



Содержание регуляторных В-лимфоцитов при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности

Трошина Е. А.¹, Нуралиева Н. Ф.¹, Дьяков И. Н.², Юкина М. Ю.¹, Гаврилова М. В.², Чернышова И. Н.², Снегирева Н. А.², Свитич О. А.², Дедов И. И.¹

¹ Государственный научный центр Российской Федерации Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»

Введение: в настоящее время сохраняет свою актуальность необходимость расширения знаний о механизмах нарушения иммунной толерантности при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности (АНН). Не исключается, что при АНН возникают нарушения в системе регуляторных В-лимфоцитов (Breg).

Цель: оценить состояние В-регуляторного звена иммунитета при АНН.

Материал и методы: содержание Breg оценивалось у пациентов с АНН, в том числе с изолированной АНН и АНН в составе аутоиммунного полигlandулярного синдрома 2 типа (АПС-2) и в составе АПС-1, у пациентов с первичной надпочечниковой недостаточностью (1-АНН) неаутоиммунного генеза, условно здоровых лиц без АНН и аутоиммунных заболеваний.

Результаты: выявлено снижение содержания Breg *in vivo* при изолированной АНН и АНН в составе АПС-2 по сравнению с условно здоровыми. Содержание Breg *in vivo* при 1-АНН неаутоиммунного генеза статистически не отличалось от показателей условно здоровых.

Заключение: впервые в мире обнаружена тенденция к снижению содержания Breg при АНН, обусловленной нарушением периферической иммунной толерантности. Таким образом, данные клетки могут рассматриваться как перспективные маркеры прогнозирования, ранней диагностики и дифференциальной диагностики АНН.

Ключевые слова: первичная надпочечниковая недостаточность, нарушение иммунной толерантности, регуляторные В-лимфоциты

Для цитирования: Трошина Е. А., Нуралиева Н. Ф., Дьяков И. Н., Юкина М. Ю., Гаврилова М. В., Чернышова И. Н., Снегирева Н. А., Свитич О. А., Дедов И. И. Содержание регуляторных В-лимфоцитов при аутоиммунной надпочечниковой недостаточности. *FOCUS Эндокринология*. 2023; 4(3): 6–12. doi: 10.15829/2713-0177-2023-3-10

The content of regulatory B-lymphocytes in autoimmune adrenal insufficiency

Troshina E. A.¹, Nuralieva N. F.¹, Dyakov I. N.², Yukina M. Yu.¹, Gavrilova M. V.², Chernyshova I. N.², Snegireva N. A.², Svitich O. A.², Dedov I. I.¹

¹ «Endocrinology research center» State funded research facility of the Ministry of Health of Russian Federation

² I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums

Introduction: Currently, the need to expand knowledge about the mechanisms of impaired immune tolerance in autoimmune adrenal insufficiency (AAI) remains relevant. It is not excluded that in AAI there are disturbances in the system of regulatory B-lymphocytes (Breg).

Objective: To assess the state of the B-regulatory cells system of immunity in AAI.

Material and methods: the content of Breg was evaluated in patients with AAI, including isolated AAI and AAI as part of autoimmune polyglandular syndrome type 2 (APS-2) and as part of APS-1, in patients with primary adrenal insufficiency (1-AI) of non-autoimmune genesis, conditionally healthy individuals without AI and autoimmune diseases.

Results: A decrease in the content of Breg *in vivo* was revealed in patients with isolated AAI and AAI in the composition of APS-2 compared with conditionally healthy participants. The content of Breg *in vivo* in patients with 1-AI of non-autoimmune genesis did not statistically differ from the indicators of conditionally healthy participants.

Conclusion: for the first time in the world, a tendency to a decrease in the content of Breg in AAI, caused by a disturbance of peripheral immune tolerance, was found. Thus, these cells can be considered as promising markers for the prognosis, early diagnosis, and differential diagnosis of AAI.

Keywords: Primary adrenal insufficiency, impaired immune tolerance, regulatory B-lymphocytes

For citation: Troshina E.A., Nuralieva N.F., Dyakov I.N., Yukina M.Yu., Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Snegireva N.A., Svitich O.A., Dedov I.I. The content of regulatory B lymphocytes in autoimmune adrenal insufficiency. *FOCUS Endocrinology*. 2023; 4(3): 6-12. doi: 10.15829/2713-0177-2023-3-10

Введение

Первичная надпочечниковая недостаточность (1-НН) — это тяжелое жизнеугрожающее заболевание с высоким риском развития аддисонического криза. Наиболее часто 1-НН развивается вследствие аутоиммунной деструкции коры надпочечников — аутоиммунная надпочечниковая недостаточность (АНН), серологическим маркером которой являются антитела к 21-гидроксилазе (АТ к P450c21). АНН нередко сочетается с аутоиммунным поражением других эндокринных и неэндокринных органов в рамках аутоиммунных полигландулярных синдромов (АПС) 1 и 2 типов: АПС-1 и АПС-2, соответственно.

В настоящее время сохраняет свою актуальность необходимость расширения знаний о механизмах нарушения иммунной толерантности (ИТ) при АНН для разработки эффективных методов предупреждения развития заболевания. Не исключается, что при АНН возникают нарушения в системе регуляторных В-лимфоцитов (Breg), которые отвечают за поддержание периферической ИТ.

Принадлежность клеток к В-лимфоцитарному ряду определяет поверхностный маркер CD19. Однако В-лимфоциты экспрессируют и множество других маркеров. Среди Breg, которые в норме составляют менее 10% циркулирующих В-лимфоцитов, наиболее изучена субпопуляция, имеющая фенотип CD24^{hi}CD38^{hi} (с высоким уровнем экспрессии поверхностных маркеров CD24 и CD38) и ингибирующая иммунный ответ за счет продукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (В10-лимфоциты (В10)) [1–4].

Изменения в системе Breg обнаружены при целом ряде аутоиммунных заболеваний (АИЗ): рассеянном склерозе, системной красной волчанке, ревматоидном артрите, синдроме Шегрена, аутоиммунном буллезном дерматозе, сахарном диабете 1 типа, аутоиммунном тиреоидите, болезни Грейвса [1, 3, 5–7]. В связи с чем не исключается, что изменение функциональных и фенотипических свойств данных клеток является пусковым фактором развития АНН [3, 8]. Однако исследований, посвященных роли данных клеток в патогенезе АНН у человека, ранее не проводилось. Более того, на животных моделях АНН Breg также не изучались.

Цель

Оценить состояние В-регуляторного звена иммунитета при 1-НН.

Материалы и методы

В период 2018–2021 гг. проведено активное одномоментное сравнительное исследование, включающее пациентов с изолированной АНН и в составе АПС-1 и –2, с 1-НН неаутоиммунного генеза и условно здоровых участников. Набор пациентов в группы

проводился в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» на основании соответствия критериям включения и при отсутствии критериев невключения (Таблица 1).

Включенные в исследование 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).

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 X-сцепленной врожденной гипоплазии надпочечников, у n = 1 — в рамках синдрома Олгрива.

Во всех группах изучалось содержание Breg *in vivo* среди всех мононуклеаров периферической крови (РВМС), а также способность В-клеток периферической крови дифференцироваться в Breg *in vitro*.

Методы исследования

Лабораторные методы исследования

Определение АТ к P450c21 осуществлялось методом ИФА с использованием коммерческих наборов: BioVendor, Чехия (АТ к P450c21). Референсный интервал составлял < 0,4 Ед/мл.

Иммунологические методы исследования

Оценку В-регуляторного компонента иммунной системы проводили в ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова».

Определяли процентное содержание CD24^{hi}CD38^{hi} Breg от общего числа В-лимфоцитов в РВМС участников исследования 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 РВМС: для получения РВМС 7,0–7,5 мл цельной крови наслаивали на среду для сепарации лимфоцитов на основе фиколла с плотностью 1,077 г/мл (Cargicorn; Sigma, США) и центрифугировали при 1200 g в течение 25 минут. РВМС 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 РВМС В-лимфоцитов, имеющих фенотип Breg: клетки осаждали центрифугированием при 1500 оборотов/минут в течение 5

Таблица 1
Критерии включения и невключения

Критерии включения и невключения	Группа с АНН	Группа с 1-НН неаутоиммунного генеза	Группа здоровых лиц
Критерии включения¹			
Мужской и женский пол	+	+	+
Возраст 18 лет и старше	+	+	+
Повышенный уровень антител к 21-гидроксилазе и/или мутация гена <i>AIRE</i> и/или наличие, по крайней мере, двух компонентов АПС-1	+	-	-
Верифицированный, в соответствии с международными клиническими рекомендациями, диагноз 1-НН	+	+	-
Двусторонняя адреналэктомия по поводу феохромоцитомы в анамнезе ² 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 ³	-	-	+
Критерии невключения⁴			
Беременность, период лактации	+	+	+
Наличие родственника с неаутоиммунной наследственной 1-НН	-	-	+
Острые инфекции, обострение хронических заболеваний, тяжелые психические заболевания	+	+	+
Тяжелые, угрожающие жизни состояния: декомпенсация ХСН, ХБП СЗб и более, легочная и печеночная недостаточности	+	+	+
Патология иммунной системы (включая врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании)	+	+	+
Прием препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (ИЛ, ИФН, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики), в том числе в анамнезе	+	+	+
Проведение вакцинаций/ревакцинаций в течение месяца перед включением в исследование	+	+	+
Эндогенный (манифестный и субклинический) гиперкортицизм, в том числе в анамнезе	-	+	+
Наличие аутоиммунных заболеваний	-	+	+
Наличие злокачественных онкологических заболеваний, в том числе в анамнезе	-	-	+
Сахарный диабет 2 типа, индекс массы тела ≥ 25 кг/м ²	-	-	+
Гипопитуитаризм любого генеза	-	-	+
Лечение глюкокортикоидами, ферментными ингибиторами (митотан, кетоконазол и т.д.), в том числе в анамнезе	-	-	+
Наличие объемных образований и/или повреждение ткани надпочечников, в том числе в анамнезе: оперативные вмешательства; кровоизлияние; на фоне инфильтративных заболеваний (гемохроматоз, амилоидоз, саркоидоз); инфекций (туберкулез, микозы и т.д.)	-	-	+

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.

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: FITC⁵-меченые АТ мыши к CD38 человека (Sony clone HIT2), PE⁶-меченые АТ мыши к CD24 человека (Sony clone ML5) и PECY7⁷-АТ мыши к CD19 челове-

ка (Sony clone H1B19). Инкубировали 30 минут при +4 °С. 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 (Capricorn, Германия), 2мМ глутамина (Gibco, США), 1мМ пирувата (Gibco, США), 100

¹ «+» – наличие критерия является основанием для включения в исследование, «-» – отсутствие критерия является основанием для исключения из исследования.

² Пациенты включены в исследование не ранее чем через 6 месяцев после оперативного лечения.

³ При уровне кортизола утром < 500 нмоль/л (n = 21 участнику) проводилась проба с инсулиновой гипогликемией.

⁴ «+» – наличие критерия является основанием для невключения в исследование, «-» – наличие критерия не является основанием для исключения из исследования.

⁵ Краситель изотиоцианат флуоресцеина.

⁶ Краситель фикоэритрин.

⁷ Краситель фикоэритрин-Су7.

Ед/мл пенициллина (Gibco), 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США)) в лунки 24-луночных планшетов и инкубировали *in vitro* в течение 72 ч при +37 °C в CO₂ инкубаторе при содержании 5% CO₂ в атмосфере. Для индукции Breg к части суспензии РВМС в момент внесения *in vitro* добавляли смесь активаторов CpG⁸ типа В (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: РМА (50 нг/мл; Sigma, США) и йономицин (500 нг/мл; Sigma, США) и антибиотик Брефельдин А (BD Cytotfix/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 РВМС проводилось методом проточной цитофлуориметрии на приборе Beckman Coulter EPICS XL; результаты анализировали с помощью SYSTEM II (Beckman COULTER, США).

Статистический анализ

Статистическая обработка 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 па-

раметрами определялся коэффициент корреляции Спирмена. С целью сравнения количественных данных двух независимых выборок применялся U-критерий Манна-Уитни; трех и более независимых выборок – критерий Краскела-Уоллиса; качественных признаков – тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. 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 рассчитанным и 0,05 интерпретировались как статистическая тенденция.

Этическая экспертиза

Локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, согласно протоколу № 8 заседания от 25.04.2018 г., постановлено, что представленная научная работа соответствует этическим стандартам добросовестной клинической практики. Все пациенты и условно здоровые лица подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

Клиническая характеристика групп 1–3 приведена в Таблице 2.

Общее содержание В-лимфоцитов *in vivo* в каждой из групп значимо не отличалось от показателя условно здоровых (9,2% [6,8%; 12,7%]): 1а – 10,6% [7,2%; 16,4%], *p* = 0,151; 1б – 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).

Таблица 2
Клиническая характеристика участников исследования

Показатель	Группа 1 n = 94	Группа 1а n = 77	Группа 1б n = 17	Группа 2 n = 23	Группа 3 n = 44	<i>p</i> **
Возраст, лет*	38 [29; 49]	42 [32; 50]	30 [24; 37]	37 [29; 38]	28 [25; 29]	< 0,001 (<i>p</i> _{1а-3} < 0,001)
Пол (Ж), n (%)	76 (81)	64 (83)	12 (71)	10 (43)	37 (84)	0,001 (<i>p</i> _{1а-2} = <i>p</i> ₂₋₃ < 0,001)
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
Число сопутствующих эндокринных аутоиммунных заболеваний	1 [1; 2]	1 [0; 1]	2 [1; 2]	0	0	< 0,001 (<i>p</i> _{1а-1б} = <i>p</i> _{1а-2} = <i>p</i> _{1а-3} = <i>p</i> _{1б-2} = <i>p</i> _{1б-3} < 0,001)
Число сопутствующих неэ-ндокринных аутоиммунных заболеваний*	0 [0; 1]	0 [0; 1]	2 [1; 3]	0	0	< 0,001 (<i>p</i> _{1а-1б} = <i>p</i> _{1б-2} = <i>p</i> _{1б-3} < 0,001)
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 (<i>p</i> _{1а-1б} < 0,001)

* Ме [Q1; Q3]

** Сравнение групп 1а, 1б, 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 = 0,008 (после применения поправки Бонферрони: 6 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; РИ – референсный интервал.

⁸ Дезоксицитидин-фосфат-дезоксигуанозин.

В отношении содержания Breg *in vivo* (Рисунок 1) 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 учетом 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, $p = 0,304$.

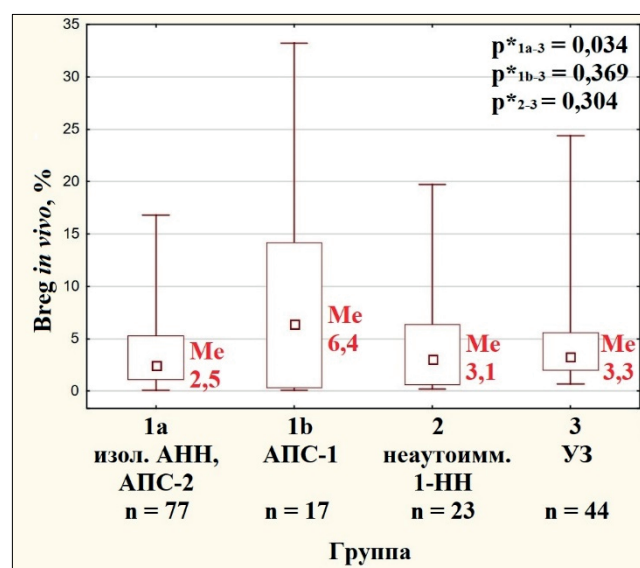


Рисунок 1. Доля регуляторных В-лимфоцитов от всех В-лимфоцитов *in vivo* у участников групп 1a, 1b, 2 и 3

* 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 полигланулярный синдром 1 типа; АПС-2 – аутоиммунный полигланулярный синдром 2 типа; неаутоимм. – неаутоиммунная; 1-НН – первичная надпочечниковая недостаточность; УЗ – условно здоровые.

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.

При оценке содержания Breg *in vivo* и длительности 1-НН / уровня АТ к Р450с21 в группах 1a и 1b значимых корреляций не обнаружено (Таблица 3). С целью уточнения ассоциации выраженности нарушения ИТ и степени снижения Breg проведена оценка содержания данных клеток у пациентов группы 1a с разным числом сопутствующих АИЗ: значимых отличий не

обнаружено. Согласно полученным результатам, при увеличении числа АИЗ от 1 до 3 отмечено снижение Breg *in vivo* (Рисунок 2). Однако у пациентов с 4 АИЗ выявлено высокое содержание Breg *in vivo*. При этом медиана содержания Breg *in vivo* в данной группе превышала не только медиану группы 1a, 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 эндокринным АИЗ (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 $p = 0,05$).

При анализе содержания Breg с учетом числа АИЗ исключительно эндокринных органов мы также не обнаружили значимых отличий между группами. Однако при увеличении числа эАИЗ от 1 до 3 отмечено снижение Breg *in vivo* (Рисунок 3).

Обсуждение

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 некоего фактора в организме пациентов, но не в самой способности В-клеток дифференцироваться в Breg. Выявленная у пациентов группы 1a тенденция к снижению содержания Breg, предположительно, является маркером АИЗ. 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.

При дальнейшем анализе факторов, которые могли оказать влияние на содержание Breg, мы обратили

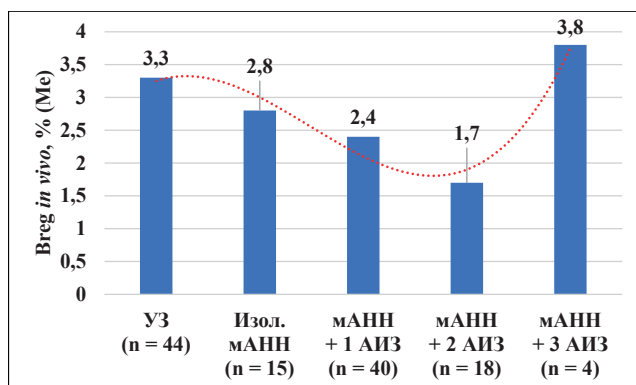


Рисунок 2. Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* у участников группы 3 и пациентов группы 1а с разным числом аутоиммунных заболеваний

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

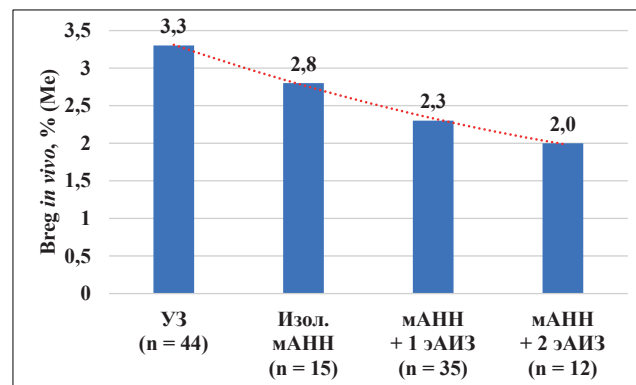


Рисунок 3. Содержание регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* у участников группы 3 и пациентов группы 1а с разным числом эндокринных аутоиммунных заболеваний

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

Таблица 3
Корреляция содержания регуляторных В-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* с уровнем антител к 21-гидроксилазе и длительностью аутоиммунной надпочечниковой недостаточности у участников групп 1а и 1б

Группа		Антитела к 21-гидроксилазе						Длительность аутоиммунной надпочечниковой недостаточности					
		1а			1б			1а			1б		
		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

* Корреляция Спирмена. Пороговый $p_0 = 0,5$.

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

внимание на длительность НН. Так как истинную длительность заболевания (от момента появления АТ к Р450с21) 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 Р450с21 выявлено значимое отличие при сравнении групп 1а и 1б. Однако, так как содержание Breg не коррелирует с длительностью НН и уровнем АТ к Р450с21 в группах 1а и 1б, 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 1а 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. [9]. Суммируя вышесказанное, наиболее вероятно, снижение содержания Breg является характеристикой эАИЗ.

Заключение

Таким образом, впервые в мире обнаружена тенденция к снижению содержания Breg при АНН, обусловленной нарушением периферической иммунной толерантности. Важно отметить, что изменения в системе Breg 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 АНН. Актуальной задачей представляется продолжение исследования с целью выявления молекулярных мишеней для таргетного воздействия на Breg и разработки новых методов лечения.

Литература/References

- 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.
- 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. – P. 63–76.
- 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.
- Esteve-Solé, A. Characterization of the highly prevalent regulatory CD24hiCD38hi B-Cell population in human cord blood / A. Esteve-Solé, I. Teixidó, A. Deyá-Martínez [et al.] // Front Immunol. – 2017. – Vol. 8. – ID 201.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Отношения и деятельность: Работа выполнена в рамках гранта РНФ 22–15–00135 «Научное обоснование, разработка и внедрение новых технологий диагностики коморбидных йододефицитных и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, в том числе с использованием возможностей искусственного интеллекта».

Трошина Е. А., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Института клинической эндокринологии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Адрес: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11; email: troshina@inbox.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8520-8702>,
Нуралиева Н. Ф., научный сотрудник отделения терапии заболеваний щитовидной железы, надпочечников и ожирения ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Адрес: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11; email: dr.nuralievaf@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6876-3336>,
Дьяков И. Н., к.б.н., заведующий лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова; Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а; email: dyakov.ilya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6348-6867>,
Юкина М. Ю., к.м.н., заведующая отделением терапии заболеваний щитовидной железы, надпочечников и ожирения ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Адрес: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11; email: kuronova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8771-8300>,
Гаврилова М. В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а; email: gavrilovamv@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6936-2486>,
Чернышова И. Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>,
Снегирева Н. А., научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5399-3224>,
Свитич О. А., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова»; Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а; email: svitichoa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>,
Дедов И. И., д.м.н., профессор, академик, член Президиума РАН, Президент ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России; Адрес: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11; e-mail: dedov@endocrincentr.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8175-7886>.

*Автор, ответственный за контакт: dr.nuralievaf@yandex.ru

Рукопись получена 18.09.2023 Рецензия получена 26.10.2023

Принята к публикации 17.11.2023

Relationships and Activities: The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant 22–15–00135 “Scientific substantiation, development and implementation of new technologies for diagnosing comorbid iodine deficiency and autoimmune thyroid diseases, including using the capabilities of artificial intelligence.”

Troshina E. A. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of the Institute of Clinical Endocrinology of the State Scientific Center of the Russian Federation, Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Endocrinology» of the Ministry of Health of Russia. Address: 117292, Moscow, st. Dmitry Ulyanov, 11; email: troshina@inbox.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8520-8702>,
***Nuralieva N. F.** – Researcher, Department of Therapy of Diseases of the thyroid, Adrenal Glands and Obesity, State Scientific Center of the Russian Federation, Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center of Endocrinology” of the Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 117292, Moscow, st. Dmitry Ulyanov, 11; email: dr.nuralievaf@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6876-3336>,
Dyakov I. N. – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Internal Medicine named after. I. I. Mechnikov; Address: 105064, Moscow, Maly Kazenny Lane, 5a; email: dyakov.ilya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6348-6867>,
Yukina M. Yu. – Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Therapy of Diseases of the Thyroid, Adrenal Glands and Obesity, State Research Center of the Russian Federation, Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Endocrinology» of the Ministry of Health of Russia. Address: 117292, Moscow, st. Dmitry Ulyanov, 11; email: kuronova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8771-8300>,
Gavrilova M. V. – Candidate of Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, Federal State Budgetary Institution Research Institute of Internal Medicine named after. I. I. Mechnikov. Address: 105064, Moscow, Maly Kazenny Lane, 5a; email: gavrilovamv@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6936-2486>,
Chernyshova I. N. – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis of the Federal State Budgetary Institution Research Institute of Internal Medicine named after. I. I. Mechnikov. Address: 105064, Moscow, Maly Kazenny Lane, 5a; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>,
Snegireva N. A. – Researcher, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, Federal State Budgetary Institution NIIVS named after. I. I. Mechnikov. Address: 105064, Moscow, Maly Kazenny Lane, 5a, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5399-3224>,
Svitich O. A. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Institution «NIIVS named after. I. I. Mechnikov»; Address: 105064, Moscow, Maly Kazenny Lane, 5a; email: svitichoa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>,
Dedov I. I. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician, Member of the Presidium of the Russian Academy of Sciences, President of the State Scientific Center of the Russian Federation, Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Endocrinology» of the Ministry of Health of Russia; Address: 117292, Moscow, st. Dmitry Ulyanov, 11; e-mail: dedov@endocrincentr.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8175-7886>
 *Corresponding author: dr.nuralievaf@yandex.ru

Received: 18.09.2023 Revision Received: 26.10.2023 Accepted: 17.11.2023