

Автоматизированный электрохемилюминесцентный метод определения кортизола в слюне для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением

Белая Ж.Е., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., Огнева Н.А., Бутрова С.А., Трошина Е.А., Колесникова Г.С., Дедов И.И.

ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
(директор – академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Резюме. Исследование уровня кортизола в слюне используется для диагностики эндогенного гиперкортицизма. Однако референтный интервал и оптимальные точки разделения отличаются при применении различных методов определения кортизола. Цель данного исследования – изучить возможности электрохемилюминесцентного (ЭХЛА) метода определения свободного кортизола в слюне на аппарате Cobas e601 для диагностики эндогенного гиперкортицизма у пациентов с ожирением. Образцы слюны были собраны в 23.00 у 98 здоровых добровольцев и 123 пациентов с ожирением, у 45 из которых был установлен эндогенный гиперкортицизм. Из этих 221 человек 205 сдавали слюну два дня подряд в 23.00 для оценки воспроизводимости метода ЭХЛА, и образцы от 197 человек были заморожены для проведения иммуноферментного анализа (ИФА). У пациентов с подозрением на эндогенный гиперкортицизм проводилась малая проба с дексаметазоном (МПД). Диагноз эндогенного гиперкортицизма окончательно подтверждался после получения результатов гистологического исследования послеоперационного материала или аутопсии. Референтный интервал уровня свободного кортизола у здоровых добровольцев составил 0,5–9,4 нмоль/л. Коэффициент корреляции при измерении свободного кортизола в одно и то же время два дня подряд – 0,785. Оптимальная точка разделения для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением – 9,4 нмоль/л (чувствительность 84,4% (95% ДИ 71,2–92,2%); специфичность 92,3% (95% ДИ 84,2–96,4%), прогностическая ценность положительного результата 11,0 (95% ДИ 5,0–23,9); прогностическая ценность отрицательного результата 0,17 (95% ДИ 0,08–0,33) и отношение правдоподобия для положительного результата 65,1 (95% ДИ 20,4–207,6). Двукратное измерение кортизола в слюне методом ЭХЛА с расчетом среднего, измерение кортизола в слюне методом ИФА и МПД по диагностическим возможностям соответствовали однократному исследованию слюны на свободный кортизол методом ЭХЛА. Вывод. Однократное исследование свободного кортизола в слюне, собранной в 23.00 методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа на анализаторе Cobas e601 – удобный и информативный метод скрининга на эндогенный гиперкортицизм среди пациентов с ожирением. *Ключевые слова:* эндогенный гиперкортицизм, свободный кортизол в слюне, электрохемилюминесцентный иммуноанализ, диагностика, ожирение.

Resume. Nighttime salivary cortisol (NSC) has been suggested to be a useful diagnostic test for Cushing's syndrome (CS). However, the reference range and cut-off value are assay-specific and discordant. The goal of this study was to assess the analytical performance of automated electrochemiluminescence immunoassay method (ECLIA) in CS. Ninety eight healthy volunteers and 123 obese patients including 45 proved to be CS provided salivary samples collected by them at 23:00 using Sallivette. Two hundred and five subjects collected salivary samples for two consecutive days and samples from 197 subjects were frozen to perform Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Obese patients underwent the 1-mg overnight dexamethasone suppression test (1-DST). CS was confirmed by the histologic diagnosis after surgical treatment or autopsy. The reference range for healthy volunteer has been set 0,5–9,4 nmol/l. Reproducibility was assessed in all subjects by a day-to-day variability and reflected by an intraclass correlation coefficient of 0,785. The cut-off value of 9,4 nmol/l has been suggested to differentiate CS among obese patients to achieve sensitivity of 84,4% (95% confidence interval 71,2–92,2%); specificity of 92,3% (95% CI 84,2–96,4%) and diagnostic odds ratio 65,1 (95% CI 20,4–207,6). Likelihood ratio positive was 11,0 (95% CI 5,0–23,9), with a likelihood ratio negative of 0,17 (95% CI 0,08–0,33). The comparison of the total areas under the ROC-curve for the measurement of NSC once, twice with mean level by ECLIA, the same samples by ELISA and 1-DST have not shown any statistically significant difference among the tests performance. Conclusion: Based on its remarkable reproducibility, easy noninvasive nature, automated assay and at least similar diagnostic performance, NSC measured by ECLIA on Cobas e601 is a preferable first-line screening test for CS. *Keywords:* Cushing's syndrome, nighttime salivary cortisol, electrochemiluminescence immunoassay method, diagnostic test, obesity.

Эндогенный гиперкортицизм — состояние хронической повышенной секреции кортизола вследствие новообразования, продуцирующего адренокортикотропный гормон (АКТГ) или кортизол. Наиболее частыми симптомами эндогенного гиперкортицизма являются центральное (диспластическое или висцеральное) ожирение (97% пациентов), гипертензия (76%), нарушение толерантности к глюкозе или диабет (70%), нарушение половой функции (69%) [1].

Для диагностики эндогенного гиперкортицизма рекомендуется исследовать уровень свободного кортизола в суточной моче (два измерения), проводить малую пробу с дексаметазоном (МПД) и оценивать уровень свободного кортизола в слюне, собранной в 23.00–24.00 [2]. Как правило, в высокоспециализированных медицинских учреждениях проводятся все диагностические тесты. В общей клинической практике оптимально начать с наиболее простого исследования для врача и пациента. Сбор мочи в течение 24 часов связан с возможностью потери или неправильного измерения общего объема. Кроме того, избыточное потребление жидкости и снижение функции почек влияют на уровень свободного кортизола в моче [3, 4]. Малая проба с дексаметазоном требует забора крови и фармакологического вмешательства, к которому некоторые пациенты могут относиться с настороженностью. Исследование уровня свободного кортизола в слюне в 23.00 имеет целый ряд преимуществ: методика неинвазивна, занимает 2–3 минуты в вечернее время, легко выполняется пациентом и не требует помощи медицинского персонала. Кортизол циркулирует в крови в связанном с белком состоянии и лишь 3–4% гормона свободно и оказывает метаболический эффект [5]. Свободный кортизол диффундирует через ацинарные клетки слюнных желез и отражает биологически активную фракцию в крови [6]. Содержание кортизола в слюне не зависит от количества слюны [7] и стабильно при комнатной температуре до 7 дней, а при сохранении образца в холодильнике даже несколько недель [8]. Первые исследования уровня свободного кортизола в слюне проводились методом радиоиммунного анализа (РИА) [9, 10, 11]. Позже в США были валидизированы методы иммуноферментного анализа (ИФА) [12] и тандем-масс-спектрометрии [13]. На базе Эндокринологического научного центра исследовался и был внедрен иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА) для определения свободного кортизола в слюне [14].

Все большую распространенность приобретают электрохемилюминесцентные методы исследования (ЭХЛА) на автоматизированных анализаторах. Такие анализаторы выполняют множество исследований, в том числе давно используются в рутинной практике для определения уровня кортизола в крови. Согласно описанию производителя, диагностические наборы для анализаторов Elecsys 1010 и 2010, Cobas e411 и e601 фирмы Хоффманн Ля Рош обладают достаточной чувствительностью для определения свободного кортизола в слюне.

При сравнении различных методов определения свободного кортизола в слюне, в частности РИА, тандем-масс-спектрометрии и ИФА было показано, что референтные интервалы и точки разделения (cut-off) отличаются [13, 15]. Таким образом, внедрение нового метода определения свободного кортизола в слюне требует дополнительного исследования.

Цель нашего исследования: изучить диагностические возможности электрохемилюминесцентного метода определения свободного кортизола в слюне на автоматизированной системе Cobas e601 (Хоффманн Ля Рош).

Материалы и методы

Работа состояла из трех разделов:

- 1) оценка референтного интервала свободного кортизола в слюне в 23:00 у здоровых добровольцев и воспроизводимости метода;
- 2) определение оптимальной точки разделения свободного кортизола в слюне для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением, оценка необходимости двукратного определения кортизола в слюне;
- 3) сравнение возможностей метода ЭХЛА с ранее признанным методом ИФА [2], малой пробой с дексаметазоном.

Образцы слюны были взяты у здоровых добровольцев и у пациентов с ожирением или избыточной массой тела, которые имели клинические признаки эндогенного гиперкортицизма (быстрый набор массы тела, изменение внешности, отмеченное самим пациентом). Пациенты были направлены в ФГУ ЭНЦ после осмотра специалистами в регионах для исключения эндогенного гиперкортицизма, а также самостоятельно обращались с целью исключить эндокринный генез ожирения за период с января 2010 г. по январь 2011 г.

Критерии исключения: беременность, работа в ночное время, кровоточивость десен, прием глюкокортикоидных гормонов, острые инфекционные заболевания, обострение хронических заболеваний (почечная и печеночная недостаточность, терминальные состояния, острые периоды инсульта и инфаркта, ранее диагностированные злокачественные новообразования), тяжелые психические расстройства, злоупотребление алкоголем (установленный диагноз «хронический алкоголизм» или употребление крепких алкогольных напитков ежедневно).

Сбор слюны производился в 23.00 два дня подряд с использованием специальной системы для сбора слюны Salivette Sarstedt. Каждому пациенту на руки выдавалась листовка с правилами использования Salivette и рекомендациями не употреблять спиртные напитки за сутки, не есть, не курить, не чистить зубы и не употреблять напитков, кроме простой воды, в течение 30 минут до сбора слюны. Правила сбора слюны указаны на рисунке 1. После сбора слюны пробирка помещалась в холодильник (не в морозильное отделение). Сбор

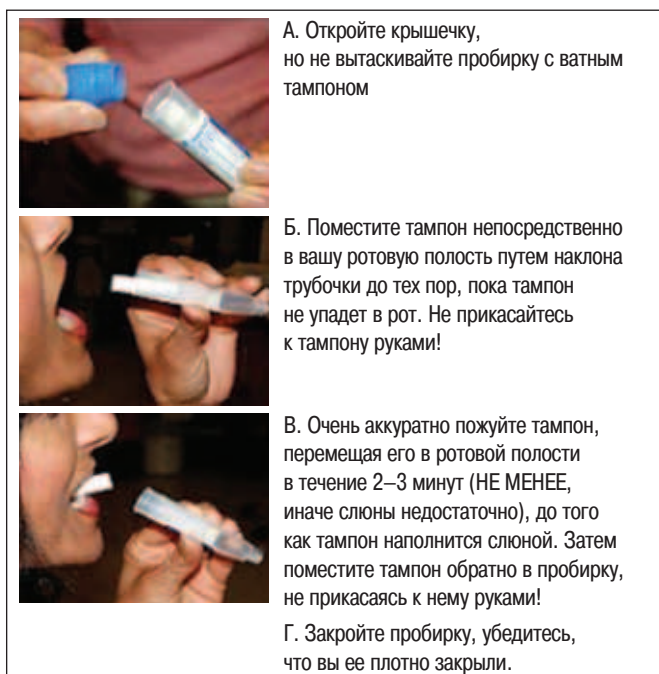


Рис. 1.

слюны всегда производился самостоятельно пациентом, не контролировался медицинским персоналом, в том числе и у стационарных больных. Пробирки центрифугировались в течение 2–3 минут при 1000 оборотов в минуту. Полученный образец слюны в порядке поступления направлялся на электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ЭХЛА) на автоматическом анализаторе Cobas e601 фирмы Хоффманн Ля Рош (диагностический набор Cortisol кат. № 11875116 122). После анализа образцы слюны были заморожены при температуре -70 градусов по Цельсию для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) – DRG Salivary Cortisol ELISA KIT SLV-2930.

Малая проба с дексаметазоном (МПД) проводилась по стандартному протоколу: в 23.00 (после последнего сбора слюны) пациент принимал дексаметазон 1 мг, наутро между 8.00–9.00 часами проводился забор крови на кортизол [2]. Современными клиническими рекомендациями для выявления эндогенного гиперкортицизма рекомендована точка разделения выше 50 нмоль/л после МДП [2], и этот критерий принят нами в работе. Кортизол в сыворотке крови исследовался методом ЭХЛА на автоматическом анализаторе фирмы Cobas e601 Хоффманн Ля Рош.

Пациенты, у которых уровень кортизола в слюне превышал ранее предложенную минимальную точку разделения 4,5 нмоль/л [16] и/или с отрицательным результатом МПД, подвергались дальнейшему обследованию. Необходимые исследования назначались индивидуально, но, как правило, включали оценку уровня свободного кортизола в моче, исследование уровня АКТГ, по показаниям проведение мультиспиральной компьютерной томографии надпочечников и/или магнитнорезонансной томографии головного мозга, а также проведение фармакологических проб. Диагноз конкретной формы

эндогенного гиперкортицизма устанавливался на основании топической локализации опухоли и гистологического подтверждения после проведения хирургического вмешательства или данных аутопсии.

Статистический анализ

Демографические и антропометрические характеристики здоровых добровольцев и пациентов представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. Независимые переменные сравнивались с использованием t-критерия для независимых групп. Оценка согласия проводилась с использованием парного t-критерия, корреляционный анализ – корреляция Пирсона. Референтный интервал рассчитан и представлен в виде 2,5–97,5 процентиля в качестве нижнего и верхнего пределов. Поиск точек разделения и расчет их чувствительности и специфичности проводился на основании построения кривой операционных характеристик (ROC-анализ). В качестве оптимальной точки разделения использовался уровень свободного кортизола в слюне, которому соответствовала максимальная сумма чувствительности и специфичности метода, рассчитанная по данным ROC-анализа отдельно для выявления эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением и здорового контроля. Для сравнения качества диагностических тестов сравнивались площади под кривыми операционных характеристик.

Для анализа данных использовался статистический пакет SPSS 16.0 и MedCalc.

Результаты

Образцы слюны были взяты у 221 человека (98 здоровых добровольцев с нормальным индексом массы тела (ИМТ) и 123 пациентов с ожирением ($\text{ИМТ} \geq 30 \text{ кг/м}^2$), в том числе, 10 человек с избыточной массой тела, которые имели клинические признаки эндогенного гиперкортицизма (быстрый набор массы тела, изменение внешности, отмеченное самим пациентом). Эндогенный гиперкортицизм был подтвержден у 45 пациентов. Общие характеристики пациентов, включенных в исследование, приведены в таблице 1.

Среди пациентов с эндогенным гиперкортицизмом, как и среди пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением, преобладали женщины, группы не отличались по возрасту ($p=0,4$) и окружности талии ($p=0,2$). Однако больные с алимен-

Таблица 1
Характеристики пациентов и группы контроля, включенных в исследование

	Эндогенный гиперкортицизм	Алиментарно-конституциональное ожирение	Здоровые добровольцы
Количество человек	45	78	98
Пол Ж:М, %	35 (78%): 10 (22%)	54 (69%): 24 (31%)	73 (74%): 25 (26%)
Возраст, лет	39,2 $\pm$ 13,3	37,5 $\pm$ 13,7	28,7 $\pm$ 7,5
ИМТ, кг/м ²	32,5 $\pm$ 6,7	38,5 $\pm$ 6,6	22,5 $\pm$ 3,2
Окружность талии	108,6 $\pm$ 14,9	115,2 $\pm$ 17,5	75,4 $\pm$ 11,2
Окружность бедер	107,0 $\pm$ 15,0	124,4 $\pm$ 15,4	96,7 $\pm$ 7,2

Таблица 2

Воспроизводимость метода при двукратной сдаче образцов слюны				
	Количество (N)	Средний уровень кортизола (нмоль/л) ± стандартное отклонение		Р (значимо при $p < 0,05$)
		первое измерение	второе измерение	
Здоровые добровольцы	91	3,17±2,26	3,12±2,42	0,86
Алиментарно-конституциональное ожирение	72	4,51±3,75	4,93±3,47	0,29
Эндогенный гиперкортицизм	42	36,30±44,29	48,50±73,86	0,14

тарно-конституциональным ожирением имели статистически значимо больший индекс массы тела (ИМТ) ($p < 0,00001$) и окружность бедер ($p < 0,00001$). Таким образом, в клинической картине эндогенного гиперкортицизма можно еще раз подчеркнуть преимущественное перераспределение подкожно-жировой клетчатки с бедер на талию и редкое развитие морбидных форм ожирения.

Референтный интервал свободного кортизола в слюне, рассчитанный по данным 98 добровольцев, составил 0,5–9,4 нмоль/л (2,5–97,5 процентиля). Минимальный уровень свободного кортизола в слюне — 0,5 нмоль/л.

Воспроизводимость оценивалась при сравнении измерения уровня кортизола в двух образцах слюны у здоровых добровольцев, пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением, эндогенным гиперкортицизмом и в целом у всех, сдавших слюну. Всего два образца слюны сдали 205 человека (410 образцов), статистически значимых различий между двумя тестами в целом выявлено не было ($p = 0,12$). Коэффициент корреляции между двумя образцами составил 0,785 ($p < 0,0001$). Результаты уровней кортизола в группах представлены в таблице 2.

Уровень кортизола в слюне, измеренный ЭХЛА, был статистически значимо выше у пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением по сравнению с людьми с нормальным ИМТ ($p < 0,001$). В связи с этим оптимальная точка разделения для выявления эндогенного гиперкортицизма отличалась среди пациентов с ожирением и среди группы контроля. Точка разделения (cut-off)

составила 6,85 нмоль/л для выявления эндогенного гиперкортицизма среди людей с нормальным ИМТ (чувствительность — 91,1%, специфичность — 96,9%); среди пациентов с ожирением — специфичность 84,6%, в целом среди всех, принявших участие в исследовании, специфичность — 91,5% (95% ДИ 86,4–94,8). Точка разделения (cut-off) верхнего предела референтного интервала (выше 9,4 нмоль/л) была оптимальной для выявления эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением (чувствительность — 84,4% и специфичность — 92,3%). Среди пациентов с нормальным ИМТ эта точка разделения позволяет добиться специфичности 97,9%. Среди всех, принявших участие в исследовании, специфичность составила 95,4% (95% ДИ 91,3–97,7%). Данные для двух основных точек разделения сведены в таблице 3.

Максимальная чувствительность метода (100%) наблюдалась при уровне кортизола 3,85 нмоль/л, однако специфичность при этом составила лишь 59,0% для пациентов с ожирением, 72,5% для людей с нормальной ИМТ и 66,5% для всех пациентов. Ранее предложенная точка разделения 4,5 нмоль/л [16] при высокой чувствительности 95,5% значительно уступает по специфичности — 68,0% среди пациентов с ожирением и 79,6% среди людей с нормальным ИМТ. Точка разделения 8,3 нмоль/л [17], при чувствительности 84,4%, обладала меньшей специфичностью, чем верхняя референтная граница (9,4 нмоль/л), для пациентов с ожирением — 89,8%, людей с нормальным ИМТ — 96%, в целом 93,8%. Максимальной специфичности (100%) удалось добиться при уровне кортизола 19,7 нмоль/л (чувствительность 62,2%) среди больных с ожирением и 14,15 нмоль/л среди людей с нормальным ИМТ (чувствительность 80%).

Существует рекомендация измерять уровень кортизола в слюне дважды [2].

Всего у 4 из 45 пациентов с эндогенным гиперкортицизмом уровень свободного кортизола в слюне составил менее 6,85 нмоль/л, при этом лишь в 1 случае повторное измерение позволило верифицировать диагноз. Уровень кортизола менее чем 9,4 нмоль/л наблюдался в 7 случаях у больных с эндогенным гиперкортицизмом, и только в 3 случаях повторное измерение было выше 9,4 нмоль/л.

Таблица 3

Диагностические возможности однократного определения свободного кортизола в слюне электрохемилюминесцентным методом на автомате Elecsys (Roche)				
	Выявление эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с:			
	нормальным ИМТ		ожирением	
Тока разделения (cut-off)	Выше 9,4 нмоль/л		6,85 нмоль/л	
Чувствительность (95% ДИ)	84,4% (71,2–92,2)		91,1% (79,3–96,5)	
Специфичность (95% ДИ)	97,9% (92,9–99,4)		84,6% (75,0–90,9)	
Прогностическая ценность положительного результата теста (95% ДИ)	41,3 (10,4–164,0)		5,9 (3,5–10,0)	
Прогностическая ценность отрицательного результата теста (95% ДИ)	0,16 (0,08–0,31)		0,1 (0,04–0,27)	
Отношение правдоподобия для положительного результата теста	260,5 (51,8–1311,1)		56,4 (17,0–186,6)	

Среди пациентов с ожирением уровень кортизола больше 6,85 нмоль/л отмечен у 12 человек. Повторный анализ слюны позволил получить результат меньше 6,85 нмоль/л у 3 пациентов, и еще у 4 из этих больных результаты повторного измерения оказались меньше, чем 9,4 нмоль/л. Уровень кортизола выше, чем 9,4 нмоль/л, был у 6 больных с ожирением, при этом у 3 из них повторное измерение позволило снять диагноз.

Уровень кортизола выше 6,85 нмоль/л зарегистрирован у 3 пациентов с нормальным ИМТ, повторное измерение позволило получить результат меньше 6,85 у 2 человек и еще у одного человека результат был ниже 9,4 нмоль/л. Уровень кортизола выше, чем 9,4 нмоль/л у пациентов с нормальной ИМТ наблюдался в 2 случаях и в обоих случаях повторный результат был ниже 9,4 нмоль/л.

Для двух измерений свободного кортизола в слюне с расчетом среднего значения точка разделения также была рассчитана исходя из максимальной суммы чувствительности и специфичности. Среди пациентов с нормальным ИМТ точка разделения — 8,1 нмоль/л позволяет добиться чувствительности 91,1% (95% ДИ 79,3–96,5) и специфичности 98% (95% ДИ 92,8–99,4%). Точка разделения 9,1 нмоль/л (среднее от двух измерений) среди пациентов с ожирением дает чувствительность 88,9% (95% ДИ 76,5–95,2) и специфичность — 92,3% (95% ДИ 84,2–96,4%).

Однако при сравнении площадей под кривыми операционных характеристик статистически значимых различий между диагностическими возможностями однократного исследования уровня свободного кортизола в слюне и двукратного с расчетом среднего получено не было ($p=0,447$).

Результаты, полученные методом ЭХЛА, срав-

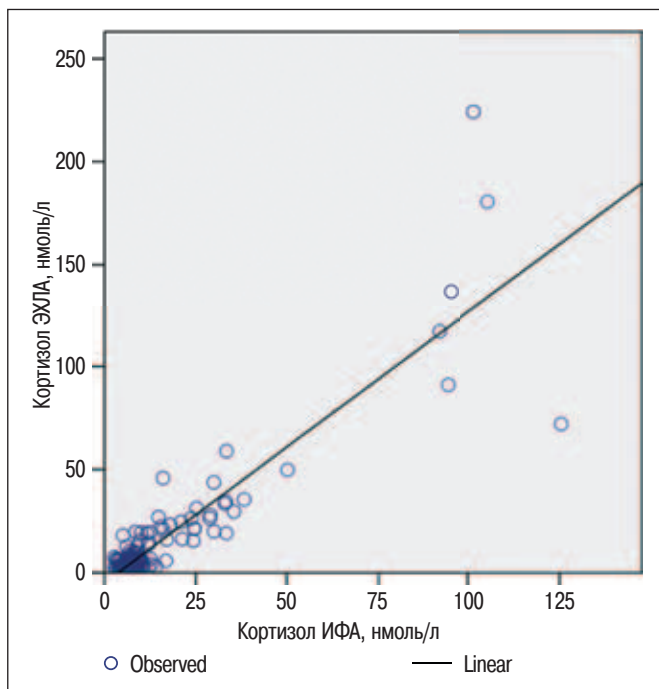


Рис. 2. Линейная зависимость уровня свободного кортизола в слюне, измеренная автоматизированным электрохемилюминесцентным методом (ЭХЛА) и иммуноферментным методом (ИФА) среди всех пациентов ($n=197$).

нивались с результатами ИФА. Образцы слюны от 197 человек были заморожены и направлены на иммуноферментный анализ. При проведении корреляционного анализа была выявлена сильная зависимость: коэффициент корреляции Пирсона $R=0,899$, $p<0,0001$ с формулой $y=-4,9+1,32x$ (рис. 2).

Уровни кортизола, определенные методами ЭХЛА и ИФА, максимально коррелировали при высоких значениях у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом (коэффициент корреляции $r=0,859$, $p<0,0001$), в то же время корреляция была слабее у здоровых добровольцев ($r=0,390$, $p<0,0001$) и у пациентов с ожирением ($r=0,257$, $p=0,03$).

Исследование замороженных образцов слюны (43 пациента из 45 с эндогенным гиперкортицизмом, 71 из 78 пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением и 83 из 98 лиц с нормальной ИМТ) методом ИФА дало сходные результаты чувствительности и специфичности. Оптимальная точка разделения для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением — 9,4 нмоль/л (чувствительность 88,4% (95% ДИ 75,5–94,9%), специфичность — 92,7% (95% ДИ 84,5–96,9%). Статистически значимых различий при сравнении площади под кривой операционных характеристик методов ЭХЛА и ИФА выявлено не было ($p=0,375$).

Дополнительно у 120 пациентов с ожирением из 123 проводили МПД (у трех пациентов с эндогенным гиперкортицизмом проба не проводилась по тяжести состояния). Использование точки раз-

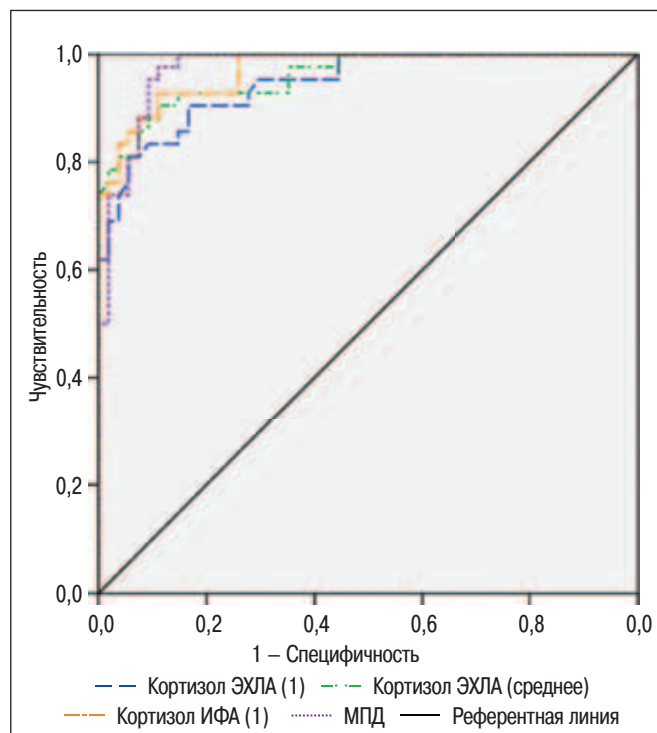


Рис. 3. Кривые операционных характеристик однократного и двукратного (с расчетом среднего) определения кортизола в слюне электрохемилюминесцентным иммуноанализом (ЭХЛА), определение кортизола в слюне методом иммуноферментного анализа (ИФА) и малая проба с дексаметазоном (МПД) для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди больных с алиментарно-конституциональным ожирением.

деления 50 нмоль/л показало чувствительность 100% (95% ДИ 91,8–100%) и специфичность 88,7% (78,5–94,4%). При сравнении площадей под кривыми операционных характеристик статистически значимых различий между диагностическими возможностями МПД и однократным определением уровня свободного кортизола в слюне методом ЭХЛА выявлено не было ($p=0,316$). Кривые операционных характеристик представлены на рисунке 3.

Дискуссия

Определение свободного кортизола в слюне рекомендуется в качестве первого теста для диагностики эндогенного гиперкортицизма [2]. В отличие от других методов ЭХЛА выполняется на автоматизированных анализаторах Elecsys или Cobas с использованием стандартных наборов для определения уровня кортизола (в крови, моче, слюне). Тест не требует высокой квалификации лаборанта, т.к. полностью автоматизирован, а также специальных условий работы в отличие от РИА. Кроме того, при определении кортизола методом ИФА или ЭХЛА длительное ожидание результата обусловлено в том числе необходимостью набора от 40 до 80 образцов слюны для оптимизации стоимости. Применение специальных пробирок со швабом Salivette не требует предварительного замораживания слюны и, таким образом, анализ может выполняться в реальном режиме времени сразу после сдачи образца. Имеются лишь единичные исследования автоматизированного метода определения свободного кортизола в слюне у здоровых добровольцев [18, 19], и в двух работах уровень кортизола в слюне (ЭХЛА) исследовался у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом [16, 17]. В одном исследовании уровень кортизола в слюне в 23.00 определялся методом ЭХЛА и РИА у 126 пациентов (ожирение, объемные образования надпочечников или другие симптомы гиперкортицизма), из которых у 9 был подтвержден эндогенный гиперкортицизм. Авторы предложили точку разделения 4,5 нмоль/л (0,35 мкг/дл) – 100% чувствительность и 88% специфичность для ЭХЛА [16]. При сравнении результатов с методом РИА авторы доказали, что точка разделения зависит от метода определения кортизола в слюне [16]. В работе итальянских исследователей уровень свободного кортизола в слюне в 23.00 методом ЭХЛА определялся у 33 пациентов с подозрением на эндогенный гиперкортицизм (ожирение, гипертензия, сахарный диабет, дислипидемия, опухоль надпочечников), из которых у 21 диагноз был подтвержден [17]. Точка разделения уровня свободного кортизола в слюне – 8,3 нмоль/л, показала чувствительность теста 100% и специфичность 97,4% [17]. Предложенные ранее точки разделения были проанализированы в данном исследовании: точка разделения 4,5 нмоль/л [16] позволяет добиться лучшей чувствительности, чем 6,85 нмоль/л, но с серьезным ущербом для специфичности. Точка разделения 8,3 нмоль/л [17] была также хороша по чувствительности, как и 9,4 нмоль/л,

но уступала по специфичности. Различия в точке разделения и диагностических возможностях (чувствительность, специфичность) метода могут быть обусловлены разным объемом выборки, критериями включения и количеством пациентов с подтвержденным эндогенным гиперкортицизмом.

Действительно, по данным метаанализа (7 исследований уровня свободного кортизола в слюне в 23.00–24.00 различными методами, кроме ЭХЛА) с участием всего 947 пациентов, из которых у 339 больных был подтвержден эндогенный гиперкортицизм, чувствительность метода составила 92% (95% ДИ 88–94), специфичность – 96% (95% ДИ 94–97), отношение правдоподобия – 311 (95% ДИ 92–1059), прогностическая ценность положительного результата – 21 (95% ДИ 10–43), прогностическая ценность отрицательного результата – 0,08 (95% ДИ 0,02–0,32) [20]. В нашем исследовании были получены сходные результаты для выявления эндогенного гиперкортицизма среди людей с нормальным ИМТ (точка разделения 6,85 нмоль/л). Диагностические возможности ЭХЛА оказались несколько хуже для выявления эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с функциональным повышением уровня кортизола, который наблюдается у больных с алиментарно-конституциональным ожирением. В ранее проведенные исследования включались не только пациенты с ожирением, но и с другой патологией, в том числе инсиденталомиями надпочечников, что не сопровождается функциональным гиперкортицизмом и, таким образом, повышает возможности метода. Исследование уровня кортизола в слюне среди 369 пациентов с ожирением или избыточной массой тела (не было выявлено ни одного случая эндогенного гиперкортицизма) показало чувствительность метода РИА 84% (95% ДИ 79–89%) и масс-спектрометрии 92% (95% ДИ 88–95%) [20], что вполне сопоставимо с нашими результатами методом ЭХЛА. Однако из-за отсутствия пациентов с эндогенным гиперкортицизмом [21] не оценивалась специфичность метода. В нашем исследовании эндогенный гиперкортицизм был подтвержден у 45 из 123 пациентов. Высокий процент лиц с диагностированным эндогенным гиперкортицизмом обусловлен специализацией отделения, в котором проводилось исследование, и активным направлением пациентов из других регионов Российской Федерации. Смещенная таким образом выборка, хотя и не отражает истинную распространенность эндогенного гиперкортицизма, позволяет лучше исследовать диагностические возможности метода, оценив не только чувствительность, но и специфичность. В настоящем исследовании состояние функционального повышения уровня кортизола у больных с алиментарно-конституциональным ожирением влияло на выбор оптимальной точки разделения (от 6,85 нмоль/л для людей с нормальным ИМТ до 9,4 нмоль/л для пациентов с ожирением). Возможно, этим объясняется широкий диапазон предложенных точек разделения.

Таким образом, сравнение площадей под кривыми показало, что диагностическая ценность определения свободного кортизола в слюне методом ИФА и ЭХЛА статистически значимо не отличается. Кроме того, исследование уровня кортизола в слюне дважды с расчетом среднего значения не имеет дополнительного статистически значимого преимущества. Соответственно, нет оснований рекомендовать двукратное измерение уровня свободного кортизола в слюне всем пациентам. Повторное измерение уровня свободного кортизола в слюне может быть проведено в клинически сомнительных случаях для улучшения специфичности исследования с повышением точки разделения до 9,4 нмоль/л. Малая проба с дексаметазоном также не обладала лучшими диагностическими возможностями по сравнению с определением свободного кортизола в слюне методом ЭХЛА. Однако проведение МПД с точкой разделения 50 нмоль/л обосновано для улучшения

чувствительности диагностики. Состояние функционального гиперкортицизма (алиментарно-конституциональное ожирение) требует повышения точки разделения и несколько ухудшает возможности метода.

В целом, исследование уровня кортизола в слюне, собранной в 23.00, методом ЭХЛА на автоматизированном анализаторе Cobas e601 фирмы Хоффман-Ля Рош является информативным и удобным методом для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением и среди людей с нормальным ИМТ и может быть рекомендовано в качестве первого исследования скрининга.

Финансирование: Работа поддержана грантом Президента для молодых ученых № МК-6978.2010.

Коллектив авторов выражает глубокую благодарность сотрудникам Эндокринологического научного центра, аспирантам и ординаторам, согласившимся принять участие в исследовании.

Литература

1. Boscaro M., Arnaldi G. Approach to the patient with possible Cushing's syndrome // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 94. – P. 3121–3131.
2. Nieman L.K., Biller B.M.K., Findling J.W., Newell-Price J., Savage M.O., Stewart P.M., Montori V.M. The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline // *J. Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2008. – Vol. 93. – P. 1526–1540.
3. Mericq M.V., Cutler Jr.G.B. High fluid intake increases urine free cortisol excretion in normal subjects // *J. Clin Endocrinol Metabolism.* – 1998. – Vol. 83. – P. 682–684.
4. Fenske M. How much "urinary free cortisol" is really cortisol during water diuresis in healthy individuals? // *Clin Chem.* – 2004. – Vol. 50. – P. 1102–1104.
5. Dunn J.F., Nisula B.C., Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin in human plasma // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 1981. – Vol. 53. – P. 58–68.
6. Brien T.G. Human corticosteroid binding globulin // *J. Clin Endocrinol (Oxf).* – 1981. – Vol. 14. – P. 193–212.
7. Read G.F., Walker R.F., Wilson D.W., Griffiths K. Steroid analysis in saliva for the assessment of endocrine function // *Ann NY Acad of Sci.* – 1990. – Vol. 95. – P. 260–274.
8. Chen Y.M., Cintron N.M., Whitson P.A. Long-term storage of salivary cortisol samples at room temperature // *Clin Chem.* – 1992. – Vol. 38. – P. 304.
9. Hiramatsu R. Direct assay of cortisol in human saliva by solid phase radioimmunoassay and its clinical applications // *Clin Chim Acta.* – 1981. – Vol. 117. – P. 239–249.
10. Evans P.J., Peters J.R., Dyas J., Walker R.F., Riad-Fahmy D., Hall R. Salivary cortisol levels in true and apparent hypercortisolism // *J. Clinical Endocrinology (Oxf).* – 1984. – Vol. 20. – P. 709–715.
11. Alexandraki K.I., Grossman A.B. Novel Insights in the diagnosis of Cushing's syndrome // *J. Neuroendocrinology.* – 2010. – Vol. 92, suppl. 1. – P. 35–43.
12. Restitute P., Galofre J.C., Gil M.J., Mugueta C., Santos S., Monreal J.I., Varo N. Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid-related disorders // *J. Clin Biochem.* – 2008. – Vol. 41. – P. 688–692.
13. Baid S.K., Sinaii N., Wade M., Rubino D., Nieman L.K. Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: a comparison of assays to establish hypercortisolism // *J. Clin Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92. – P. 3102–3107.
14. Гончаров Н.П., Кацян Г.В., Марова Е.И., Колесникова Г.С., Арапова С.Д., Рожинская Л.Я.: Использование ультрачувствительного метода определения биологически активного свободного кортизола в слюне для оценки глюкокортикоидной функции коры надпочечников // *Проблемы эндокринологии.* – 2008. – Т. 58. – № 3. – С. 27–35.
15. Raff H., Raff J.L., Findling J.W. Late-night salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – Vol. 83. – P. 2681–2686.
16. Beko G., Varga I., Glaz E., Sereg M., Feldman K., Toth M., Racz K., Patocs A. Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods // *Clin Chim Acta.* – 2010. – Vol. 411. – P. 364–367.
17. Carrozza C., Corsello S.M., Paragliola R.M., Palumbo F.I.S., Locantore P., Sferrazza A., Pontecorvi A., Zuppi C. Clinical accuracy of midnight salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay method in Cushing's syndrome // *Annals of Clinical Biochemistry.* – 2010. – Vol. 47, pp. 228–232.
18. Vogeser M., Durner J., Seliger E., Auernhammer C. Measurement of late-night salivary cortisol with an automated immunoassay system // *Clin Chem Lab Med.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1441–1445.
19. Schindhelm R.K., Leur J.J., Rondeel J.M. Salivary cortisol as an alternative for serum cortisol in the low-dose adrenocorticotrophic hormone stimulation test? // *J. Endocrinol Invest.* – 2010. – Vol. 33. – P. 92–95.
20. Carroll T., Raff H., Findling J.W. Late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing syndrome: a meta-analysis // *Endocr. Pract.* – 2009. – Vol. 15. – P. 335–342.
21. Baid S.M., Rubino D., Sinaii N., Ramsey S., Frank A., Nieman L.K. Specificity of screening tests for Cushing's syndrome in an overweight and obese population // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 2009. – Vol. 94. – P. 3857–3864.

Белая Ж.Е.	к.м.н., старший научный сотрудник отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва E-mail: jannabelaya@gmail.com
Ильин А.В.	заведующий отделением лаборатории клинической биохимии ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Мельниченко Г.А.	профессор, член-корреспондент РАМН, директор института клинической эндокринологии ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Рожинская Л.Я.	профессор, заведующая отделением нейроэндокринологии и остеопатий ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Драгунова Н.В.	аспирант отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Дзеранова Л.К.	д.м.н., главный научный сотрудник отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Огнева Н.А.	аспирант отделения терапии с группой патологии метаболизма и ожирения ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Бутрова С.А.	к.м.н. ведущий научный сотрудник отделения терапии с группой патологии метаболизма и ожирения ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Трошина Е.А.	профессор, заведующая отделением терапии с группой патологии метаболизма и ожирения ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Колесникова Г.С.	д.б.н., главный научный сотрудник ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
Дедов И.И.	академик РАН и РАМН, директор ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
