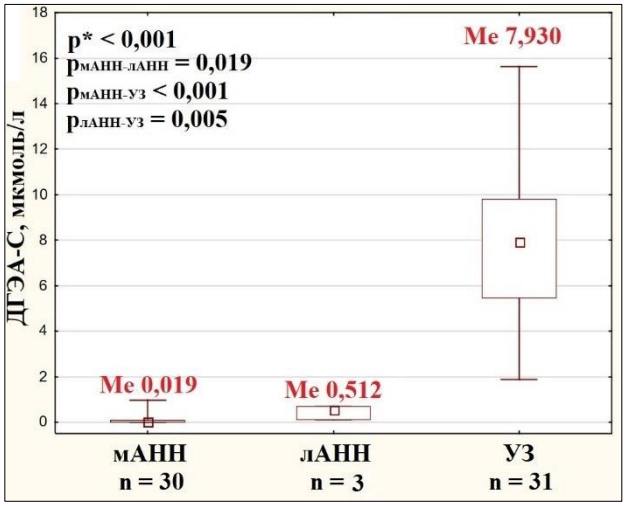


Рисунок 17 – Уровень дегидроэпиандростерон-сульфата у условно здоровых женщин и с разными стадиями (манифестной и латентной) аутоиммунной надпочечниковой недостаточности * критерий Краскела-Уоллиса. Для попарных сравнений: U-критерий Манна-Уитни. Пороговый p_0 = 0,017 (после применения поправки Бонферрони: 3 гипотезы).

Примечания: ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; УЗ – условно здоровые; Me – медиана.

Модифицированная классификация АНН приведена в Таблице П2.

Таким образом, на основании модифицированной классификации, у пациентов №$2_р$ и №$7_р$ диагностирована подстадия 1 лАНН, а у пациентов №$1_р$, №№$4_р$-$6_р$ – подстадия 2 лАНН.

Пациентам была назначена заместительная терапия препаратами минералокортикоидов, больным №$1_р$, №№$4_р$-$6_р$ также инициировано лечение глюкокортикоидами. Дозы препаратов представлены в Таблице 14 и не менялись в течение 6 месяцев.

Таблица 14 – Заместительная терапия аутоиммунной надпочечниковой недостаточности у пациентов с ранними стадиями заболевания в течение первых 6 (№$2_р$, №$3_р$, №$7_р$ и №$8_р$) и 12 (№$1_р$) месяцев после диагностики заболевания

№ пациента	**№$1_р$**	**№$2_р$**	**№$3_р$**	**№$4_р$**	**№$5_р$**	**№$6_р$**	**№$7_р$**	**№$8_р$**
Суточная доза гидрокортизона, мг	15	-	-	25	15	15	-	-
Суточная доза флудрокортизона, мкг	100	50	-	50	25	25	50	-

Через 6 месяцев пациентам с пАНН (№$3_р$ и №$8_р$), а также с подстадией 1 лАНН (№$2_р$ и №$7_р$) проведено повторное обследование для исключения прогрессии АНН и необходимости инициации заместительной терапии НН (больным №$3_р$ и №$8_р$) или дополнительного назначения глюкокортикоидов (больным №$2_р$ и №$7_р$). Кроме того, повторное обследование через 12 месяцев выполнено пациенту №$1_р$, которому после диагностики лАНН во время хирургического вмешательства по месту жительства проводилась общая анестезия без парентерального введения глюкокортикоидов. Учитывая отсутствие тяжелых последствий операции, заподозрено восстановление функции коры надпочечников, что потребовало проведения повторного обследования. На момент повторного обследования через 12 месяцев после диагностики лАНН пациент продолжал получать заместительную терапию в объеме, представленном в Таблице 14. Диагностические тесты пациентам №$3_р$ и №$8_р$ выполнены на фоне отсутствия заместительной терапии НН, пациентам №$2_р$ и №$7_р$ – через сутки после приема флудрокортизона, пациенту №$1_р$ – через 2 суток после отмены глюкокортикоидов и минералокортикоида. Согласно полученным результатам[29] (Таблица 15), у пациентов №$2_р$, №$3_р$, №$7_р$, №$8_р$ при динамическом наблюдении через 6 месяцев прогрессии заболевания не обнаружено, в то же время, у больного №$1_р$ через 12 месяцев диагностирована мАНН.

[29] При интерпретации результатов анализа крови на ренин необходимо учитывать, что на значение данного показателя оказывает влияние длительная терапия флудрокортизоном накануне забора крови.

Таблица 15 – Результаты повторного обследования пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности через 6 (№$2_р$, №$3_р$, №$7_р$ и №$8_р$) и 12 (№$1_р$) месяцев после диагностики заболевания

Характеристика	**Пациенты**				
	№$1_р$	**№$2_р$**	**№$3_р$**	**№$7_р$**	**№$8_р$**
Стадия (подстадия) АНН при первичном обследовании	лАНН (2)	лАНН (1)	пАНН	лАНН (1)	пАНН
АТ к Р450с21, Ед/мл (РИ < 0,4)	1,532	9,884	0,725	28,324	18,863
АКТГ, пг/мл (РИ 7,2-63,3)	1875	182	45	93	25
Базальный кортизол, нмоль/л (РИ 171-536)	1,9	460,4	545,3	455,6	535,7
Максимальный уровень кортизола в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией, нмоль/л (РИ ≥ 500)	2,5	511,2	-	632,7	-
Альдостерон, пмоль/л (РИ 69,8-1085,8)	78	45	254	81	523
Ренин, мЕд/л (РИ 2,8-39,9)	41	58	20	41	23
ДГЭА-С, мкмоль/л	0,1*	2,1**	3,0*	0,4*	3,2*
Стадия (подстадия) АНН при повторном обследовании	мАНН	лАНН (1)	пАНН	лАНН (1)	пАНН

* РИ 1,65-11

** РИ 1,2-13,4

Примечания: АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза; АКТГ – адренокортикотропный гормон; ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; РИ – референсный интервал; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; пАНН – потенциальная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность.

Корреляции между показателями функции коры надпочечников: АКТГ ($r = 0,286$, $p = 0,493$), пиковый кортизол в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией[30] ($r = -0,381$, $p = 0,352$), альдостерон ($r = -0,333$, $p = 0,420$), ренин ($r = -0,072$, $p = 0,866$), ДГЭА-С ($r = 0,048$, $p = 0,911$) – с уровнем АТ к Р450с21 на ранних стадиях заболевания не обнаружены (корреляция Спирмена; пороговый $p_0 = 0,010$ после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез).

3.1.4. Качество жизни пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности исходно и на фоне лечения/в динамике

[30] Или базальный кортизол, если проба не проводилась.

Показатели качества жизни пациентов с ранними стадиями АНН исходно и на фоне лечения/в динамике представлены в Таблице 16. 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, Рисунки 18; 19. В связи с небольшим числом пациентов с пАНН, статистический анализ по сравнению РН и МН исходно и в динамике не выполнялся. Однако, значительных изменений у каждого из пациентов не выявлено.

На основании полученных результатов разработан алгоритм диагностики и лечения ранних стадий АНН (Рисунок П1 приложения).

Таблица 16 – Качество жизни на фоне терапии/в динамике пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

№ пациента	**№1$_р$**	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№6$_р$**	**№7$_р$**	**№8$_р$**
Стадия (подстадия) АНН при первичном обследовании	лАНН (2)	лАНН (1)	пАНН	лАНН (2)	лАНН (2)	лАНН (2)	лАНН (1)	пАНН
РН исходно (15,4-62,3)	43,33	43,56	52,24	43,43	46,38	53,07	36,72	55,87
РН на фоне терапии/в динамике через 6 месяцев (15,4-62,3)	56,74	59,26	58,15	51,24	53,54	56,12	54,57	58,28
МН исходно (10,1-64,5)	45,93	21,57	50,18	25,91	36,74	50,40	41,23	46,25
МН на фоне терапии/в динамике через 6 месяцев (10,1-64,5)	56,47	56,89	46,52	33,91	39,10	55,48	54,98	52,06

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; пАНН – потенциальная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; РН – физический компонент качества жизни; МН – психологический компонент качества жизни.

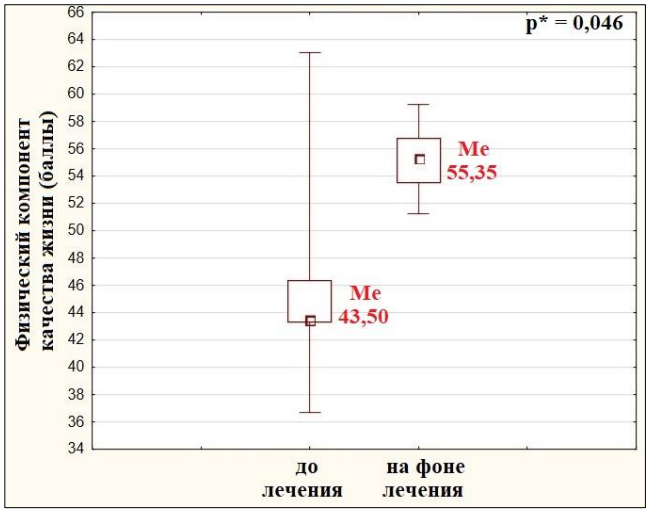


Рисунок 18 – Физический компонент качества жизни (баллы) при латентной аутоиммунной надпочечниковой недостаточности до и на фоне лечения (n = 6)

* парный критерий Вилкоксона. Пороговый p = 0,05.

Примечание: Me – медиана.

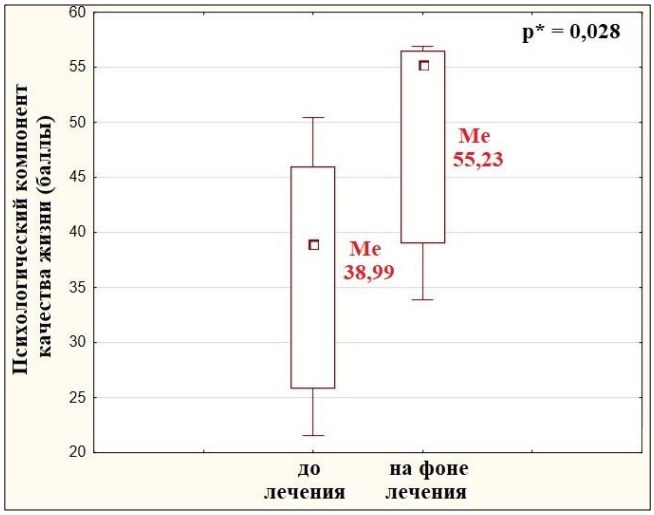


Рисунок 19 – Психологический компонент качества жизни (баллы) при латентной аутоиммунной надпочечниковой недостаточности до и на фоне лечения (n = 6)

* парный критерий Вилкоксона. Пороговый p = 0,05.

Примечание: Me – медиана.

3.2. Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности

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

3.2.1.1. Клиническая характеристика обследованных лиц

Характеристика групп 1-3 приведена в Таблице 17.

В группе 1а выделена группа с изолированной АНН (n = 15) в возрасте 44 [31; 49] лет. Индекс массы тела (ИМТ) у этих пациентов составил 23,00 [20,10; 24,45] кг/м^2, число женщин – 12.

У пациентов с наследственными вариантами 1-НН, включенных в группу 2, диагноз был доказан данными генетического исследования: мутации генов *ABCD1* (n = 2), *NR0B1* (n = 1), *AAAS* (n = 1) при адренолейкодистрофии, Х-сцепленной врожденной гипоплазии коры надпочечников, синдроме Олгрова, соответственно. У n = 1 пациента с адренолейкодистрофией и n = 1 пациента с Х-сцепленной врожденной гипоплазией коры надпочечников диагноз выставлен на основании типичной клинической картины, результатов лабораторного тестирования и отягощенного семейного анамнеза, однако генетическое тестирование не проводилось. У остальных больных (n = 17) в анамнезе была выявлена двусторонняя феохромоцитома: у 47% (n = 8) – в рамках синдрома множественной эндокринной неоплазии (МЭН) 2А, у 18% (n = 3) – в рамках синдрома МЭН 2В, у 29% (n = 5) – в рамках болезни фон Гиппеля-Линдау (во всех случаях диагноз был генетически верифицирован: мутация *RET* при МЭН 2А и МЭН 2В и мутация *VHL* при болезни фон Гиппеля-Линдау) и в 6% случаев (n = 1) наследственная причина заболевания не идентифицирована. Сопутствующие эндокринные заболевания неаутоиммунного генеза в группе 2: первичный послеоперационный гипотиреоз в исходе тиреоидэктомии по поводу медуллярного рака в 48% случаев (n = 11), послеоперационный гипопаратиреоз в 26% случаев (n = 6), первичный гиперпаратиреоз в 7% случаев (n = 2), параганглиомы/рецидив феохромоцитомы в 30% случаев (n = 7), нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы/кишечника в 7% случаев (n = 2), рецидив медуллярного рака ЩЖ в 17% случаев (n = 4), СД2 в 4% случаев (n = 1), аденома гипофиза в 4% случаев (n = 1), ГГ в 7% случаев (n = 2), узловой коллоидный эутиреоидный зоб в 4% случаев (n = 1).

Клиническая характеристика пациентов с пАНН и лАНН представлена в Таблице 13 раздела 3.1.3. В настоящее исследование включены пациенты №№$1_р$-$5_р$ и №$7_р$. Пациенту №$1_р$ обследование проводилось трехкратно с интервалами по 6 месяцев, пациентам №$2_р$ и №$4_р$ – двукратно с интервалом по 6 месяцев. На момент первичного обследования все пациенты заместительную терапию не получали, при повторных исследованиях через 6 месяцев – получали лечение, в соответствии с Таблицей 14 раздела 3.1.4.

Таблица 17 – Клиническая характеристика участников исследования

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 2**	**Группа 3**	**p****
	n = 94	**n = 77**	**n = 17**	**n = 23**	**n = 44**	
Возраст, лет*	38 [29; 49]	42 [32; 50]	30 [24; 37]	37 [29; 38]	28 [25; 29]	**< *0,001*** (p_{1a-3} **< *0,001***)
Распределение по возрасту Молодой (18-44 лет), n (%) Средний и пожилой (≥ 45 лет), n (%)	 56 (60) 38 (40)	 42 (55) 35 (45)	 14 (82) 3 (18)	 21 (91) 2 (9)	 41 (93) 3 (7)	**< *0,001*** (p_{1a-3} **< *0,001***)
Пол (Ж), n (%)	76 (81)	64 (83)	12 (71)	10 (43)	37 (84)	***0,001*** ($p_{1a-2} = p_{2-3}$ **< *0,001***)
Индекс массы тела, кг/м^2*	23,75 [20,40; 27,80]	23,90 [20,70; 27,90]	22,65 [19,05; 25,65]	24,20 [19,60; 30,10]	20,20 [19,50; 23,00]	0,005
Длительность приема глюкокортикоидов, лет*	4,4 [0,7; 11,0]	3,5 [0,6; 9,0]	9,5 [2,2; 21,0]	6,0 [3,3; 10,0]	неприменимо	0,030
Доза глюкокортикоидов, мг[31,32]*	25,0 [20,0; 30,0]	25,0 [20,0; 30,0]	27,5 [20,0; 30,0]	27,5 [20,0; 32,5]	неприменимо	0,897
Доза минералокортикоидов, мкг *	100,0 [50,0; 100,0]	100,0 [50,0; 100,0]	62,5 [25,0; 100,0]	100,0 [50,0; 100,0]	неприменимо	0,285

[31] Приведены дозы, эквивалентные дозе гидрокортизона.

[32] При анализе дозы глюкокортикоидов была исключена пациентка группы 2 с МЭН 2В с прогрессированием медуллярного рака ЩЖ, получавшая глюкокортикоиды в дозе, эквивалентной 60 мг гидрокортизона, без клинических признаков ятрогенного гиперкортицизма. Такая высокая доза была обусловлена тяжелой сопутствующей патологией. Также, была исключена пациентка с АПС-1, получавшая глюкокортикоиды в дозе, эквивалентной 40 мг гидрокортизона, без клинических признаков ятрогенного гиперкортицизма. Такая высокая доза была обусловлена наличием синдрома мальабсорбции.

Продолжение Таблицы 17

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 2**	**Группа 3**	**p****
	n = 94	**n = 77**	**n = 17**	**n = 23**	**n = 44**	
Сопутствующие манифестные эндокринные аутоиммунные заболевания – n (%)	АИТ – 46 (49)	АИТ – 44 (57)	Гипопаратиреоз – 15 (88)	0	0	-
	ГГ – 18 (19)	СД1/LADA – 10 (13)	ГГ – 11 (65)			
	Гипопаратиреоз – 15 (16)	Болезнь Грейвса – 7 (9)	АИТ – 2 (12)			
	СД1/LADA – 12 (13)	ГГ – 7 (9)	СД1/LADA – 2 (12)			
	Болезнь Грейвса – 7 (7)	ЭОП – 1 (1)				
	ЭОП – 1 (1)					
Число сопутствующих эндокринных аутоиммунных заболеваний	1 [1; 2]	1 [0; 1]	2 [1; 2]	0	0	***< 0,001*** ($p_{1a-1b} = p_{1a-2} = p_{1a-3} = p_{1b-2} = p_{1b-3}$ ***< 0,001***)
Сопутствующие неэндокринные аутоиммунные заболевания – n (%)	Аутоиммунный гастрит – 14 (15)	Аутоиммунный гастрит – 5 (7)	Аутоиммунный гастрит – 9 (53)	0	0	-
	Витилиго – 8 (9)	Витилиго – 4 (5)	Алопеция – 6 (35)			
	Алопеция – 7 (7)	Бронхиальная астма – 2 (3)	Витилиго – 4 (24)			
	Дистрофия роговицы – 3 (3)	Аутоиммунный гепатит – 2 (3)	Дистрофия роговицы – 3 (18)			

Продолжение Таблицы 17

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 2**	**Группа 3**	**p****
	n = 94	**n = 77**	**n = 17**	**n = 23**	**n = 44**	
Сопутствующие неэндокринные аутоиммунные заболевания – n (%)	Гипоплазия зубной эмали – 3 (3)	Атопический дерматит – 1 (1)	Синдром мальабсорбции – 3 (18)			
	Синдром мальабсорбции – 3 (3)	Идиопатический дерматомиозит – 1 (1)	Гипоплазия зубной эмали – 3 (18)			
	Аутоиммунный гепатит – 3 (3)	Алопеция – 1 (1)	Аутоиммунный гепатит – 1 (6)			
	Бронхиальная астма – 3 (3)		Бронхиальная астма – 1 (6)			
	Идиопатический дерматомиозит – 1 (1)		Пигментный ретинит – 1 (6)			
	Пигментный ретинит – 1 (1)					
	Атопический дерматит – 1 (1)					
Число сопутствующих неэндокринных аутоиммунных заболеваний *	0 [0; 1]	0 [0; 1]	2 [1; 3]	0	0	***< 0,001*** ($p_{1a\text{-}1b} = p_{1b\text{-}2} = p_{1b\text{-}3}$ ***< 0,001***)

Продолжение Таблицы 17

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 2**	**Группа 3**	**p****
	n = 94	**n = 77**	**n = 17**	**n = 23**	**n = 44**	
Общее число сопутствующих аутоиммунных заболеваний (эндокринных и неэндокринных) *	1 [1; 2]	1 [1; 2]	4 [2; 5]	0	0	**< *0,001*** ($p_{1a-1b} = p_{1a-2} = p_{1a-3} = p_{1b-2} = = p_{1b-3} <$ ***0,001***)
Общее число аутоиммунных заболеваний*	2 [2; 3]	2 [2; 3]	5 [3; 6]	0	0	**< *0,001*** ($p_{1a-1b} = p_{1a-2} = p_{1a-3} = p_{1b-2} = = p_{1b-3} <$ ***0,001***)
Носительство антител-маркеров аутоиммунных форм нарушений углеводного обмена/к ткани щитовидной железы, n, %	ТПО – 60 (64)	ТПО – 53 (69)	ТПО – 7 (41)	0	0	-
	ТГ – 19 (20)	ТГ – 16 (21)	ТГ – 3 (18)			
	GAD – 9 (10)	GAD – 3 (4)	GAD – 6 (35)			
	ICA – 12 (13)	ICA – 6 (8)	ICA – 6 (35)			
	IAA – 5 (5)	IAA – 4 (5)	IAA – 1 (6)			
	ZnT8 – 16 (17)	ZnT8 – 12 (16)	ZnT8 – 4 (24)			
	IA2 – 14 (15)	IA2 – 11 (14)	IA2 – 3 (18)			

Продолжение Таблицы 17

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 2**	**Группа 3**	**p****
	n = 94	**n = 77**	**n = 17**	**n = 23**	**n = 44**	
Носительство антител-маркеров аутоиммунных форм нарушений углеводного обмена/к ткани щитовидной железы без манифестного заболевания, n, %	**Без АИТ/БГ: n = 41**	**Без АИТ/БГ: n = 26**	**Без АИТ/БГ: n = 15**	0	0	-
	ТПО – 19 (46)	ТПО – 14 (54)	ТПО – 5 (33)			
	ТГ – 5 (12)	ТГ – 3 (12)	ТГ – 2 (13)			
	Без СД1/LADA: n = 82	**Без СД1/LADA: n = 67**	**Без СД1/LADA: n = 15**			
	GAD – 6 (7)	GAD – 1 (2)	GAD – 5 (33)			
	ICA – 7 (9)	ICA – 2 (3)	ICA – 5 (33)			
	IAA – 4 (4)	IAA – 3 (5)	IAA – 1 (7)			
	ZnT8 – 10 (12)	ZnT8 – 7 (10)	ZnT8 – 3 (20)			
	IA2 – 8 (9)	IA2 – 7 (10)	IA2 – 1 (7)			
Антитела к 21-гидроксилазе, Ед/мл (РИ < 0,4)*	22,99 [3,81; 53,12]	33,12 [12,41; 58,02]	1,58 [0,29; 3,69]	0,02 [0,01; 0,10]	0,03 [0,01; 0,14]	***< 0,001*** (p_{1a-1b} ***< 0,001***)
Адренокортикотропный гормон, пг/мл (РИ 7,2-63,3)*	-	-	-	-	20,32 [16,42; 25,67]	-
Базальный кортизол, нмоль/л (РИ 171-536)*	-	-	-	-	430,3 [375,9; 546,0]	-
Альдостерон, пмоль/л (РИ 69,8-1085,8)*	-	-	-	-	404 [266; 593]	-

Продолжение Таблицы 17

Показатель	**Группа 1**	**Группа 1a**	**Группа 1b**	**Группа 2**	**Группа 3**	**p****
	n = 94	**n = 77**	**n = 17**	**n = 23**	**n = 44**	
Ренин, мЕд/л (РИ 2,8-39,9)*	83,91 [19,59; 204,60]	81,83 [20,98; 177,10]	97,25 [14,77; 311,30]	70,56 [29,22; 140,90]	28,44 [17,45; 40,81]	< ***0,001*** ($p_{1a-3} = p_{2-3}$ < ***0,001***)
Дегидроэпиандростерон-сульфат, мкмоль/л (РИ: 1,65-11 (Ж 18-39 лет), 0,26-6,68 (Ж ≥ 40 лет), 1,2-13,4 (М 18-54 лет), 0,44-6,76 (М ≥ 55 лет))*	0,024 [0,003; 0,158]	0,043 [0,003; 0,145]	0,003 [0,003; 0,839]	0,167 [0,087; 0,686]	7,620 [4,700; 9,630]	< ***0,001*** ($p_{1a-3} = p_{1b-3} = p_{2-3}$ < ***0,001***)

* Me [Q1; Q3]

** Сравнение групп 1a, 1b, 2 и 3; в скобках приведены значимые различия, выявленные при анализе post hoc. Для количественных признаков: критерий Краскела-Уоллиса, для качественных признаков – тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 = 0,004 (после применения поправки Бонферрони: 14 гипотез). Для попарных сравнений количественных признаков: U-критерий Манна-Уитни. Пороговый p_0 = 0,001 (после применения поправки Бонферрони: 6 сравнений). Полужирным и курсивным шрифтами выделены статистически значимые различия.

Примечания: Ж – женский пол; М – мужской пол; АИЗ – аутоиммунное заболевание; ЭОП – эндокринная офтальмопатия; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; БГ – болезнь Грейвса; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IAA – антитела к инсулину; IA2 – тирозинфосфатаза; ZnT8 – транспортер цинка 8; РИ – референсный интервал.

3.2.1.2. Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro*

Общее содержание В-лимфоцитов *in vivo* в каждой из групп значимо не отличалось от показателя условно здоровых (9,2% [6,8%; 12,7%]): 1a – 10,6% [7,2%; 16,4%], p = 0,151; 1b – 5,6% [3,9%; 12,4%], p = 0,198; 2 – 10,3% [7,9%; 15,5%], p = 0,275 (U-критерий Манна-Уитни, пороговый p_0 = 0,017 после применения поправки Бонферрони: 3 сравнения).

В отношении содержания Breg *in vivo* (Рисунок 20) выявлено снижение данного показателя при изолированной АНН и АНН в составе АПС-2 (2,5% [1,1%; 5,3%]) по сравнению с условно здоровыми (3,3% [2,0%; 5,5%]), p = 0,034 (с учётом поправки на множественность сравнений, пороговый p_0 = 0,017; различие выявлено на уровне статистической тенденции). У пациентов с АПС-1 обнаружено незначимое (p = 0,369) повышение содержания Breg *in vivo* (6,4% [0,3%; 14,2%]). Содержание Breg *in vivo* при 1-НН неаутоиммунного генеза (3,1% [0,6%; 6,4%]) статистически не отличалось от показателей условно здоровых, p = 0,304. Также не выявлено отличий при сравнении пациентов с 1-НН аутоиммунного (группа 1; 2,7% [1,0%; 6,7%]) и неаутоиммунного (группа 2; 3,1% [0,6%; 6,4%]) генеза, p = 0,929 (U-критерий Манна-Уитни).

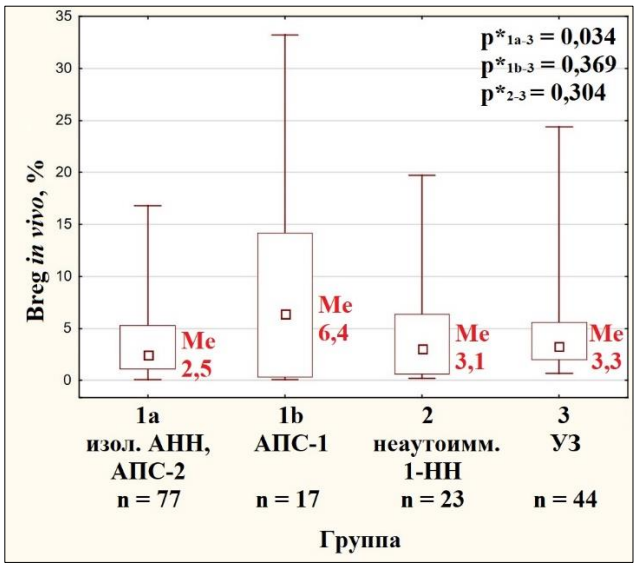


Рисунок 20 – Доля регуляторных В-лимфоцитов от всех В-лимфоцитов *in vivo* у участников групп 1a, 1b, 2 и 3

* Сравнение групп 1a и 3, групп 1b и 3, групп 2 и 3. U-критерий Манна-Уитни. Пороговый p_0 = 0,017 (после применения поправки Бонферрони: 3 сравнения).

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; изол. АНН – изолированная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; неаутоимм. – неаутоиммунная;1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; УЗ – условно здоровые.

При сравнении содержания Breg *in vivo* у пациентов молодого возраста различий между группами не выявлено (1a: 2,4% [1,3%; 5,4%]; 1b: 6,1% [0,3%; 8,7%]; 2: 3,1% [0,6%; 6,4%]; 3: 3,3% [1,9%; 5,6%]), p = 0,354 (критерий Краскела-Уоллиса; пороговый p_0 = 0,008 после применения поправки Бонферрони: 6 сравнений). Также не выявлено отличий при сравнении пациентов молодого возраста с 1-НН аутоиммунного и неаутоиммунного генеза (группа 1: 2,9% [1,0%; 6,8%]; группа 2: 3,1% [0,6%; 6,4%]), p = 0,263 (U-критерий Манна-Уитни; пороговый p = 0,05). При сравнении содержания Breg *in vivo* у пациентов с изолированной АНН (n = 15; 2,8% [1,4%; 4,0%]) как с условно здоровыми (3,3% [2,0%; 5,5%]), так и с 1-НН неаутоиммунного генеза (3,1% [0,6%; 6,4%]) значимых отличий не выявлено: p = 0,541 и p = 0,152, соответственно (U-критерий Манна-Уитни, пороговый p_0 = 0,025 после применения поправки Бонферрони: 2 сравнения).

Уровень индукции Breg *in vitro* в группе условно здоровых составил: без добавления специфических активаторов: 0,9% [0,4%; 2,9%]; с добавлением активаторов: 2,3% [0,7%; 5,7%]; абсолютный прирост: 0,3% [-0,1%; 2,5%]; кратность: 1,5 [1,0; 3,6]. Значимые различия для всех групп пациентов по уровню индукции Breg *in vitro* (как без, так и с добавлением специфических активаторов) при сравнении с условно здоровыми отсутствовали, в т.ч. при анализе пациентов молодого возраста (Таблица 18). Также не выявлено отличий при сравнении уровня индукции Breg *in vitro* у пациентов с 1-НН аутоиммунного и неаутоиммунного генеза, в т.ч. молодого возраста (Таблица 19).

При сравнении содержания Breg *in vitro* с добавлением специфических активаторов и без них у пациентов с изолированной АНН как с условно здоровыми, так и с 1-НН неаутоиммунного генеза значимых отличий не выявлено, в т.ч. при оценке абсолютного прироста и кратности (Таблица 20).

Таблица 18 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vitro* у участников групп 1a, 1b, 2 и 3

Группа	**1a**	**1b**	**2**	**3**	**p****
	n = 77	**n = 17**	**n = 23**	**n = 44**	
Breg *in vitro* без активаторов, %	1,2 [0,3; 2,6]	2,1 [0,4; 3,5]	0,5 [0,2; 1,7]	0,9 [0,4; 2,9]	p_{1a-3} = 0,742 p_{1b-3} = 0,578 p_{2-3} = 0,106
Breg *in vitro* с активаторами, %	1,7 [0,6; 5,3]	5,6 [0,8; 8,3%]	0,9 [0,5; 3,8]	2,3 [0,7; 5,7]	p_{1a-3} = 0,676 p_{1b-3} = 0,299 p_{2-3} = 0,236
Абсолютный прирост, %	0,5 [0,0; 2,4]	2,1 [0,2; 5,2]	0,2 [0,0; 0,7]	0,3 [-0,1; 2,5]	p_{1a-3} = 0,666 p_{1b-3} = 0,126 p_{2-3} = 0,582
Кратность прироста	1,7 [1,0; 3,5]	1,9 [1,2; 3,8]	1,2 [0,9; 4,8]	1,5 [1,0; 3,6]	p_{1a-3} = 0,441 p_{1b-3} = 0,442 p_{2-3} = 0,954

Продолжение Таблицы 18

Группа (участники молодого возраста)	**1a**	**1b**	**2**	**3**	**p****
	n = 42	**n = 14**	**n = 21**	**n = 41**	
Breg *in vitro* без активаторов, %	1,2 [0,3; 3,0]	2,3 [0,6; 3,5]	0,5 [0,2; 1,9]	1,1 [0,5; 3,1]	p_{1a-3} = 0,751 p_{1b-3} = 0,579 p_{2-3} = 0,153
Breg *in vitro* с активаторами, %	1,8 [0,9; 5,3]	5,7 [1,0; 6,8]	1,0 [0,5; 4,8]	2,5 [0,8; 5,7]	p_{1a-3} = 0,759 p_{1b-3} = 0,330 p_{2-3} = 0,288
Абсолютный прирост, %	0,9 [0,0; 3,1]	2,3 [0,2; 4,9]	0,2 [-0,1; 0,7]	0,4 [-0,1; 3,5]	p_{1a-3} = 0,492 p_{1b-3} = 0,244 p_{2-3} = 0,536
Кратность прироста	2,0 [1,0; 4,1]	1,9 [1,2; 2,8]	1,2 [0,9; 4,8]	1,5 [1,0; 3,4]	p_{1a-3} = 0,364 p_{1b-3} = 0,743 p_{2-3} = 0,783

*Me [Q1; Q3]

** сравнение групп 1a и 3; групп 1b и 3; групп 2 и 3. U-критерий Манна-Уитни. Пороговый p_0 = 0,002 (после применения поправки Бонферрони: 24 сравнения).

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал.

Таблица 19 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vitro* у участников групп 1 и 3

Группа	**1**	**3**	**p****
	n = 94	**n = 44**	
Breg *in vitro* без активаторов, %	1,2 [0,3; 3,0]	0,9 [0,4; 2,9]	0,902
Breg *in vitro* с активаторами, %	1,8 [0,6; 5,7]	2,3 [0,7; 5,7]	0,945
Абсолютный прирост, %	0,8 [0,0; 2,8]	0,3 [-0,1; 2,5]	0,428
Кратность прироста	1,8 [1,0; 3,6]	1,5 [1,0; 3,6]	0,382
Группа (участники молодого возраста)	**1**	**3**	**p****
	n = 56	**n = 41**	
Breg *in vitro* без активаторов, %	1,3 [0,3; 3,1]	1,1 [0,5; 3,1]	0,963
Breg *in vitro* с активаторами, %	2,5 [0,9; 6,8]	2,5 [0,8; 5,7]	0,918
Абсолютный прирост, %	1,2 [0,1; 3,5]	0,4 [-0,1; 3,5]	0,324
Кратность прироста	1,8 [1,0; 3,7]	1,5 [1,0; 3,4]	0,394

*Me [Q1; Q3]

** U-критерий Манна-Уитни. Пороговый p_0 = 0,006 (после применения поправки Бонферрони: 8 гипотез).

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал.

Таблица 20 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vitro* в группах 1а (с изолированной аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью), 2 и 3

Группа	**1а (изолированная АНН)**	**2**	**3**	**p****
	n = 15	**n = 23**	**n = 44**	
Breg *in vitro* без активаторов, %	1,2 [0,2; 1,4]	0,5 [0,2; 1,7]	0,9 [0,4; 2,9]	p_{1a-3} = 0,267 p_{1a-2} = 0,688
Breg *in vitro* с активаторами, %	1,6 [0,5; 4,1]	0,9 [0,5; 3,8]	2,3 [0,7; 5,7]	p_{1a-3} = 0,537 p_{1a-2} = 0,700
Абсолютный прирост, %	1,0 [0,2; 1,6]	0,2 [0,0; 0,7]	0,3 [-0,1; 2,5]	p_{1a-3} = 0,616 p_{1a-2} = 0,235
Кратность прироста	1,8 [1,4; 3,2]	1,2 [0,9; 4,8]	1,5 [1,0; 3,6]	p_{1a-3} = 0,323 p_{1a-2} = 0,325

*Me [Q1; Q3]

** сравнение групп 1а (с изолированной АНН) и 3; групп 1а (с изолированной АНН) и 2. U-критерий Манна-Уитни. Пороговый p_0 = 0,006 (после применения поправки Бонферрони: 8 сравнений).

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал.

Далее проведена оценка связи содержания регуляторных В-лимфоцитов с другими показателями. Значимых корреляций содержания Breg с возрастом и ИМТ не обнаружено, однако выявлены ассоциации на уровне статистической тенденции (Таблицы 21; 22). С учётом этих результатов, а также, принимая во внимание, что различия на уровне статистической тенденции в содержании Breg *in vivo* по сравнению со здоровыми выявлены исключительно в группе 1а, мы провели дополнительный сравнительный анализ пациентов данной группы мужского и женского пола по возрасту и ИМТ. Обнаружено, что мужчины и женщины группы 1а не отличались как по возрасту (33 [26; 56] лет и 42 [33; 49] лет, p = 0,936), так и по ИМТ (24,9 [22,9; 26,6] кг/м^2 и 23,7 [20,4; 28,0] кг/м^2, p = 0,331; U-критерий Манна-Уитни, пороговый p_0 = 0,025 после применения поправки Бонферрони: 2 сравнения).

Результаты сравнительного анализа содержания Breg у лиц женского и мужского пола во всех группах приведены в Таблице 23. При оценке содержания Breg (как *in vivo*, так и *in vitro* до и после стимуляции) и длительности НН / уровня АТ к P450c21 в группах 1а и 1b значимых корреляций не обнаружено (Таблица 24). Оценка корреляции содержания Breg с ДГЭА-С во всех группах представлена в Таблице 25. Оценка корреляции содержания Breg с прочими

гормональными показателями (АКТГ, кортизол, альдостерон, ренин) в группе 3 представлена в Таблице 26.

С целью уточнения ассоциации выраженности нарушения ИТ и степени снижения Breg, проведена оценка содержания данных клеток у пациентов группы 1а с разным числом сопутствующих АИЗ: значимых отличий не обнаружено (Таблица 27). Согласно полученным результатам, при увеличении числа АИЗ от 1 до 3 отмечено снижение Breg *in vivo* (Рисунок 21), а также уменьшение абсолютного прироста и кратности прироста *in vitro*. Однако, у пациентов с 4 АИЗ выявлено высокое содержание Breg как *in vivo*, так и *in vitro*. При этом медиана содержания Breg *in vivo* в данной группе превышала не только медиану группы 1а, но и медиану группы 3. Так как все пациенты с 4 АИЗ имели, по крайней мере, одно неэндокринное АИЗ, мы предположили, что данный фактор может оказывать влияние на уровень Breg. Однако, при сравнении содержания Breg *in vivo* у пациентов с АНН и 1 сопутствующим эАИЗ (n = 35; 2,3% [1,3%; 5,6%]) и у пациентов с АНН и 1 сопутствующим неэндокринным АИЗ (n = 5; 2,9% [1,6%; 6,7%]) значимых отличий не выявлено, p = 0,734 (U-критерий Манна-Уитни, пороговый p = 0,05).

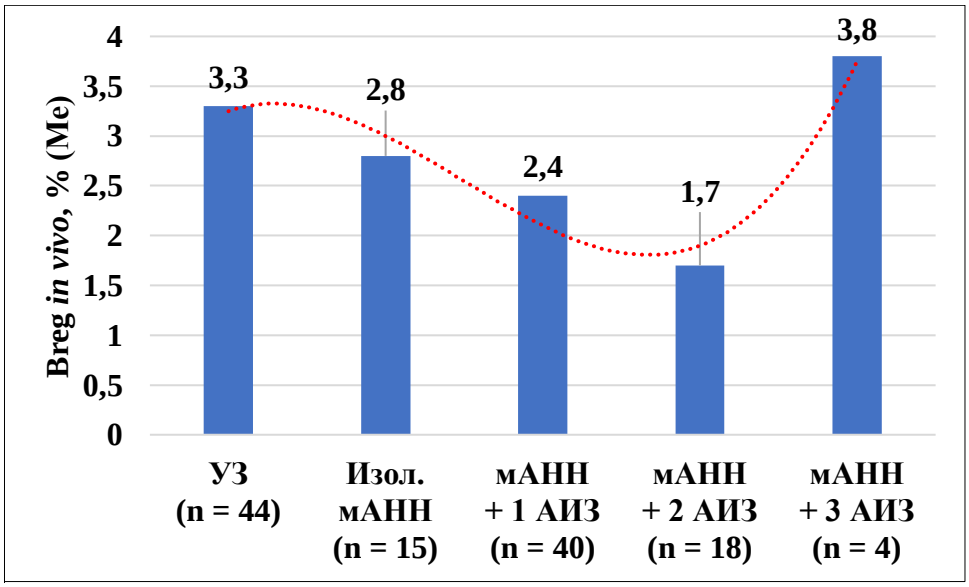


Рисунок 21 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* у участников группы 3 и пациентов группы 1а с разным числом аутоиммунных заболеваний

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; УЗ – условно здоровые; изол. – изолированная; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АИЗ – аутоиммунное заболевание.

При анализе содержания Breg с учетом числа АИЗ исключительно эндокринных органов (Таблица 28) мы также не обнаружили значимых отличий между группами. Однако, при

увеличении числа эАИЗ от 1 до 3 отмечено снижение Breg *in vivo* (Рисунок 22), а также уменьшение абсолютного прироста и кратности прироста *in vitro*.

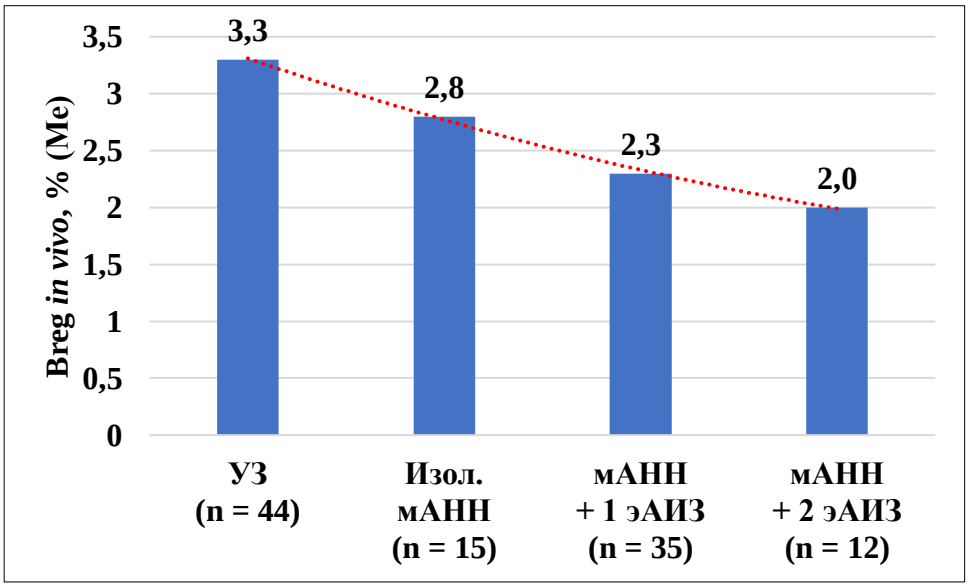


Рисунок 22 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* у участников группы 3 и пациентов группы 1а с разным числом эндокринных аутоиммунных заболеваний

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; УЗ – условно здоровые; изол. – изолированная; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; эАИЗ – эндокринное аутоиммунное заболевание.

Таблица 21 – Корреляция содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* с возрастом у участников групп 1a, 1b, 2 и 3

Группа		**1a**			**1b**			**2**			**3**		
		Общ.	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**
		n = 77	**n = 13**	**n = 64**	**n = 17**	**n = 5**	**n = 12**	**n = 23**	**n = 13**	**n = 10**	**n = 44**	**n = 7**	**n = 37**
Breg *in vivo*, %	r*	0,000	-0,465	0,145	-0,089	-0,205	-0,132	0,196	0,164	-0,607	0,229	0,213	0,190
	p	0,997	0,110	0,262	0,744	0,741	0,670	0,370	0,593	0,063	0,154	0,686	0,283
Breg *in vitro* без активаторов, %	r*	0,048	-0,562	0,187	0,053	-0,200	0,087	-0,121	0,057	-0,206	-0,109	-0,577	-0,080
	p	0,689	0,057	0,149	0,845	0,747	0,798	0,590	0,860	0,567	0,507	0,231	0,660
Breg *in vitro* с активаторами, %	r*	-0,031	***-0,686***	0,142	0,135	-0,300	0,272	-0,083	-0,039	0,022	-0,094	-0,698	-0,061
	p	0,791	***0,014***	0,272	0,619	0,624	0,419	0,720	0,908	0,952	0,569	0,123	0,734
Абсолютный прирост, %	r*	-0,110	-0,476	-0,017	-0,010	-0,300	0,299	0,303	0,494	0,134	-0,223	-0,698	-0,163
	p	0,353	0,118	0,899	0,970	0,624	0,372	0,182	0,122	0,713	0,173	0,123	0,365
Кратность прироста	r*	-0,115	-0,250	-0,091	0,238	0,200	0,368	0,451	0,476	0,439	-0,007	-0,030	-0,015
	p	0,354	0,516	0,496	0,375	0,747	0,266	0,053	0,139	0,276	0,964	0,954	0,933

* Корреляция Спирмена. Пороговый $p_0 = 0,010$ (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез в каждой группе для всех участников, мужчин и женщин). Полужирным и курсивным шрифтами выделена корреляция на уровне статистической тенденции.

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; общ. – все участники, входящие в группу; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Таблица 22 – Корреляция содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* с индексом массы тела у участников групп 1a, 1b, 2 и 3

Группа		**1a**			**1b**			**2**			**3**		
		Общ.	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**
		n = 77	**n = 13**	**n = 64**	**n = 17**	**n = 5**	**n = 12**	**n = 23**	**n = 13**	**n = 10**	**n = 44**	**n = 7**	**n = 37**
Breg *in vivo*, %	r*	-0,124	-0,385	-0,088	-0,391	-0,237	***-0,645***	-0,162	-0,088	-0,200	0,153	-0,086	0,164
	p	0,289	0,194	0,494	0,134	0,701	***0,032***	0,460	0,775	0,580	0,345	0,872	0,353
Breg *in vitro* без активаторов, %	r*	-0,110	-0,402	-0,051	-0,242	0,051	-0,209	-0,030	-0,004	0,062	-0,245	-0,600	***-0,347***
	p	0,356	0,195	0,695	0,366	0,935	0,537	0,894	0,991	0,866	0,132	0,208	***0,048***
Breg *in vitro* с активаторами, %	r*	-0,014	-0,416	0,045	-0,081	0,154	-0,337	0,086	0,201	0,061	-0,255	-0,771	***-0,353***
	p	0,906	0,179	0,726	0,765	0,805	0,311	0,711	0,554	0,868	0,118	0,072	***0,044***
Абсолютный прирост, %	r*	0,056	-0,232	0,105	0,219	0,103	0,045	0,377	0,486	0,352	-0,225	-0,143	-0,264
	p	0,638	0,467	0,421	0,414	0,870	0,894	0,092	0,129	0,319	0,169	0,787	0,137
Кратность прироста	r*	0,072	0,167	0,066	0,231	0,206	0,000	0,423	0,436	0,524	-0,085	0,143	-0,155
	p	0,563	0,668	0,623	0,389	0,741	1,000	0,071	0,180	0,183	0,608	0,787	0,390

* Корреляция Спирмена. Пороговый $p_0 = 0,010$ (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез в каждой группе для всех участников, мужчин и женщин). Полужирным и курсивным шрифтами выделены корреляции на уровне статистической тенденции.

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; общ. – все участники, входящие в группу; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Таблица 23 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* у участников мужского и женского пола групп 1a, 1b, 2 и 3

Показатель*	**Группа 1a**			**Группа 1b**			**Группа 2**			**Группа 3**		
	М	**Ж**	**p****	**М**	**Ж**	**p****	**М**	**Ж**	**p****	**М**	**Ж**	**p****
	n = 13	**n = 64**		**n = 5**	**n = 12**		**n = 13**	**n = 10**		**n = 7**	**n = 37**	
Breg *in vivo*, %	3,0 [2,0; 6,7]	2,4 [1,1; 4,6]	0,374	3,3 [0,3; 7,8]	6,7 [0,3; 15,6]	0,733	1,6 [0,5; 3,3]	6,0 [3,1; 7,6]	***0,028***	3,5 [2,6; 5,6]	3,3 [1,7; 5,5]	0,733
Breg *in vitro* без активаторов, %	0,9 [0,1; 1,4]	1,2 [0,3; 3,0]	0,067	0,4 [0,3; 3,1]	2,3 [0,6; 3,6]	0,533	0,7 [0,3; 1,9]	0,3 [0,1; 1,1]	0,260	2,5 [0,8; 3,8]	0,8 [0,4; 2,8]	0,242
Breg *in vitro* с активаторами, %	1,5 [0,2; 4,7]	1,7 [0,7; 5,3]	0,446	1,4 [0,5; 5,4]	6,8 [1,0; 10,0]	0,174	2,1 [0,7; 3,8]	0,8 [0,2; 4,8]	0,503	2,7 [1,7; 8,9]	1,6 [0,6; 3,9]	0,243
Абсолютный прирост, %	0,5 [0,0; 3,3]	0,4 [0,0; 1,7]	0,899	0,2 [0,1; 1,1]	3,5 [0,4; 6,3]	0,089	0,4 [-0,3; 3,0]	0,2 [0,0; 0,7]	0,915	0,9 [-0,3; 1,2]	0,3 [-0,1; 2,5]	0,830
Кратность прироста	2,9 [1,5; 10,5]	1,6 [1,0; 3,2]	0,174	1,8 [1,3; 2,0]	2,5 [1,2; 4,0]	0,650	1,2 [0,5; 4,8]	1,4 [1,0; 5,2]	0,591	1,9 [1,0; 2,3]	1,5 [1,0; 3,6]	0,800

*Me [Q1; Q3]

** Сравнение показателей у участников мужского и женского пола в соответствующих группах. U-критерий Манна-Уитни. Пороговый $p_0 = 0,010$ (после применения поправки Бонферрони: 5 сравнений в каждой группе). Полужирным и курсивным шрифтами выделено различие на уровне статистической тенденции.

Примечания: Me - медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал; Breg – регуляторные В-лимфоциты; общ. – все участники, входящие в группу; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Таблица 24 – Корреляция содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* с уровнем антител к 21-гидроксилазе и длительностью аутоиммунной надпочечниковой недостаточности у участников групп 1a и 1b

Группа		**Антитела к 21-гидроксилазе**						**Длительность аутоиммунной надпочечниковой недостаточности**					
		1a			**1b**			**1a**			**1b**		
		Общ.	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**
		n = 77	**n = 13**	**n = 64**	**n = 17**	**n = 5**	**n = 12**	**n = 77**	**n = 13**	**n = 64**	**n = 17**	**n = 5**	**n = 12**
Breg *in vivo*, %	r*	0,136	0,071	0,144	-0,143	-0,103	-0,091	-0,034	-0,320	0,055	0,280	0,564	0,183
	p	0,277	0,817	0,305	0,610	0,870	0,803	0,772	0,286	0,674	0,293	0,322	0,591
Breg *in vitro* без активаторов, %	r*	0,110	0,296	0,034	-0,254	-0,800	-0,006	-0,088	-0,426	0,007	0,144	0,300	0,142
	p	0,377	0,350	0,807	0,361	0,104	0,987	0,454	0,168	0,960	0,594	0,624	0,678
Breg *in vitro* с активаторами, %	r*	0,045	0,049	0,023	0,030	-0,300	0,024	-0,077	-0,517	0,036	-0,078	-0,300	0,144
	p	0,716	0,879	0,868	0,914	0,624	0,947	0,512	0,085	0,782	0,775	0,624	0,672
Абсолютный прирост, %	r*	-0,140	-0,218	-0,134	0,343	0,700	0,309	0,036	-0,379	0,137	-0,332	-0,800	-0,114
	p	0,261	0,496	0,334	0,211	0,188	0,385	0,764	0,225	0,288	0,209	0,104	0,738
Кратность прироста	r*	-0,128	-0,333	-0,062	0,486	1,000	0,236	0,133	0,076	0,151	-0,405	-0,800	-0,146
	p	0,329	0,381	0,664	0,067	-	0,511	0,279	0,847	0,255	0,120	0,104	0,668

* Корреляция Спирмена. Пороговый p_0 = 0,010 (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез в каждой группе для всех участников, мужчин и женщин).

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; общ. – все участники, входящие в группу; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Таблица 25 – Корреляция содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* с уровнем дегидроэпиандростерон-сульфата у участников групп 1a, 1b, 2 и 3

Группа		**1a**			**1b**			**2**			**3**		
		Общ.	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**[33]	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**
		n = 77	**n = 13**	**n = 64**	**n = 17**	**n = 5**	**n = 12**	**n = 23**	**n = 13**	**n = 10**	**n = 44**	**n = 7**	**n = 37**
Breg *in vivo*, %	r*	0,164	0,500	0,116	-0,047	0,289	-	-0,271	-0,231	0,697	0,029	0,086	0,028
	p	0,158	0,082	0,366	0,864	0,637	-	0,211	0,448	0,025	0,860	0,872	0,876
Breg *in vitro* без активаторов, %	r*	-0,123	0,494	-0,010	-0,233	-0,308	-	0,078	-0,491	0,117	-0,020	-0,086	-0,112
	p	0,297	0,103	0,941	0,385	0,614	-	0,723	0,105	0,748	0,904	0,872	0,536
Breg *in vitro* с активаторами, %	r*	-0,013	0,444	0,045	-0,392	-0,564	-	-0,067	-0,521	-0,140	0,007	0,143	-0,098
	p	0,910	0,149	0,728	0,133	0,322	-	0,773	0,101	0,700	0,964	0,787	0,589
Абсолютный прирост, %	r*	0,136	0,134	0,170	-0,473	-0,410	-	-0,261	-0,440	-0,222	0,119	0,486	0,047
	p	0,247	0,678	0,186	0,065	0,493	-	0,252	0,175	0,537	0,469	0,328	0,796
Кратность прироста	r*	0,170	-0,117	0,115	-0,115	0,051	-	-0,375	-0,391	-0,524	0,051	0,086	0,038
	p	0,167	0,765	0,388	0,673	0,935	-	0,113	0,235	0,183	0,756	0,872	0,835

* Корреляция Спирмена. Пороговый $p_0 = 0,010$ (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез в каждой группе для всех участников, мужчин и женщин).

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; общ. – все участники, входящие в группу; М – мужской пол; Ж – женский пол.

[33] В 100% случаев уровень ДГЭА-С составил 0,003 мкмоль/л.

Таблица 26 – Корреляция содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* с уровнями адренокортикотропного гормона, кортизола, альдостерона, ренина у участников группы 3

Группа		**АКТГ**			**Кортизол**			**Альдостерон**			**Ренин**		
		Общ.	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**	**Общ.**	**М**	**Ж**
		n = 44	**n = 7**	**n = 37**	**n = 44**	**n = 7**	**n = 37**	**n = 44**	**n = 7**	**n = 37**	**n = 44**	**n = 7**	**n = 37**
Breg *in vivo*, %	r*	-0,006	-0,714	0,139	-0,136	-0,371	-0,101	-0,122	-0,257	-0,093	0,092	0,600	0,059
	p	0,971	0,111	0,464	0,408	0,468	0,577	0,453	0,623	0,600	0,594	0,285	0,752
Breg *in vitro* без активаторов, %	r*	0,007	-0,143	0,025	0,031	0,371	-0,031	0,118	-0,086	0,272	0,329	-0,500	0,381
	p	0,969	0,787	0,898	0,855	0,468	0,868	0,473	0,872	0,126	0,054	0,391	0,038
Breg *in vitro* с активаторами, %	r*	0,021	0,029	0,016	0,031	0,600	-0,031	0,305	0,143	***0,458***	***0,450***	-0,700	***0,528***
	p	0,905	0,957	0,933	0,855	0,208	0,868	0,059	0,787	***0,007***	***0,007***	0,188	***0,003***
Абсолютный прирост, %	r*	0,309	***0,943***	0,165	0,136	0,543	0,072	***0,422***	0,200	0,432	0,378	-0,700	***0,488***
	p	0,070	***0,005***	0,393	0,414	0,266	0,695	***0,007***	0,704	0,012	0,025	0,188	***0,006***
Кратность прироста	r*	0,118	0,657	0,012	0,009	0,086	0,013	0,334	0,200	0,338	0,306	-0,400	0,357
	p	0,500	0,156	0,951	0,959	0,872	0,944	0,038	0,704	0,054	0,074	0,505	0,053

* Корреляция Спирмена. Пороговый p_0 = 0,010 (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез в каждой группе для всех участников, мужчин и женщин). Полужирным и курсивным шрифтами выделены статистически значимые корреляции.

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; АКТГ – адренокортикотропный гормон; общ. – все участники, входящие в группу; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Таблица 27 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* у пациентов группы 1а с разным числом сопутствующих аутоиммунных заболеваний

Число аутоиммунных заболеваний											**p****
1	**2**						**3**			**4**	
Изол. АНН	**Общ.**	**АНН + АИТ**	**АНН + СД1**	**АНН + БГ**	**АНН + ГГ**	**АНН + пр. неэндокринные АИЗ**	**Общ.**	**АНН + АИТ + СД1**	**Пр. комбинации**		
n = 15	**n = 40**	**n = 26**	**n = 1**	**n = 5**	**n = 3**	**n = 5**	**n = 18**	**n = 6**	**n = 12**	**n = 4**	
Breg *in vivo*, %*											0,701
2,8 [1,4; 4,0]	2,4 [1,5; 5,6]	2,3 [1,3; 5,6]	0,1	2,7 [1,8; 4,6]	4,0 [2,2; 8,3]	2,9 [1,6; 6,7]	1,7 [0,5; 6,1]	2,0 [1,9; 4,2]	1,0 [0,5; 8,0]	3,8 [0,7; 6,8]	
Breg *in vitro* без стимуляции, %*											0,557
1,2 [0,2; 1,4]	1,5 [0,5; 4,1]	1,5 [0,8; 3,5]	0,1	4,1 [0,3; 9,3]	3,9 [0,9; 8,7]	1,3 [0,1; 2,0]	0,9 [0,2; 1,9]	0,4 [0,2; 1,0]	1,0 [0,2; 2,5]	1,9 [0,7; 3,7]	
Breg *in vitro* со стимуляцией, %*											0,282
1,6 [0,5; 4,1]	1,8 [0,6; 7,3]	1,8 [0,6; 5,7]	1,7	7,0 [0,4; 17,4]	9,9 [1,4; 10,0]	2,5 [0,8; 10,2]	1,4 [0,2; 2,2]	1,0 [0,2; 1,4]	1,9 [0,5; 2,6]	5,0 [3,0; 16,0]	
Абсолютный прирост, %*											0,242
1,0 [0,2; 1,6]	0,4 [0,0; 3,3]	0,1 [-0,4; 2,6]	1,6	1,5 [0,1; 8,1]	1,3 [0,5; 6,0]	1,6 [0,1; 3,3]	0,1 [0,0; 1,1]	0,0 [0,0; 0,4]	0,5 [0,0; 1,9]	2,4 [0,7; 14,0]	

Продолжение Таблицы 27

Число аутоиммунных заболеваний											**p****
1	**2**						**3**			**4**	
Изол. АНН	**Общ.**	**АНН + АИТ**	**АНН + СД1**	**АНН + БГ**	**АНН + ГГ**	**АНН + пр. неэндокринные АИЗ**	**Общ.**	**АНН + АИТ + СД1**	**Пр. комбинации**		
n = 15	**n = 40**	**n = 26**	**n = 1**	**n = 5**	**n = 3**	**n = 5**	**n = 18**	**n = 6**	**n = 12**	**n = 4**	
Кратность прироста*											0,299
1,8 [1,4; 3,2]	1,5 [1,0; 3,0]	1,2 [0,8; 2,9]	17,0	2,0 [1,1; 2,9]	1,6 [1,1; 2,5]	2,5 [1,5; 8,0]	1,4 [1,0; 3,3]	1,2 [0,6; 2,6]	2,0 [1,0; 3,3]	7,4 [2,6; 10,9]	

*Me [Q1; Q3]

**сравнение пациентов с 1 аутоиммунным заболеванием, 2 аутоиммунными заболеваниями (общ.), 3 аутоиммунными заболеваниями (общ.) и 4 аутоиммунными заболеваниями. Критерий Краскела-Уоллиса. Пороговый p_0 = 0,010 (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез).

Примечания: Me – медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал; Breg – регуляторные В-лимфоциты; изол. – изолированная; общ. – все участники, входящие в группу; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; СД1 – сахарный диабет 1 типа; БГ – болезнь Грейвса; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; пр. – прочие.

Таблица 28 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* у пациентов группы 1а с разным числом сопутствующих аутоиммунных эндокринопатий и без неэндокринных аутоиммунных заболеваний (n = 62)

Показатель*	**Число эндокринных аутоиммунных заболеваний**									**p****
	1	**2**					**3**			
	Изол. АНН	**Общ.**	**АНН + АИТ**	**АНН + СД1**	**АНН + БГ**	**АНН + ГГ**	**Общ.**	**АНН + АИТ + СД1**	**Пр. комбинации**	
	n = 15	**n = 35**	**n = 26**	**n = 1**	**n = 5**	**n = 3**	**n = 12**	**n = 6**	**n = 6**	
Breg *in vivo*, %	2,8 [1,4; 4,0]	2,3 [1,3; 5,6]	2,3 [1,3; 5,6]	0,1	2,7 [1,8; 4,6]	4,0 [2,2; 8,3]	2,0 [0,7; 9,2]	2,0 [1,9; 4,2]	4,7 [0,7; 9,2]	0,950
Breg *in vitro* без стимуляции, %	1,2 [0,2; 1,4]	1,5 [0,6; 4,2]	1,5 [0,8; 3,5]	0,1	4,1 [0,3; 9,3]	3,9 [0,9; 8,7]	0,4 [0,2; 4,5]	0,4 [0,2; 1,0]	1,1 [0,2; 4,5]	0,198
Breg *in vitro* со стимуляцией, %	1,6 [0,5; 4,1]	1,8 [0,6; 7,1]	1,8 [0,6; 5,7]	1,7	7,0 [0,4; 17,4]	9,9 [1,4; 10,0]	1,4 [0,2; 2,2]	1,0 [0,2; 1,4]	2,1 [1,1; 2,4]	0,421
Абсолютный прирост, %	1,0 [0,2; 1,6]	0,2 [-0,1; 3,1]	0,1 [-0,4; 2,6]	1,6	1,5 [0,1; 8,1]	1,3 [0,5; 6,0]	0,1 [0,0; 1,1]	0,0 [0,0; 0,4]	0,5 [0,0; 2,2]	0,463
Кратность прироста	1,8 [1,4; 3,2]	1,3 [1,0; 2,9]	1,2 [0,8; 2,9]	17,0	2,0 [1,1; 2,9]	1,6 [1,1; 2,5]	1,2 [1,0; 3,7]	1,2 [0,6; 2,6]	1,7 [1,0; 3,7]	0,507

*Me [Q1; Q3]

**сравнение пациентов с 1 эАИЗ, 2 эАИЗ (общ.) и 3 эАИЗ (общ.). Критерий Краскела-Уоллиса. Пороговый p_0 = 0,010 (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез).

Примечания: Me – медиана; [Q1; Q3] – интерквартильный интервал; эАИЗ – эндокринные аутоиммунные заболевания; Breg – регуляторные В-лимфоциты; изол. – изолированная; общ. – все участники, входящие в группу; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; СД1 – сахарный диабет 1 типа; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; БГ – болезнь Грейвса; пр. – прочие.

3.2.1.3. Результаты иммунологического исследования пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Иммунологические показатели пациентов с ранними стадиями заболевания представлены в Таблице 29.

В связи с небольшим числом пациентов с ранними стадиями АНН, статистическая обработка была невозможна. Кроме того, большинство из них имели раннюю АНН в составе АПС. Соответственно, иммунологические факторы, запущенные уже имеющимся аутоиммунным процессом, экранировали эффект ранней АНН у этих больных, и анализ полученных данных является малоинформативным. В связи с чем, проводился анализ результатов обследования единственного пациента (№$4_р$) с изолированной лАНН исходно и в динамике через 6 месяцев. Исходный уровень Breg *in vivo* у этого больного ниже медианы показателя условно здоровых. В динамике отмечается снижение данного показателя на фоне увеличения уровня АТ к Р450с21 (Рисунок 23). При сопоставлении результатов обследования пациента №$4_р$ с данными пациентов с мАНН (Рисунок 24) обращает на себя внимание транзиторное увеличение содержания Breg *in vivo* при изолированной мАНН с последующим его уменьшением по мере развития сопутствующих эАИЗ.

При анализе уровней гормональных показателей и АТ к Р450с21 значимых корреляций с содержанием Breg на ранних стадиях АНН не обнаружено (Таблица 30).

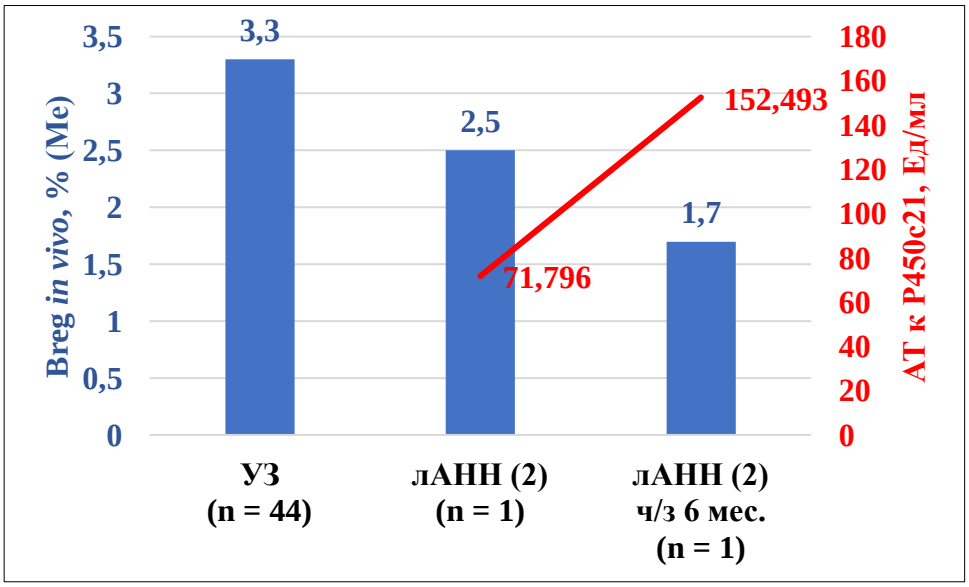


Рисунок 23 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* у участников группы 3 и динамика содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и уровня антител к 21-гидроксилазе у пациента №$4_р$ с латентной аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; АТ – антитела; P450c21 – 21-гидроксилаза; УЗ – условно здоровые; лАНН (2) – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность, подстадия 2; ч/з 6 мес. – через 6 месяцев.

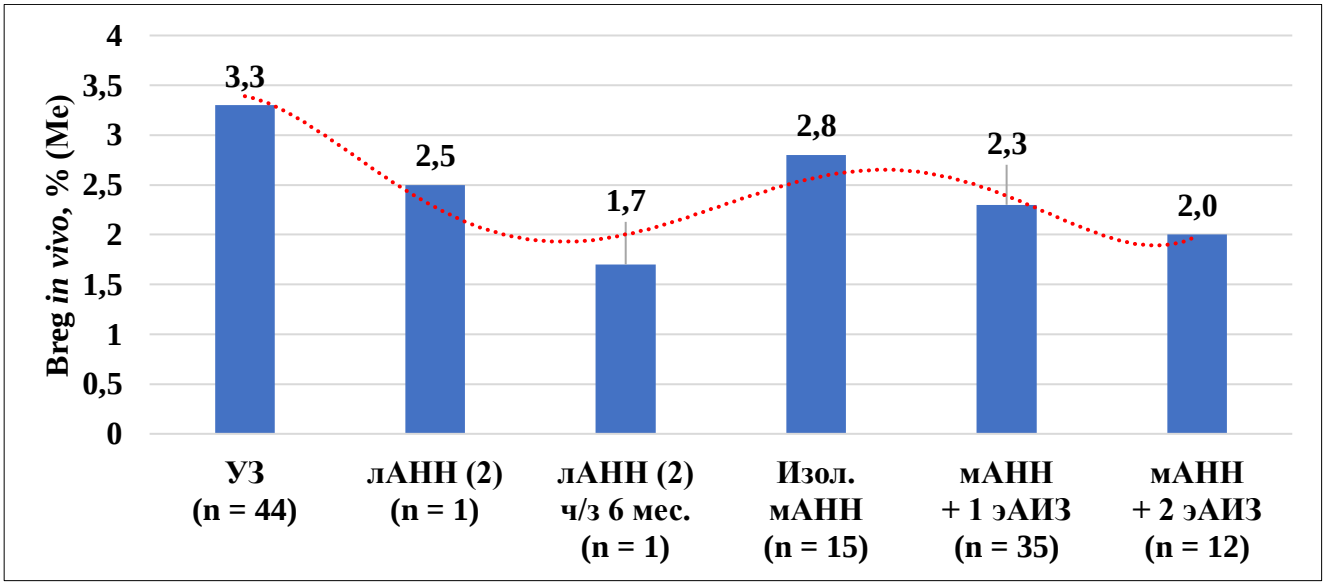


Рисунок 24 – Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* у участников группы 3, пациента №4$_р$ с латентной аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью (исходно и в динамике через 6 месяцев) и пациентов с манифестной стадией с разным числом сопутствующих аутоиммунных эндокринных заболеваний

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; Me – медиана; УЗ – условно здоровые; лАНН (2) – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность, подстадия 2; ч/з 6 мес. – через 6 месяцев; изол. – изолированная; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; эАИЗ – эндокринное аутоиммунное заболевание.

Таблица 29 – Результаты иммунологического исследования пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Первичное обследование						
Показатель	**Пациенты**					
	№1$_р$	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№7$_р$**
Стадия (подстадия) АНН	**лАНН (2)**	**лАНН (1)**	**пАНН**	**лАНН (2)**	**лАНН (2)**	**лАНН (1)**
АТ к P450c21, Ед/мл (РИ < 0,4)	2,940	92,670	0,604	71,976	12,858	23,604
CD19$^+$, %	13,7	31,4	-[34]	4,5	18,2	9,1
Breg *in vivo*, %	0,7	0,7	-[35]	2,5	0,8	6,5
Breg *in vitro* без активаторов, %	0	1,1	0,2	0,6	3,3	1,9
Breg *in vitro* с активаторами, %	0,1	5,7	1,0	2,9	0,6	9,4
Абсолютный прирост Breg, %	0,1	4,6	0,8	2,3	-2,7	7,5
Кратность прироста Breg	-	5,2	5,0	4,8	0,2	4,9
Повторное обследование через 6 месяцев после первичного обследования						
Показатель	**Пациенты**					
	№1$_р$	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№7$_р$**
Стадия (подстадия) АНН	**лАНН (2)**[36]	**лАНН (1)**	-	**лАНН (2)**	-	-
АТ к P450c21, Ед/мл (РИ < 0,4)	1,502	9,884		152,493		

[34] Проба повреждена.
[35] Проба повреждена.
[36] Предположительно. Гормональное обследование на фоне отмены глюкокортикоидов и минералокортикоидов через 6 месяцев после диагностики лАНН пациенту №1$_р$ не выполнялось.

Продолжение Таблицы 29

Повторное обследование через 6 месяцев после первичного обследования						
Показатель	**Пациенты**					
	№1$_р$	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№7$_р$**
CD19$^+$, %	9,1	12,5	-	8,1	-	-
Breg *in vivo*, %	0,1	3,8		1,7		
Breg *in vitro* без активаторов, %	0,7	10,0		0,7		
Breg *in vitro* с активаторами, %	4,2	16,5		5,9		
Абсолютный прирост Breg, %	3,5	6,5		5,2		
Кратность прироста Breg	6,0	1,7		8,4		

Повторное обследование через 12 месяцев после первичного обследования						
Показатель	**Пациенты**					
	№1$_р$	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№7$_р$**
Стадия (подстадия) АНН	**мАНН**	-	-	-	-	-
АТ к Р450с21, Ед/мл (РИ < 0,4)	1,532					
CD19$^+$, %	17,5					
Breg *in vivo*, %	0,3					
Breg *in vitro* без активаторов, %	0,2					
Breg *in vitro* с активаторами, %	0					

Продолжение Таблицы 29

Повторное обследование через 12 месяцев после первичного обследования						
Показатель	**Пациенты**					
	№1$_р$	**№2$_р$**	**№3$_р$**	**№4$_р$**	**№5$_р$**	**№7$_р$**
Абсолютный прирост Breg, %	-0,2	-	-	-	-	-
Кратность прироста Breg	0					

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; РИ – референсный интервал; $CD19^+$ – В-лимфоциты; Breg – регуляторные В-лимфоциты; мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; пАНН – потенциальная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза.

Таблица 30 – Корреляция содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* с уровнями гормональных показателей и антител к 21-гидроксилазе у пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Группа		**АКТГ**	**Кортизол**[37]	**Альдостерон**	**Ренин**	**ДГЭА-С**	**АТ к Р450с21**
		n = 6	**n = 6**	**n = 6**	**n = 6**	**n = 6**	**n = 6**
Breg *in vivo*[38], %	r*	0,718	0,205	-0,205	0,395	0,308	0,103
	p	0,172	0,741	0,740	0,511	0,614	0,870
Breg *in vitro* без активаторов, %	r*	0,086	0,314	0,143	-0,029	0,029	0,429
	p	0,872	0,544	0,787	0,957	0,957	0,397
Breg *in vitro* с активаторами, %	r*	0,200	0,543	-0,600	0,000	0,029	0,657
	p	0,704	0,266	0,208	1,000	0,957	0,156
Абсолютный прирост, %	r*	0,257	0,486	-0,714	0,145	-0,143	0,600
	p	0,623	0,329	0,111	0,784	0,787	0,208
Кратность прироста[39]	r*	-0,600	0,500	-0,300	-0,500	-0,100	0,300
	p	0,284	0,391	0,624	0,391	0,873	0,624

* Корреляция Спирмена. Пороговый p_0 = 0,002 (после применения поправки Бонферрони: 30 гипотез).

Примечания: Breg – регуляторные В-лимфоциты; АКТГ – адренокортикотропный гормон; ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат; АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза.

[37] Максимальный в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией или базальный, если проба не выполнялась.

[38] Так как проба пациента №$3_р$ повреждена, корреляция содержания Breg *in vivo* с прочими показателями рассчитана на n = 5 пациентов.

[39] Так как кратность прироста у пациента №$1_р$ определить невозможно, в связи с содержанием Breg *in vitro* до добавления активаторов равным 0, корреляция кратности прироста Breg с прочими показателями рассчитана на n = 5 пациентов.

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

3.2.2.1. Клиническая характеристика обследованных лиц

Характеристика включенных в исследование представлена в Таблице 31.

Таблица 31 – Характеристика участников исследования

Группа		Участники				
		n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)		
				n	%	Соотношение
1	Изолированная АНН + АПС-2	54	19-72	43/11	80/20	3,9:1
	АПС-1	9	18-45	6/3	67/33	2:1
2	Условно здоровые	32	18-60	24/8	75/25	3:1

Примечания: АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; М – мужской пол; Ж – женский пол.

3.2.2.2. Оценка ассоциации полиморфных маркеров генов *TLR9, IL28B, TLR2* с аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью

В нашем исследовании выявлено преобладание на уровне статистической тенденции в группе 1 (пациентов с АНН) по сравнению с группой 2 (условно здоровых) генотипа CT полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B*, а также аллеля T полиморфизма rs5743836 гена *TLR9*. Напротив, частоты генотипа CC полиморфизма rs12979860 гена *IL28B* и аллеля C полиморфизма rs5743836 гена *TLR9* были на уровне статистической тенденции выше в группе 2, чем в группе 1 (Таблица 32). При сравнительном анализе распределения частот гаплотипов по двум локусам гена *IL28B* (rs8099917 и rs12979860) обнаружена более высокая (на уровне статистической тенденции) частота CCTT в группе 2, по сравнению с группой 1 (Таблица 33). 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 1a и 2 сохранялись отличия на уровне статистической тенденции только в отношении частот генотипа CT полиморфизма rs12979860 гена *IL28B* и аллелей T и C полиморфизма rs5743836 гена *TLR9* (Таблицы 34; 35). В группе 1b по сравнению с группой 2 на уровне статистической

тенденции чаще встречались генотип CT полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B* и гаплотип CTTT по двум локусам гена *IL28B* (rs8099917 и rs12979860), Таблицы 36; 37.

Таблица 32 – Распределение частот аллелей и генотипов в изучаемых однонуклеотидных полиморфизмах и результат анализа их ассоциаций с группой 1

Полиморфизм	**Аллели/ генотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 63	**$n_{пац}$ = 32**	
		$n_{алл}$ = 126	**$n_{алл}$ = 64**	
IL28B rs12979860	Аллель C	0,659	0,766	0,131
	Аллель T	0,341	0,234	
	CC	***0,413***	***0,656***	***0,025***
	CT	***0,492***	***0,219***	***0,010***
	TT	0,095	0,125	0,926**
IL28B rs8099917	Аллель T	0,794	0,828	0,571
	Аллель G	0,206	0,172	
	TT	0,619	0,688	0,511
	TG	0,349	0,281	0,504
	GG	0,032	0,031	0,544**
TLR2 s5743708	Аллель A	0,119	0,031	0,083**
	Аллель G	0,881	0,969	
	AA	0,000	0,000	–
	AG	0,238	0,063	0,068**
	GG	0,762	0,938	0,068**
TLR9 rs5743836	**Аллель T**	***0,873***	***0,750***	***0,032*****
	Аллель C	***0,127***	***0,250***	
	TT	0,746	0,563	0,069
	TC	0,254	0,375	0,221
	CC	0,000	0,063	0,212**

Продолжение Таблицы 32

Полиморфизм	**Аллели/ генотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 63	**$n_{пац}$ = 32**	
		$n_{алл}$ = 126	**$n_{алл}$ = 64**	
TLR9 rs352140	Аллель G	0,429	0,516	0,255
	Аллель A	0,571	0,484	
	GG	0,175	0,250	0,385
	GA	0,508	0,531	0,830
	AA	0,317	0,219	0,313

Примечания: Гр. – группа; пац. – пациенты; алл. – аллели.
* Пороговый p_0 = 0,003 (после применения поправки Бонферрони: 19 гипотез). Полужирным и курсивным шрифтами выделены различия на уровне статистической тенденции.
** с поправкой Йейтса.

Таблица 33 – Распределение частот гаплотипов в генах *IL28B* и *TLR9* и результат анализа их ассоциаций с группой 1

Полиморфизмы	**Гаплотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 63	**$n_{пац}$ = 32**	
IL28B rs12979860-rs8099917	**CCTT**	***0,381***	***0,625***	***0,024***
	CCTG	0,016	0,031	0,793**
	CCGG	0,016	0,000	0,729**
	CTTT	0,222	0,063	0,094**
	CTTG	0,270	0,156	0,215
	CTGG	0,000	0,000	–
	TTTT	0,016	0,000	0,729**
	TTTG	0,063	0,094	0,906**
	TTGG	0,016	0,031	0,793**
TLR9 rs5743836-rs352140	TTGG	0,143	0,063	0,414**
	TTGA	0,317	0,375	0,575

Продолжение Таблицы 33

Полиморфизмы	**Гаплотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 63	**$n_{пац}$ = 32**	
TLR9 rs5743836-rs352140	TTAA	0,286	0,125	0,134**
	TCGG	0,032	0,125	0,187**
	TCGA	0,190	0,156	0,681**
TLR9 rs5743836-rs352140	TCAA	0,032	0,094	0,428**
	CCGG	0,000	0,063	0,212**
	CCGA	0,000	0,000	–
	CCAA	0,000	0,000	–

Примечания: Гр. – группа; пац. – пациенты.
* Пороговый p_0 = 0,003 (после применения поправки Бонферрони: 15 гипотез). Полужирным и курсивным шрифтами выделены различия на уровне статистической тенденции.
** с поправкой Йейтса.

Таблица 34 – Распределение частот аллелей и генотипов в изучаемых однонуклеотидных полиморфизмах и результат анализа их ассоциаций с группой 1а

Полиморфизмы	**Аллели/ генотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1а	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 54	**$n_{пац}$ = 32**	
		$n_{алл}$ = 108	**$n_{алл}$ = 64**	
IL28B rs12979860	Аллель C	0,676	0,766	0,211
	Аллель T	0,324	0,234	
	CC	0,444	0,656	0,057
	CT	***0,463***	***0,219***	***0,024***
	TT	0,093	0,125	0,912**
IL28B rs8099917	Аллель T	0,787	0,828	0,513
	Аллель G	0,213	0,172	
	TT	0,611	0,688	0,621
	TG	0,352	0,281	0,499

Продолжение Таблицы 34

Полиморфизмы	**Аллели/ генотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1а	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 54	**$n_{пац}$ = 32**	
		$n_{алл}$ = 108	**$n_{алл}$ = 64**	
IL28B rs8099917	GG	0,037	0,031	0,641**
TLR2 s5743708	Аллель A	0,120	0,031	0,085**
	Аллель G	0,880	0,969	
	AA	0,000	0,000	–
	AG	0,241	0,063	0,070**
	GG	0,759	0,938	0,070**
TLR9 rs5743836	**Аллель T**	***0,870***	***0,750***	***0,044***
	Аллель C	***0,130***	***0,250***	
	TT	0,741	0,563	0,089
	TC	0,259	0,375	0,259
	CC	0,000	0,063	0,263**
TLR9 rs352140	Аллель G	0,426	0,516	0,254
	Аллель A	0,574	0,484	
	GG	0,167	0,250	0,348
	GA	0,519	0,531	0,909
	AA	0,315	0,219	0,337

Примечания: Гр. – группа; пац. – пациенты; алл. – аллели.

* Пороговый p_0 = 0,003 (после применения поправки Бонферрони: 19 гипотез). Полужирным и курсивным шрифтами выделены различия на уровне статистической тенденции.

** с поправкой Йейтса.

Таблица 35 – Распределение частот гаплотипов в генах *IL28B* и *TLR9* и результат анализа их ассоциаций с группой 1а

Полиморфизмы	**Гаплотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1а	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 54	**$n_{пац}$ = 32**	
IL28B rs12979860-rs8099917	CCTT	0,407	0,625	0,051
	CCTG	0,019	0,031	0,718**
	CCGG	0,019	0,000	0,790**
	CTTT	0,185	0,063	0,206**
	CTTG	0,278	0,156	0,197
	CTGG	0,000	0,000	–
	TTTT	0,019	0,000	0,790**
	TTTG	0,056	0,094	0,815**
	TTGG	0,019	0,031	0,718**
TLR9 rs5743836-rs352140	TTGG	0,130	0,063	0,536**
	TTGA	0,333	0,375	0,695
	TTAA	0,278	0,125	0,167**
	TCGG	0,037	0,125	0,267**
	TCGA	0,185	0,156	0,733
	TCAA	0,037	0,094	0,542**
	CCGG	0,000	0,063	0,263**
	CCGA	0,000	0,000	–
	CCAA	0,000	0,000	–

Примечания: Гр. – группа; пац. – пациенты.

* Пороговый p_0 = 0,003 (после применения поправки Бонферрони: 15 гипотез).

** с поправкой Йейтса.

Таблица 36 – Распределение частот аллелей и генотипов в изучаемых однонуклеотидных полиморфизмов и результат анализа их ассоциаций с группой 1b

Полиморфизмы	**Аллели/ генотипы**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1b	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 9	**$n_{пац}$ = 32**	
		$n_{алл}$ = 18	**$n_{алл}$ = 64**	
IL28B rs12979860	Аллель C	0,556	0,766	0,080
	Аллель T	0,444	0,234	
	CC	0,222	0,656	0,053**
	CT	***0,667***	***0,219***	***0,032***
	TT	0,111	0,125	0,643**
IL28B rs8099917	Аллель T	0,833	0,828	0,762**
	Аллель G	0,167	0,172	
	TT	0,667	0,688	0,774**
	TG	0,333	0,281	0,911**
	GG	0,000	0,031	0,505**
TLR2 s5743708	Аллель A	0,111	0,031	0,441**
	Аллель G	0,889	0,969	
	AA	0,000	0,000	–
	AG	0,222	0,063	0,429**
	GG	0,778	0,938	0,429**
TLR9 rs5743836	Аллель T	0,889	0,750	0,350**
	Аллель C	0,111	0,250	
	TT	0,778	0,563	0,434**
	TC	0,222	0,375	0,648**
	CC	0,000	0,063	0,915**
TLR9 rs352140	Аллель G	0,444	0,516	0,594
	Аллель A	0,556	0,484	
	GG	0,222	0,250	0,789**

Продолжение Таблицы 36

Полиморфизмы	Аллели/ генотипы	Частоты		p*, χ2
		Гр. 1b	Гр. 2	
		$n_{пац}$ = 9	$n_{пац}$ = 32	
		$n_{алл}$ = 18	$n_{алл}$ = 64	
TLR9 rs352140	GA	0,444	0,531	0,934**
	AA	0,333	0,219	0,789**

Примечания: Гр. – группа; пац. – пациенты; алл. – аллели.
* Пороговый p_0 = 0,003 (после применения поправки Бонферрони: 19 гипотез). Полужирным и курсивным шрифтами выделены различия на уровне статистической тенденции.
** с поправкой Йейтса.

Таблица 37 – Распределение частот гаплотипов в генах *IL28B* и *TLR9* и результат анализа их ассоциаций с группой 1b

Полиморфизмы	Гаплотип	Частоты		p*, χ2
		Гр. 1b	Гр. 2	
		$n_{пац}$ = 9	$n_{пац}$ = 32	
IL28B rs12979860-rs8099917	CCTT	0,222	0,625	0,429**
	CCTG	0,000	0,031	0,493**
	CCGG	0,000	0,000	–
	CTTT	***0,444***	***0,063***	***0,020***
	CTTG	0,222	0,156	0,971**
	CTGG	0,000	0,000	–
	TTTT	0,000	0,000	–
	TTTG	0,111	0,094	0,631**
	TTGG	0,000	0,031	0,493**
TLR9 rs5743836-rs352140	TTGG	0,222	0,063	0,429**
	TTGA	0,222	0,375	0,648**
	TTAA	0,333	0,125	0,334**
	TCGG	0,000	0,125	0,631**
	TCGA	0,222	0,156	0,971**

Продолжение Таблицы 37

Полиморфизмы	**Гаплотип**	**Частоты**		**p*, χ2**
		Гр. 1b	**Гр. 2**	
		$n_{пац}$ = 9	**$n_{пац}$ = 32**	
TLR9 rs5743836-rs352140	TCAA	0,000	0,094	0,818**
	CCGG	0,000	0,063	0,915**
	CCGA	0,000	0,000	–
	CCAA	0,000	0,000	–

Примечания: Гр. – группа; пац. – пациенты.

* Пороговый p_0 = 0,004 (после применения поправки Бонферрони: 13 гипотез). Полужирным и курсивным шрифтами выделены различия на уровне статистической тенденции.

** с поправкой Йейтса.

3.3. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности

3.3.1. Клиническая характеристика обследованных лиц

Характеристика включенных в исследование представлена в Таблице 38.

Таблица 38 – Характеристика участников исследования

Группа		Участники				
		n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)		
				n	%	Соотношение
1	Манифестная 1-НН	15	20-46	12/3	80/20	4:1
	2-НН	10	25-69	9/1	90/10	9:1
	Потенциальная 1-НН	2	19-39	2/0	100/0	-
	Латентная 1-НН с сохранной глюкокортикоидной функцией	2	27-38	1/1	50/50	1:1
	Латентная 1-НН с глюкокортикоидной недостаточностью	4	18-50	2/2	50/50	1:1
2	Условно здоровые	61	18-74	43/18	70/30	2,4:1

Примечания: 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; 2-НН – вторичная надпочечниковая недостаточность; М – мужской пол; Ж – женский пол.

Все пациенты с 1-НН группы 1 были обследованы в рамках раздела «АТ к Р450с21 как диагностический маркер ранних стадий АНН». В соответствии с полученными результатами, у всех пациентов группы 1 с манифестной 1-НН подтвержден аутоиммунный генез заболевания в рамках АПС-2. Предполагаемая длительность заболевания (от момента появления клинических признаков; Me [Q1; Q3]) на момент постановки диагноза составила 3,0 [1,5-5,0] лет.

Клиническая характеристика пациентов с пАНН и лАНН представлена в Таблице 13 раздела 3.1.3.

Среди пациентов с 2-НН у n = 4 причиной заболевания было успешное оперативное лечение болезни Иценко-Кушинга, у n = 3 – резкое прекращение терапии глюкокортикоидами, у n = 2 – выраженная кровопотеря во время родоразрешения (синдром Шиена-Симмондса), у n = 1 – гипофизит. Длительность (Me [Q1; Q3]) заболевания от момента воздействия этиологического фактора: оперативного вмешательства/родоразрешения/отмены глюкокортикоидов, или

появления клинических признаков при гипофизите до постановки диагноза составила 0,5 [0,5; 1,0] лет.

3.3.2. Исследование диагностической точности анализа кортизола утренней слюны при манифестной надпочечниковой недостаточности

Медиана кортизола крови у пациентов с манифестной НН составила 62,87 [22,00; 226,30] нмоль/л и статистически значимо отличалась от медианы кортизола крови здоровых участников — 526,20 [346,50; 716,50] нмоль/л, $p < 0,001$. У пациентов с манифестной 1-НН и с 2-НН группы 1 и участников группы 2 выявлена значимая положительная корреляционная связь средней силы между уровнем кортизола слюны и базального кортизола крови ($r = 0,531$, $p < 0,001$, Рисунок 25).

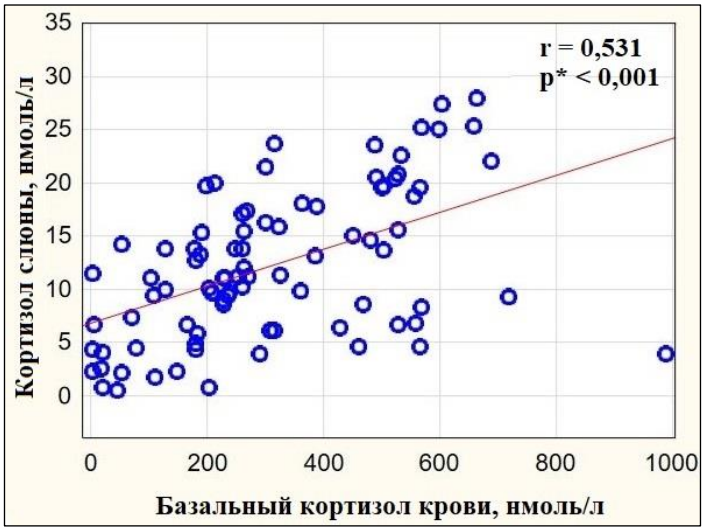


Рисунок 25 – Корреляция уровня кортизола слюны и базального кортизола крови утром у пациентов с манифестной первичной и вторичной надпочечниковой недостаточностью группы 1 (n = 25) и условно здоровых участников группы 2 (n = 61)
* Корреляция Спирмена. Пороговый p = 0,05.

Медиана кортизола слюны у пациентов с манифестной НН составила 4,88 [2,39; 11,10] нмоль/л и статистически значимо отличалась от медианы кортизола слюны здоровых участников – 13,82 [9,51; 19,70] нмоль/л, $p < 0,001$, Рисунок 26.

При применении принятых в лаборатории референсных значений точность, чувствительность, специфичность, +PV, -PV определения кортизола утренней слюны составили: 77%, 95% ДИ [67%; 85%]; 56%, 95% ДИ [39%; 71%]; 85%, 95% ДИ [78%; 91%]; 61%, 95% ДИ [42%; 77%] и 83%, 95% ДИ [76%; 88%], соответственно (кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик теста представлены в Таблице 39).

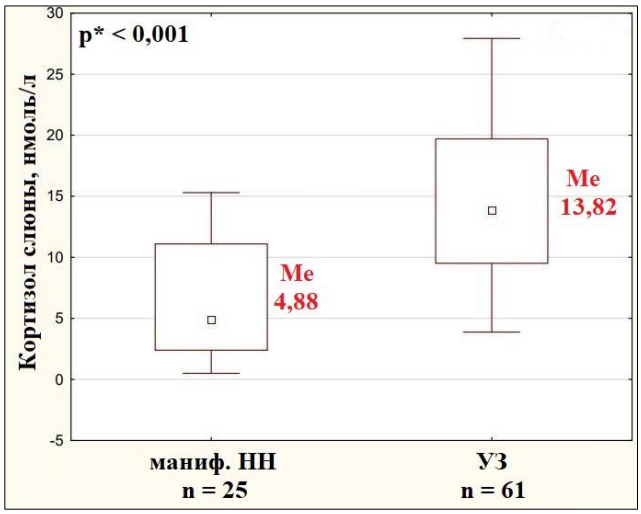


Рисунок 26 – Кортизол слюны утром у пациентов с манифестной первичной и вторичной надпочечниковой недостаточностью и в группе условно здоровых лиц

* U-критерий Манна-Уитни. Пороговый p = 0,05.

Примечания: маниф. – манифестная; НН – надпочечниковая недостаточность; УЗ – условно здоровые; Me – медиана.

Таблица 39 – Кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик анализа утренней слюны на кортизол (согласно референсным значениям, принятым в лаборатории) в диагностике манифестной первичной и вторичной надпочечниковой недостаточности

Уровень кортизола утренней слюны	**НН +[40]**	**НН -[41]**
Кортизол утренней слюны не снижен (≥ 6,8 нмоль/л)	14 ИП	9 ЛП
Кортизол утренней слюны снижен (< 6,8 нмоль/л)	11 ЛО	52 ИО

Примечания: НН – надпочечниковая недостаточность; ИП – истиннположительный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ИО – истинноотрицательный результат.

По результатам ROC-анализа, максимальная диагностическая точность теста определяется при пороге уровня кортизола утренней слюны: < 8,4 нмоль/л. Точность, чувствительность, специфичность, +PV, -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 (кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик теста представлены в Таблице 40). Площадь под кривой AUC

[40] «+» – наличие заболевания.
[41] «-» – отсутствие заболевания.

составила 82%, 95% ДИ [73%; 92%] (стандартная ошибка 0,047, p < 0,001), таким образом, качество модели является очень хорошим (Рисунок 27). Нежелательные последствия выполнения индексного или референсного тестов отсутствовали.

Таблица 40 – Кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик анализа утренней слюны на кортизол (согласно пороговому уровню, определенному при ROC-анализе) в диагностике манифестной первичной и вторичной надпочечниковой недостаточности

Уровень кортизола утренней слюны	**НН +[42]**	**НН -[43]**
Кортизол утренней слюны не снижен (≥ 8,4 нмоль/л)	16 ИП	10 ЛП
Кортизол утренней слюны снижен (< 8,4 нмоль/л)	9 ЛО	51 ИО

Примечания: НН – надпочечниковая недостаточность; ИП – истиннположительный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ИО – истинноотрицательный результат.

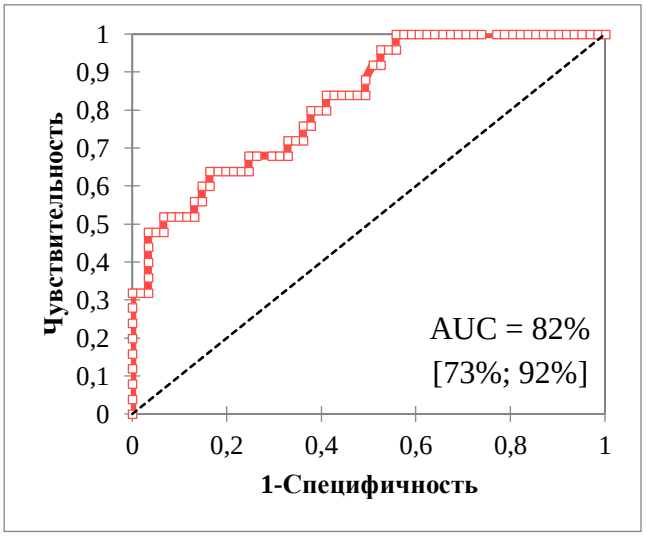


Рисунок 27 – ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность определения кортизола слюны утром у пациентов с манифестной первичной и вторичной надпочечниковой недостаточностью (n = 25) и условно здоровых лиц (n = 61)

Примечание: AUC – area under the curve.

3.3.3. Результаты исследования уровня кортизола в слюне при ранних стадиях надпочечниковой недостаточности

[42] «+» – наличие заболевания.
[43] «-» – отсутствие заболевания.

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 (Me [Q1; Q3]), (min, max) – 7,0 [6,2; 7,8], (5,7, 8,35) нмоль/л. Таким образом, в когорте больных с ранними стадиями 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%] (кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик теста представлены в Таблице 41).

Таблица 41 – Кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик анализа утренней слюны на кортизол (согласно пороговому уровню, определенному при ROC-анализе) в диагностике ранних стадий надпочечниковой недостаточности

Уровень кортизола утренней слюны	**НН +[44]**	**НН -[45]**
Кортизол утренней слюны не снижен (≥ 8,4 нмоль/л)	4 ИП	1 ЛП
Кортизол утренней слюны снижен (< 8,4 нмоль/л)	0 ЛО	3 ИО

Примечания: НН – надпочечниковая недостаточность; ИП – истиннположительный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ИО – истинноотрицательный результат.

[44] «+» – наличие заболевания со снижением секреции кортизола.
[45] «-» – пАНН или лАНН без снижения секреции кортизола.

3.4. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний

3.4.1. Клиническая характеристика обследованных лиц

Все участники данного исследования были обследованы в рамках раздела «АТ к P450c21 как диагностический маркер ранних стадий АНН» (характеристика представлена в Таблицах 10 и 12). Информация о поле, возрасте, комбинациях диагнозов также приведена в Таблице 42. Подробная клиническая характеристика и результаты исследования АТ методом ИФА и с использованием клеточной культуры HEK-blue пациентов группы 1 представлены в Таблице 43.

Таблица 42 – Характеристика участников исследования

Группа		Участники				
		n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)		
				n	%	Соотношение
1	АПС-1	18	18-49	13/5	72/28	2,6:1
2	АНН	30	19-66	27/3	90/10	9:1
	Изолированная АНН	3	24-60	2/1	67/33	2:1
	АНН + АИТ	7	21-63	7/0	100/0	-
	АНН + БГ	5	23-63	4/1	80/20	4:1
	АНН + АИТ + СД1/LADA	5	26-60	4/1	80/20	4:1
	АНН + АИТ + ГГ	6	35-8	6/0	100/0	-
	АНН + ГГ	4	19-44	4/0	100/0	-
3	эАИЗ	59	19-72	48/11	81/19	4,4:1
	АИТ	9	27-72	8/1	89/11	8:1
	БГ	13	22-71	10/3	77/23	3,3:1
	АИТ + СД1/LADA	7	24-70	5/2	71/29	2,5:1
	БГ + СД1/LADA	1	35	1/0	100/0	-
	АИТ + ГГ	1	30	1/0	100/0	-
	БГ + ГГ	1	44	1/0	100/0	-
	ГГ	5	19-58	5/0	100/0	-

Продолжение Таблицы 42

Группа		Участники				
		n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)		
				n	%	соотношение
3	ГГ + гипопаратиреоз	1	33	1/0	100/0	-
	ГГ + СД1/LADA	1	25	1/0	100/0	-
	СД1/ LADA	20	19-64	15/5	75/25	3:1
4	Неаутоиммунные эндокринные заболевания	71	18-88	51/20	72/28	2,6:1
	ЗЩЖ	11	35-65	8/3	73/27	2,7:1
	ЗЩЖ + СД2	3	65-68	3/0	100/0	-
	ЗЩЖ + ЗОЩЖ	6	51-67	6/0	100/0	-
	СД2	15	45-88	10/5	67/33	2:1
	ГГ	6	18-60	5/1	83/17	5:1
	НН	18	19-70	9/9	50/50	1:1
	ЗОЩЖ	12	28-72	10/2	83/17	5:1
5	УЗ	28	18-60	22/6	79/21	3,8:1

Примечания: М – мужской пол; Ж – женский пол; эАИЗ – эндокринные аутоиммунные заболевания; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; БГ – болезнь Грейвса; СД1 – сахарный диабет 1 типа; СД2 – сахарный диабет 2 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; ЗЩЖ – заболевание щитовидной железы; НН – надпочечниковая недостаточность; ЗОЩЖ – заболевание околощитовидных желез; УЗ – условно здоровые.

Таблица 43 – Характеристика пациентов группы 1

N	Возраст	Пол	Мутация *AIRE*	эАИЗ						КСК	АТ[46] (повышение уровня)									
				АНН	Гипопаратиреоз	СД1/LADA	АИТ	ГГ	БГ		АТ-ТПО	АТ-ТГ	АТ-рТТГ	АТ-GAD	ICA	IAA	АТ-IA2	АТ-ZnT8	АТ-P450c21	АТ-ИФН-ω
1	20	Ж	R257X/-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
2	18	Ж	R257X/ R257X	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3	30	Ж	R257X/ R257X	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
4	18	М	R257X/ A58V	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5	27	М	не иссл.	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	НВ
6	28	Ж	R257X/ c.931delT	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	30	Ж	R257X/ R257X	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	45	М	не иссл.	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
9	29	Ж	R257X/ R257X	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
10	49	М	R257X/ R257X	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11	45	Ж	не иссл.	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

[46] Методом иммуноферментного анализа и с использованием клеточной культуры HEK-blue.

Продолжение Таблицы 43

N	Возраст	Пол	Мутация *AIRE*	эАИЗ						КСК	АТ[47] (повышение уровня)									
				АНН	Гипопаратиреоз	СД1/LADA	АИТ	ГГ	БГ		АТ-ТПО	АТ-ТГ	АТ-рТТГ	АТ-GAD	ICA	IAA	АТ-IA2	АТ-ZnT8	АТ-Р450с21	АТ-ИФН-ω
12	18	Ж	R257X/ R257X	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
13	27	Ж	R257X/-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
14	36	М	не иссл.	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
15	32	Ж	R257X/ R257X	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
16	31	Ж	R257X/ R257X	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
17	44	Ж	R257X/ R257X	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
18	25	Ж	R257X/ c.821delG	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+

Примечания: Ж – женский пол; М – мужской пол; эАИЗ – эндокринные аутоиммунные заболевания; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм; БГ – болезнь Грейвса; КСК – кожно-слизистый кандидоз; АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; рТТГ – рецептор тиреотропного гормона; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IAA – антитела к инсулину; IA2 – тирозинфосфатаза; ZnT8 – транспортер цинка 8; ИФН-ω – интерферон-ω; не иссл. – не исследовался; НВ – не выполнено[48].

[47] Методом иммуноферментного анализа и с использованием клеточной культуры HEK-blue.
[48] По техническим причинам.

3.4.2. Результаты исследования уровня антител методом иммуноферментного анализа

Результаты иммунологического исследования методом ИФА представлены в Таблицах 44 (АТ, специфичных для АЗЩЖ) и 45 (АТ, специфичных для аутоиммунных форм СД).

Таблица 44 – Результаты исследования антител, специфичных для аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, методом иммуноферментного анализа

Группа											**p**
1 (АПС-1)		**2 (АНН изолированная и в составе АПС-2)**			**3 (Эндокринные аутоиммунные заболевания)**			**4 (Неаутоиммунные эндокринные заболевания)**		**5 (УЗ)**	
n = 18		**n = 30**			**n = 59**			**n = 71**		**n = 28**	
С АИТ	**Без АИТ**	**+ АИТ**	**+ БГ**	**Без АИТ/БГ**	**АИТ**	**БГ**	**Прочие**	**ЗЩЖ**	**Прочие**		
n = 5	**n = 13**	**n = 18**	**n = 5**	**n = 7**	**n = 17**	**n = 15**	**n = 27**	**n = 20**	**n = 51**		
Антитела к тиреоидной пероксидазе, n (%)*											
8 (44)		23 (77)			31 (53)			5 (7)		0	***< 0,001*****[49]
5 (100)	3 (23)	14 (78)	5 (100)	4 (57)	16 (94)	7 (47)	8 (30)	4 (20)	1 (2)		***0,001*****[50]

[49] $p_{1-4} = p_{1-5} = p_{2-4} = p_{2-5} = p_{3-4} = p_{3-5}$ ***< 0,001***

[50] $p_{2-4} = p_{2-5} = p_{3-4} < 0{,}001$; p_{3-5} = ***0,001***

Продолжение Таблицы 44

Группа											p
1 (АПС-1)		**2 (АНН изолированная и в составе АПС-2)**			**3 (Эндокринные аутоиммунные заболевания)**			**4 (Неаутоиммунные эндокринные заболевания)**		**5 (УЗ)**	
n = 18		**n = 30**			**n = 59**			**n = 71**		**n = 28**	
С АИТ	**Без АИТ**	**+ АИТ**	**+ БГ**	**Без АИТ/БГ**	**АИТ**	**БГ**	**Прочие**	**ЗЩЖ**	**Прочие**		
n = 5	**n = 13**	**n = 18**	**n = 5**	**n = 7**	**n = 17**	**n = 15**	**n = 27**	**n = 20**	**n = 51**		
Антитела к тиреоглобулину, n (%)*											
5 (28)		16 (53)			17 (29)			2 (3)		0	***< 0,001*****[51]
4 (80)	1 (8)	11 (61)	1 (20)	4 (57)	10 (59)	5 (33)	2 (7)	1 (5)	1 (2)		***< 0,001*****[52]
Антитела к рецептору тиреотропного гормона, n (%)*											
0		1 (3)			5 (9)			0		0	0,112**
0	0	0	1 (20)	0	0	5 (33)	0	0	0		-

*превышения РИ уровня АТ

** Сравнение групп 1-5; в сносках приведен анализ post hoc. Тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 = 0,010 (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез). Для попарных сравнений: тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 = 0,001 (после применения поправки Бонферрони: 10 сравнений). Полужирным и курсивным шрифтами выделены статистически значимые различия.

*** Сравнение групп 1 (без АИТ), 2 (без АИТ/БГ), 3 (прочие), 4 (прочие), 5; в сносках приведен анализ post hoc. Тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 = 0,010 (после применения поправки Бонферрони: 5 гипотез). Для попарных сравнений: тест Хи-квадрат и Хи-

[51] $p_{2-4} = p_{2-5} = p_{3-4} = p_{3-5}$ < ***0,001***

[52] $p_{2-4} = p_{2-5}$ < ***0,001***

квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 = 0,001 (после применения поправки Бонферрони: 10 сравнений). Полужирным и курсивным шрифтами выделены статистически значимые различия.

Примечания: АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; АИТ – аутоиммунный тиреоидит; БГ – болезнь Грейвса; ЗЩЖ – заболевания щитовидной железы; УЗ – условно здоровые; РИ – референсный интервал.

Таблица 45 – Результаты исследования антител, специфичных для аутоиммунного сахарного диабета, методом иммуноферментного анализа

Группа									**p**
1 (АПС-1)		**2 (АНН изолированная и в составе АПС-2)**		**3 (Эндокринные аутоиммунные заболевания)**		**4 (Неаутоиммунные эндокринные заболевания)**		**5 (УЗ)**	
n = 18		**n = 30**		**n = 59**		**n = 71**		**n = 28**	
С СД1/LADA	**Без СД1/LADA**	**+ СД1/LADA**	**Без СД1/LADA**	**СД1/LADA**	**Прочие**	**СД2**	**Прочие**		
n = 1	**n = 17**	**n = 5**	**n = 25**	**n = 29**	**n = 30**	**n = 18**	**n = 53**		
Антитела к глутаматдекарбоксилазе, n (%)*									
6 (33)		2 (7)		10 (17)		1 (1)		2 (7)	***0,001****[53]
1 (100)	5 (29)	1 (20)	1 (4)	6 (21)	4 (13)	0	1 (2)		0,007***
Антитела к островковым клеткам поджелудочной железы, n (%)*									
6 (33)		2 (7)		5 (8)		3 (4)		4 (14)	0,005**
1 (100)	5 (29)	1 (20)	1 (4)	3 (10)	2 (7)	1 (6)	2 (4)		0,016***

[53] $p_{1-4} = p_{3-4}$ < ***0,001***

Продолжение Таблицы 45

Группа									**p**
1 (АПС-1)		**2 (АНН изолированная и в составе АПС-2)**		**3 (Эндокринные аутоиммунные заболевания)**		**4 (Неаутоиммунные эндокринные заболевания)**		**5 (УЗ)**	
n = 18		**n = 30**		**n = 59**		**n = 71**		**n = 28**	
С СД1/LADA	**Без СД1/LADA**	**+ СД1/LADA**	**Без СД1/LADA**	**СД1/LADA**	**Прочие**	**СД2**	**Прочие**		
n = 1	**n = 17**	**n = 5**	**n = 25**	**n = 29**	**n = 30**	**n = 18**	**n = 53**		
Антитела к инсулину, n (%)*									
1 (6)		1 (3)		4 (7)		2 (3)		0	0,586**
0	1 (6)	1 (20)	0	2 (7)	2 (7)	1 (6)	1 (2)		0,382***
Антитела к тирозинфосфатазе, n (%)*									
2 (11)		5 (17)		12 (20)		2 (3)		2 (7)	0,023**
1 (100)	1 (6)	0	5 (20)	9 (31)	3 (10)	0	2 (4)		0,193***
Антитела к транспортеру цинка, n (%)*									
3 (17)		7 (23)		22 (37)		7 (10)		3 (11)	***0,002*****[54]
1 (100)	2 (12)	2 (40)	5 (20)	18 (62)	4 (13)	0	7 (13)		0,892***

*превышения РИ уровня АТ

** Сравнение групп 1-5; в сносках приведен анализ post hoc. Тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 = 0,005 (после применения поправки Бонферрони: 10 гипотез). Для попарных сравнений: тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 =

[54] p_{3-4} < ***0,001***

0,001 (после применения поправки Бонферрони: 10 сравнений). Полужирным и курсивным шрифтами выделены статистически значимые различия.

*** Сравнение групп 1 (без СД1/LADA), 2 (без СД1/LADA), 3 (прочие), 4 (прочие), 5. Тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый p_0 = 0,005 (после применения поправки Бонферрони: 10 гипотез).

Примечания: АТ – антитела; АПС-1 – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; АПС-2 – аутоиммунный полигландулярный синдром 2 типа; АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность; УЗ – условно здоровые; СД1 – сахарный диабет 1 типа; LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых; СД2 – сахарный диабет 2 типа; РИ – референсный интервал.

3.4.3. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа

3.4.3.1. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа в детекции органо-специфических антител

Для определения чувствительности и специфичности мультиплексного анализа в выявлении органо-специфических АТ к ТГ, ТПО, P450c21, GAD, IA2 и ICA за истинноположительные и истинноотрицательные результаты принимались, соответственно, положительные и отрицательные результаты ИФА (кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик тестов представлены в Таблице 46). Точность метода мультиплексного иммуноанализа при определении органо-специфических АТ составляла от 89% до 98% (Таблица 47). Нежелательные последствия выполнения индексного или референсного тестов отсутствовали.

Таблица 46 – Кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик мультиплексного иммуноанализа в детекции органоспецифических антител

АТ-P450c21	**ИФА +**	**ИФА -**
Мультиплексный иммуноанализ +	30 ИП	9 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	13 ЛО	154 ИО
АТ-GAD	**ИФА +**	**ИФА -**
Мультиплексный иммуноанализ +	16 ИП	2 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	4 ЛО	184 ИО
IA2	**ИФА +**	**ИФА -**
Мультиплексный иммуноанализ +	17 ИП	0 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	5 ЛО	184 ИО
ICA	**ИФА +**	**ИФА -**
Мультиплексный иммуноанализ +	18 ИП	8 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	2 ЛО	178 ИО
АТ-ТГ	**ИФА +**	**ИФА -**
Мультиплексный иммуноанализ +	35 ИП	8 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	3 ЛО	160 ИО

Продолжение Таблицы 46

АТ-ТПО	**ИФА +**	**ИФА -**
Мультиплексный иммуноанализ +	57 ИП	13 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	9 ЛО	127 ИО
Все органоспецифические АТ (АТ-Р450с21; АТ-GAD; АТ-IA2; ICA; АТ-ТГ; АТ-ТПО)	**ИФА +**	**ИФА -**
Мультиплексный иммуноанализ +	173 ИП	40 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	36 ЛО	987 ИО

Примечания: «+» – положительный результат; «-» – отрицательный результат; АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза; ТПО – тиреоидная пероксидаза; ТГ – тиреоглобулин; GAD – глутаматдекарбоксилаза; ICA – антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IA2 – тирозинфосфатаза; ИФА – иммуноферментный анализ; ИП – истиннположительный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ИО – истинноотрицательный результат.

Таблица 47 – Диагностическая эффективность мультиплексного анализа в выявлении органо-специфических антител

АТ (n = 206)	**Se, 95% ДИ**	**Sp, 95% ДИ**	**Ac, 95% ДИ**
АТ-Р450с21	70% [58%; 79%]	95% [91%; 97%]	89% [84%; 93%]
АТ-GAD	80% [62%; 88%]	99% [97%; 100%]	97% [94%; 99%]
АТ-IA2	77% [55%; 92%]	100% [98%; 100%]	98% [94%; 99%]
ICA	90% [70%; 98%]	96% [94%; 97%]	95% [91%; 97%]
АТ-ТГ	92% [81%; 98%]	95% [93%; 97%]	95% [90%; 97%]
АТ-ТПО	86% [78%; 92%]	91% [87%; 94%]	89% [84%; 93%]
Общие	83% [78%; 87%]	96% [95%; 97%]	94% [92%; 95%]

Примечания: АТ – антитела; Р450с21 – 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.

3.4.3.2. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа в детекции антител к интерферону-ω, интерферону-α-2a и интерлейкину-22

Флуоресцентное изображение биочипа после анализа сыворотки пациента с АПС-1 представлено на Рисунке 28. Из 18 пациентов с АПС-1, у 16 с помощью биочипов был выявлен

характерный триплет АТ (ИФН-ω + ИФН-α-2а + ИЛ-22) (Рисунок 29). У двух пациентов с АПС-1 (№12 и №17) были определены только АТ к ИФН-ω и ИФН-α-2а. Также, примечательно, что у одного пациента (№8) выявлены положительные АТ к ИФН-ω, но с нормализованным сигналом (5,2) лишь ненамного выше порогового уровня (рассматривался как истиннположительный результат).

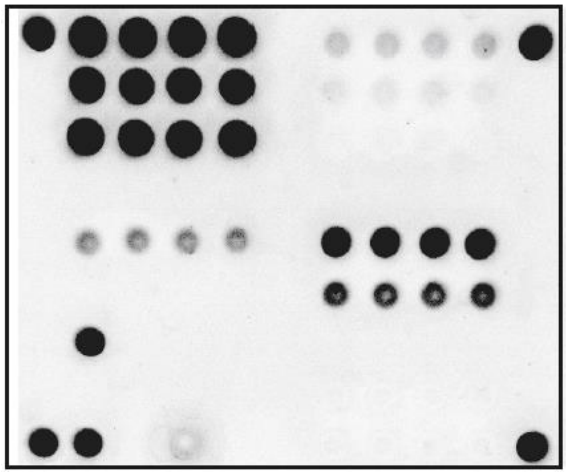


Рисунок 28 – Флуоресцентное изображение биочипа после анализа сыворотки пациента с аутоиммунным полигландулярным синдромом 1 типа

Примечание: у пациента, по данным мультиплексного анализа, выявлены антитела к интерферону-ω, интерферону-α-2а, интерлейкину-22, 21-гидроксилазе, глутаматдекарбоксилазе, тиреоглобулину, тиреоидной пероксидазе.

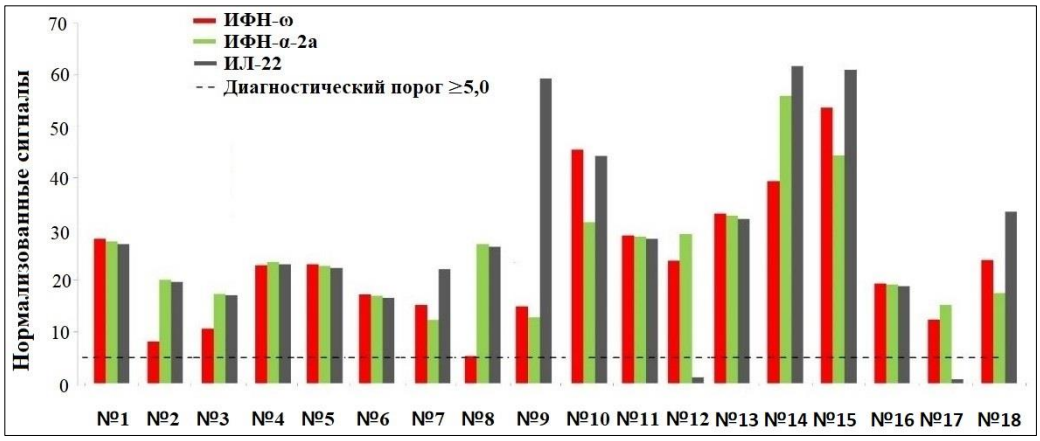


Рисунок 29 – Нормализованные сигналы для антител к интерферону-ω, интерферону-α-2а и интерлейкину-22 в образцах сывороток пациентов с аутоиммунным полигландулярным синдромом 1 типа (n = 18), по данным мультиплексного анализа

Примечания: ИФН-ω – интерферон-ω; ИФН-α-2а– интерферон-α-2а; ИЛ-22 – интерлейкин-22.

Среди 188 образцов от пациентов из групп сравнения, не имеющих диагностированного АПС-1, превышение порогового значения 5,0 для АТ к ИФН-ω, ИФН-α-2а и/или ИЛ-22 было зафиксировано в трех образцах в группе 4. Генетическое тестирование на наличие мутаций в гене *AIRE* для данных пациентов не проводилось. Для образца №87 от пациента (женщина, 56 лет) с диагностированным первичным гиперпаратиреозом и многоузловым зобом были выявлены повышенные АТ к ИЛ-22, для пациента №147 (женщина, 45 лет) с генетически доказанным синдромом МЭН-1 (первичный гиперпаратиреоз; множественные инсулиномы, нефункционирующие опухоли поджелудочной железы, гастриномы 12-перстной кишки; карциноиды легких, мультифокальные гормонально-неактивные образования обоих надпочечников, гиперпролактинемия) были выявлены АТ к ИФН-α-2а. В образце пациента №56 были выявлены АТ к ИФН-ω и ИФН-α-2а, при этом АТ к ИЛ-22 определены не были. У данного пациента (мужчина, 70 лет) диагностирована 1-НН неаутоимунного генеза вследствие впервые выявленной лимфомы надпочечников, что подтверждено данными КТ, а также нормальным уровнем АТ к Р450с21. Других патологий выявлено не было.

Для ряда образцов АТ к ИФН или ИЛ-22 были выявлены в низком титре ≥ 2,0, но не превышающим порог ≥ 5,0. Однако, ни в одном образце от пациентов из групп сравнения не были выявлены триплеты АТ к ИФН-ω + ИФН-α-2а + ИЛ-22. Таким образом, метод характеризуется высокой диагностической точностью (Таблицы 48; 49). Нежелательные последствия выполнения индексного или референсного тестов отсутствовали.

При сравнении мультиплексного иммуноанализа с HEK-blue cells assay оба метода продемонстрировали сопоставимую высокую диагностическую точность в отношении определения АТ-ИФН-ω (Таблицы 50; 51, Рисунок 30).

Таблица 48 – Кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик мультиплексного иммуноанализа в детекции антител к интерферону-ω, интерферону-α-2а и интерлейкину-22

АТ-ИФН-α	**АПС-1 +**	**АПС-1 -**
Мультиплексный иммуноанализ +	18 ИП	2 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	0 ЛО	186 ИО
АТ-ИФН-ω	**АПС-1 +**	**АПС-1 -**
Мультиплексный иммуноанализ +	18 ИП	1 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	0 ЛО	187 ИО

Продолжение Таблицы 48

АТ-ИЛ-22	**АПС-1 +**	**АПС-1 -**
Мультиплексный иммуноанализ +	16 ИП	1 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	2 ЛО	187 ИО
2 из 3 АТ (к ИФН-ω, ИФН-α, ИЛ-22)	**АПС-1 +**	**АПС-1 -**
Мультиплексный иммуноанализ +	18 ИП	1 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	0 ЛО	187 ИО
3 из 3 АТ (к ИФН-ω, ИФН-α, ИЛ-22)	**АПС-1 +**	**АПС-1 -**
Мультиплексный иммуноанализ +	16 ИП	0 ЛП
Мультиплексный иммуноанализ -	2 ЛО	188 ИО

Примечания: «Мультиплексный иммуноанализ +» – положительный результат мультиплексного иммуноанализа; «Мультиплексный иммуноанализ -» – отрицательный результат мультиплексного иммуноанализа; «АПС-1 +» – подтвержденный аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; «АПС-1 -» – отсутствие аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа; АТ – антитела; ИФН-ω – интерфрон-ω; ИФН-α – интерфрон-α; ИЛ-22 – интерлейкин-22; ИП – истиннположительный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ИО – истинноотрицательный результат.

Таблица 49 – Диагностическая эффективность исследования антител к интерферону-ω, интерферону-α-2а и интерлейкину-22 методом мультиплексного анализа на гидрогелевом биочипе

АТ (n = 206)	**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 (к 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%]

Примечания: АТ – антитела; ИФН-ω – интерфрон-ω; ИФН-α – интерфрон-α; ИЛ-22 – интерлейкин-22; Se – чувствительность; ДИ – доверительный интервал; Sp – специфичность; Ac – точность.

Таблица 50 – Кросс-табуляции частот для расчета операционных характеристик HEK-blue cells assay в детекции антител к интерферону-ω

Антитела к интерферону-ω (n = 205)	**АПС-1 +**	**АПС-1 -**
HEK-blue cells assay +	16 ИП	0 ЛП
HEK-blue cells assay -	1 ЛО	188 ИО

Примечания: «HEK-blue cells assay +» – положительный результат HEK-blue cells assay; «HEK-blue cells assay -» – отрицательный результат HEK-blue cells assay; «АПС-1 +» – подтвержденный аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа; «АПС-1 -» – отсутствие аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа; АТ – антитела; ИП – истиннположительный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ИО – истинноотрицательный результат.

Таблица 51 – Сравнительный анализ диагностической эффективности исследования антител к интерферону-ω методами HEK-blue cells assay и мультиплексного анализа

Показатели	**HEK-blue cells assay**	**Мультиплексный анализ на гидрогелевом биочипе**
	n = 205	**n = 206**
Se, 95% ДИ	94% [71%; 100%]	100% [82%; 100%]
Sp, 95% ДИ	100% [98%; 100%]	100% [98%; 100%]
Ac, 95% ДИ	100% [97%; 100%]	100% [97%; 100%]
AUC, 95% ДИ	97% [91%; 100%]	100% [99%; 100%]
Стандартная ошибка	0,029	0,003
p	< 0,001	< 0,001

Примечания: Se – чувствительность; ДИ – доверительный интервал; Sp – специфичность; Ac – точность; AUC – area under the curve.

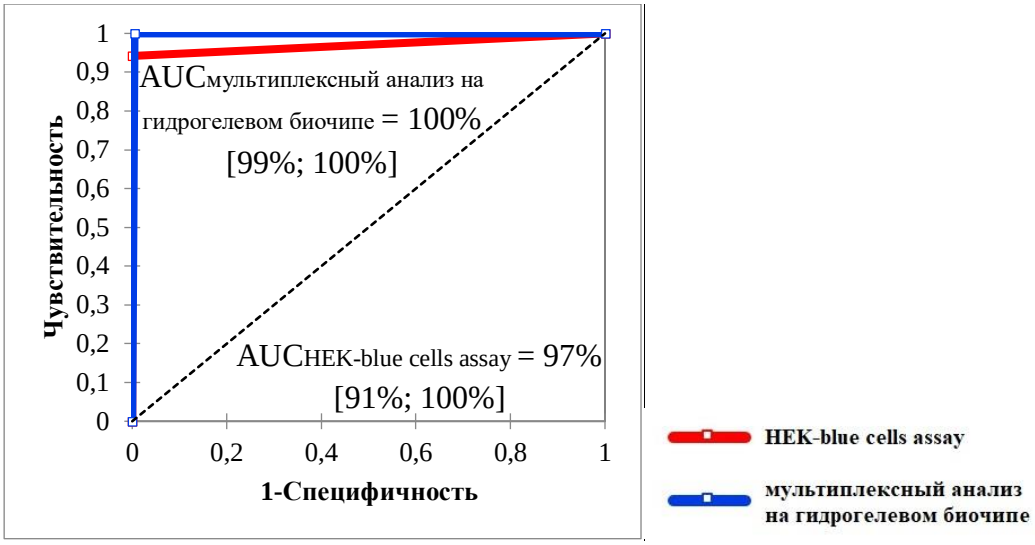


Рисунок 30 – ROC-кривые соотношения чувствительность/специфичность определения антител к интерферону-ω методами HEK-blue cells assay (n = 205) и мультиплексного анализа на гидрогелевом биочипе (n = 206)

Примечание: AUC – area under the curve.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

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

4.1.1. Клиническая характеристика обследованных лиц

Возраст манифестации заболевания у пациентов в нашем исследовании сопоставим с показателями в других работах (в среднем 20-50 лет) [3]. В нашем исследовании так же, как и по данным литературы [3; 110], у пациентов с АНН при распределении по половому признаку отмечается преобладание женщин. Однако, описанная выборка (соотношение 4,4:1) отличается от выборок других исследователей (так, по данным Betterle C. и соавт. (2002) [26], соотношение женщин и мужчин составляет 1,7:1, а по данным Ghaderi M. и соавт. (2006) [111] – 1:0,83).

Согласно полученным данным, изолированная АНН отмечается только в 24% случаев. В 19% случаев АНН развивается в рамках АПС-1, и в 57% - в рамках АПС-2. Таким образом, частота АНН в составе АПС в нашем исследовании превышает таковую, по данным литературы (50% [3; 112]). Мы предполагаем, что эти данные отражают настороженность врачей в отношении возможности развития сопутствующих АИЗ и, соответственно, рост их выявляемости.

В составе АПС-1 наиболее частыми сопутствующими АИЗ ожидаемо являются гипопаратиреоз и КСК, реже из эАИЗ – ГГ, а из неэндокринных АИЗ – аутоиммунный гастрит/гастродуоденит и алопеция. Согласно данным Garelli S. и соавт., проанализировавших большую (n = 568) когорту пациентов с АПС-1 из 20 стран, наиболее часто (после основных компонентов синдрома) из АИЗ развиваются ГГ и первичный гипотиреоз в исходе АИТ, а также дисплазия зубной эмали, аутоиммунное поражение кишечника и алопеция [113]. Высокая частота дисплазии зубной эмали при АПС-1 подтверждена и в другой работе [114]. Несоответствие данных в отношении неэндокринных АИЗ, возможно, обусловлено отсутствием активного скрининга большинства из них.

В составе АПС взрослых (АПС-2-4) наиболее частой сопутствующей эндокринной аутоиммунной патологией является первичный гипотиреоз в исходе АИТ, реже СД1, неэндокринной – аутоиммунный гастрит/гастродуоденит и витилиго, что соответствует литературным данным [115]. Первичный гипотиреоз в исходе АИТ являлся наиболее частой сопутствующей эндокринной аутоиммунной патологией и в общей когорте пациентов. При исключении КСК, наиболее частой неэндокринной аутоиммунной патологией в общей когорте

является аутоиммунный гастрит/гастродуоденит. Приведенные результаты соответствуют данным других исследователей [112].

При отсутствии как АЗЩЖ, так и СД1/LADA носительство АТ-маркеров аутоиммунных форм нарушений углеводного обмена/к ткани ЩЖ отмечалось в 62% случаев: при АПС-2 – в 80% случаев, при АПС-1 – в 50% случаев и при изолированной АНН – в 66% случаев. Наиболее часто (в 46% случаев) выявлялись АТ-ТПО, реже (в 14% случаев) ICA, затем (по 12% случаев) – АТ-ТГ, AT-GAD, AT-ZnT8; AT-IA2 (6%) и IAA (4%). При АПС-2 наиболее часто обнаружено повышение АТ-ТПО и АТ-ТГ (по 40% случаев), при АПС-1 – к ТПО, GAD, ICA (по 31% случаев), при изолированной АНН – к ТПО (52% случаев). Полученные результаты отличаются от данных Betterle C. и соавт. [26], которые выявили носительство АТ при АПС-1 в 65% случаев, при АПС-2, так же, как и при АПС-4 и изолированной АНН – в 50% случаев, однако авторы не сообщают о спектре исследованных АТ. В работе, включавшей 492 пациентов с АНН [116], авторы уточняют, что носительство антитиреоидных АТ при отсутствии нарушений функции ЩЖ у пациентов с АПС-1 встречалось в 12,5% случаев (по нашим данным, АТ-ТПО – в 28% случаев, к ТГ – в 11% случаев), с АПС-2 – в 20,8% случаев (по нашим данным, АТ-ТПО – в 50% случаев, к ТГ – в 33% случаев). Носительство АТ к GAD и ICA без нарушений углеводного обмена, по данным авторов, отмечается у 36,1% пациентов с АПС-1 и 11,5% пациентов с АПС-2 (в нашем исследовании эти показатели составляют в отношении как GAD, так и ICA 28% при АПС-1 и 2% при АПС-2). Важно отметить, что авторы относили к изолированной АНН пациентов без какого-либо (как эндокринного, так и неэндокринного) манифестного/субклинического АИЗ и носительства АТ (за исключением АТ-маркеров болезни Аддисона). Мы же, исходя из определения АПС (первичное аутоиммунное поражение ≥ 2 периферических эндокринных желез [3]), пациентов с носительством АТ к ткани ЩЖ/маркеров аутоиммунного поражения островкового аппарата поджелудочной железы относили к изолированной АНН. Однако, в случае манифестации у этих больных других эАИЗ, они впоследствии будут иметь диагноз АПС-2.

4.1.2. Исследование диагностической эффективности анализа крови на антитела к 21-гидроксилазе при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Настоящая работа является одной из самых масштабных в России по количеству включенных взрослых пациентов, которым проведено определение уровня АТ к P450c21. В отличие от Betterle C. и соавт. (2002) [26], которые обнаружили повышение данного показателя только у 81% больных АНН, мы выявили положительные АТ у 94% пациентов с манифестной

АНН. Более того, повышение АТ к P450c21 обнаружено у больных с лАНН и у пациентов без признаков НН, по данным гормональных анализов крови. Данные больные требуют тщательного динамического наблюдения, так как носительство АТ к P450c21 может являться предиктором развития АНН. Таким образом, можно сделать вывод о том, что определение АТ к P450c21 является высокочувствительным методом диагностики АНН.

Важно отметить, что в настоящем исследовании впервые проведен анализ чувствительности исследования АТ к P450c21 методом ИФА во взрослой когорте пациентов. Так, в более ранних работах данное исследование выполнялось при помощи методов Вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, иммунофлуоресценции [8; 26].

Мы, так же, как и Betterle C. и соавт. (2002) [26], обнаружили уменьшение уровня АТ к P450c21 со временем, однако при разделении на группы значимая корреляция сохранялась только для пациентов с АПС-1. Наиболее вероятно, отсутствие значимой корреляции уровня АТ к P450c21 с продолжительностью АНН в группах 1a и 1c объясняется тем, что в наше исследование было включено небольшое число пациентов с изолированной АНН и АНН в составе АПС-2 и большой длительностью приема глюкокортикоидов. Необходимо также отметить, что уровень АТ к P450c21 при АПС-1 значимо ниже по сравнению как с пациентами с АПС-2, так и с пациентами с изолированной АНН, однако длительность заболевания в группах значимо не отличалась. Наиболее вероятно, это обусловлено разным патогенезом: нарушение центральной ИТ при АПС-1 и периферической ИТ – при АПС-2 и изолированной АНН. Так, при нарушении центральной ИТ аутореактивные клоны лимфоцитов эффективно элиминируются механизмами периферической ИТ, соответственно, продукция АТ снижается.

Таким образом, с учётом высокой чувствительности и +PV, исследование АТ к P450c21 методом ИФА может быть внедрено в клиническую практику с целью диагностики аутоиммунного генеза 1-НН, однако при большой длительности заболевания возможно получение ложноотрицательных результатов.

4.1.3. Уровень антител к 21-гидроксилазе у пациентов без установленного диагноза аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Носительство АТ к P450c21 выявлено у 3% пациентов группы 2 с АИЗ. Полученные данные по распространенности носительства АТ к P450c21 отличаются от результатов Betterle C. и соавт. (1997) [117], которые обнаружили АТ у 43 из 8840 пациентов с АИЗ (0,5%). Наиболее вероятно, это обусловлено разными методами иммунологического исследования (в исследовании

Betterle C. и соавт. применялся метод SDS-PAGE (электрофореза в додецилсульфате натрия в полиакриламидном геле)).

По результатам нашего исследования, длительность постановки правильного диагноза АНН в группе 1 составляет 0,8 [0,0; 2,0] лет. Данный показатель сопоставим с результатами исследования, проведенного в Польше [118]: 9,1 ± 3,5 месяцев у пациентов с адреналовым кризом на момент диагностики и 5,8 ± 2,8 месяцев у пациентов без адреналового криза на момент диагностики. Необходимо отметить, что по полученным нами данным, до постановки правильного диагноза в 24% случаев пациенты переносили аддисонические кризы (в 8% случаев – неоднократно) и в 14% – получали патогенетически необоснованное лечение. В то же время, проведенный нами активный скрининг АНН путем определения АТ к P450c21 позволил своевременно диагностировать заболевание на латентной стадии, начать лечение и разработать план дальнейшего наблюдения.

Мы не обнаружили в настоящем исследовании корреляции между уровнем АТ к P450c21 и гормонов, отражающих функцию коры надпочечников, на ранних стадиях АНН. С учётом небольшого числа пациентов с ранними стадиями АНН, однозначных выводов сделать нельзя, требуется накопление данных. Необходимо отметить, что ранее коррелляция уровня АТ к P450c21 с уровнем гормонов, отражающих функцию коры надпочечников, на потенциальной и латентной стадиях АНН не оценивалась. В работе Laureti S. и соавт. проведено сравнение уровня АТ к P450c21 на разных стадиях АНН, получена значимая разница (увеличение уровня АТ по мере прогрессирования заболевания) [27]. Однако в нашем исследовании подобный анализ не проводился, в связи с несопоставимыми по численности группами.

По нашим данным, в 39% случаев (95% ДИ [30%; 48%]) развитию АНН предшествовала манифестация прочих АИЗ (в 15%, 95% ДИ [9%; 23%] – множественных). Кроме того, именно в группе 2 (пациенты с аутоиммунными патологиями при отсутствии диагностированной АНН на момент включения в исследование) выявлено повышение уровня АТ к P450c21. В 50% случаев у пациентов с ранней АНН на момент выявления АТ к P450c21 манифестировало, по крайней мере, два других эАИЗ. Таким образом, наши данные подтвердили целесообразность рассмотрения вопроса о проведении скрининга АНН в первую очередь именно в когорте больных с другими АИЗ (особенно с множественными), которые относятся к группе риска [27]. Eisenbarth G. S. и соавт. (2004) [34] также рекомендуют проведение скрининга у членов семьи первой степени родства с АИЗ, особенно в рамках АПС. Более того, так как АТ могут появиться в любом возрасте, целесообразно проводить повторный скрининг у тех лиц, у которых АТ изначально были отрицательными.

Необходимо отметить, что полученные нами данные не позволяют рекомендовать скрининг АНН при неэндокринных АИЗ, так как в данной группе повышение АТ к P450c21 не зафиксировано. Однако, с учётом небольшого объема выборки в группе 2d в настоящем исследовании, а также общих звеньев патогенеза АИЗ в рамках феномена полиаутоиммунности, необходимо рассмотрение вопроса об определении АТ к P450c21 и в когорте пациентов с неэндокринными АИЗ.

Отметим, что в настоящее время однозначных выводов о необходимости включения анализа крови на АТ к P450c21 в скрининг АНН сделать невозможно. Для того, чтобы установить ценность данного метода в раннем обнаружении АНН, требуется дополнительное исследование с проспективным наблюдением с учётом сроков между выполнением анализа и манифестацией заболевания.

С учётом статистически значимой отрицательной корреляции между числом вновь диагностированных случаев АНН и возрастом в группе 1, можно предположить, что риск развития заболевания снижается с возрастом.

4.1.4. Классификация стадий аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

В нашей работе результаты лабораторного исследования пациентов №$1_р$, №$2_р$ и №№$4_р$-$7_р$ не соответствовали ни одной из стадий классификации Betterle C. и соавт. [26]. В связи с чем, мы сделали вывод о необходимости пересмотра данной классификации. С учётом анализа клинико-лабораторных данных диагностированных в нашем исследовании случаев пАНН и лАНН, предложена модифицированная классификация АНН.

В первую очередь, в модифицированную классификацию введены новые параметры – АТ к P450c21 (необходимость указания которых, с учётом патогенеза заболевания, не вызывает сомнений) и ДГЭА-С. В нашей работе анализ уровня ДГЭА-С осуществлялся исключительно у участников женского пола, у которых надпочечники продуцируют большую часть ДГЭА, в отличие от мужчин, у которых также отмечается вненадпочечниковый синтез данного гормона гонадами. Выбор отрезной точки по возрасту основан на выраженном снижении уровня ДГЭА-С после 40 лет [17; 119]. Значимое снижение ДГЭА-С у пациенток с манифестной НН неоднократно сообщалось другими авторами [18; 120]. Однако исследований, направленных на оценку уровня данного гормона на ранних стадиях АНН, ранее не проводилось. Так как, согласно полученным результатам, уровень ДГЭА-С при лАНН отличался от уровня как у пациентов с манифестной АНН, так и от условно здоровых, данный показатель может быть использован в качестве диагностического критерия стадий АНН. При этом подчеркивается, что уровень ДГЭА-

С является именно дополнительным диагностическим критерием (согласно мнению и других исследователей [18; 120]), а его оценку целесообразно проводить только у молодых женщин.

Также, подчеркивается наличие клинических проявлений уже на ранних стадиях заболевания и возможность повышения АКТГ еще на подстадии 1 лАНН (что отмечалось у больных №$2_р$ и №$7_р$) и выявления нормального уровня альдостерона на всех подстадиях лАНН (так же, как и при мАНН, с учётом данных литературы [3]).

Кроме того, приведены показатели кортизола на фоне пробы с инсулиновой гипогликемией (с учётом отсутствия тетракозактида на российском фармацевтическом рынке): < 500 нмоль/л или ≥ 500 нмоль/л. Модифицированная классификация также предусматривает возможность сниженного базального кортизола при адекватном его выбросе в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией, с учётом данных литературы [109].

Суммируя вышесказанное, нами выделены три стадии АНН: потенциальная, латентная (включающая 2 подстадии) и манифестная. При этом на подстадии 1 лАНН отмечается нарушение минералокортикоидной функции, в то время как выброс кортизола в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией составляет ≥ 500 нмоль/л. На подстадии 2 лАНН выброс кортизола в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией составляет < 500 нмоль/л.

Перспективным направлением дальнейших исследований является уточнение отрезных точек для остальных подстадий лАНН (не выполнено в настоящей работе, в связи с крайне низкой распространенностью лАНН; однако, при активном внедрении скрининга ожидается увеличение выявляемости данной группы больных). Кроме того, требуется оценка возможности применения модифицированной классификации в отношении 1-НН неаутоиммунного генеза.

4.1.5. Оценка качества жизни при ранних стадиях аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

О сниженном качестве жизни пациентов с мАНН [121; 122], в т.ч. на фоне адекватной заместительной терапии [5], сообщалось в литературе. Однако при лАНН качество жизни ранее не оценивалось.

Согласно полученным результатам оценки качества жизни у пациентов с латентной стадией АНН, на фоне лечения отмечается значимое улучшение показателей РН и МН. Таким образом, эти данные свидетельствуют в пользу того, что заместительная терапия минералокортикоидом должна быть инициирована с подстадии 1 лАНН, а глюкокортикоидом – с подстадии 2 лАНН. В отношении момента инициации заместительной терапии глюкокортикоидом наше мнение согласуется с мнением Younes N. и соавт. [33].

С учётом полученных данных, нами разработан алгоритм диагностики и лечения ранних стадий АНН. Перспективным направлением дальнейших исследований является оценка наиболее оптимальной суточной дозы препаратов глюкокортикоидов и минералокортикоидов при лАНН. Также, актуально определение периодичности и алгоритма наблюдения за пациентами с пАНН.

4.1.6. Ограничения исследования

В настоящем исследовании не удалось уточнить стадию АНН у части пациентов группы 2 с повышенными АТ к Р450с21. Это обусловлено тем, что сыворотка для иммунологического исследования анализировалась через некоторое время после забора крови, когда пациенты, проживающие, в большинстве случаев, в регионах России, не имели возможности или отказывались приехать в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» для повторного обследования и уточнения стадии АНН. Таким образом, предложения по модификации классификации АНН и алгоритму диагностики и лечения ранних стадий заболевания внесены на основании обследования небольшой когорты обследованных лиц. Однако, проведение масштабных эпидемиологических исследований для оценки распространенности пАНН и лАНН, накопления данных о клинико-анамнестических и лабораторных особенностях данной группы больных является многообещающим направлением для дальнейшей работы.

4.2.Механизмы нарушений иммунной толерантности при первичной надпочечниковой недостаточности

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

4.2.1.1. Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro*

Отсутствие нарушения дифференцировки Breg *in vitro*, несмотря на снижение содержания *in vivo,* при АПС-2 и изолированной АНН свидетельствует о том, что выявленные изменения в периферической крови обусловлены воздействием некого фактора в организме пациентов, но не в самой способности В-клеток дифференцироваться в Breg. Выявленная у пациентов группы 1а тенденция к снижению содержания Breg, предположительно, является маркером АИЗ. Однако, содержание Breg при изолированной АНН (в составе группы 1а) и у условно здоровых группы 3 не отличалось. Возможно, потеря значимости обусловлена небольшим числом пациентов с изолированной АНН в группе 1а. Необходимо также отметить, что, значимые отличия в содержании Breg в группах 2 и 3 не выявлены, соответственно, можно сделать вывод об отсутствии влияния заместительной терапии 1-НН на полученные результаты. Также, примечательно, что в группе с АПС-1 отмечался более высокий уровень Breg, по сравнению с условно здоровыми. Это, по нашему мнению, может быть обусловлено компенсаторным повышением уровня Breg в ответ на нарушение центральной ИТ.

Суммируя вышесказанное, в результате проведенного исследования, установлена тенденция к снижению уровня Breg у пациентов с аутоиммунной эндокринопатией, обусловленной нарушением периферической ИТ. Таким образом, снижение Breg в периферической крови может быть предложено в качестве маркера, свидетельствующего об аутоиммунном процессе. Однако определить, является ли снижение Breg причиной нарушения периферической ИТ и инициации аутоиммунного процесса, или же, наоборот, результатом развивающегося АИЗ, невозможно.

С целью исключения влияния на полученные результаты различных факторов, по которым неоднородны группы сравнения, мы провели несколько дополнительных анализов. В частности, высказано предположение о влиянии ИМТ на полученные результаты, с учётом данных García-Hernándeza M. H. и соавт. [123], которые обнаружили снижение уровня Breg у лиц с избыточной массой тела и ожирением по сравнению с лицами с нормальной массой тела.

Соответственно, мы предположили, что снижение Breg у пациентов с АПС-2 и изолированной АНН, может быть обусловлено тенденцией к более высокому ИМТ по сравнению с группой условно здоровых лиц. Отрицательная корреляция содержания Breg с ИМТ действительно выявлена, однако на уровне статистической тенденции и только у пациентов женского пола исключительно в группах 1b и 3. Кроме того, так как показатель ИМТ у мужчин и женщин в группе 1a значимо не отличался, его влияние на полученные результаты может быть исключено.

В отношении возраста в нашем исследовании выявлена корреляция на уровне статистической тенденции исключительно содержания Breg *in vitro* при добавлении активаторов у мужчин с изолированной АНН и в составе АПС-2. Так как показатель возраста между мужчинами и женщинами в группе 1a значимо не отличался, его влияние на полученные результаты также может быть исключено.

При сравнении содержания Breg у лиц женского и мужского пола различия на уровне статистической тенденции выявлены исключительно при 1-НН неаутоиммунного генеза. Таким образом, пол участников исследования также не оказывает влияния на полученные результаты.

При дальнейшем анализе факторов, которые могли оказать влияние на содержание Breg, мы обратили внимание на длительность НН. Так как истинную длительность заболевания (от момента появления АТ к P450c21) оценить практически невозможно, мы оценивали продолжительность приема пациентами препаратов глюкокортикоидов. В нашей выборке статистически значимого отличия в длительности заместительной терапии между группами не отмечалось. В то же время, по уровню АТ к P450c21 выявлено значимое отличие при сравнении групп 1a и 1b. Однако, так как содержание Breg не коррелирует с длительностью НН и уровнем АТ к P450c21 в группах 1a и 1b, можно сделать вывод об отсутствии связи между этими показателями.

По нашему мнению, главным фактором, который мог оказать влияние на содержание Breg, является число сопутствующих АИЗ: как эндокринных, так и неэндокринных. Мы не выявили значимых отличий в содержании Breg у пациентов с АНН группы 1a и разным числом сопутствующих АИЗ, в том числе эАИЗ, однако, при увеличении числа сопутствующих эАИЗ медиана Breg *in vivo* уменьшается. Таким образом, усиление нарушения ИТ (что проявляется увеличением числа сопутствующих эАИЗ) ассоциировано со снижением Breg *in vivo*. Важно отметить, что мы не выявили подобной ассоциации при анализе пациентов не только с эАИЗ, но и с неэндокринными АИЗ. Такой результат может быть обусловлен увеличением содержания Breg с низкой функциональной активностью при неэндокринных АИЗ, о чем сообщали Santaguida M. G. и соавт. [23]. Суммируя вышесказанное, наиболее вероятно, снижение содержания Breg является характеристикой эАИЗ.

Также необходимо отметить относительно высокий уровень Breg как *in vivo*, так и *in vitro* при сочетании АНН с ГГ и относительно низкий уровень Breg как *in vivo*, так и *in vitro* при сочетании АНН с СД1. Данный факт требует дальнейшего изучения. Известно, что как СД1, так и ГГ являются Т-клеточно-опосредованнымы заболеваниями [124; 125]. При этом большинство исследователей сообщают о сниженном уровне Breg при СД1 [126], тогда как при ГГ содержание данных клеток не исследовалось. С другой стороны, необходимо отметить общее эмбриональное происхождение надпочечников и яичников, а также возможность выявления как при АНН, так и при ГГ АТ к ферментам стероидогенеза: 17α-гидроксилазе и ферменту отщепления боковой цепи [127].

При анализе корреляций с уровнем гормонов в группе 3 значимые ассоциации содержания Breg обнаружены только в отношении альдостерона и ренина, что подтверждает данные литературы об их влиянии на иммунную систему [128; 129]. В то же время, корреляции содержания Breg с уровнями кортизола в группе 3 и ДГЭА-С во всех группах не определялось, а корреляция с уровнем АКТГ выявлена исключительно у здоровых мужчин. Не исключается, что отсутствие связи объясняется пульсаторным характером секреции АКТГ [130], а, следовательно, колебанием уровней кортизола и ДГЭА (конвертирующегося затем в ДГЭА-С).

4.2.1.2. Результаты иммунологического исследования пациентов с ранними стадиями аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Нами впервые проведена оценка содержания Breg у пациентов на разных стадиях АНН. При интерпретации результатов важно отметить, что мы провели оценку иммунологических показателей на всех стадиях АНН:

- пАНН – пациент №$3_р$;
- лАНН, подстадия 1 – пациенты №$2_р$, №$7_р$;
- лАНН, подстадия 2 – пациенты №$1_р$ (при первичном обследовании), №$4_р$, №$5_р$;
- мАНН – все пациенты группы 1, а также пациент №$1_р$ при динамическом обследовании.

При оценке результатов иммунологических исследований пациентов на ранних стадиях АНН обращает на себя внимание выраженное снижение Breg *in vivo* у пациентов №$1_р$ и №$5_р$ по сравнению с остальными пациентами как с ранней стадией, так и с манифестной стадией АНН, а также условно здоровыми. При этом у пациента №$1_р$ при прогрессии до манифестной АНН отмечается уменьшение Breg *in vivo*. Примечательно, что у пациента №$2_р$ при первичном исследовании также зафиксирован очень низкий уровень Breg *in vivo*, однако в динамике данный

показатель увеличился на фоне практически 10-кратного снижения уровня АТ к Р450с21 (при этом гормональное обследование через 6 месяцев после диагностики заболевания, напротив, свидетельствует о прогрессировании деструкции коры надпочечников: увеличение уровня АКТГ, снижение уровня альдостерона). В то же время, у больного №$7_р$ содержание Breg значительно повышено, в том числе по сравнению с условно здоровыми.

У единственного пациента в нашем исследовании (№$4_р$) с изолированной лАНН исходно уровень Breg *in vivo* ниже медианы показателя условно здоровых. В динамике отмечается снижение данного показателя на фоне увеличения уровня АТ к Р450с21. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что на этапе индукции аутоиммунного процесса отмечается снижение уровня Breg, которое прогрессирует на фоне усиления нарушения ИТ. С учётом результатов обследования пациента №$4_р$, отмечено, что при манифестной изолированной АНН происходит транзиторное повышение Breg, по сравнению с латентной стадией. Мы предполагаем, что это обусловлено развитием аутоиммунного воспаления, которое, как известно, является стимулятором дифференцировки В-лимфоцитов в Breg.

Дискордантные результаты, полученные у пациентов с ранними стадиями АНН, могут свидетельствовать о волнообразной прогрессии иммунных нарушений на начальных этапах заболевания. Выявление отличий как от условно здоровых, так и от пациентов на манифестной стадии предполагает, что на ранних этапах заболевания происходит активация определенных компонентов иммунной системы, однако затем, по мере разрушения органа-мишени, интенсивность этого процесса снижается.

Также, мы предположили, что изменение содержания Breg *in vivo* может отражать начальные нарушения функции коры надпочечников. Однако значимых корреляций содержания Breg *in vivo* на ранних стадиях АНН с уровнем гормонов, отражающих функцию коры надпочечников (так же, как и АТ к Р450с21) не обнаружено. Необходимо отметить, что, с учётом выявленной связи между содержанием Breg *in vivo* с уровнями альдостерона, ренина и АКТГ в группе 3 и небольшого числа пациентов с ранней АНН, в настоящее время однозначных выводов сделать нельзя, требуется накопление дополнительных данных.

4.2.1.3. Ограничения исследования

Сравниваемые когорты пациентов с АПС-2 (и изолированной АНН) и условно здоровых лиц не сопоставимы по возрасту. Это обусловлено желанием минимизировать количество факторов, потенциально влияющих на Breg, в связи с чем, в группу условно здоровых

включались участники без острых/тяжелых хронических заболеваний, которые в большинстве случаев относились к лицам молодого возраста.

Сравниваемые когорты пациентов с 1-НН неаутоиммунного генеза и 1-НН в рамках АПС-2 не сопоставимы по полу. Это было обусловлено более высокой распространенностью 1-НН в рамках АПС-2 среди женщин. При этом частота встречаемости феохромоцитомы у мужчин и женщин не отличается, в то время как адренолейкодистрофия и врожденная гипоплазия коры надпочечников характеризуются Х-сцепленным типом наследования и, соответственно, развиваются исключительно у мужчин [131; 132].

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

У пациентов с АНН группы 1 среди маркеров генов *TLR2* (s5743708) и *TLR9* (rs352140) не выявлено значимых отличий в распределении генотипов и аллелей. Из двух исследованных полиморфных локусов гена *IL28B* (rs8099917 и rs12979860) ассоциация с риском развития заболевания выявлена только в отношении rs12979860. Так, на уровне статистической тенденции установлено повышение частоты встречаемости гетерозиготного генотипа CT и снижение встречаемости гомозиготного генотипа CC по данному маркеру у пациентов с АНН группы 1. Кроме того, на уровне статистической тенденции в группе 1 по сравнению с группой 2 выявлено преобладание аллеля T полиморфизма rs5743836 гена *TLR9,* тогда как в группе 2 по сравнению с группой 1 – аллеля C этого же полиморфизма. Таким образом, не исключается, что генотип CT по полиморфному локусу rs12979860 гена *IL28B* и аллель T полиморфизма rs5743836 гена *TLR9* являются прогностическими маркерами, повышающими вероятность развития АНН, тогда как генотип CC по полиморфному локусу rs12979860 гена *IL28B* и аллель C полиморфизма rs5743836 гена *TLR9* – выполняют протективную роль при данном заболевании. Сравнительный анализ распределения частот гаплотипов по двум локусам гена *IL28B* (rs8099917 и rs12979860) показал, что CCTT выявлялся чаще на уровне статистической тенденции в группе 2, чем в группе 1. Соответственно, предполагается, что гаплотип CCTT может являться протективным в отношении развития АНН.

В группе 1а сохранялись на уровне статистической тенденции выявленные ранее ассоциации гетерозиготного генотипа CT по маркеру rs12979860 гена *IL28B* и аллелей T и C полиморфизма rs5743836 гена *TLR9.* Таким образом, не исключается, что в российской популяции генотип CT полиморфизма rs12979860 гена *IL28B* и аллель T полиморфизма

rs5743836 гена *TLR9* повышают вероятность развития АНН вследствие нарушения периферической ИТ, тогда как аллель С полиморфизма rs5743836 гена *TLR9* – напротив, снижает.

В группе 1b по сравнению с группой 2 на уровне статистической тенденции чаще встречались генотип CT полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B* (так же, как и в группе 1) и гаплотип CTTT по двум локусам данного гена (rs8099917 и rs12979860). Как известно, АПС-1 является моногенным заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленным мутацией гена *AIRE*. С учётом отличий в клинических проявлениях заболевания даже у членов одной семьи, а также между различными популяциями (так, у иранских евреев КСК и АНН встречаются реже, в то время как у финских пациентов СД1 встречается чаще, чем в других этнических группах), предполагается наличие неких дополнительных факторов, обусловливающих фенотипическую вариабельность АПС-1. Так, в работе Halonen M. и соавт. [133] обнаружена ассоциация некоторых компонентов АПС-1 с определенными аллелями генов HLA II класса. В то же время, изучение распределения генотипов и аллелей полиморфных маркеров других генов при АПС-1 ранее не проводилось. В нашей работе выявлены генетические маркеры, которые, предположительно, могут модулировать клиническое течение АПС-1. Однако для подтверждения данной гипотезы требуется проведение дополнительных исследований.

Таким образом, как в группе 1a, так и в группе 1b определялась тенденция к более высокой частоте генотипа CT полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B* по сравнению с группой 2, в отличие от прочих генетических маркеров. В связи с чем, именно данный генотип может рассматриваться в качестве нового предиктора развития АНН вследствие нарушения периферической ИТ и дополнительного фактора, ассоциированного с заболеванием, обусловленным нарушением центральной ИТ.

Важно отметить, что в связи с отсутствием статистической значимости после поправки на множественность сравнений (в отношении всех изученных в настоящем исследовании генетических маркеров), однозначных выводов сделать нельзя. С учётом немногочисленности выборок, что является ограничением исследования, требуется продолжить накопление и анализ данных на большой когорте пациентов с АНН вследствие нарушения центральной и периферической ИТ как в российской, так и в других популяциях. Отметим, что исследование, направленное на анализ частоты генотипов и аллелей полиморфизмов генов *TLR2, TLR9* и *IL28B* проведены впервые не только в российской популяции, но и во всем мире.

4.3. Кортизол слюны в диагностике надпочечниковой недостаточности

Результаты проведенного исследования подтверждают корреляцию уровня кортизола крови и слюны, что отмечалось и другими авторами [82; 83; 134; 135]. Так же, как и в ранее опубликованной работе [83], выявлены значимые различия в уровне кортизола слюны у пациентов с НН и условно здоровых лиц.

Чувствительность и специфичность анализа кортизола утренней слюны при НН в нашем исследовании выше, чем в работе Restituto P. и соавт. [83], что, предположительно, может быть связано с применением авторами метода ИФА. Однако чувствительность исследования кортизола слюны электрохемилюминисцентным методом (при диагностике НН – 40% (специфичность 97%, AUC 0,78), а при подтверждении сохранной функции коры надпочечников – 13% (специфичность 97%, AUC 0,78)) [84] также ниже, чем полученный нами показатель.

В соответствии с результатами нашей работы, применение диагностических порогов, соответствующих референсным значениям, установленным производителем, не позволяет дифференцировать наличие или отсутствие НН. Полученная в настоящем исследовании отрезная точка (8,4 нмоль/л) обладает более высокой чувствительностью и специфичностью. По нашему мнению, данный диагностический порог может в первую очередь применяться для исключения НН, с учётом высокой специфичности.

Согласно полученным нами данным, применение отрезной точки 8,4 нмоль/л позволяет диагностировать, в том числе, и латентную стадию НН с нарушенной глюкокортикоидной функцией. Однако, при этом у одного из пациентов с сохранной функцией пучковой зоны коры надпочечников был бы получен ложноположительный результат. Примечательно, что у данного больного (№$2_р$ Таблицы 13) выявлены начальные изменения, свидетельствующие о нарушении глюкокортикоидной функции (повышение АКТГ при неизмененном выбросе кортизола в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией). Соответственно, не исключается, что снижение св. кортизола слюны может быть даже более ранним признаком нарушения глюкокортикоидной функции, чем недостаточная секреция кортизола в ходе пробы с инсулиновой гипогликемией. Однако, данное предположение требует подтверждения на большой выборке пациентов.

Таким образом, результаты нашего исследования также показали возможность применения анализа кортизола утренней слюны для диагностики ранних стадий НН, однако, с учётом немногочисленности выборки, требуется дальнейшее накопление данных. Необходимо отметить, что исследование кортизола слюны при ранней НН нами выполнено впервые в мире.

С учётом вероятности влияния на результат исследования кортизола слюны техники сбора (ложнозаниженный результат при недостаточно долгом жевании тампона или ложнозавышенный результат при наличии микротравм в полости рта и курении [134]), по нашему мнению, данный тест может применяться как метод второго ряда или как дополнительный анализ в сложных случаях, а также в качестве альтернативы при наличии противопоказаний к пробе с инсулиновой гипогликемией. Необходимо продолжить накопление данных для подтверждения вышеуказанных выводов.

4.3.1. Ограничения исследования

Несмотря на тщательный отбор пациентов и условно здоровых, мы не исключаем наличие у участников микротравм в полости рта, так как для решения вопроса о включение в исследование не требовалось предоставление консультации стоматолога. Данный факт мог оказать влияние на полученные результаты.

4.4. Профилирование сывороточных антител, характерных для эндокринных аутоиммунных заболеваний

4.4.1. Исследование уровня антител методом иммуноферментного анализа

Согласно полученным результатам, при анализе всех включенных в группы 1-5 как у пациентов с АНН в рамках АПС-1, так и у пациентов с АНН другого генеза (так же, как у больных с прочими эАИЗ, включая АИТ), значимо чаще отмечалось повышение АТ к ТПО, по сравнению с УЗ и больными неаутоиммунными эндокринными заболеваниями. Это свидетельствует о высоком риске развития АИТ при АНН (как изолированной, так и в составе АПС-1 и -2) и прочих эАИЗ. Значимые отличия отмечались и в отношении АТ к ТГ, за исключением сравнения пациентов групп 1 и 5, а также 1 и 4, что может быть обусловлено относительно низкой частотой развития АИТ при АПС-1 (28%), по сравнению с АПС-2 (сочетание АНН и АИТ встречалось в 60% случаев). Кроме того, как отмечено выше, АТ к ТГ обнаруживаются реже, чем АТ к ТПО и в популяции пациентов с АИТ в целом [38]. Значимые отличия в частоте повышения АТ к ТПО в группах 2 и 3 по сравнению с группами 4 и 5 свидетельствует о риске манифестации АИТ у пациентов с АНН (изолированной и в составе АПС-2), а также при прочих эАИЗ.

Выявление АТ к ТПО у пациентов с неаутоиммунными заболеваниями ЩЖ в 20% случаев свидетельствует об их частом сочетании с АЗЩЖ. Вместе с тем, у ряда пациентов с АИТ уровень АТ может снижаться по мере увеличения длительности заболевания. Так, в группе 2 при сочетании АНН с АИТ повышение АТ к ТПО зафиксировано только в 78% случаев. Обнаружение повышенного уровня АТ к ТПО и ТГ при БГ также хорошо известно [136].

Повышение АТ-рТТГ в нашем исследовании зафиксировано только у 6 из 20 участников с БГ, что обусловлено компенсацией заболевания у большинства пациентов. Отсутствие высокого уровня АТ-рТТГ у прочих участников без БГ свидетельствует о высокой специфичности данного анализа.

При сочетании АНН с СД1 в группе 2 наиболее часто выявлялось повышение АТ-ZnT8 (40% случаев), так же, как и при СД1 без АНН (62% случаев). Эти результаты соответствуют последним литературным данным в отношении пациентов с СД1 [137]. Обращает на себя внимание обнаружение повышенного уровня АТ-маркеров аутоиммунного поражения поджелудочной железы и при СД2. При анализе анамнестических и клинических данных пациента (№155) группы 4 с незначительным повышением ICA сомнений в наличии неаутоиммунного СД не было: дебют заболевания в 59 лет на фоне избыточной массы тела,

околоцелевые показатели гликемии на фоне таблетированной сахароснижающей терапии. Кроме того, у другого пациента (№38) группы 4 с неаутоиммунным СД выявлено повышение IAA, которые могли сформироваться в ответ на экзогенное введение препаратов инсулина.

Отметим, что далеко не в 100% случаев у больных СД1/LADA выявляется повышение всех специфичных АТ. Так, ни у одного из пациентов с АНН (не в составе АПС-1) в сочетании с СД1 не выявлено повышения АТ к IA2 (вместе с тем, на момент дебюта заболевания эти АТ определяются у 75% пациентов [138]), что может быть объяснено снижением их уровня по мере увеличения длительности СД1/LADA. Наиболее вероятно, снижением уровня АТ со временем объясняется и то, что значимые отличия в частоте выявления показателей, превышающих референсные значения, между группами с СД1 и без данного заболевания обнаружены только в отношении АТ к GAD и ZnT8.

4.4.2. Исследование диагностической эффективности мультиплексного анализа в детекции органо-специфических антител и антител к интерферону-ω, интерферону-α-2a и интерлейкину-22

С учётом высокой точности метода мультиплексного иммуноанализа при определении органо-специфических АТ (89%-98%), разработанный метод может использоваться для их скрининга в крови. В отношении АТ-маркеров СД1 в нашем исследовании показатели чувствительности и специфичности сопоставимы с показателями, полученными Gu Y. и соавт. [99] и Zhao Z. и соавт. [139]. В то же время, полученная нами чувствительность и специфичность метода в выявлении АТ к ТПО и ТГ значительно превышает соответствующие показатели в работе Gu Y. и соавт. [99]. Важно отметить, что АГ P450c21 включен в диагностическую панель для мультиплексного анализа нами впервые.

Результаты нашего исследования продемонстрировали, что доля лиц без АПС-1 с АТ к цитокинам небольшая (2%, 3/188). Более того, мы, так же, как и Meloni A. и соавт. [93], не выявили анти-цитокиновые АТ у пациентов с АПС не 1 типа, в отличие от другого исследования [140]. Несмотря на то, что мы не проводили оценку нейтрализующей способности выявленных АТ к ИФН-ω, ИФН-α-2 и ИЛ-22, полученные результаты позволили нам поставить правильный диагноз у 18/18 пациентов с АПС-1. Более того, детекция характерной триады АТ (АТ-ИФН-ω + АТ-ИФН-α-2 + АТ-ИЛ-22) при помощи биочипа позволила установить диагноз АПС-1 со 100% специфичностью.

У двух пациентов в возрасте 18 лет (№12) и 44 года (№17) с классической триадой АПС-1 и генетически верифицированным диагнозом АТ к ИЛ-22 не выявлены, что описывалось ранее

другими авторами [95]. Мы не обнаружили ассоциации отрицательного результата с ремиссией КСК и длительностью грибковой инфекции.

Формирование АТ у больного №147, предположительно, обусловлено противовирусной терапией, которую он получал по поводу гепатита С за 17 лет до включения в исследование. Данный феномен описан в литературе [141; 142]. Пациент №56 отрицал терапию препаратами ИФН. Данных за наличие миастении gravis и тимомы не получено. Не исключается, что формирование АТ к ИФН у данного пациента является следствием наличия лимфомы. У пациента №87 диагностировано кандидозное поражение мочевых путей, чем, наиболее вероятно, и объясняется обнаружение АТ к ИЛ-22. Другой особенностью больного является расположение эктопированной ткани ОЩЖ в ткани тимуса. Таким образом, не исключается, что у пациента могли сформироваться АТ в результате поражения тимуса, характерные для тимомы.

Так как наше исследование включало пациентов старше 18 лет, полученные данные подтверждают возможность обнаружения АТ к ИФН-ω и ИФН-α-2а во взрослом возрасте, так же, как и в детстве [143], а также сохранения высокого уровня антицитокиновых АТ в течение нескольких десятилетий после манифестации АПС-1 [144]. Несмотря на то, что разработанный метод не позволяет проводить количественную оценку уровня АТ, важно, что уровни сигналов от АТ к ИФН-ω, ИФН-α-2а и ИЛ-22 были значительно выше, по сравнению с сигналами от органо-специфических АТ, что соответствует ранее опубликованным данным [97].

По результатам проведенного анализа, мы также впервые доказали, что HEK-blue cells assay и мультиплексный иммуноанализ на гидрогелевом биочипе являются равноценными высокочувствительными и высокоспецифичными методами определения АТ-ИФН-ω. Ложноотрицательный результат при помощи HEK-blue cells assay выявлен у одного пациента (№7) с распространенной мутацией *AIRE* и классической триадой АПС-1. Необходимо отметить, что методом мультиплексного анализа у данного пациента обнаружены как АТ-ИФН-ω, так и к АТ-ИФН-α-2. Полученный результат не противоречит данным литературы: так, отсутствие АТ-ИФН-ω у пациентов с мутациями в *AIRE* и только одним компонентом АПС-1 (гипопаратиреоз) отмечено в работе Cervato S. и соавт. [145]. Таким образом, определение АТ-ИФН-ω с использованием клеточной культуры HEK-blue является надежным методом диагностики АПС-1. Однако мультиплексный иммуноанализ на гидрогелевом биочипе позволяет также с высокой точностью определять и другие АТ, что представляет собой неоспоримое преимущество при скрининге и диагностике эАИЗ. Дополнительными значительными преимуществами мультиплексного иммуноанализа на гидрогелевом биочипе являются уменьшение трудозатрат и, предположительно, сокращение финансовых затрат.

Метод мультиплексного иммуноанализа на гидрогелевом биочипе для выявления АТ, характеризующих АПС-1, запатентован и является основой для создания тест-системы «АПС-БИОЧИП». Дальнейшая регистрация набора реагентов в Росздравнадзоре как медицинского изделия и его применение в практическом здравоохранении позволит проводить скрининг аутоиммунных эндокринопатий в группе риска и выявлять скомпрометированных пациентов за несколько лет до появления симптомов заболевания. Обследование может быть внедрено в систему диспансеризации группы риска. Тем самым следует ожидать устойчивого социально-экономического эффекта от применения созданной технологии за счет снижения инвалидизации населения и сокращения бюджетных ассигнований на лечение.

Исследований, уточняющих наиболее оптимальную периодичность скрининга эАИЗ на взрослой когорте пациентов, ранее не проводилось. По нашему мнению, такой скрининг целесообразно проводить 1 раз в 5 лет. В отношении поиска АНН, с учётом того, что заболевание является жизнеугрожающим, дополнительное обследование может быть рекомендовано перед плановыми хирургическими вмешательствами или при подготовке к беременности и родам.

4.4.3. Ограничения исследования

В настоящем исследовании отсутствовал референсный лабораторный тест для АТ к ИФН-α и ИЛ-22, что могло оказать влияние на рассчитанные операционные характеристики мультиплексного иммуноанализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первичная надпочечниковая недостаточность относится к числу наиболее тяжелых хронических болезней человека и ассоциирована с риском развития жизнеугрожающего осложнения – аддисонического криза. Сохраняет свою актуальность поиск новых подходов для терапевтического воздействия и предупреждения развития заболевания.

В рамках проведенной научной работы впервые в России осуществлен активный скрининг с целью выявления заболевания на ранних стадиях и своевременной инициации терапии для предупреждения развития аддисонического криза. Результаты настоящего исследования подтвердили обоснованность обследования группы риска (пациентов с аутоиммунными эндокринными заболеваниями и особенно в составе аутоиммунных полигландулярных синдромов) с обязательным определением антител к 21-гидроксилазе. С учётом полученных данных, предложены изменения в классификацию аутоиммунной надпочечниковой недостаточности, которую рекомендовано активно применять в клинической практике. Вместе с тем, целесообразно накопление данных о клинико-лабораторных особенностях ранних стадий заболевания для уточнения и расширения классификации. Требуется также изучение возможности применения предложенной классификации в отношении первичной надпочечниковой недостаточности неаутоиммунного генеза.

Также, впервые в мире обнаружена тенденция к снижению содержания регуляторных В-лимфоцитов при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности, обусловленной нарушением периферической иммунной толерантности. Важно отметить, что изменения в системе регуляторных В-лимфоцитов определяются уже на ранних стадиях болезни Аддисона и не зависят от длительности патологического процесса, заместительной терапии гипокортицизма и уровня антител к 21-гидроксилазе, а также числа сопутствующих аутоиммунных заболеваний. Таким образом, данные клетки могут рассматриваться как перспективные маркеры прогнозирования, ранней диагностики и дифференциальной диагностики аутоиммунной надпочечниковой недостаточности. Актуальной задачей представляется продолжение исследования с целью выявления молекулярных мишеней для таргетного воздействия на регуляторные В-лимфоциты и разработки новых методов лечения.

Впервые в мире исследованы частоты генотипов и аллелей полиморфизмов генов *TLR2, TLR9* и *IL28B* в когорте пациентов с первичной надпочечниковой недостаточностью аутоиммунного генеза. На основании полученных данных генотип CT полиморфизма rs12979860 гена *IL28B* предложен в качестве нового возможного генетического предиктора гипокортицизма, обусловленного нарушением периферической иммунной толерантности, а также

дополнительного фактора, ассоциированного с гипокортицизмом, развившимся вследствие нарушения центральной иммунной толерантности. Необходимо накопление данных для уточнения выявленных ассоциаций, в том числе в других популяциях.

Также, впервые в России предложен диагностический уровень кортизола утренней слюны, позволяющий исключить надпочечниковую недостаточность. Применение данного надежного и безопасного метода является особенно актуальным при наличии противопоказаний к пробе с инсулиновой гипогликемией.

С целью оптимизации алгоритма обследования пациентов с первичной надпочечниковой недостаточностью и прочими эндокринными аутоиммунными заболеваниями разработана диагностическая панель для мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа. Доказана высокая эффективность метода в единовременной детекции как органоспецифических антител, так и антител-маркеров аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа (точность до 100%). Перспективой дальнейших исследований является включение (без существенного изменения стоимости) новых иммунореагентов – белков, для которых, в соответствии с актуальными публикациями, показано участие в патогенезе аутоиммунных полигландулярных синдромов. Такие молекулярные зонды можно валидировать параллельно с широко используемыми в клинике тестами, что позволит получать новые научные результаты. Кроме того, требуется проведение исследований с целью уточнения наиболее оптимальной периодичности скрининга эндокринных аутоиммунных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. В когорте взрослых пациентов в России доказана высокая чувствительность (94%, 95% ДИ [88%; 98%]) и прогностическая ценность положительного результата (100%, 95% ДИ [97%; 100%]) определения методом иммуноферментного анализа антител к 21-гидроксилазе крови в диагностике аутоиммунной надпочечниковой недостаточности.
2. Носительство антител к 21-гидроксилазе обнаружено исключительно в группе риска у пациентов с эндокринными аутоиммунными заболеваниями в 3% (95% ДИ [2%; 5%]) случаев. В 39% случаев (95% ДИ [30%; 48%]) развитию аутоиммунной надпочечниковой недостаточности предшествует манифестация других аутоиммунных заболеваний (эндокринных и неэндокринных), в том числе в 15% случаев (95% ДИ [9%; 23%]) – множественных.
3. Тенденция к снижению содержания регуляторных В-лимфоцитов не связана с нарушением их дифференцировки, но может являться предиктором развития или маркером аутоиммунного процесса при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности вследствие нарушения периферической иммунной толерантности.
4. Пациенты с аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью вследствие нарушения как центральной, так и периферической иммунной толерантности отличаются от условно здоровых лиц тенденцией к более частому носительству генотипа CT полиморфного маркера rs12979860 гена *IL28B*.
5. Исследование кортизола утренней слюны является высокоспецифичным дополнительным методом исключения надпочечниковой недостаточности (специфичность 84%, 95% ДИ [76%; 90%], прогностическая ценность отрицательного результата 85%, 95% ДИ [78%; 91%]).
6. Метод мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа обладает высокой эффективностью в выявлении как маркеров аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа (99%, 95% ДИ [97%; 100%]), так и органо-специфических антител в крови (94%, 95% ДИ [92%; 95%]).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Анализ крови на дегидроэпиандростерон-сульфат рекомендовано внедрить в классификацию аутоиммунной надпочечниковой недостаточности у женщин молодого возраста.
2. Рекомендовано внедрить в клиническую практику модифицированную классификацию аутоиммунной надпочечниковой недостаточности и алгоритм диагностики и лечения ранних стадий заболевания (таблица П2, рисунок П1).
3. Уровень кортизола утренней слюны ≥ 8,4 нмоль/л рекомендован в качестве дополнительного диагностического критерия для исключения надпочечниковой недостаточности.
4. Метод мультиплексного иммуноанализа на гидрогелевом биочипе рекомендовано применять для верификации диагноза аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа, а также для скрининга органо-специфических антител в крови у пациентов с эндокринными аутоиммунными заболеваниями.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность

2-НН – вторичная надпочечниковая недостаточность

Abs – длина волны

ACA – adrenal cortex autoantibodies

AUC – area under the curve

Breg – регуляторные В-лимфоциты

Ca – кальций

CD – Cluster of Differentiation

DPBS – фосфатно-солевой буфер Дульбекко

FOXP3 – Forkhead winged helix box3

GAD – глутаматдекарбоксилаза

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HLA – Human Leukocyte Antigens

IA2 – тирозинфосфатаза

IAA – антитела к инсулину

ICA – антитела к клеткам островков Лангерганса

LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых

Max – максимальное значение

MH – психологический компонент качества жизни

MHC – Major Histocompatibility Complex

Min – минимальное значение

P – фосфор

P450c21 – 21-гидроксилаза

PBMC – мононуклеары периферической крови

PBS – фосфатно-солевой буфер

PH – физический компонент качества жизни

PMA – форбол-12-миристат-13-ацетат

-PV – прогностическая ценность отрицательного результата

+PV – прогностическая ценность положительного результата

Th – Т-хелперы

TIM-1 – Т-клеточный иммуноглобулин-муцин 1 типа

TLR – toll-подобный рецептор

Treg – регуляторные Т-лимфоциты

ZnT8 – транспортер цинка

АГ – антиген

АД – артериальное давление

АЗЩЖ – аутоиммунное заболевание щитовидной железы

АИЗ – аутоиммунное заболевание

АИТ – аутоиммунный тиреоидит

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АНН – аутоиммунная надпочечниковая недостаточность

АПК – антигенпрезентирующая клетка

АПС – аутоиммунный полигландулярный синдром

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АТ – антитело

БГ – болезнь Грейвса

ГГ – гипергонадотропный гипогонадизм

ДГЭА – дегидроэпиандростерон

ДГЭА-С – дегидроэпиандростерон-сульфат

ДИ – доверительный интервал

ДК – дендритная клетка

Ж – женский

ИЛ – интерлейкин

ИМБ – Институт молекулярной биологии

ИМТ – индекс массы тела

ИТ – иммунная толерантность

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

КСК – кожно-слизистый кандидоз

лАНН – латентная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность

ЛГ – лютеинизирующий гормон

М – мужской

мАНН – манифестная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность

МЭН – множественная эндокринная неоплазия

ОЩЖ – околощитовидная железа

пАНН – потенциальная аутоиммунная надпочечниковая недостаточность

ПК – плазматическая клетка

ПТГ – паратиреоидный гормон

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РИ – референсный интервал

рТТГ – рецептор тиреотропного гормона

сАКТГ – синтетический аналог адренокортикотропного гормона короткого действия

сАКТГп – синтетический аналог адренокортикотропного гормона пролонгированного действия

св. – свободный

СД – сахарный диабет

СД1 – сахарный диабет 1 типа

СД2 – сахарный диабет 2 типа

СКВ – системная красная волчанка

соавт. – соавторы

ТГ – тиреоглобулин

ТПО – тиреоидная пероксидаза

ТТГ – тиреотропный гормон

ТФР – трансформирующий фактор роста

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХБП – хроническая болезнь почек

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЩЖ – щитовидная железа

эАИЗ – эндокринное аутоиммунное заболевание

ЭОП – эндокринная офтальмопатия

ЭТС – сыворотка крови эмбриональная телячья

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фадеев, В. В. Надпочечниковая недостаточность (клиника, диагностика, лечение): методические рекомендации для врачей / В. В. Фадеев, Г. А. Мельниченко. – Москва: Медпрактика-М, 2003. – 48 с.
2. Дедов, И. И. Надпочечниковая недостаточность (этиология, патгенез, клиника, лечение): методическое пособие для врачей / И. И. Дедов, Е. И. Марова, В. В. Вакс. – Москва, 2000. – 57 с.
3. Юкина, М. Ю. Надпочечниковая недостаточность / М. Ю. Юкина, Е.А. Трошина, Н.М. Платонова, Д.Г. Бельцевич // Сборник методических рекомендаций (в помощь практическому врачу) / под ред. Е. А. Трошиной. – Тверь, 2017. – С. 149-192.
4. Charmandari, E. Adrenal insufficiency / E. Charmandari, N. C. Nicolaides, G. P. Chrousos // Lancet. – 2014. – Vol. 383, № 9935. – P. 2152-2167.
5. Bornstein, S. R. Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: An endocrine society clinical practice guideline / S. R. Bornstein, B. Allolio, W. Arlt [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2016. – Vol. 101, № 2. – P. 364-389.
6. Bratland, E. Cellular immunity and immunopathology in autoimmune Addison’s disease / E. Bratland, E. S. Husebye // Mol Cell Endocrinol. – 2011. – Vol. 336, № 1-2. – P. 180-190.
7. Brandão Neto, R. A. Diagnosis and classification of Addison's disease (autoimmune adrenalitis) / R. A. Brandão Neto, J. F. de Carvalho // Autoimmun Rev. – 2014. – Vol. 13, № 4-5. – P. 408-411.
8. Coco, G. Estimated risk for developing autoimmune Addison's disease in patients with adrenal cortex autoantibodies / G. Coco, C. Dal Pra, F. Presotto [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2006. – Vol. 91, № 5. – P. 1637-1645.
9. Baker, P. R. Predicting the onset of Addison's disease: ACTH, renin, cortisol and 21-hydroxylase autoantibodies / P. R. Baker, P. Nanduri, P. A. Gottlieb [et al.] // Clin Endocrinol (Oxf). – 2012. – Vol. 76, № 5. – P. 617–624.
10. Lebovitz, H. E. Autoimmune polyglandular syndromes: interplay between the immune and the endocrine systems leading to a diverse set of clinical diseases and new insights into immune regulation / H. E. Lebovitz // Diabetes Technol Ther. – 2013. – Vol. 15, № S2. – P. 21-28.
11. Husebye, E. S. Autoimmune Polyendocrine Syndromes / E. S. Husebye, M. S. Anderson, O. Kämpe // N Engl J Med. – 2018. – Vol. 378, № 12. – P. 1132–1141.
12. Zirilli, G. Peculiarities of autoimmune polyglandular syndromes in children and adolescents / G. Zirilli, S. Santucci, C. Cuzzupè [et al.] // Acta Biomed. – 2017. – Vol. 88(3):271-275.

13. Karamifar, H. Autoimmune polyglandular syndrome type 2: an unusual presentation / H. Karamifar, S. Dalili, Z. Karamizadeh [et al.] // Acta Medica Iranica. – 2010. – Vol. 48, № 3. – P. 196-197.

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

15. Мокрышева, Н. Г. Первичная надпочечниковая недостаточность. Клинические рекомендации / Н. Г. Мокрышева, Г. А. Мельниченко, Е. А. Трошина [и др.] // Рубрикатор клинических рекомендаций [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/524_2.

16. Kazlauskaite, R. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency: a metaanalysis / R. Kazlauskaite, A. T. Evans, C. V. Villabona [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2008. – Vol. 93. – P. 4245–4253.

17. Maninger, N. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS) / N. Maninger, O. M. Wolkowitz, V. I. Reus [et al.] // Front Neuroendocrinol. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 65–91.

18. Allolio, B. DHEA: why, when, and how much--DHEA replacement in adrenal insufficiency / B. Allolio, W. Arlt, S. Hahner // Ann Endocrinol (Paris). – 2007. – Vol. 68, № 4. – P. 268-273.

19. Allolio, B. Dehydroepiandrosterone and androstenedione / B. Allolio, W. Arlt, S. Hahner // Testosterone: Action, Deficiency, Substitution / E. Nieschlag, H. M. Behre, editors, S. Nieschlag, co-editor. – 4th edition. – Cambridge University Press, 2012. – Chap. 10. – P. 437–458.

20. Cho, H. Y. Different cut-off values of the insulin tolerance test, the high-dose short Synacthen test (250 μg) and the low-dose short Synacthen test (1 μg) in assessing central adrenal insufficiency / H. Y. Cho, J. H. Kim, S. W. Kim [et al.] // Clin Endocrinol (Oxf). – 2014. – Vol. 81. – P. 77–84.

21. Ergin, A. Insulin Tolerance Test (ITT) / A. Ergin, A. Hamrahian, A. Kennedy, M. Gupta // The Cleveland Clinic Manual of Dynamic Endocrine Testing / A. B. Ergin, A. L. Kennedy, M. K. Gupta, A. H. Hamrahian. – Springer, Cham, 2015. – Chap. 10. – P. 39-42.

22. Horn, M. A. Screening for X-linked adrenoleukodystrophy among adult men with Addison’s disease / M. A. Horn, M. M. Erichsen, A. S. Wolff [et al.] // Clin Endocrinol (Oxf). – 2013. – Vol. 79. – P. 316–320.

23. Ekman, B. A randomized, double-blind, crossover study comparing two- and four-dose hydrocortisone regimen with regard to quality of life, cortisol and ACTH profiles in patients with primary adrenal insufficiency / B. Ekman, M. Bachrach-Lindström, T. Lindström [et al.] // Clin Endocrinol (Oxf). – 2012. – Vol. 77. – P. 18–25.

24. Forss, M. Current practice of glucocorticoid replacement therapy and patient-perceived health outcomes in adrenal insufficiency – a worldwide patient survey / M. Forss, G. Batcheller, S. Skrtic, G. Johannsson // BMC Endocr Disord. – 2012. – Vol. 12. – ID 8.

25. Miller, W. L. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders / W. L. Miller, R. J. Auchus // Endocr Rev. – 2011. – Vol. 32. – P. 81–151.

26. Betterle, C. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: Autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction / C. Betterle, C. Dal Pra, F. Mantero, R. Zanchetta // Endocr Rev. – 2002. – Vol. 23, № 3. – P. 327-364.

27. Laureti, S. Levels of adrenocortical autoantibodies correlate with the degree of adrenal dysfunction in subjects with preclinical Addison's disease / S. Laureti, A. De Bellis, V. I. Muccitelli [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 1998. – Vol. 83, № 10. – P. 3507-3511.

28. Dawoodji, A. High frequency of cytolytic 21-hydroxylase − specific CD8+ T cells in autoimmune Addison’s disease patients / A. Dawoodji, J. Chen, D. Shepherd [et al.] // J Immunol. – 2014. – Vol. 193. – P. 2118-2126.

29. Mavragani, C. P. Adrenal autoimmunity in primary Sjogren’s syndrome / C. P. Mavragani, M. Schini, F. Gravani [et al.] // ARTHRITIS & RHEUMATISM. – 2012. – Vol. 64, № 12. – P. 4066–4071.

30. Michels, A. Addison disease: early detection and treatment principles / A. Michels, N. Michels // Am Acad Fam Physicians. – 2014. – Vol. 18, № 7. – P. 563-568.

31. Yamamoto, T. Comorbid latent adrenal insufficiency with autoimmune thyroid disease / T. Yamamoto // Eur Thyroid J. – 2015. – Vol. 4, № 3. – P. 201-206.

32. Yamamoto, T. History of stress-related health changes: a cue to pursue a diagnosis of latent primary adrenal insufficiency / T. Yamamoto // Intern Med. – 2014. – Vol. 53, № 3. – P. 183-188.

33. Younes, N. Latent Adrenal Insufficiency: From Concept to Diagnosis / N. Younes, I. Bourdeau, A. Lacroix // Front Endocrinol (Lausanne). – 2021. – Vol. 12. – ID 720769.

34. Eisenbarth, G. S. Autoimmune Polyendocrine Syndromes / G. S. Eisenbarth, P. A. Gottlieb // N Engl J Med. – 2004. – Vol. 350. – P. 2068-2079.

35. De Bellis, A. Time Course of 21-hydroxylase antibodies and long- term remission of subclinical autoimmune adrenalitis after corticosteroid therapy: Case Report / A. De Bellis, A. Falorni, S. Laureti [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2001. – Vol. 86, № 2. – P. 675-678.

36. Петунина, Н. А. Клиника, диагностика и лечение аутоиммунного тиреоидита / Н. А. Петунина // Проблемы Эндокринологии. – 2002. – Т. 48, № 6. – С. 16-21.

37. Орлова, Е. М. Аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа: клинические варианты, генетические основы, иммунологические маркеры, лечение и прогноз: дис. ... докт. мед. наук: 14.01.02. – ФГБУ «НМИЦ эндокринологии», Москва, 2017. – 332 с.

38. Anaya, J. M. Autoimmunity: From Bench to Bedside / J. M. Anaya, Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga [et al.], editors. Bogota: El Rosario University Press. School of de Medicine and Health Sciences, CREA, 2013.

39. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / под ред. Воробьева А. А., Быкова А. С. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2003. – 232 с.

40. Kovacs, W. J. To B or not to B? Glucocorticoid impact on B lymphocyte fate and function / W. J. Kovacs // Endocrinology. – 2014. – Vol. 155, № 2. – P. 339-342.

41. Levine, A. G. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet / A. G. Levine, A. Medoza, S. Hemmers [et al.] // Nature. 2017. – Vol. 546, № 7658. – P. 421–425.

42. Engel, P. CD Nomenclature 2015: Human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology / P. Engel, L. Boumsell, R. Balderas [et al.] // J Immunol. – 2015. – Vol. 195, № 10. – P. 4555-4563.

43. Kriegel, M. A. Defective suppressor function of human $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II / M. A. Kriegel, T. Lohmann, C. Gabler [et al.] // J. Exp. Med. – 2004. – Vol. 199, № 9. – P. 1285–1291.

44. Amrouche, K. Influence of drug molecules on regulatory B cells / K. Amrouche, C. Jamin // Clin Immunol. – 2017. – Vol. 184. – P. 1-10.

45. Santaguida, M. G. BREG cells in Hashimoto’s thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases / M. G. Santaguida, I. Gatto, G. Mangino [et al.] // Clin Immunol. – 2017. – Vol. 184. – P. 42-47.

46. Sattler, S. Regulatory B cells -implications in autoimmune and allergic disorders / S. Sattler, L. E. P. M. van der Vlugt, L. Hussaarts [et al.] // Recent Advances in Immunology to Target Cancer, Inflammation and Infections / J. R. Kanwar, editor. – InTech, 2012. – Chap. 9. – P. 177-200.

47. Rydzewska, M. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases / M. Rydzewska, M. Jaromin, I. E. Pasierowska [et al.] // Thyroid Research. – 2018. – Vol. 11. – ID 2.

48. Byun, D. J. Cancer immunotherapy—immune checkpoint blockade and associated endocrinopathies / D. J. Byun, J. D. Wolchok, L. M. Rosenberg, M. Girotra // Nat Rev Endocrinol. – 2017. – Vol. 13, № 4. – P. 195–207.

49. Насонов, Е. Л. Ингибиция иммунных контрольных точек и аутоиммунитет: ревматологические проблемы / Е. Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2018. – Т. 1, № 1. – С. 5-9.

50. Казмирчук, В. Е. Клиническая иммунология и аллергология / В. Е. Казмирчук, JI. В. Ковальчук, Д. В. Мальцев. – Киев: Феникс, 2009. – 524 с.

51. Andersen, M. H. Cytotoxic T cells / M. H. Andersen, D. Schrama, T. P. Straten, J. C. Becker // J Invest Dermatol. – 2006. – Vol. 126, № 1. – P. 32-41.

52. Bøe, A. S. Autoantibodies against 21-hydroxylase and side-chain cleavage enzyme in autoimmune Addison's disease are mainly immunoglobulin G1 / A. S. Bøe, G. Bredholt, P. M. Knappskog [et al.] // European Journal of Endocrinology. – 2004. – Vol. 150. – P. 49-56.

53. Bellis, A. D. Revisitation of autoimmune Addison's disease: known and open pathophysiologic and clinical aspects / A. D. Bellis, G. Bellastella, M. I. Maiorino [et al.] // Int J Clin Endocrinol. – 2019. – Vol. 3, № 1. – P. 001-0013.

54. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник для студентов учреждений высшего профессионального образования и последипломного образования врачей / А. А. Ярилин. – Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – 749 с.

55. Graziano, R. F. Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) / R. F. Graziano, P. M. Guyre // Encyclopedia of life sciences. – Wiley-Blackwell, 2006.

56. Parra, D. Evolution of B Cell Immunity / D. Parra, F. Takizawa, J. O. Sunyer // Annu Rev Anim Biosci. – 2013. – Vol. 1. – P. 65–97.

57. Mauri, C. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential / C. Mauri, M. Menon // J Clin Invest. – 2017. – Vol. 127, № 3. – P. 772-779.

58. Janeway, C. A. Jr. Immunobiology: the immune system in health and disease / C. A. Jr. Janeway, P. Travers, M. Walport [et al.]. – 5th edition. – New York: Garland Science, 2001.

59. Лушова, А. А. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры / А. А. Лушова, Э. А. Жеремян, Е. А. Астахова, А. Б. Спиридонова [и др.] // Иммунология. – 2019. – Т. 40, № 6. – Р. 63–76.

60. Lykken, J. M. Regulatory B10 cell development and function / J. M. Lykken, K. M. Candando, T. F. Tedder // Int Immunol. – 2015. – Vol. 27, № 10. – P. 471-477.

61. Wortel, C. M. Regulatory B cells: phenotype, function and role in transplantation / C. M. Wortel, S. Heidt // Transpl Immunol. – 2017. – Vol. 41, № 2017. – P. 1-9.

62. Esteve-Solé, A. Characterization of the highly prevalent regulatory CD24hiCD38hi B-Cell population in human cord blood / A. Esteve-Solé, I. Teixidó, A. Deyà-Martínez [et al.] // Front Immunol. – 2017. – Vol. 8. – ID 201.

63. Schweigert, O. Soluble T cell immunoglobulin and mucin domain (TIM)-1 and -4 generated by A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)-10 and -17 bind to phosphatidylserine / O. Schweigert, C. Dewitz, K. Möller-Hackbarth [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2014. – Vol. 1843, № 2. – P. 275-287.

64. Hamad, A. R. A. B cell-targeted immunotherapy for type 1 diabetes: What can make it work? / A. R. A. Hamad, R. Ahmed, T. Donner, G. Fousteri // Discov Med. – 2016. – Vol. 21, № 115. – P. 213-219.

65. Sarvaria, A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity / A. Sarvaria, J. A. Madrigal, A. Saudemont // Cell Mol Immunol. – 2017. – Vol. 14, № 8. – P. 662–674.

66. Kristensen, B. Characterization of regulatory B cells in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis / B. Kristensen, L. Hegedüs, S. K. Lundy [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. 1-13.

67. Rosser, E. C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function / E. C. Rosser, C. Mauri // Immunity. – 2015. – Vol. 42, № 4. – P. 607-612.

68. Kleffel, S. Interleukin-10+regulatory b cells arise within antigen-experienced CD40+B cells to maintain tolerance to islet autoantigens / S. Kleffel, A. Vergani, S. Tezza [et al.] // Diabetes. – 2015. – Vol. 64, № 1. – P. 158-171.

69. Di Caro, V. Involvement of suppressive B-lymphocytes in the mechanism of tolerogenic dendritic cell reversal of type 1 diabetes in NOD mice / V. Di Caro, B. Phillips, C. Engman [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 1. – ID e83575.

70. Ray, A. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10 / A. Ray, B. N. Dittel // J. Clin. Med. – 2017. – Vol. 6, № 1. – ID 12.

71. Yang, M. Regulatory B cells in autoimmune diseases / M. Yang, K. Rui, S. Wang [et al.] // Cell Mol Immunol. – 2013. – Vol. 10, № 2. – P. 122-132.

72. National Library of Medicine [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54106.

73. Kanczkowski, W. Role of toll-like receptors and inflammation in adrenal gland insufficiency / W. Kanczkowski, K. Zacharowski, S. R. Bornstein // Neuroimmunomodulation. – 2010. – Vol. 17, № 3. – P. 180-183.

74. Filippi, C. M. TLR2 signaling improves immunoregulation to prevent type 1 diabetes / C. M. Filippi, K. Ehrhardt, E. A. Estes [et al.] // Eur J Immunol. – 2011. – Vol. 41, № 5. – P. 1399-1409.

75. National Library of Medicine [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7097.

76. Hellesen, A. The effect of types I and III interferons on adrenocortical cells and its possible implications for autoimmune Addison's disease / A. Hellesen, K. Edvardsen, L. Breivik [et al.] // Clin Exp Immunol. – 2014. – Vol. 176, № 3. – P. 351-362.

77. National Library of Medicine [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/282617.

78. Gharbia, O. M. Toll-like receptor 5 and Toll-like receptor 9 single nucleotide polymorphisms and risk of systemic lupus erythematosus and nephritis in Egyptian patients / O. M. Gharbia, S. A. R Bassiouni, M. E. S Zaki [et al.] // Egyptian Rheumatology and Rehabilitation. – 2021. – Vol. 48. – ID 49.

79. Zhang, Y. Analysis of the association of polymorphisms rs5743708 in TLR2 and rs4986790 in TLR4 with atopic dermatitis risk / Y. Zhang, H.-C. Wang, C. Feng, M. Yan // Immunol Invest. – 2019. – Vol. 48, № 2. – P. 169-180.

80. Gatselis, N. K. Programmed cell death-1 rs11568821 and interleukin-28B rs12979860 polymorphisms in autoimmune hepatitis / N. K. Gatselis, K. Azariadis, A. Lyberopoulou, G. N. Dalekos // J Transl Autoimmun. – 2021. – Vol. 4. – ID 100126.

81. Chen, J.-Y. Interferon-λ3/4 genetic variants and interferon-λ3 serum levels are biomarkers of lupus nephritis and disease activity in Taiwanese / J.-Y. Chen, C.-M. Wang, T.-D. Chen [et al.] // Arthritis Res Ther. – 2018. – Vol. 20, № 1. – ID 193.

82. Langelaan, M. L. P. Salivary cortisol in the diagnosis of adrenal insufficiency: cost efficient and patient friendly / M. L. P Langelaan, J. M. H Kisters, M. M. Oosterwerff, A-K. Boer // Endocr Connect. – 2018. – Vol. 7, № 4. – P. 560-566.

83. Restituto, P. Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid related disorders / P. Restituto, J. C. Galofré, M. J. Gil [et al.] // Clin Biochem. – 2008. – Vol. 41, № 9. – P. 688-692.

84. Deutschbein, T. Salivary cortisol as a diagnostic tool for Cushing's syndrome and adrenal insufficiency: improved screening by an automatic immunoassay / T. Deutschbein, M. Broecker-Preuss, J. Flitsch [et al.] // Eur J Endocrinol. – 2012. – Vol. 166, № 4. – P. 613-618.

85. Sellitti, D. F. Intrinsic Regulation of Thyroid Function by Thyroglobulin / D. F. Sellitti, K. Suzuki // THYROID. – 2014. – Vol. 24, № 4. – P. 625-638.

86. Le, S. N. Modelling of thyroid peroxidase reveals insights into its enzyme function and autoantigenicity / S. N. Le, B. T. Porebski, J. Mccoey [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 12. – ID e0142615.

87. Furmaniak, J. Blocking type TSH receptor antibodies / J. Furmaniak, J. Sanders // Autoimmun Highlights. – 2013. – Vol. 4. – P. 11-26.

88. Christensen, N. J. Decrease in TSH receptor autoantibodies during antithyroid treatment: relationship with a long noncoding Heg RNA and Cdk1 mRNA in mononuclear cells / N. J. Christensen, G. Habekost, P. Bratholm // ISRN Endocrinol. – 2011. – Vol. 2011. – ID 287052.

89. Fiorina, P. GABAergic system in b-cells: from autoimmunity target to regeneration tool / P. Fiorina // DIABETES. – 2013. – Vol. 62. – ID 3674-3676.

90. Torii, S. Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases / S. Torii // Endocr J. – 2009. – Vol. 56, № 5. – P. 639-648.

91. Lemaire, K. Zinc transporters and their role in the pancreatic b –cell / K. Lemaire, F. Chimienti, F. Schuit // Journal of Diabetes Investigation. – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 202-211.

92. Payne, A. H. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones / A. H. Payne, D. B. Hales // Endocrine Reviews. – 2004. – Vol. 25, № 6. – P. 947-970.

93. Meloni, A. Autoantibodies against type I interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type I / A. Meloni, M. Furcas, F. Cetani [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2008. – Vol. 93. – P. 4389-4397.

94. Орлова, Е. М. Новые иммунологические методы диагностики аутоиммунного полиэндокринного синдрома 1-го типа (первый опыт в России) / Е. М. Орлова, Л. С. Созаева, М. Е. Карманов [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2015. – Т. 5. – С. 9-13.

95. Kisand, K. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines / K. Kisand, A. S. B. Wolff, K. T. Podkrajšek [et al.] // J. Exp. Med. – 2010. – Vol. 207, № 2. – P. 299-308.

96. Amoroso, M. 3 Screen islet cell autoantibody ELISA: a sensitive and specific ELISA for the combined measurement of autoantibodies to GAD-65, to IA2 and to ZnT8 / M. Amoroso, P. Achenbach, M. Powell [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 2016. – Vol. 462. – P. 60–64.

97. Rosenberg, J. M. Protein microarrays identify disease-specific anti-cytokine autoantibody profiles in the landscape of immunodeficiency / J. M. Rosenberg, J. V. Price, G. Barcenas-Morales [et al.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2016. – Vol. 137, № 1. – P. 204-213.e3.

98. Landegren, N. Proteome-wide survey of the autoimmune target repertoire in autoimmune polyendocrine syndrome type 1 / N. Landegren, D. Sharon, E. Freyhult [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 1–11.

99. Gu, Y. High-throughput multiplexed autoantibody detection to screen type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases simultaneously / Y. Gu, Z. Zhao, K. Waugh [et al.] // EBioMedicine. – 2019. – Vol. 47. – P. 365–372.

100. Ahsan, H. Multiplex Technology for Biomarker Immunoassays / H. Ahsan, R. Ahmad // Innate Immunity in Health and Disease / K. S. Shailendra, H. Prakash, editors. – InTech, 2020. – Chap. 15. – P. 1-10.

101. Грядунов, Д. А. Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя / Д. А. Грядунов, Б. Л. Шаскольский, Т. В. Наседкина [и др.] // Acta Naturae. – 2018. – Т. 10, № 4. – С. 4-18.

102. Ahsan, H. Monoplex and multiplex immunoassays: approval, advancements, and alternatives / H. Ahsan // Comp Clin Path. – 2022. – Vol. 31, № 2. – P. 333-345.

103. Tozzoli, R. Autoantibody profiling of patients with antiphospholipid syndrome using an automated multiplexed immunoassay system / R. Tozzoli, D. Villalta // Autoimmun Rev. – 2014. – Vol. 13. – P. 59–63.

104. Holding, S. Clinical evaluation of the Bioplex 2200 celiac IgA and IgG kits – a novel multiplex screen incorporating an integral check for IgA deficiency / S. Holding, F. Wilson, D. Spradbery // J Immunol Methods. – 2014. – Vol. 405. – P. 29–34.

105. Google Patents [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://patents.google.com/patent/CN1448724A/en

106. Gryadunov, D. A. The EIMB hydrogel microarray technology: thirty years later / D. A. Gryadunov, B. L. Shaskolskiy, T. V. Nasedkina [et al.] // Acta Naturae. – 2018. – Vol. 10, № 4. – P. 4–18.

107. Rubina, A. Y. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications / A. Y. Rubina, E. I. Dementieva, A. A. Stomakhin [et al.] // Biotechniques. – 2003. – Vol. 34, № 5. – P. 1008-1014, 1016-1020, 1022.

108. Lysov, Y. Microarray analyzer based on wide field fluorescent microscopy with laser illumination and a device for speckle suppression / Y. Lysov, V. Barsky, D. Urasov [et al.] // Biomedical Optics Express. – 2017. – Vol. 8, № 11. – ID 4798.

109. Manosroi, W. Diagnostic performance of basal cortisol level at 0900-1300 h in adrenal insufficiency / W. Manosroi, M. Phimphilai, J. Khorana, P. Atthakomol // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, № 11. – ID e0225255.

110. Трошина, Е. А. Аутоиммунный полигландулярный синдром взрослых / Е. А. Трошина, Т. В. Никонова, О. А. Свитич, М. Ю. Юкина; под ред. И. И. Дедова, Е. А. Трошиной. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 264 с.

111. Ghaderi, M. MHC2TA single nucleotide polymorphism and genetic risk for autoimmune adrenal insufficiency / M. Ghaderi, G. Gambelunghe, C. Tortoioli [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2006. – Vol. 91. – P. 4107–4111.

112. Dalin, F. Clinical and immunological characteristics of autoimmune Addison disease: a nationwide Swedish multicenter study / F. Dalin, G. N. Eriksson, P. Dahlqvist [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2017. – Vol. 102, № 2. – P. 379-389.

113. Garelli, S. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1: an Italian survey on 158 patients / S. Garelli, M. D. Costa, C. Sabbadin [et al.] // J Endocrinol Invest. – 2021. – Vol. 44, № 11. – P. 2493-2510.

114. Ahonen, P. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients / P. Ahonen, S. Myllarniemi, I. Sipila, J. Perheentupa // New Engl J Med. – 1990. – Vol. 322, № 26. – P. 1829-1836.

115. Majeroni, B. A. Autoimmune polyglandular syndrome, type II / B. A. Majeroni, P. Patel // Am Fam Physician. – 2007. – Vol. 75, № 5. – P. 667-670.

116. Betterle, C. Addison's disease: a survey on 633 patients in Padova / C. Betterle, R. Scarpa, S. Garelli [et al.] // Eur J Endocrinol. – 2013. – Vol. 169, № 6. – P. 773-784.

117. Betterle, C. I. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: Markers of Low Progression to Clinical Addison’s Disease / C. Betterle, M. Volpato, B. Rees Smith [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 1997. – Vol. 82, № 3. – P. 932-938.

118. Papierska, L. Delay in diagnosis of adrenal insufficiency is a frequent cause of adrenal crisis / L. Papierska, M. B. Rabijewski // International Journal of Endocrinology. – 2013. – Vol. 2013. – P. 9-14.

119. Kushnir, M. M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals / M. M. Kushnir, T. Blamires, A. L. Rockwood [et al.] // Clin Chem. – 2010. – Vol. 56, № 7. – P. 1138-1147.

120. Al-Aridi, R. Biochemical diagnosis of adrenal insufficiency: the added value of dehydroepiandrosterone sulfate measurements / R. Al-Aridi, D. Abdelmannan, B. M. Arafah // Endocr Pract. – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 261-270.

121. Aulinas, A. Health-related quality of life in primary and secondary adrenal insufficiency / A. Aulinas, S. M. Webb // Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res. – 2014. – Vol. 14, № 6. – P. 873-888.

122. Andela, C. D. Quality of life in patients with adrenal insufficiency correlates stronger with hydrocortisone dosage, than with long-term systemic cortisol levels / C. D. Andela, S. M. Staufenbiel, S. D. Joustra [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2016. – Vol. 72. – P. 80-86.

123. García-Hernández, M. H. Frequency of regulatory B cells in adipose tissue and peripheral blood from individuals with overweight, obesity and normal-weight / M. H. García-Hernández, E.

Rodríguez-Varela, R. E. García-Jacobo [et al.] // Obes Res Clin Pract. – 2018. – Vol. 12, № 6. – P. 513-519.

124. 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.

125. Jiao, X. T reg deficiency-mediated TH1 response causes human premature ovarian insufficiency through apoptosis and steroidogenesis dysfunction of granulosa cells / X. Jiao, X. Zhang, N. Li [et al.] // Clin Transl Med. – 2021. – Vol. 11, № 6. – ID e448.

126. Boldison, J. Regulatory B Cells: Role in Type 1 Diabetes / J. Boldison, F. S. Wong // Front Immunol. – 2021. – Vol. 12. – ID 746187.

127. Ebrahimi, M. The role of autoimmunity in premature ovarian failure / M. Ebrahimi, F. A. Asbagh // Iran J Reprod Med. – 2015. – Vol. 13, № 8. – P. 461-72.

128. Muñoz-Durango, N. Modulation of immunity and inflammation by the mineralocorticoid receptor and aldosterone / N. Muñoz-Durango, A. Vecchiola, L. M. Gonzalez-Gomez [et al.] // Biomed Res Int. – 2015. – Vol. 2015. – ID 652738.

129. Crowley, S. D. Immunologic effects of the renin-angiotensin system / S. D. Crowley, N. P. Rudemiller // J Am Soc Nephrol. – 2017. – Vol. 28, № 5. – P. 1350-1361.

130. Мельниченко, Г. А. Лабораторная диагностика надпочечниковой недостаточности / Г. А. Мельниченко, В. В. Фадеев // Проблемы Эндокринологии. – 1997. – Т. 43, № 5. – С. 39-47.

131. Alesina, P. F. Adrenal tumors: are gender aspects relevant? / P. F. Alesina, M. K. Walz // Visc Med. – 2020. – Vol. 36, № 1. – P. 15-19.

132. Тюльпаков, А. Н. Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика 10 случаев врожденной гипоплазии надпочечников, обусловленной дефектами фактора DAX1 / А. Н. Тюльпаков, Н. Ю. Калинченко // Проблемы Эндокринологии. – 2010. – Т. 56, № 2. – Р. 3-9.

133. Halonen, M. AIRE mutations and human leukocyte antigen genotypes as determinants of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy phenotype / M. Halonen, P. Eskelin, A.-G. Myhre [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2002. – Vol. 87, № 6. – P. 2568-2574.

134. Titman, A. Salivary cortisol, cortisone and serum cortisol concentrations are related to age and body mass index in healthy children and young people / A. Titman, V. Price, D. Hawcutt [et al.] // Clin Endocrinol (Oxf). – 2020. – Vol. 93, № 5. – P. 572-578.

135. El-Farhan, N. Measuring cortisol in serum, urine and saliva – are our assays good enough? / N. El-Farhan, D. A. Rees, C. Evans // Ann Clin Biochem. – 2017. – Vol. 54, № 3. – P. 308-322.

136. Fröhlich, E. Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases / E. Fröhlich, W. Richard // Front Immunol. – 2017. – Vol. 8. – ID 521.

137. Boudiaf, A. L. Could ZnT8 antibodies replace ICA, GAD, IA2 and insulin antibodies in the diagnosis of type 1 diabetes? / A. L. Boudiaf, D. Bouziane, M. Smara [et al.] // Curr Res Transl Med. – 2018. – Vol. 66, № 1. – P. 1-7.

138. Bingley, P. J. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers / P. J. Bingley, E. Bonifacio, A. J. Williams [et al.] // Diabetes. – 1997. – Vol. 46, № 11. – P. 1701-1710.

139. Zhao, Z. A multiplex assay combining insulin, GAD, IA-2 and transglutaminase autoantibodies to facilitate screening for pre-type 1 diabetes and celiac disease / Z. Zhao, D. Miao, A. Michels [et al.] // J Immunol Methods. – 2016. – Vol. 430. – P. 28-32.

140. Kemp, E. H. Autoantibodies against the calcium-sensing receptor and cytokines in autoimmune polyglandular syndromes types 2, 3 and 4 / E. H. Kemp, G. J. Kahaly, J. A. Porter [et al.] // Clin. Endocrinol. – 2018. – Vol. 88. – P. 139–145.

141. Antonelli, G. Neutralizing antibodies to interferon-: Relative frequency in patients treated with different interferon preparations / G. Antonelli, M. Currenti, O. Turriziani, F. Dianzani // J. Infect. Dis. – 1991. – Vol. 163. – P. 882–885.

142. Antonelli, G. Interferon antibodies in patients with infectious diseases / G. Antonelli, E. Simeoni, M. Currenti [et al.] // Biotherapy. – 1997. – Vol. 10. – P. 7–14.

143. Wolff, A. S. B. Anti-cytokine autoantibodies preceding onset of autoimmune polyendocrine syndrome type I features in early childhood / A. S. B. Wolff, A. K. Sarkadi, L. Maródi [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 33. – P. 1341–1348.

144. Larosa, M. D. P. Assessment of autoantibodies to interferon-ω in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type 1: Using a new immunoprecipitation assay / M. D. P. Larosa, R. Mackenzie, P. Burne [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2017. – Vol. 55. – P. 1003–1012.

145. Cervato, S. AIRE gene mutations and autoantibodies to interferon omega in patients with chronic hypoparathyroidism without APECED / S. Cervato, L. Morlin, M. P. Albergoni [et al.] // Clin Endocrinol (Oxf). – 2010. – Vol. 73, № 5. – P. 630-636.

Приложение

(обязательное)

Таблица П1 – Классификация аутоиммунной надпочечниковой недостаточности, предложенная Betterle C. и соавторами [26; 33]

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

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

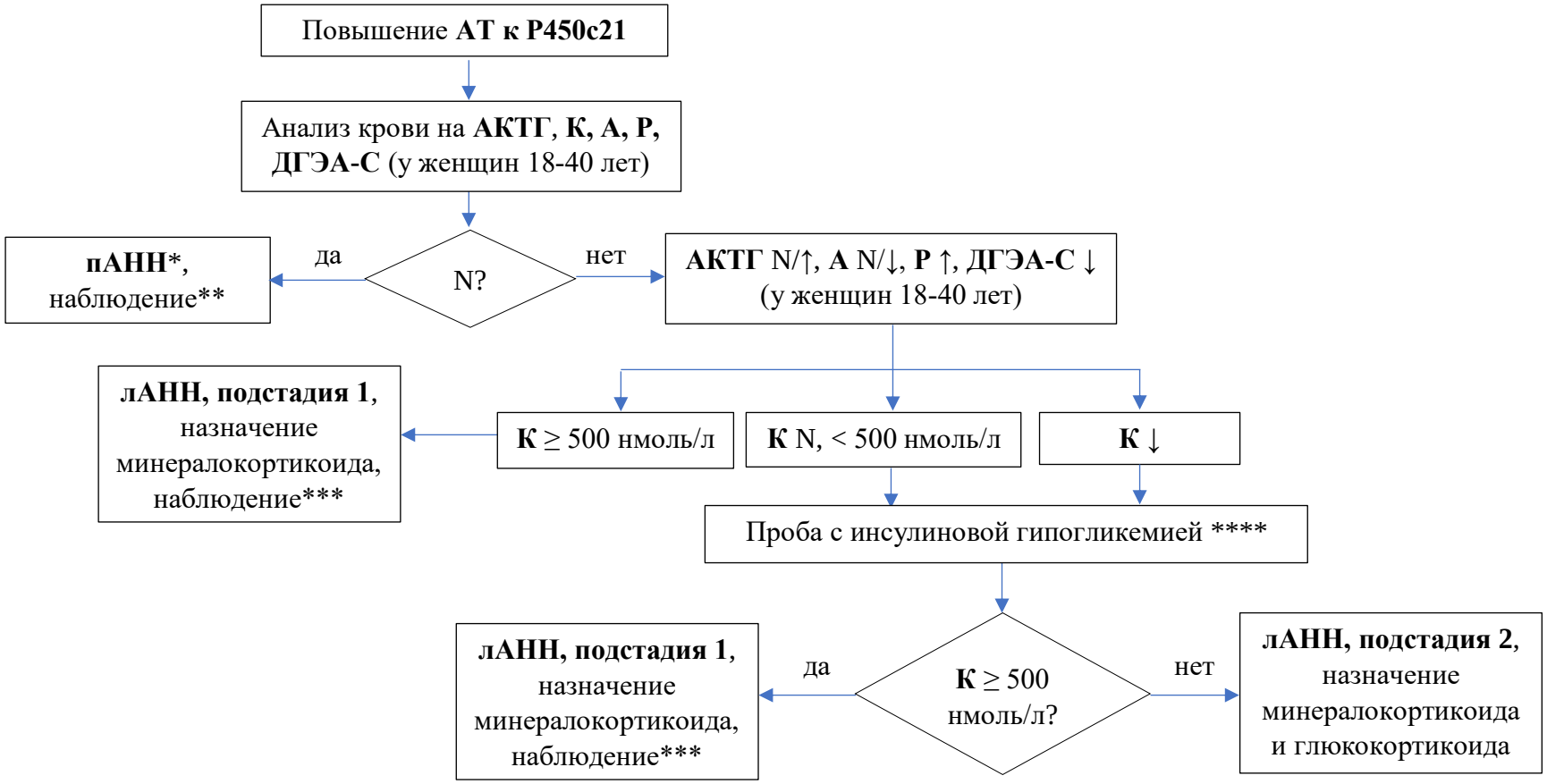
Таблица П2 – Модифицированная классификация аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Стадии	АТ к P450c21	АКТГ	Кортизол базальный	Кортизол на фоне пробы с инсулиновой гипогликемией, нмоль/л	Ренин	Альдостерон	ДГЭА-С[55]	Клинические проявления АНН
Потенциальная АНН	↑	N	N	≥ 500	N	N	N	-
Латентная АНН -подстадия 1 -подстадия 2	 ↑ ↑	 N/↑ N/↑	 N/↓ (но ≥ 140 нмоль/л) N/↓ (но ≥ 140 нмоль/л)	 ≥ 500 < 500	 ↑ ↑	 N/↓ N/↓	 ↓ ↓	 ± ±
Манифестная АНН	↑[56]/N[57]	↑↑	↓↓ (< 140 нмоль/л)	< 500	↑↑[58]	N/↓	↓	+[59]

Примечания: АНН – 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.

[55] Дополнительный диагностический критерий. Исследование целесообразно проводить только у женщин 18-40 лет.
[56] В дебюте заболевания.
[57] При длительном течении заболевания.
[58] В дебюте заболевания, при отсутствии заместительной терапии.
[59] В дебюте заболевания, при отсутствии заместительной терапии.

Рисунок П1 – Алгоритм диагностики и лечения ранних стадий аутоиммунной первичной надпочечниковой недостаточности на основании исследования антител к 21-гидроксилазе



Примечания: АТ – антитела; Р450с21 – 21-гидроксилаза; АКТГ – адренокортикотропный 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 первичная надпочечниковая недостаточность 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 плазменная концентрация адренокортикотропного гормона повышена более (>) чем в 2 раза относительно верхнего референсного значения.