

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ НОСИТЕЛЬСТВА АУТОАНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ С ЦЕЛИАКИЕЙ МЕТОДАМИ МОНО- И МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

Н. Ф. Нуралиева¹✉, М. Ю. Юкина¹, С. В. Быкова², Е. Н. Савватеева³, Л. В. Никанкина¹, Е. В. Кулагина³, Б. Л. Шаскольский³, Д. А. Грядун³, Е. А. Трошина¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Поиск сопутствующих аутоиммунных заболеваний (АИЗ) у пациентов с целиакией является актуальной задачей. Целью исследования было определить частоту носительства антител (АТ) — маркеров развития АИЗ у пациентов с целиакией с помощью различных иммунологических подходов. У пациентов с целиакией (группа 1, $n = 27$) и здоровых лиц (группа 2, $n = 16$) в сыворотке крови с использованием ИФА и метода мультиплексного иммуноанализа (МИ) на гидрогелевом биочипе определены АТ к тиреоидной пероксидазе (ТПО), тиреоглобулину (ТГ), глутаматдекарбоксилазе (GAD), островковым клеткам поджелудочной железы (ICA), тирозинфосфатазе (IA2), 21-гидроксилазе (P450c21), внутреннему фактору Кастла, тканевой трансглутаминазе (TGM2). Биочип также позволяет проводить исследование АТ к интерферонам (ИФН) альфа и омега, интерлейкину 22. Методом ИФА в группе 1 выявлены АТ к IA2 (30%), ТПО (22%), ТГ (19%), GAD (19%), в группе 2 — к IA2 (38%), ТПО (19%), GAD (19%). В группе 1 с использованием биочипа обнаружены АТ к ТПО (11%), ТГ (11%), P450c21 (4%), ИФН-альфа (4%), ICA (4%), в группе 2 — к ТПО (13%), ICA (13%), ТГ (6%), ИФН-альфа (6%). Значимых различий в частоте повышения АТ в группах не выявлено ($p > 0.05$). У пациентов с носительством АТ, выявленных на биочипах, при отрицательном результате ИФА не исключается развитие АИЗ в отсроченном периоде, что позволяет предположить прогностическую значимость МИ. Отсутствие значимых различий в частоте повышения АТ среди пациентов с целиакией и здоровых лиц может быть обусловлено ограниченной численностью групп наблюдения и свидетельствовать о высокой распространенности потенциальных форм АИЗ в данных когортах.

Ключевые слова: целиакия, аутоиммунные заболевания, скрининг, мультиплексный иммуноанализ, гидрогелевый биочип

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Фонда научно-технологического развития Югры № 2023-571-05/2023.

Вклад авторов: Н. Ф. Нуралиева — анализ литературы, концепция и дизайн исследования, обследование пациентов, сбор материала, лабораторные исследования, анализ и интерпретация результатов, написание статьи; М. Ю. Юкина — анализ литературы, концепция и дизайн исследования, обследование пациентов, сбор материала, лабораторные исследования, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование статьи; С. В. Быкова — обследование пациентов, сбор материала, редактирование статьи; Е. Н. Савватеева — анализ литературы, концепция и дизайн исследования, лабораторные исследования на биочипах, анализ и интерпретация результатов; Е. В. Кулагина, Л. В. Никанкина — лабораторные исследования (ИФА); Б. Л. Шаскольский — анализ результатов мультиплексного исследования аутоантител; Д. А. Грядун — концепция и дизайн исследования; редактирование статьи; Е. А. Трошина — редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России (протокол № 14 от 29 июля 2022 г.). Все пациенты и условно здоровые лица подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Нурана Фейзуллаевна Нуралиева
ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, г. Москва, 117292, Россия; nnurana@yandex.ru

Статья получена: 02.04.2025 **Статья принята к печати:** 16.04.2025 **Опубликована онлайн:** 23.04.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.020

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DETERMINATION OF THE RATE OF AUTOANTIBODY CARRIER STATE IN PATIENTS WITH CELIAC DISEASE BY MONO- AND MULTIPLEX IMMUNOASSAY

Nuralieva NF¹✉, Yukina MY¹, Bykova SV², Savvateeva EN³, Nikankina LV¹, Kulagina EV³, Shaskolskiy BL³, Gryadunov DA³, Troshina EA¹

¹ Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

² Loginov Moscow Clinical Scientific Centre, Moscow, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The search for concomitant autoimmune disorders (ADs) in patients with celiac disease is a pressing issue. The study aimed to determine the rate of the carrier state for antibodies (Abs) being the markers of AD development in patients with celiac disease using various immunological approaches. Enzyme-linked immunoassay and hydrogel microarray-based multiplex immunoassay (MI) were used to determine Abs against thyroid peroxidase (TPO), thyroglobulin (TG), glutamate decarboxylase (GAD), pancreatic islet cells (ICA), tyrosine phosphatase (IA2), 21-hydroxylase (P450c21), Castle's intrinsic factor, tissue transglutaminase (TGM2) in blood serum of patients with celiac disease (group 1, $n = 27$) and healthy individuals (group 2, $n = 16$). The microarray also enables testing of Abs against interferons (IFN) alpha and omega, interleukin 22. In group 1, Abs against IA2 (30%), TPO (22%), TG (19%), GAD (19%) were detected by the enzyme-linked immunoassay, and in group 2 Abs against IA2 (38%), TPO (19%), GAD (19%) were detected. In group 1, Abs against TPO (11%), TG (11%), P450c21 (4%), IFN-alpha (4%), ICA (4%) were detected using the microarray, and in group 2 Abs against TPO (13%), ICA (13%), TG (6%), IFN-alpha (6%) were identified. No significant differences in the rate of elevated Abs in the groups were revealed ($p > 0.05$). Patients, in whom the Ab carrier state was established using microarrays, with negative results enzyme-linked immunoassay can develop the delayed ADs, which suggests prognostic value of MI. The lack of significant differences in the rate of elevated Abs in patients with celiac disease and healthy individuals can result from small size of the studied groups and can suggest high prevalence of potential AD forms in these cohorts.

Keywords: celiac disease, autoimmune diseases, screening, multiplex immunoassay, hydrogel microarray

Funding: the study was supported by the Foundation for Scientific and Technological Development of Yurga (No. 2023-571-05/2023).

Author contribution: Nuralieva NF — literature review, study concept and design, patient assessment, material collection, laboratory testing, analysis and interpretation of the results, manuscript writing; Yukina MY — literature review, study concept and design, patient assessment, material collection, laboratory testing, analysis and interpretation of the results, manuscript writing and editing; Bykova SV — patient assessment, material collection, manuscript editing; Savvateeva EN — literature review, study concept and design; laboratory microarray testing; analysis and interpretation of the results; Kulagina EV, Nikankina LV — laboratory testing (ELISA); Shaskolskiy BL — analysis of the autoantibody multiplex testing results; Gryadunov DA — study concept and design; manuscript editing; Troshina EA — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Endocrinology Research Centre (protocol No. 14 dated 29 July 2022). All the patients and conditionally healthy individuals submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nurana F. Nuralieva
Dmitriya Ulyanova, 11, Moscow, 117292, Russia; nnurana@yandex.ru

Received: 02.04.2025 **Accepted:** 16.04.2025 **Published online:** 23.04.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.020

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Целиакия — аутоиммунное заболевание (АИЗ), обусловленное непереносимостью глютена у генетически предрасположенных лиц и характеризующееся повреждением слизистой оболочки тонкой кишки. Клинически целиакия проявляется диареей, потерей веса, а также задержкой роста и развития у детей. Необходимо отметить, что классические гастроинтестинальные симптомы (абдоминальная боль, тошнота, метеоризм) при целиакии в настоящее время встречаются реже, в связи с изменением морфогенеза заболевания за последние 30 лет. Нередко целиакия имеет атипичное течение и манифестирует поражением кожи, репродуктивными нарушениями и неврологическими проявлениями [1]. Хорошо известно о частой ассоциации целиакии с другими АИЗ, такими как сахарный диабет 1-го типа (СД1), аутоиммунный тиреоидит (АИТ), аутоиммунный гепатит, герпетиформный дерматит [2–4], а также с синдромом Шегрена, селективным дефицитом IgA, ювенильным хроническим артритом, аутоиммунным миокардитом [5]. Опубликованы данные о коморбидности целиакии с первичным билиарным циррозом, первичным склерозирующим гепатитом, болезнью Аддисона, витилиго, гнездной алопецией, дерматомиозитом, периферической нейропатией, ревматоидным артритом и другими АИЗ [6]. Более того, некоторые из перечисленных АИЗ рассматривают в качестве клинических «масок» целиакии, например, гнездная алопеция [1]. Таким образом, пациенты с АИЗ составляют группу риска по развитию целиакии. С целью своевременной диагностики пациентам с АИЗ требуется проведение скрининга на наличие целиакии. Вместе с тем, лицам с установленной целиакией следует рекомендовать обследование для исключения возможных сопутствующих АИЗ. В частности, в опубликованных исследованиях осуществляется анализ антител (АТ) — маркеров СД1, аутоиммунных тиреопатий, синдрома Шегрена, антинуклеарных, антимитохондриальных АТ, АТ к ДНК, к антигену Смита, нейтрофилам, гладким мышцам, микросомам, париетальным клеткам желудка [7]. Авторами не выявлена более высокая частота носительства АТ, специфичных к АИЗ, у пациентов с целиакией по сравнению со здоровыми участниками. По мнению исследователей, такие результаты обусловлены небольшим числом пациентов и соблюдением ими безглютеновой диеты. Однако в работе выявлена более высокая частота развития сопутствующих АИЗ при целиакии, в отличие от здоровых лиц. Таким образом, авторы делают вывод о необходимости как клинического, так и лабораторного обследования пациентов с целиакией при подозрении на сопутствующее АИЗ, и рекомендуют не ограничиваться исключительно анализом крови на антитела.

Учитывая большое число потенциальных АИЗ, которые могут развиваться у пациента, проведение регулярного скрининга методом иммуноферментного анализа может быть значительно затруднено, в связи с высокой стоимостью и длительностью исследования, а также необходимостью забора большого количества биологического материала. В этой связи с целью оптимизации алгоритма обследования пациентов с целиакией, целесообразно рассмотреть возможность применения мультиплексного иммуноанализа, который позволяет в одном образце крови небольшого объема (5 мкл) получить за короткий промежуток времени информацию о наличии/отсутствии большого числа АТ, специфичных для различных АИЗ. Метод мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа

применяют для диагностики и скрининга целиакии. В настоящее время производят диагностические наборы, позволяющие одновременно определять наличие у пациента АТ к глинам и тканевой трансглутаминазе (TGM2) [8, 9], а также АТ к эндомизину [10]. Результаты, полученные при помощи мультиплексного иммуноанализа, соответствуют данным моноплексных методов [10] и характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью [9]. Предполагается, что благодаря преаналитическим, аналитическим и экономическим преимуществам, по мере внедрения мультиплексного иммуноанализа, необходимость в проведении биопсии с целью подтверждения диагноза значительно сократится [8].

С учетом высокого риска развития у одного пациента нескольких АИЗ разработаны диагностические наборы на основе мультиплексного иммуноанализа, которые позволяют исследовать АТ, специфичные не только к целиакии, но и к другим АИЗ. Предложен метод мультиплексного электрохемилюминисцентного анализа для выявления АТ к инсулину, глутаматдекарбоксилазе (GAD), тирозинфосфатазе (IA2), тканевой трансглутаминазе, тиреоидной пероксидазе (ТПО), тиреоглобулину (ТГ), ИФН-альфа [11]. Вместе с тем, нет опубликованных работ, оценивающих частоту носительства АТ, включая специфичные для эндокринных АИЗ, у пациентов с целиакией методом мультиплексного иммуноанализа.

Цель настоящей работы — определить частоту носительства антител — маркеров аутоиммунных заболеваний у пациентов с целиакией методами иммуноферментного и мультиплексного иммуноанализа.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Место и время проведения исследования

Исследование проводили в ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Национальном медицинском исследовательском центре эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации и Институте молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

Набор материала осуществляли в марте–июне 2023 г., лабораторное обследование проводили в марте–декабре 2023 г., анализ результатов — в январе–июне 2024 г.

Исследуемые когорты

Когорта пациентов с целиакией (группа 1)

Критерии включения: мужской или женский пол; возраст 18 лет и старше; верифицированный на основании клинических, иммунологических и инструментальных данных диагноз целиакии (согласно данным предоставленной медицинской документации). Критерии исключения: беременность, период лактации; острые инфекции; обострение хронических заболеваний; тяжелые, угрожающие жизни состояния (декомпенсация хронической сердечной недостаточности, хроническая болезнь почек СЗб и более, легочная и печеночная недостаточность); патология иммунной системы (включая врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании); прием в течение месяца перед включением в исследование препаратов, влияющих на

функцию иммунной системы (интерлейкины, интерфероны, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики); проведение вакцинации/ревакцинации в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным предоставленной медицинской документации).

Когорта условно здоровых участников (группа 2)

Критерии включения: мужской или женский пол, возраст 18 лет и старше, отсутствие субклинического/ манифестного аутоиммунного заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации). Критерии исключения: симптомы целиакии (диарея, анемия, потеря веса), беременность, период лактации; острые инфекции; обострение хронических заболеваний; тяжелые, угрожающие жизни состояния (декомпенсация хронической сердечной недостаточности, хроническая болезнь почек СЗб и более, легочная и печеночная недостаточность; патология иммунной системы, в том числе врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании); прием препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (интерлейкины, интерфероны, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики), в течение месяца перед включением в исследование; проведение вакцинации/ревакцинации в течение месяца перед включением в исследование.

В группу 1 включено 27 пациентов от 29 до 51 года (медианный возраст — 36 лет), из них 17 (63%) — женщины. В группу 2 включено 16 участников в возрасте от 30 до 52 лет (медианный возраст — 41 год), из них 12 (75%) — женщины. Длительность заболевания на момент включения в исследование у пациентов группы 1 составила 7 [3; 21], (1, 36) лет. В группе 1 сопутствующие АИЗ диагностированы у трех пациентов (11%), в том числе аутоиммунный тиреоидит (АИТ) — у двоих (7%) и гипопаратиреоз — у одного (4%).

Способ формирования выборок из нескольких изучаемых когорт

Применяли сплошной способ формирования выборок.

Дизайн исследования

Многоцентровое интервенционное одномоментное двухвыборочное сравнительное исследование.

Методы

Критерии установления диагноза целиакии

Диагноз целиакии устанавливали на основании комплексного обследования пациентов с учетом клинической картины заболевания, повышенных серологических маркеров (уровень антител к тканевой трансглутаминазе (IgA и IgG) выше референсных значений), а также морфологической картины слизистой оболочки тонкой кишки (признаки гиперрегенераторной атрофии слизистой оболочки тонкой кишки по классификации Марша–Оберхубера) в соответствии с рекомендациями всероссийского консенсуса по диагностике и лечению целиакии у взрослых и детей [4].

Всем включенным в исследование проводили определение АТ-маркеров АИЗ методами ИФА, хемилюминесцентного

анализа и мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа.

Иммуноферментный анализ

В рамках скрининга сопутствующих АИЗ всем включенным пациентам выполняли исследование уровня АТ — маркеров АИТ (к ТПО, ТГ), сахарного диабета 1-го типа (к GAD, островковым клеткам поджелудочной железы (ICA), IA2), аутоиммунной надпочечниковой недостаточности (к 21-гидроксилазе (P450c21)), аутоиммунного гастрита (внутреннему фактору Кастла), целиакии (уровень IgA АТ к тканевой TGM2).

Забор крови производили в вакуумные пробирки с инертным гелем из кубитальной вены утром в период с 08:00 до 10:00 в состоянии натощак (голодание в течение не менее 8 ч и не более 14 ч до забора). Полученные пробы центрифугировали не позднее чем через 15 мин после забора с использованием центрифуги Eppendorf 5810R (Eppendorf, США) при температуре 4 °C на скорости 3000 оборотов в минуту в течение 15 мин и затем обрабатывали. Определение уровня АТ к ТПО и ТГ проводили в день взятия крови. Образцы сыворотки для последующего определения уровней АТ к P450c21, GAD, IA2, ICA, внутреннему фактору Кастла и тканевой TGM2 подлежали временной заморозке в микропробирках при температуре –80 °C. Определение АТ к ТГ проводилось на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas 6000 (Roche, Германия), АТ к ТПО — методом хемилюминесцентного иммуноанализа на автоматическом анализаторе Architect i2000 (Abbott, США). Определение АТ к P450c21, IA-2, GAD, ICA, внутреннему фактору Кастла, тканевой TGM2 осуществляли методом ИФА с использованием коммерческих наборов (BioVendor, Чехия (АТ к P450c21); Medipan, Германия (АТ к IA-2); Biomerica, США (АТ к GAD, ICA); Orgentec Diagnostika, Германия (АТ к внутреннему фактору Кастла); Хема, Россия (АТ к тканевой TGM2, общий IgA)). Референсные интервалы иммунологических показателей крови составляли: АТ к P450c21 — < 0,4 Ед/мл, ТПО — 0–5,6 МЕ/мл, ТГ — 0–115 МЕ/мл, GAD — < 1 Ед/мл (1–1,05 — «серая зона», > 1,05 — положительный уровень), IA2 — < 8 Ед/мл (8–10 — «серая зона», ≥ 10 — положительный уровень), ICA — < 0,95 Ед/мл (0,95–1,05 — «серая зона», > 1,05 — положительный уровень), внутреннему фактору Кастла — < 6 Ед/мл, IgA АТ к тканевой TGM2 — ≤ 20 Ед/мл, общий IgA — 0,9–5,0 г/л. Показатели в пределах «серой зоны» расценивали как повышенные.

Мультиплексный иммуноанализ на основе гидрогелевого биочипа

Гидрогелевые биочипы изготавливали методом сополимеризационной иммобилизации на основе технологии гидрогелевых биочипов, разработанной в ИМБ РАН. Созданный и апробированный ранее биочип [12], позволяющий выявлять как органоспецифические АТ (АТ к P450c21, АТ к GAD, АТ к IA-2, АТ к ICA, АТ к ТГ и АТ к ТПО), так и АТ против цитокинов (АТ к ИНФ-омега, АТ к ИНФ-альфа и АТ к интерлейкину 22) был модифицирован для выявления антител IgA к тканевой TGM2. С этой целью на биочип были добавлены гидрогелевые элементы, содержащие тканевую TGM2 (R&D Systems, США). Для одновременного выявления антител классов G и A в качестве детектирующих использовали смесь антител против IgG человека, меченных флуоресцентным красителем Cy5.5, и

Таблица 1. Уровни исследованных методом иммуноферментного анализа антител и частота их повышения в группах 1 и 2

Уровень антител***				Частота повышения, n (%)			
Антитела	Группа 1	Группа 2	p^*	Антитела	Группа 1	Группа 2	p^{**}
	$n = 27$	$n = 16$			$n = 27$	$n = 16$	
к ТПО, МЕ/мл	0,8 [0,5; 4,1]	0,5 [0,3; 2,0]	0,315	к ТПО	6 (22)	3 (19)	0,907
к ТГ, МЕ/мл	16,4 [13,6; 83,1]	14,0 [12,2; 18,2]	0,149	к ТГ	5 (19)	2 (13)	0,929
к GAD, Ед/мл	0,5 [0,5; 0,8]	0,5 [0,4; 0,8]	0,734	к GAD	5 (19)	3 (19)	0,699
к IA2, Ед/мл	3,6 [1,0; 8,4]	1,0 [1,0; 9,5]	0,792	к IA2	8 (30)	6 (38)	0,595
ICA, Ед/мл	0,4 [0,3; 0,5]	0,3 [0,3; 0,5]	0,49	ICA	2 (7)	0	0,715
к P450c21, Ед/мл	0,1 [0,1; 0,1]	0,1 [0; 0,1]	0,866	к P450c21	0	0	–
к внутреннему фактору Кастла, Ед/мл	3,2 [0; 4,6]	1,7 [1,1; 2,6]	0,253	к внутреннему фактору Кастла	4 (15)	–	–
к TGM2, Ед/мл	1,2 [0,7; 3,5]	0,9 [0,6; 1,5]	0,125	к TGM2	0	0	–
				Минимум одно АТ	20 (74)	10 (63)	0,424

Примечания: * — U -критерий Манна–Уитни. Пороговый $p_0 = 0,004$ (после применения поправки Бонферрони: 14 сравнений). ** — тест Хи-квадрат и тест Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый $p_0 = 0,004$ (после применения поправки Бонферрони: 14 сравнений). *** — Медианное значение, $[Q_1; Q_3]$. ТПО — тиреоидная пероксидаза; ТГ — тиреоглобулин; GAD — глутаматдекарбоксилаза; ICA — антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IA2 — тирозинфосфатаза; P450c21 — 21-гидроксилаза, TGM2 — тканевая трансглутаминаза.

антител против IgA человека, меченных флуоресцентным красителем Cy3. Конъюгаты F(ab')₂-фрагментов антител козы к иммуноглобулину G человека (Invitrogen, США) и F(ab')₂-фрагментов антител козы к иммуноглобулину A человека (Invitrogen, США) получали согласно методике производителя флуоресцентных красителей Cy5.5 и Cy3, соответственно («Люмипроб РУС», Россия). Регистрацию флуоресцентных изображений биочипов и вычисление флуоресцентных сигналов получали с помощью анализатора и программного обеспечения (ИМБ РАН, Россия). Интерпретация результатов анализа на биочипе с установлением наличия/отсутствия АТ в сыворотке крови проводили, как описано ранее [12].

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием пакетов программного обеспечения: STATISTICA 13 (StatSoft, США, 2017) и MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия, 2020). Для количественных признаков указывали медиану и интерквартильный интервал. Так как распределение признаков было отличным от нормального, применяли непараметрические тесты. С целью сравнения количественных данных двух независимых выборок применяли U -критерий Манна–Уитни; 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 применяли поправку Бонферрони. После применения поправки значения p в диапазоне между рассчитанным и 0,05 интерпретировали как статистическую тенденцию.

Многопараметрический анализ сигналов, полученных по результатам исследования образцов сыворотки крови на биочипах, соответствующих уровням аутоантител, с учетом наличия или отсутствия диагноза «целиакия», проводили с использованием метода решающих деревьев для построения одиночного дерева по алгоритму классификации и регрессии (CART). Полученное разбиение на классы по спектру значений сигналов анализировали с помощью точного теста Фишера для проверки гипотезы об

однородности. Затем с помощью точного теста Фишера для парных сравнений с применением поправок Бонферрони проводили апостериорные сравнения (post-hoc анализ). Вычисления и построение рисунков производили с помощью языка R с использованием пакетов rpart версии 4.1.24, rpart.plot версии 3.1.2, ggplot2 версии 3.5.1, rstatix версии 0.7.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значимых отличий по возрасту ($p = 0,372$) и полу ($p = 0,633$) между группами не выявлено. Уровни АТ, исследованных методом ИФА, и частота их повышения представлены в табл. 1. Повышение IgA к тканевой TGM2 не выявлено ни у одного из участников исследования. В группе 1 у семи (26%) пациентов не выявлено повышение АТ, повышение одного АТ отмечено у 13 (48%) пациентов, двух АТ — у пяти (19%), трех АТ — у одного (4%), четырех АТ — у одного (4%). В группе 2 у шести (38%) обследуемых не выявлено повышение АТ, повышение одного АТ отмечено у восьми (50%) лиц, двух АТ — у 1 (6%), четырех АТ — у одного (6%). Медианные значения уровня общего IgA методом ИФА у пациентов с целиакией составили 1,1 г/л [95% ДИ: 0,9; 1,5], в группе здоровых — 1,1 г/л [95% ДИ 1,0; 1,4]. У одного пациента группы 1 уровень общего IgA был ниже предела обнаружения ($< 0,06$ г/л).

Значения сигналов элементов биочипа, соответствующие уровням исследованных АТ, полученные методом мультиплексного иммуноанализа, и частота их повышения представлены в табл. 2. Антитела к TGM2 (TGM2-IgA) также не выявлены ни у одного из участников исследования. В группе 1 у 18 (66%) пациентов АТ не выявлены, наличие одного АТ отмечено у восьми (30%) пациентов, двух АТ — у одного (4%). В группе 2 АТ не выявлены у 12 (75%) обследуемых, одно АТ обнаружено у троих (19%), три АТ — у одного (6%).

Среди всей исследуемой когорты ($n = 43$) выявлено восемь носителей АТ (18,6%), для которых было обнаружено более одного АТ к целевой группе белков и/или выявленные АТ подтверждены двумя методами: два носителя АТ против белков-маркеров сахарного диабета — пациент с целиакией и здоровый; шесть носителей антитиреоидных АТ — пять пациентов с целиакией без установленного диагноза АИТ и один

Таблица 2. Значения сигналов элементов биочипа, соответствующие уровням исследованных АТ, полученные методом мультиплексного иммуноанализа, и частота их повышения в группах 1 и 2

Значения сигналов элементов биочипа, отн. ед.***				Частота повышения, n (%)			
Антитела	Группа 1	Группа 2	p^*	Антитела	Группа 1	Группа 2	p^{**}
	$n = 27$	$n = 16$			$n = 27$	$n = 16$	
к ТПО	1,1 [0,9; 1,4]	1,4 [1,0; 1,8]	0,247	к ТПО	3 (11)	2 (13)	0,383
к ТГ	0,8 [0,7; 1,0]	0,95 [0,7; 1,2]	0,496	к ТГ	3 (11)	1 (6)	0,446
к GAD	1,0 [0,9; 1,1]	0,9 [0,8; 1,0]	0,126	к GAD	0	0	–
к IA2	1,0 [0,9; 1,0]	0,9 [0,8; 1,1]	0,724	к IA2	0	0	–
ICA	1,0 [0,9; 1,3]	1,4 [0,8; 2,1]	0,358	ICA	1 (4)	2 (13)	0,37
к P450c21	0,9 [0,8; 1,0]	1,1 [0,8; 1,9]	0,097	к P450c21	1 (4)	0	0,297
к ИФН-омега	1,0 [0,7; 1,1]	0,85 [0,5; 1,0]	0,529	к ИФН-омега	0	0	–
к ИФН-альфа	0,9 [0,8; 1,2]	1,2 [0,9; 1,7]	0,346	к ИФН-альфа	1 (4)	1 (6)	0,31
к ИЛ-22	1,0 [1,0; 1,3]	0,9 [0,8; 1,1]	0,449	к ИЛ-22	0	0	–
к TGM-2 (IgA)	1,1 [0,9; 1,1]	0,8 [0,3; 1,2]	0,065	к TGM-2 (IgA)	0	0	–
				Минимум одно АТ	8 (30)	3 (19)	0,668

Примечания: * — U -критерий Манна-Уитни. Пороговый $p_0 = 0,003$ (после применения поправки Бонферрони: 16 сравнений). ** — тест Хи-квадрат и тест Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый $p_0 = 0,003$ (после применения поправки Бонферрони: 16 сравнений). *** — Медианное значение, $[Q_1; Q_3]$. ТПО — тиреоидная пероксидаза; ТГ — тиреоглобулин; GAD — глутаматдекарбоксилаза; ICA — антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IA2 — тирозинфосфатаза; P450c21 — 21-гидроксилаза; ИФН (интерферон); ИЛ-22 (интерлейкин 22), TGM2 — тканевая трансглутаминаза

условно здоровый пациент без установленного диагноза АИТ. Для двух пациентов с помощью мультиплексного анализа установлено носительство АТ к интерферону альфа (условно здоровый пациент с МЭН-1 и пациент с целиакией). У четырех пациентов с целиакией методом ИФА выявлены АТ к внутреннему фактору Кастла, ассоциированные с аутоиммунным гастритом.

В силу того что ни одним из методов не выявлен повышенный уровень антител IgA к тканевой TGM2 у пациентов с целиакией, нами был проведен многопараметрический анализ сигналов элементов биочипа по результатам анализа образцов сыворотки крови исследуемых групп. На основании входного массива сигналов, полученных на биочипах, соответствующих различным уровням десяти исследуемых АТ, построено дерево классификации и регрессии (CART) (рис. 1).

Полученное дерево показывает вероятность наличия у пациента диагноза «целиакия» с точностью 0,92 в случае, если соблюдаются два условия: значение TGM2-IgA 0,57

и значение ICA-IgG < 1,7. Распределение пациентов по классам построенного дерева в зависимости от диагноза «целиакия» (рис. 2, табл. 3) было проанализировано с помощью точного критерия Фишера. Полученное значение p составило < 0,0001.

Результаты апостериорных сравнений с использованием точного теста Фишера с применением поправок Бонферрони (табл. 4) свидетельствуют о различии на уровне значимости $p < 0,005$ в классах 2 и 3 и в классах 1 и 3. Различие между классами 1 и 2 несущественно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выборку пациентов с целиакией можно считать репрезентативной по полу (отмечается преобладание женщин) и возрасту манифестации заболевания.

В настоящем исследовании не выявлено повышения АТ к тканевой TGM2 ни в одном образце. Среди причин возможных ложноотрицательных серологических тестов при

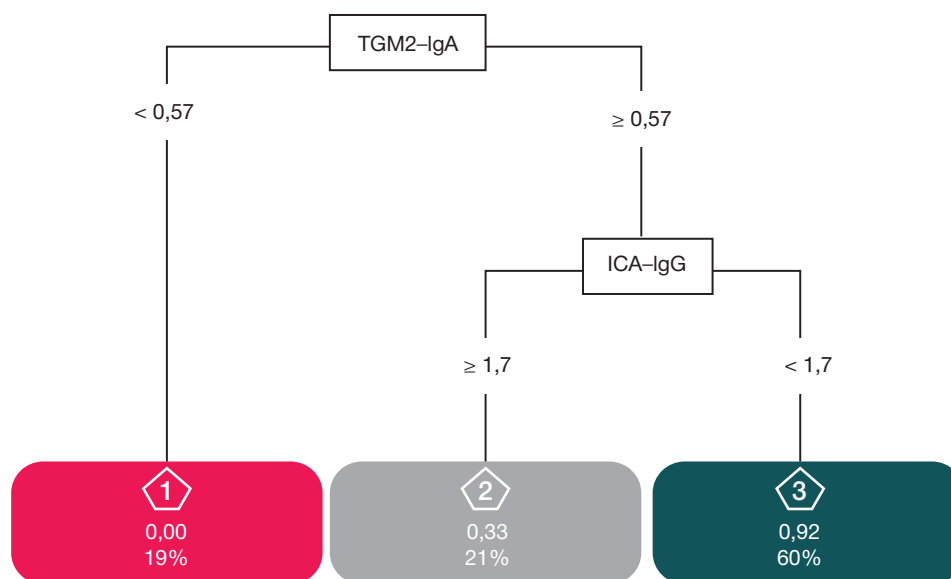


Рис. 1. Дерево классификации и регрессии (CART). В каждом концевом узле дерева (листе) указано название выделенного класса (здесь: 1, 2, 3), вероятность диагноза «целиакия» (здесь: 0,00, 0,33, 0,92), доля пациентов в классе в сравнении со всей выборкой (здесь: 19%, 21%, 60%)

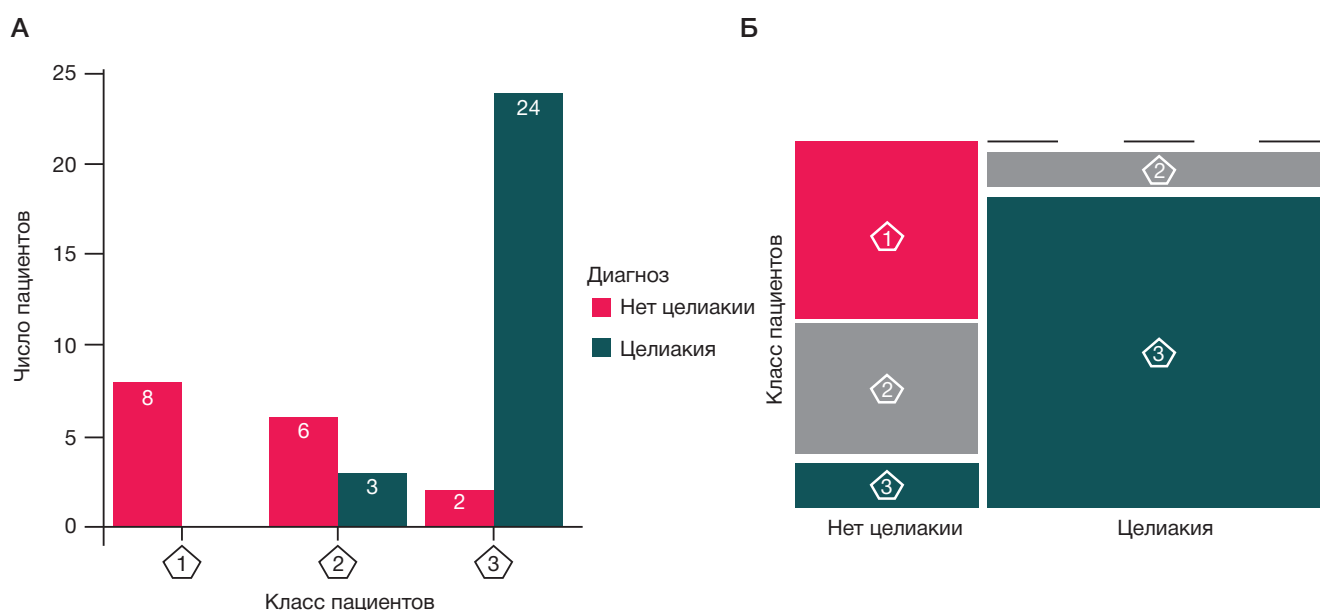


Рис. 2. Распределение пациентов по классам и наличию диагноза «целиакия» в виде столбчатой а) и мозаичной б) диаграмм. Соответствующие классы обозначены цифрами в пятиугольниках

целиакии выделяют селективный дефицит IgA, уменьшение или исключение глютена из рациона, использование кортикостероидов или иммунодепрессантов [13].

Для исключения дефицита IgA у пациентов и здоровых доноров методом ИФА определяли уровень общего IgA в сыворотке крови. У одного пациента группы 1 (мужчина, 33 года) с помощью ИФА был выявлен дефицит IgA: уровень общего IgA был ниже предела обнаружения. Остальные пациенты группы 1 обладали уровнем общего IgA в пределах нормы, что также наблюдали и для группы 2. Целиакия является аутоиммунным заболеванием, ассоциированным с дефицитом IgA. Тем не менее данные о частоте дефицита IgA среди пациентов с целиакией в разных популяциях варьируются в широких пределах — от 0,55 до 16,67% [16]. Результаты исследуемой выборки пациентов соответствуют ранее опубликованным данным (дефицит IgA выявлен у одного из 27 пациентов; 3,7%). Таким образом, так как отсутствует дефицит иммуноглобулина A у 26 из 27 пациентов, отрицательные результаты тестирования IgA к тканевой TGM2 обусловлены длительным анамнезом целиакии и приверженностью к безглютеновой диете у большинства пациентов.

АИТ у пациентов с целиакией на момент включения в настоящее исследование встречался только в 7% случаев ($n = 2$). У одного из этих пациентов методом ИФА выявлено повышение как АТ к ТГ, так и АТ к ТПО, тогда как при мультиплексном анализе данных АТ выявлено не было. У второго пациента оба метода выявили повышение исключительно АТ к ТГ. Согласно результатам других авторов, частота АИТ у пациентов с целиакией составляет 5,7–18,9% [15, 16]. С учетом молодого возраста пациентов, высокой частотой повышения антител к ТПО и ТГ (методом ИФА частота повышения АТ к ТПО и ТГ оставляет 22% и 19% соответственно), высоковероятно, что частота АИТ в данной группе будет возрастать со временем.

У одного из пациентов диагностирован гипопаратиреоз. В литературе сочетание целиакии с гипопаратиреозом описано в единичных случаях. Предполагается, что гипопаратиреоз не является первичным, а развивается вследствие перекрестной реактивности АТ к эндомизию с антигенами околощитовидных желез [17]. Необходимо отметить, что у данного пациента также диагностирован сахарный диабет на фоне сниженного уровня С-пептида и нормальных уровней АТ к инсулину, GAD, IA2, транспортеру цинка 8 (ZnT8), ICA (исследование расширенной панели АТ-маркеров СД1 проведено до включения в исследование). Таким образом, аутоиммунный генез заболевания не подтвержден. Ранее проведенное генетическое обследование установило наличие патогенной мутации в гене GSK, что подтверждает MODY-диабет. Повышения АТ к внутреннему фактору Кастла, Р450с21, ИФН-альфа и ИФН-омега у данного пациента не выявлено. В отношении АТ к ткани щитовидной железы получены неоднозначные результаты — уровни АТ к ТГ, измеренные двумя методами, были в пределах нормальных значений, как и уровень АТ к ТПО, выявленный при ИФА, тогда как методом мультиплексного анализа определен уровень АТ к ТПО в пределах «серой зоны». Анамнез пациента примечателен развитием подострого тиреоидита, требовавшего назначения преднизолона, однако на момент забора крови лечение было завершено (подтвержден эутиреоз).

Отметим, что частота сопутствующих АИЗ в нашем исследовании (11%) меньше по сравнению с опубликованными ранее данными [13]: 33,7% пациентов имели, по крайней мере, одно АИЗ, из них 8,1% — множественную аутоиммунную патологию; наиболее часто встречались АИТ (18,9%), реже СД1 (13,5%) и прочие. Возможно, это обусловлено небольшим числом участников в нашем исследовании.

Таблица 3. Распределение пациентов по классам в зависимости от сигналов, полученных на биочипах, и наличия диагноза «целиакия»

Диагноз «целиакия»	Класс 1	Класс 2	Класс 3
Да	0	3	24
Нет	8	6	2

Таблица 4. Результаты парного сравнения классов

Классы	<i>p</i>	<i>p</i> -скорректированное*
1 и 2	0,206	0,618
1 и 3	0,00000248	0,00000744
2 и 3	0,0012	0,0036

Примечания: * — *p*-значение с поправкой Бонферрони

Методом ИФА, как и методом мультиплексного анализа, нами не обнаружено значимых отличий в частоте повышения АТ-маркеров эндокринных и неэндокринных АИЗ при сравнении групп. Аналогичные результаты описаны в литературе, когда проводили оценку частоты носительства АТ к ТПО, ТГ, GAD, ICA у пациентов с целиакией и здоровых участников [7]. Вместе с тем, есть сообщения о более высокой частоте АТ к GAD у пациентов с целиакией [18]. Необходимо отметить, что частота повышения АТ к ТПО у пациентов с целиакией значительно варьирует, по данным разных авторов, и составляет от 3,9 до 30,5% [7, 13, 19, 20–22], что, вероятно, обусловлено различиями в возрасте участников, а также чувствительности диагностических наборов. Частота повышения АТ к ТГ при целиакии, согласно литературным данным, составляет 11,2–11,7% [20, 23], к GAD — 0–13,5% [7, 13, 18, 19, 24], к IA2 — 1–1,25% [18, 19], к париетальным клеткам желудка — 10,9% [19], к P450c21 — 2,2% [19].

В обследованной нами когорте пациентов с целиакией частота повышения АТ значительно превышала аналогичные данные, полученные в другой работе: 13 (17,6%) из 74 обследованных пациентов были носителями одного АТ, 9 (12,2%) — носителями двух и более АТ [15]. Однако необходимо отметить, что авторы анализировали исключительно АТ к GAD, ТПО и антинуклеарные АТ. В исследовании других авторов носительство как минимум одного АТ зафиксировано у 31,5% из 92 обследованных пациентов (в работе проведено определение АТ к инсулину, GAD, IA2, ZnT8, ТПО, париетальным клеткам желудка, P450c21) [19]. В отличие от нашего исследования, в этой работе носительство по крайней мере одного АТ при целиакии встречалось значимо чаще, чем в когорте здоровых лиц (обследовано 237 участников). Авторы отмечают, что частота носительства АТ увеличивается с возрастом: так, в группе 34–50 лет повышенный уровень АТ встречается в 34,8% случаев, тогда как у пациентов 18–34 лет — в 28,3% случаев. В нашей когорте у одного пациента из группы 1 с помощью мультиплексного анализа выявлены АТ к P450c21 (2,8 отн. ед.), что может быть также связано с возрастом, составляющим 76 лет.

С помощью мультиплексного анализа, помимо органо-специфических АТ, исследованы АТ к интерферонам I типа (ИНФ-альфа и ИНФ-омега) и интерлейкину 22. Ни у одного пациента из групп 1 и 2 не выявлены АТ к интерлейкину 22, ассоциированные с кожно-слизистым кандидозом, и АТ к ИНФ-омега. Высокие титры АТ к интерферонам I типа, высокоспецифичные для аутоиммунного полигландулярного синдрома 1-го типа, могут быть выявлены также у пациентов с некоторыми другими заболеваниями, в том числе с системной красной волчанкой, миастенией, опухолью вилочковой железы [25]. АТ к ИНФ-альфа обнаружены в довольно низком титре (2,5 отн. ед.) у одного пациента с целиакией, у которого другие антитела были в пределах референсных значений и данных за сопутствующие АИЗ не получено. АТ к ИНФ-альфа

(5,6 отн. ед.) выявлены также у одного пациента из группы 2 с синдромом множественных эндокринных неоплазий 1-го типа (МЭН-1), включающего гиперпаратиреоз и инсулиному. Примечательно, что в нашей ранее опубликованной работе [12] также сообщалось о пациенте-носителе АТ к ИНФ-альфа с синдромом МЭН-1, компонентами которого были в том числе инсулинома и гиперпаратиреоз. Эти данные требуют подтверждения. Важно также добавить еще одну особенность, характерную для носительства АТ к ИНФ-альфа: как было показано в ранее опубликованном нами исследовании, оно ассоциировано с рисками тяжелого течения COVID-19 [26].

Отсутствие значимых различий в частоте повышения АТ в группах 1 и 2 может быть обусловлено ограниченной численностью групп наблюдения и свидетельствовать о высокой распространенности потенциальных форм АИЗ в обследованных когортах, а также подтверждает условность термина «здоровый».

Как при помощи ИФА, так и при помощи мультиплексного иммуноанализа, наиболее часто в группе 1 выявлялись маркеры СД1 и АИТ, что согласуется с литературными данными о высоком риске развития данных патологий при целиакии [6]. Важно отметить, что при помощи ИФА, который рассматривается в настоящее время в клинической практике в качестве «золотого стандарта», носительство АТ выявлялось чаще, чем при помощи мультиплексного иммуноанализа как в группе 1, так и в группе 2. Однако в трех случаях мультиплексный иммуноанализ позволил выявить носительство АТ (к P450c21 в группе 1 у одного пациента и к ICA в группе 2 у двух участников) при отрицательном результате, полученном методом ИФА. При гормональном обследовании пациентов с повышенными АТ признаков гипокортицизма и СД1 не обнаружено, однако мы продолжили динамическое наблюдение за данными участниками (так как не исключено развитие АИЗ в отсроченном периоде), чтобы корректно оценить прогностическую значимость полученного результата.

Таким образом, поскольку результаты определения того или иного показателя различными иммунологическими методами могут различаться, выявление у пациента без клинических признаков заболевания одного АТ при скрининговом исследовании требует проведения уточняющих тестов.

В связи со сложностью анализа многомерных данных и неочевидностью получаемых выводов требуется применение математических методов для интерпретации таких массивов данных. Методы решающих деревьев и, в частности, алгоритм дерева классификации и регрессии CART используют в анализе медицинских данных, благодаря их способности обнаруживать сложные взаимодействия между переменными и предоставлять визуально интерпретируемые результаты [27]. В проведенной работе были проанализированы десятимерные массивы данных в виде значений сигналов биочипа для 43 пациентов. Показано, что при проведении мультиплексного анализа

на биочипах можно относить пациентов к одному из трех классов, в которых третий статистически значимо ($p < 0,005$) отличается от первого и второго по частоте обнаружения участников с целиакией. При этом в первый класс вошли только здоровые обследуемые, во второй класс вошли и здоровые и пациенты с целиакией с результатами теста, входящего в условную «серую зону», а третий класс составили 89% пациентов с целиакией и два (12,5%) участника группы 2. Следует отметить, что у одного условно здорового пациента, отнесенного к третьему классу, были диагностированы идиопатический гипопаратиреоз и синдром Фара. Второй условно здоровый индивид является носителем антител к глицину. Однако повышение данных антител является неспецифическим и не служит основанием для диагностики целиакии.

Введение новых подходов для исключения целиакии у лиц, соблюдающих безглютеновую диету, является в настоящее время актуальной задачей, для решения которой разрабатываются специальные методы [28]. Снижение уровня различных аутоантител у пациентов с целиакией, соблюдающих безглютеновую диету, было показано ранее [29, 30]. В частности, безглютеновая диета у пациентов с целиакией ассоциирована с уменьшением или исчезновением островково-специфических аутоантител, в том числе ICA-IgG [30]. Для нашей выборки было показано снижение значений ICA-IgG и P450c21-IgG (данные не представлены) для пациентов с целиакией по сравнению с группой здоровых лиц. Включение в алгоритм CART значений ICA-IgG наряду со значениями TGM2-IgA дало

наилучшее разделение пациентов по классам в зависимости от наличия диагноза «целиакия» с точностью 0,92.

ВЫВОДЫ

Отсутствие АТ-маркеров к тканевой TGM2 у пациентов с целиакией может быть обусловлено длительностью течения заболевания и приверженностью к безглютеновой диете. Частота повышения АТ-маркеров эндокринных АИЗ у пациентов с целиакией значимо не отличается от данного показателя у здоровых лиц. Отсутствие значимых различий в частоте повышения АТ в группах пациентов с целиакией и здоровых участников может быть обусловлено ограниченной численностью групп наблюдения и свидетельствовать о высокой распространенности потенциальных форм АИЗ в данных когортах, а также подтверждает условность термина «здоровый». У пациентов с носительством АТ по данным мультиплексного иммуноанализа при отрицательном результате ИФА не исключается развитие АИЗ в отсроченном периоде, что позволит предположить прогностическую значимость метода мультиплексного иммуноанализа. Многопараметрический анализ маркеров аутоиммунных заболеваний, полученных на биочипах, показал возможность установления диагноза «целиакия» пациентам, соблюдающим безглютеновую диету, в случаях, когда уровень антител к тканевой TGM2 в пределах нормы. Таким образом, показано, что метод мультиплексного иммуноанализа может быть применен как на этапе верификации диагноза целиакии, так и для скрининга органоспецифических АТ в крови у пациентов с АИЗ.

Литература

- Ахмедова Э. Ф., Белинская В. А. Гнездная алопеция как основное проявление целиакии. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022; 205 (9): 303–07. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-205-9-303-307.
- Быкова С. В., Сабельникова Е. А., Задиран Е. И., Парфенов А. И. Осведомленность врачей о целиакии: результаты опроса. Эффективная фармакотерапия. 2021; 17 (16): 92–100. DOI: 10.33978/2307-3586-2021-17-16-92-100.
- Парфенов А. И. Целиакия (болезнь Ги-Гертнера-Гейбнера). М.: Медицинское информационное агентство, 2023; 488 с.
- Парфенов А. И., Быкова С. В., Сабельникова Е. А., Маев И. В., Баранов А. А., Бакулин И. Г. и др. Всероссийский консенсус по диагностике и лечению целиакии у детей и взрослых. Терапевтический архив. 2017; 89 (3): 94–107. DOI: 10.17116/terarkh201789394-107.
- Kocsis D, Csaplár M, Jócsák E, Pák P, Tóth Z, Miheller P, et al. Celiac disease association with other autoimmune disorders: Three case reports. Case Reports in Internal Medicine. 2015; 2 (1): 23–29. DOI: 0.5430/crim.v2n1p23.
- Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. Biomed Research International. 2013; 2013: 127589. DOI: 10.1155/2013/127589.
- Caglar E, Ugurlu S, Ozenoglu A, Can G, Kadioglu P, Dobrucali A. Autoantibody frequency in celiac disease. Clinics. 2009; 64 (12): 1195–200. DOI: 10.1590/S1807-59322009001200009.
- Lochman I, Martis P, Burlingame RW, Lochmanová A. Multiplex assays to diagnose celiac disease. Annals of the New York Academy of Sciences. 2007; 1109: 330–7. DOI: 10.1196/annals.1398.039.
- Holding S, Wilson F, Spradbery D. Clinical evaluation of the BioPlex 2200 Celiac IgA and IgG Kits — a novel multiplex screen incorporating an integral check for IgA deficiency. Journal of Immunological Methods. 2014; 405: 29–34. DOI: 10.1016/j.jim.2014.01.002.
- Abdukhakimova D, Dossybayeva K, Grechka A, Almukhamedova Z, Boltanova A, Kozina L, et al. Reliability of the multiplex CytoBead CeliAK immunoassay to assess Anti-tTG IgA for celiac disease screening. Frontiers in Medicine. 2021; 8: 731067. DOI: 10.3389/fmed.2021.731067.
- Gu Y, Zhao Z, Waugh K, Miao D, Jia X, Cheng J, et al. High-throughput multiplexed autoantibody detection to screen type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases simultaneously. EBioMedicine. 2019; 47: 365–72. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.08.036.
- Savvateeva EN, Yukina MY, Nuralieva NF, Filippova MA, Gryadunov DA, Troshina EA. Multiplex autoantibody detection in patients with autoimmune polyglandular syndromes. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22 (11): 5502. DOI: 10.3390/ijms22115502.
- Rashid M, Lee J. Serologic testing in celiac disease: Practical guide for clinicians. Canadian Family Physician. 2016; 62 (1): 38–43.
- Odineal DD, Gershwin ME. The epidemiology and clinical manifestations of autoimmunity in selective IgA deficiency. Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 2020; 58 (1): 107–33. DOI: 10.1007/s12016-019-08756-7.
- Gupta V, Singh A, Makharia GK. Prevalence of auto-antibodies and autoimmune disorders in patients with celiac disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2020; 55 (7): 785. DOI: 10.1080/00365521.2020.1785544.
- Volta U, De Franceschi L, Molinaro N, Tetta C, Bianchi FB. Organ-specific autoantibodies in celiac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology. 1997; 29: 18–21.
- Patel SR, Shashaty RJ, Denoux P. Nutritional Nightmare: Hypoparathyroidism Secondary to Celiac Disease. The American Journal of Medicine. 2017; 130 (12): e525–e526. DOI: 10.1016/j.amjmed.2017.07.032.
- Ghozzi M, Souguir D, Melayah S, Abidi S, Faleh M, Ghedira I. Frequency of auto-antibodies of type 1 diabetes in adult patients with celiac disease. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2021; 35 (9): e23941. DOI: 10.1002/jcla.23941.

19. Tiberti C, Panimolle F, Borghini R, Montuori M, Trovato CM, Filardi T, et al. Type 1 diabetes, thyroid, gastric and adrenal humoral autoantibodies are present altogether in almost one third of adult celiac patients at diagnosis, with a higher frequency than children and adolescent celiac patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2020; 55 (5): 549–54. DOI: 10.1080/00365521.2020.1754898.
20. Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *The Journal of Pediatrics*. 2000; 137: 263–65. DOI: 10.1067/mpd.2000.107160.
21. Velluzzi F, Caradonna A, Boy MF, Pinna MA, Cabula R, Lai MA, et al. Thyroid and celiac disease: clinical, serological, and echographic study. *American Journal of Gastroenterology*. 1998; 93: 976–979. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1998.291_u.x.
22. Carta MG, Hardoy MC, Boi MF, Mariotti S, Carpinello B, Usai P. Association between panic disorder, major depressive disorder and celiac disease: a possible role of thyroid autoimmunity. *Journal of Psychosomatic Research*. 2002; 53: 789–93. DOI: 10.1016/s0022-3999(02)00328-8.
23. Gaibi S, Mohammad Amini H, Feizollah Zadeh S. Investigating the prevalence of autoimmune thyroid diseases in children with celiac disease in Urmia city, Iran. *Studies in Medical Sciences*. 2023; 34(6): 330–37.
24. Hadjivassiliou M, Aeschlimann D, Grünewald RA, Sanders DS, Sharrack B, Woodroffe N. GAD antibody-associated neurological illness and its relationship to gluten sensitivity. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2011; 123 (3): 175–80. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2010.01356.x.
25. Gupta S, Tatouli IP, Rosen LB, Hasni S, Alevizos I, Manna ZG, et al. Distinct functions of autoantibodies against interferon in systemic lupus erythematosus: a comprehensive analysis of anticytokine autoantibodies in common rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatology*. 2016; 68 (7): 1677–87. DOI: 10.1002/art.39607.
26. Savvateeva E, Filippova M, Valuev-Elliston V, Nuralieva N, Yukina M, Troshina E, et al. Microarray-based detection of antibodies against SARS-CoV-2 proteins, common respiratory viruses and type I interferons. *Viruses*. 2021; 13: 2553. DOI: 10.3390/v13122553.
27. Zimmerman RK, Balasubramani GK, Nowalk MP, Eng H, Urbanski L, Jackson M L, et al. Classification and Regression Tree (CART) analysis to predict influenza in primary care patients. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16 (1): 503. DOI: 10.1186/s12879-016-1839-x.
28. Sarna VK, Lundin KEA, Mørkrid L, Qiao SW, Sollid LM, Christophersen A. HLA-DQ-gluten tetramer blood test accurately identifies patients with and without celiac disease in absence of gluten consumption. *Gastroenterology*. 2018; 154 (4): 886–896. e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.11.006.
29. Elia ZN, Berwary NJA. Effectiveness of a gluten-free diet on the autoantibody frequency of endocrine and neuron disorders in patients with celiac disease. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 2024; 7 (1): 34–43. DOI: 10.5455/jabet.2024.d03.
30. Tiberti C, Montuori M, Trovato CM, Panimolle F, Filardi T, Valitutti F, et al. Gluten-free diet impact on dynamics of pancreatic islet-specific autoimmunity detected at celiac disease diagnosis. *Pediatric Diabetes*. 2020; 21 (5): 774–80. DOI: 10.1111/pedi.13054.

References

1. Ahmedova JeF, Belinskaja VA. Gnezdnaia alopecija kak osnovnoe pojavlenie celiakii. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2022; 205 (9): 303–07. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-205-9-303-307. Russian.
2. Bykova SV, Sabel'nikova EA, Zadiran EI, Parfenov AI. Osvedomlennost' vrachej o celiakii: rezul'taty oprosa. *Jeffektivnaja farmakoterapija*. 2021; 17(16): 92–100. DOI: 10.3397/82307-3586-2021-17-16-92-100. Russian.
3. Parfenov AI. Celiakija (bolezni Gi-Gertera-Gejbnera). M.: Medicinskoje informacionnoe agentstvo, 2023; 488 c. Russian.
4. Parfenov AI, Bykova SV, Sabel'nikova EA, Maev IV, Baranov AA, Bakulin IG, i dr. Vserossijskij konsensus po diagnostike i lecheniju celiakii u detej i vzroslyh. *Terapevticheskij arhiv*. 2017; 89 (3): 94–107. DOI: 10.17116/terarkh201789394-107. Russian.
5. Kocsis D, Csaplár M, Jöcsák E, Pák P, Tóth Z, Miheller P, et al. Celiac disease association with other autoimmune disorders: Three case reports. *Case Reports in Internal Medicine*. 2015; 2 (1): 23–29. DOI: 0.5430/crim.v2n1p23.
6. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *Biomed Research International*. 2013; 2013: 127589. DOI: 10.1155/2013/127589.
7. Caglar E, Ugurlu S, Ozenoglu A, Can G, Kadioglu P, Dobrucali A. Autoantibody frequency in celiac disease. *Clinics*. 2009; 64 (12): 1195–200. DOI: 10.1590/S1807-59322009001200009.
8. Lochman I, Martis P, Burlingame RW, Lochmanová A. Multiplex assays to diagnose celiac disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1109: 330–7. DOI: 10.1196/annals.1398.039.
9. Holding S, Wilson F, Spradbery D. Clinical evaluation of the BioPlex 2200 Celiac IgA and IgG Kits — a novel multiplex screen incorporating an integral check for IgA deficiency. *Journal of Immunological Methods*. 2014; 405: 29–34. DOI: 10.1016/j.jim.2014.01.002.
10. Abdulkhakimova D, Dossybayeva K, Grechka A, Almukhamedova Z, Boltanova A, Kozina L, et al. Reliability of the multiplex CytoBead CeliAK immunoassay to assess Anti-tTG IgA for celiac disease screening. *Frontiers in Medicine*. 2021; 8: 731067. DOI: 10.3389/fmed.2021.731067.
11. Gu Y, Zhao Z, Waugh K, Miao D, Jia X, Cheng J, et al. High-throughput multiplexed autoantibody detection to screen type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases simultaneously. *EBioMedicine*. 2019; 47: 365–72. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.08.036.
12. Savvateeva EN, Yukina MY, Nuralieva NF, Filippova MA, Gryadunov DA, Troshina EA. Multiplex autoantibody detection in patients with autoimmune polyglandular syndromes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (11): 5502. DOI: 10.3390/ijms22115502.
13. Rashid M, Lee J. Serologic testing in celiac disease: Practical guide for clinicians. *Canadian Family Physician*. 2016; 62 (1): 38–43.
14. Odineal DD, Gershwin ME. The epidemiology and clinical manifestations of autoimmunity in selective IgA deficiency. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2020; 58 (1): 107–33. DOI: 10.1007/s12016-019-08756-7.
15. Gupta V, Singh A, Makharia GK. Prevalence of auto-antibodies and autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2020; 55 (7): 785. DOI: 10.1080/00365521.2020.1785544.
16. Volta U, De Franceschi L, Molinaro N, Tetta C, Bianchi FB. Organ-specific autoantibodies in coeliac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? *Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1997; 29: 18–21.
17. Patel SR, Shashaty RJ, Denoux P. Nutritional Nightmare: Hypoparathyroidism Secondary to Celiac Disease. *The American Journal of Medicine*. 2017; 130 (12): e525–e526. DOI: 10.1016/j.amjmed.2017.07.032.
18. Ghazzi M, Souguir D, Melayah S, Abidi S, Faleh M, Ghedira I. Frequency of auto-antibodies of type 1 diabetes in adult patients with celiac disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021; 35 (9): e23941. DOI: 10.1002/jcla.23941.
19. Tiberti C, Panimolle F, Borghini R, Montuori M, Trovato CM, Filardi T, et al. Type 1 diabetes, thyroid, gastric and adrenal humoral autoantibodies are present altogether in almost one third of adult celiac patients at diagnosis, with a higher frequency than children and adolescent celiac patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2020; 55 (5): 549–54. DOI: 10.1080/00365521.2020.1754898.
20. Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *The Journal of Pediatrics*. 2000; 137: 263–65. DOI: 10.1067/mpd.2000.107160.
21. Velluzzi F, Caradonna A, Boy MF, Pinna MA, Cabula R, Lai MA, et al. Thyroid and celiac disease: clinical, serological, and echographic study. *American Journal of Gastroenterology*. 1998; 93: 976–979. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1998.291_u.x.
22. Carta MG, Hardoy MC, Boi MF, Mariotti S, Carpinello B, Usai P.

- Association between panic disorder, major depressive disorder and celiac disease: a possible role of thyroid autoimmunity. *Journal of Psychosomatic Research*. 2002; 53: 789–93. DOI: 10.1016/s0022-3999(02)00328-8.
23. Gaibi S, Mohammad Amini H, Feizollah Zadeh S. Investigating the prevalence of autoimmune thyroid diseases in children with celiac disease in Urmia city, Iran. *Studies in Medical Sciences*. 2023; 34(6): 330–37.
 24. Hadjivassiliou M, Aeschlimann D, Grünewald RA, Sanders DS, Sharrack B, Woodroffe N. GAD antibody-associated neurological illness and its relationship to gluten sensitivity. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2011; 123 (3): 175–80. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2010.01356.x.
 25. Gupta S, Tatouli IP, Rosen LB, Hasni S, Alevizos I, Manna ZG, et al. Distinct functions of autoantibodies against interferon in systemic lupus erythematosus: a comprehensive analysis of anticytokine autoantibodies in common rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatology*. 2016; 68 (7): 1677–87. DOI: 10.1002/art.39607.
 26. Savvateeva E, Filippova M, Valuev-Elliston V, Nuralieva N, Yukina M, Troshina E, et al. Microarray-based detection of antibodies against SARS-CoV-2 proteins, common respiratory viruses and type I interferons. *Viruses*. 2021; 13: 2553. DOI: 10.3390/v13122553.
 27. Zimmerman RK, Balasubramani GK, Nowalk MP, Eng H, Urbanski L, Jackson M L, et al. Classification and Regression Tree (CART) analysis to predict influenza in primary care patients. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16 (1): 503. DOI: 10.1186/s12879-016-1839-x.
 28. Sarna VK, Lundin KEA, Mørkrid L, Qiao SW, Sollid LM, Christophersen A. HLA-DQ-gluten tetramer blood test accurately identifies patients with and without celiac disease in absence of gluten consumption. *Gastroenterology*. 2018; 154 (4): 886–896. e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.11.006.
 29. Elia ZN, Berwary NJA. Effectiveness of a gluten-free diet on the autoantibody frequency of endocrine and neuron disorders in patients with celiac disease. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 2024; 7 (1): 34–43. DOI: 10.5455/jabet.2024.d03.
 30. Tiberti C, Montuori M, Trovato CM, Panimolle F, Filardi T, Valitutti F, et al. Gluten-free diet impact on dynamics of pancreatic islet-specific autoimmunity detected at celiac disease diagnosis. *Pediatric Diabetes*. 2020; 21 (5): 774–80. DOI: 10.1111/pedi.13054.