

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

на правах рукописи

СОЗАЕВА ЛЕЙЛА САЛИХОВНА

**Антитела к интерферонам, цитокинам и органам-мишеням при
аутоиммунном полигландулярном синдроме 1 типа и их прогностическое
значение**

(14.01.02 - Эндокринология)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук
профессор, член-корреспондент РАН,
Петеркова В.А.

Москва, 2016

Оглавление

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 10 |
| 1.1.История вопроса..... | 10 |
| 1.2.Клинические особенности АПС 1 типа | 12 |
| 1.3.Антитела к интерферонам 1 типа | 13 |
| 1.3.1.Интерфероны 1 типа | 13 |
| 1.3.2.Антитела к интерферону- ω | 14 |
| 1.4.Компоненты заболевания и орган-специфические антитела | 19 |
| 1.4.1.Хронический кожно-слизистый кандидоз..... | 19 |
| 1.4.2.Гипопаратиреоз | 23 |
| 1.4.3.Хроническая первичная надпочечниковая недостаточность | 24 |
| 1.4.4.Аутоиммунный гепатит..... | 26 |
| 1.4.5.Гипогонадизм | 28 |
| 1.4.6.Сахарный диабет | 30 |
| 1.4.7.Гипотиреоз и гипертиреоз..... | 30 |
| 1.4.8.Мальабсорбция..... | 31 |
| 1.4.9.Тубулоинтерстициальный нефрит | 33 |
| 1.4.10.Заболевания легких..... | 33 |
| 1.4.11.Алопеция и витилиго | 35 |
| 1.4.12.Гипопитуитаризм | 36 |
| 1.4.13.Пернициозная анемия | 37 |
| 1.4.14.Неврологические расстройства | 37 |
| 1.4.15.Другие компоненты | 38 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 40 |

| | |
|--|-----|
| 2.1. Дизайн исследования | 40 |
| 2.2. Методы исследования..... | 43 |
| 2.3. Статистический анализ результатов | 48 |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ | 49 |
| 3.1. Характеристика пациентов | 49 |
| 3.2. Антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ | 58 |
| 3.3. Антитела к ИЛ-22 и ИЛ-17F | 62 |
| 3.4. Антитела к NALP5 | 66 |
| 3.5. Антитела к SCC и 21ОН..... | 74 |
| 3.6. Обсуждение результатов исследований | 87 |
| Заключение | 101 |
| Выводы | 102 |
| Практические рекомендации | 103 |
| Список сокращений и условных обозначений..... | 104 |
| Список литературы | 105 |
| Приложения | 118 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа (АПС 1) - это редкое аутоиммунное аутосомно-рецессивное заболевание, сопровождающееся полиэндокринной недостаточностью, а также поражением других органов и систем. Причиной заболевания являются мутации в гене *AIRE*, который кодирует белок «аутоиммунный регулятор». Патогенез заболевания до конца не изучен.

Частота известна только у некоторых популяций, таких как иранские евреи (1:9000), жители Сардинии (1:14000), жители Финляндии (1:25000), Норвегии (1:80000) [1–4]. По опубликованным данным максимальная по численности когорта пациентов с АПС 1 типа включает 91 человек [5]. Частота заболевания в РФ не известна.

АПС 1 типа является клинически полиморфным заболеванием - три основных «классических» компонента (хронический кожно-слизистый кандидоз (ХКСК), гипопаратиреоз (ГПТ), хроническая первичная надпочечниковая недостаточность(ХНН)) могут дополняться более чем пятнадцатью дополнительными клиническими компонентами с поражением как органов эндокринной системы, так и других систем (хронический аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный гепатит, пернициозная анемия, первичный гипогонадизм, апластическая анемия и др.) [6]. Однако, три основных компонента не всегда присутствуют на момент манифестации заболевания, что может затруднять диагностику. Компоненты могут развиваться в любом возрасте, порядок манифестации может варьировать, кроме того, значительная часть пациентов может оставаться моносимптомной на протяжении десятков лет жизни, что затрудняет клиническую диагностику. На сегодняшний день невозможно прогнозировать набор компонентов и возраст их манифестации для каждого больного. Ранее было показано, что молекулярно-генетическая

диагностика с выявлением мутаций в гене *AIRE* позволяет установить диагноз при моносимптомном или атипичном течении заболевания [7]. Однако полное секвенирование гена *AIRE* является дорогостоящим методом, который не применим в широкой практике. В последние годы много внимания уделяется изучению аутоантител к различным цитокинам. Особое значение приобрели антитела к интерферону- ω (ИФН- ω), которые по данным зарубежных авторов выявляются у всех пациентов с АПС 1 типа вне зависимости от клинической картины и длительности течения заболевания [8]. В российской популяции данное исследование не проводилось. Определение антител к цитокинам может раскрыть новые патогенетические механизмы развития как АПС 1 типа, так и ряда других аутоиммунных заболеваний. Например, выявлено, что в патогенезе хронического кожно-слизистого кандидоза могут играть роль антитела к Th17-цитокинам (интерлейкин-17F(ИЛ-17F), интерлейкин-22(ИЛ-22)) [9]. В российской когорте пациентов не изучались и эти виды антител.

Известно, что для данного заболевания характерна циркуляция в крови орган-специфических аутоантител в высоких титрах, таких как антитела к 21-гидроксилазе, инсулину, тирозинкиназе, глутаматдекарбоксилазе, тиреопероксидазе, CYP11A1, CYP1A2, NALP5 и др. [10,11]. Является ли выявление определенных антител строгим диагностическим маркером соответствующего компонента, а также какие временные периоды разделяют появление антител и клиническую манифестацию по-прежнему не до конца понятно. Изучение широкого спектра антител при АПС 1 типа и корреляций с клиническим течением заболевания весьма актуально как с практической точки зрения, так и с точки зрения изучения патогенеза заболевания.

Степень разработанности темы исследования

АПС 1 типа активно изучается исследователями из разных стран, в том числе изучаются иммунологические и генетические особенности этого заболевания. Несмотря на это, многие аспекты заболевания остаются не до конца изученными. В связи с тем, что заболевание является редким, большинство исследований проведено на маленьких группах пациентов, что не всегда

позволяет получать статистически достоверные результаты. При АПС 1 типа в крови пациентов обнаруживается множество аутоантител, но диагностическая и прогностическая значимость различных аутоантител остается до конца не известной, в настоящий момент невозможно прогнозировать течение заболевания и оценивать риски развития компонентов АПС 1 типа.

Цель исследования:

Определить клиническое и прогностическое значение антител к интерферонам, интерлейкинам и орган-специфических антител при АПС 1 типа.

Задачи:

1. Исследовать антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ и определить их диагностическую значимость при АПС 1 типа;
2. Исследовать антитела к интерлейкину-22 и интерлейкину-17F, определить их диагностическое и прогностическое значение при АПС 1 типа, оценить корреляции с компонентами заболевания;
3. Исследовать антитела к NALP5, определить их диагностическую и прогностическую значимость в развитии гипопаратиреоза, а также оценить корреляции с другими компонентами АПС 1 типа;
4. Исследовать антитела к 21-гидроксилазе и SCC, определить их диагностическую и прогностическую значимость в развитии хронической первичной надпочечниковой недостаточности, а также оценить корреляции с другими компонентами АПС 1 типа.

Научная новизна

Впервые в России проведено исследование антител к ИФН- ω и $-\alpha 2$, ИЛ-22 и -17F и антигенам органов-мишеней (21-гидроксилазе, SCC, NALP5). Изучена диагностическая значимость исследования антител к интерферонам на большой когорте пациентов с АПС 1 типа. Проведен анализ связи орган-специфических антител с развитием основных компонентов АПС 1 типа.

Теоретическая и практическая значимость

В работе показана высокая специфичность и чувствительность антител к ИФН- ω и $-\alpha 2$, доказана эффективность применения этих антител в качестве

диагностических маркеров заболевания. Разработан и внедрен в клиническую практику алгоритм диагностики стертых форм АПС 1 типа, в основе которого лежит определение антител к интерферонам.

Проведен анализ связи клинических компонентов заболевания с орган-специфическими антителами. Показана значимость антител к 21-гидроксилазе и SCC для прогнозирования и диагностики хронической первичной надпочечниковой недостаточности у пациентов с АПС 1 типа. Дополнительно показана значимость антител к SCC в прогнозировании и диагностике первичного гипогонадизма у пациентов женского пола. Изучена роль определения антител к NALP5 в прогнозировании и диагностике гипопаратиреоза. Определение этих антител предложено использовать в качестве маркеров прогноза надпочечниковой недостаточности, гипопаратиреоза и первичного гипогонадизма.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антитела к интерферону- ω являются специфичными и чувствительными маркерами АПС 1 типа, что позволяет использовать их для скрининговой диагностики пациентов с аутоиммунными заболеваниями для исключения стертых или атипичных форм АПС 1 типа. Высокая специфичность и чувствительность антител к интерферону- $\alpha 2$ позволяет использовать их для диагностики АПС 1 типа в качестве дополнительного к антителам к интерферону- ω диагностического маркера.

2. Корреляция между обнаружением антител к интерлейкину-22, интерлейкину-17F и наличием хронического кожно-слизистого кандидоза не обнаружена. Высокая чувствительность антител к интерлейкину-22 при АПС 1 типа позволяет рассматривать их в качестве дополнительного маркера заболевания.

3. Выявлена статистически достоверная связь между антителами к NALP5 и гипопаратиреозом. Антитела к NALP5 имеют высокую специфичность и прогностическую ценность положительного результата, что позволяет использовать их в качестве прогностического и диагностического маркера гипопаратиреоза у пациентов с АПС 1 типа. Ассоциация антител к NALP5 с

другими компонентами АПС 1 типа не обнаружена. Выявлено, что частота гипопаратиреоза, а также частота обнаружение антител к NALP5 достоверно чаще у пациентов женского пола. Таким образом, женский пол является предрасполагающим фактором для развития гипопаратиреоза у пациентов с АПС 1 типа.

4. Обнаружена статистически достоверная связь между антителами к 21-гидроксилазе, SCC и хронической первичной надпочечниковой недостаточностью. Специфичность, чувствительность и прогностическая значимость положительного результата антител к 21гидроксилазе и SCC высокие, что позволяет использовать их в качестве прогностического и диагностического маркера хронической первичной надпочечниковой недостаточности у пациентов с АПС 1 типа. Кроме того, антитела к SCC являются маркерами преждевременного истощения яичников у пациенток с АПС 1 типа.

Внедрение в практику

Научные положения и практические рекомендации, изложенные в диссертации, внедрены в повседневную работу отделения опухолей эндокринной системы НИИ Детской эндокринологии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ.

Апробация полученных результатов

Диссертационная работа апробирована 29 апреля 2016 года на межотделенческой конференции ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России. Основные положения диссертации обсуждены на европейских конгрессах эндокринологов 52rd Joint ESPE Meeting (Милан, Италия, 2013), 53rd Annual ESPE Meeting (Дублин, Ирландия, 2014), 54rd ESPE Meeting (Барселона, Испания, 2015), на Всероссийском конгрессе эндокринологов (Москва, 2016).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в отечественных журналах, включенных в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для публикации основных научных результатов диссертаций, а также 1 статья в иностранном журнале.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на русском языке, в объеме 125 страницы машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 34 рисунками. Список использованной литературы включает 126 источника

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1.История вопроса

Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа – редкое генетическое заболевание, характеризующееся мультиорганной недостаточностью, вследствие аутоиммунных процессов, затрагивающих в основном органы эндокринной системы. Это заболевание входит в группу аутоиммунных полигландулярных синдромов, которые подразделяют на 3 типа[12]:

- АПС 1 типа – включает в себя сочетания двух из трех основных компонентов: ХНН, ГПТ, ХКСК
- АПС 2 типа – включает в себя сочетания ХНН с другими аутоиммунными заболеваниями за исключением ГПТ и ХКСК
- АПС 3 типа – сочетания различных аутоиммунных заболеваний эндокринной и других систем за исключением ХНН

Некоторые авторы выделяют 4 типа АПС: 1 тип представляет собой сочетание ХКСК, ГПТ и ХНН, 2 типа –сочетание аутоиммунных заболеваний щитовидной железы и/или сахарного диабета с ХНН, 3 тип –сочетание аутоиммунных заболеваний щитовидной железы с другими аутоиммунными заболеваниями за исключением ХНН, 4 тип – сочетание различных аутоиммунных заболеваний, не соответствующих критериям первых трех типа АПС [13,14].

Среди группы полигландулярных синдромов только АПС 1 типа имеет моногенную природу.

Впервые АПС 1 типа был описан в 1929 году врачами E.S.Thorpe и H.E.Handley у девочки 7 лет, страдающей судорожным синдромом и хроническим кандидозом слизистой полости рта [15]. При обследовании пациентки было обнаружено снижение кальция крови и повышение фосфора. Попытка лечить

девочку пероральным приемом хлорида кальция и рыбьего жира в больших дозах не увенчалась успехом, но был получен выраженный положительный эффект от введения ребенку экстракта паращитовидных желез: исчезли судороги, уровень кальция крови повысился до нормальных значений. В 1946 году M.F. Leonard впервые описала сочетание ГПТ, ХНН, алопеции, кератоконъюнктивита и изменений эмали зубов у девочки 9 лет [16]. А в 1956 все описанные ранее случаи были обобщены J. Whitaker в «синдром семейного ювенильного гипокортицизма, гипопаратиреоза и поверхностного кандидоза», который в дальнейшем стал называться синдромом Уайтакера, или аутоиммунным полигландулярным синдромом 1 типа [17].

Значение мутаций, расположенных в области 21q22.3 было впервые описано в 1996г P.Bjorses[18]. В 1997 К. Nagamine идентифицировал ген, нарушение функции которого приводило к развитию АПС 1 типа, а также описал первые мутации в этом гене [19].

Ген *AIRE* расположен на 21 хромосоме в области q22.3 и кодирует белок массой 58 кДа. Было показано, что *AIRE* экспрессируется в медуллярных клетках тимуса, в дендритоподобных клетках лимфатических узлов и селезенки, а также в фетальной печени, но его экспрессия не происходит в клетках и тканях, поражающихся при АПС 1 типа [20][21][22]. На субклеточном уровне, *AIRE* локализуется в ядерных тельцах, которые, как известно, связаны с транскрипционно-активными и хроматин-ассоциированными белками[23]. *AIRE* содержит функциональные домены, найденные в других ассоциированных с хроматином белках, таких как N-концевой HSR / CARD домен (семейство каспаз), SAND (SP100, *AIRE*, NucP41 / 75, DEAF1) домен и два PHD-типа (plathomeodomain) домена цинковых пальцев, расположенных в С-концевой области белка[24][25].

По последним данным, белок *AIRE* играет ключевую роль в процессах негативной селекции аутореактивных Т-лимфоцитов в тимусе. Исследования, проведенные на мышинных моделях (*AIRE*-дефицитные мыши) показали, что белок *AIRE* играет важную роль в представлении ткане-специфичных антигенов в

медулярных клетках тимуса – происходит, так называемая, эктопическая экспрессия антигенов различных органов и тканей организма в тимусе, которая приводит к узнаванию аутореактивных Т-лимфоцитов и запускаются механизмы их апоптоза, т.е. реализуются механизмы негативной селекции аутореактивных Т-лимфоцитов в тимусе[26][27][28][29][30]. Исследования на клеточных моделях показали, что AIRE выступает не только в роли прямого транскрипционного фактора, он также запускает и регулирует работы других транскрипционных факторов, а также существуют «белки-партнеры AIRE», с участием которых белок AIRE регулирует иммунологическую толерантность[31][32][33][34]. Также у AIRE выполняет функцию фактора конечного созревания медулярных эпителиальных клеток тимуса [35][36][37].

1.2.Клинические особенности АПС 1 типа

Клиническая картина АПС 1 типа полиморфна и представляет из себя сочетание аутоиммунного поражения различных органов и тканей. Однако компоненты заболевания встречаются с различной частотой. Самыми частыми проявлениями заболевания являются ХКСК, ГПТ и ХНН – это три основных компонента АПС 1 типа [7][38]. Они могут дополняться большим количеством малых компонентов с вовлечением в патологический процесс как органов эндокринной системы (сахарный диабет, гипотиреоз, первичный гипогонадизм, гипопитуитаризм), так и других органов (алопеция, мальабсорбция, витилиго, аутоиммунный гепатит, пернициозная анемия, апластическая анемия, гипоплазия зубной эмали, аплазия селезенки, хронические блефариты и кератиты, тубулоинтерстициальный нефрит и др.) [7][38] [39] [40].

Полная триада основных компонентов развивается примерно у двух третей пациентов, а новые клинические проявления могут развиваться в течение почти всего периода жизни пациентов[40][25]. Чаще всего первым компонентом заболевания является ХКСК и проявляется он у 75-93% пациентов. Вторым компонентом является, как правило, ГПТ и проявляется он у 77-96% пациентов. Позже всего присоединяется ХНН и наблюдается у 63-92%. [7] [39] [41]

Количество компонентов заболевания может варьировать от 1 до 10 и более в редких случаях.[39] [38] [42] [41] [43]

Для установления диагноза АПС 1 типа были приняты клинические критерии, которые включили в себя следующее [41]:

1. Выявление у пациента двух или трех основных компонентов заболевания (ХКСК, ГПТ и ХНН);
2. Выявление хотя бы одного основного компонента у сибса пациента с подтвержденным АПС 1 типа;
3. Выявление 2х мутаций в гене *AIRE*

Учитывая аутоиммунную природу заболевания, особое значение при изучении АПС 1 типа придается исследованиям иммунологических характеристик заболевания, в особенности, аутоантител. У пациентов с АПС 1 типа в крови выявляются антитела к различным цитокинам и орган-специфические антитела. Антитела к некоторым цитокинам, в частности, к интерферонам, очень специфичны для АПС 1 типа и выявляются практически у всех пациентов с этим заболеванием. Описано также большое количество антител к органам и тканям, выработку которых связывают с развитием тех или иных компонентов заболевания. В связи с этим, дальнейший обзор литературы будет состоять из двух блоков: первый блок, посвященный антителам к интерферонам, и второй блок, в котором будет представлена краткая информация по различным компонентам АПС 1 типа и данные по антителам, с которыми связывают эти проявления.

1.3.Антитела к интерферонам 1 типа

1.3.1.Интерфероны 1 типа

Впервые интерфероны были открыты в 1957 г в качестве веществ, обладающих противовирусной активностью. Интерфероны подразделяют на две группы, а также отдельно выделяют интерферон-подобные цитокины [44]. Интерферонами 1 типа являются ИФН-α, ИФН-β, ИФН-ε, ИФН-κ, ИФН-ω, ИФН-δ

и ИФН- τ . Интерферонами 2 типа являются ИФН- γ . К группе интерферон-подобных цитокинов относят следующие белки: лимитин, ИЛ-28А, ИЛ-28В, ИЛ-29 [44]. Недавно выделили группу интерферонов 3 типа, к которой относятся ИФН- $\lambda 1$, ИФН- $\lambda 2$ и ИФН- $\lambda 3$ [45]. Разделение интерферонов на различные типы происходит на основании рецепторов, с которыми они взаимодействуют [44]. Интерфероны обладают широким спектром биологической активности и могут оказывать противовирусное, антипролиферативное действие, стимулировать цитотоксичную активность клеток иммунной системы (NK-клеток, Т-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и дендритных клеток) в ответ на возрастание экспрессии опухоль-ассоциированных поверхностных антигенов, стимулировать другие поверхностные клеточные молекулы (антигены главного комплекса гистосовместимости класса I), вызывать индукцию и активацию проапоптотических генов и протеинов, ингибировать анти-апоптотические гены, обладают антиангиогенезной активностью [44].

1.3.2. Антитела к интерферону- ω

Антитела к ряду цитокинов (ИФН- $\alpha 2$, ИФН- ω), а также некоторым интерлейкинам впервые были описаны у пациентов с тимоматами и аутоиммунной миастенией. Было проведено исследование антител к широкому спектру цитокинов, и у этой группы пациентов была выявлена высокая частота антител к ИФН- $\alpha 2$, ИФН- ω и ИЛ-21 [46]. В работе был использован метод нейтрализации антивирусных интерферонов (AVINA – англ. AntiViral Interferon Neutrolization Assay). AVINA основан на противовирусной активности ИФНов. В основе метода лежит заражение клеток глиобластомы человека вирусом миоэнцефалита в присутствии сыворотки пациента и специфического интерферона, в случае наличия в сыворотке пациента антител к данному ИФН происходит гибель клеток, что можно зафиксировать при помощи специального красителя и абсорбционного анализа. AVINA был впервые использован под руководством А.Меагер для определения антител к ИФНам у пациентов с тимоматами и миастенией [46].

Исследование антител к цитокинам у пациентов с АПС 1 типа было впервые проведено также под руководством А.Meager. В рамках этой работы были исследованы сыворотки пациентов на присутствие антител ко всем трем типам ИФНов. В данное исследование было включено 16 пациентов из Норвегии и 60 пациентов из Финляндии с генетически подтвержденным диагнозом АПС 1 типа, а также 9 пациентов с АПС 2 типа и 16 пациентов с изолированными ХНН, ГПТ или ХКСК. Исследователи выявили высокие титры антител к большинству подтипов ИФНов- α у пациентов с АПС 1 типа, особенно к ИФН- $\alpha 2$ (у 100% пациентов с АПС 1 типа), а также ИФН- ω (у 100% пациентов с АПС 1 типа). Эти антитела не были обнаружены ни у одного из обследованных пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями. В более низких титрах и в меньшем проценте случаев АПС 1 типа были обнаружены антитела к ИФН- β (22%). Антитела к ИФНам типа III выявлялись в очень низких титрах, а антитела к ИФНам II типа выявлялись крайне редко, и они не относились к группе нейтрализующих антител [8]. Авторы сравнили результаты данного исследования с результатами их предыдущей работы по исследованию антител к ИФНам у пациентов с тимоматами. У пациентов с тимоматами также обнаруживались антитела к ИФН- α и ИФН- ω , но реже (только у 60% пациентов), а титр этих антител не достигал высоких значений [46].

Таким образом, антитела к ИФН- ω оказались специфичными для АПС 1 типа в независимости от спектра манифестировавших компонентов. Интерес представляет то, что, несмотря на высокие титры антител к ИФН- ω и - $\alpha 2$, пациенты не имеют повышенной предрасположенности к вирусным заболеваниям. Существует гипотеза, что в организме присутствует много различных типов и подтипов ИФНов, выполняющих роль за противовирусных агентов, а нейтрализующие антитела обнаруживаются только к определенным подтипам ИФНов, а остальные подтипы ИФНов остаются не затронутыми данным иммунным процессом и могут выполнять свои функции [47]. Также одним из объяснений этого факта является то, что интерфероны вырабатываются

локально, исполняя свои функции паракринным путем, оставаясь недоступными для воздействия аутоантител [47].

Проводились работы по изучению влияния антител к ИФНам на процессы дисрегуляции интерфероновой активности в организме. Так, в работе K.Kisand показано влияние этих антител на экспрессию интерферон-стимулирующих генов в моноцитах и дендритных клетках [47]. Было показано, что происходит значимое снижение экспрессии интерферон-стимулирующих генов у пациентов с АПС 1 типа, которые имели высокие титры антител к ИФН ω и ИФН- α 2, по сравнению со здоровой контрольной группой. Однако, у пациентов, имеющих антитела только к ИФН ω (антитела к ИФН- α 2 были отрицательными), наоборот, отмечается усиление экспрессии данных генов, что говорит о влиянии на экспрессию именно антител к ИФН- α 2. Причем после культивирования моноцитов и дендритных клеток пациентов с АПС 1 типа в фетальной телячьей сыворотке, не содержащей антител, экспрессия ИСГ восстанавливалась, что подтверждало то, что изменения в клетках пациента происходили вследствие влияния антител к ИФН- α 2. Также было показано, что в ответ на стимуляцию вирусами дендритные и плазматические клетки пациентов с АПС 1 типа вырабатывают интерфероны 1 типа и имеют нормальные уровни экспрессии генов интерферонов 1 типа, сопоставимые со здоровой контрольной группой. Авторами было отмечено, что из двух пациентов, которые не имели антител к ИФН- α 2, у одного был аутоиммунный тиреоидит, а у второго - высокие антитела к тиреопероксидазе. Это вызвало особый интерес в связи с тем, что побочным эффектом терапии препаратами интерферона- α является, как известно, аутоиммунное поражение щитовидной железы [47]. Полученные результаты не до конца раскрывают патогенетические механизмы воздействия антител к ИФН 1 типа на течение заболевания и требуют дальнейших исследований.

Эффективность метода определения антител к ИФН ω для диагностики АПС 1 типа была подтверждена в 2008 году исследованием, в которое были включены 174 пациента с АПС 1 типа из Италии, Великобритании, Финляндии и Норвегии. Нейтрализующие антитела к ИФН ω были выявлены в 100% случаев.

Исключение составила одна пациентка с классическими проявлениями АПС 1 типа, в первом образце которой антитела ни к ИФН- ω , ни к ИФН- $\alpha 2$ выявлены не были, но затем два образца, взятые позднее, оказались положительными на оба вида антител [3, 36]. Антитела к ИФН- $\alpha 2$ были выявлены у 94% пациентов в этом исследовании, что также доказывает, что они обладают высокой специфичностью и чувствительностью, но в меньшей степени, чем антитела к ИФН- ω .

Не было выявлено никакой взаимосвязи между титром антител, различными мутациями в гене AIRE, продолжительностью и количеством компонентов заболевания.

Авторами было предложено использовать антитела к ИФН- ω и антитела к ИФН- $\alpha 2$ в качестве диагностического критерия заболевания [46]. В настоящий момент этот метод является основным методом диагностики заболевания в Норвегии, Швеции, Эстонии и ряде других европейских стран [48].

В 2009 году было проведено исследование антител к ИФН- ω у норвежских пациентов с АПС 1 типа радиоиммунным методом. Метод основан на детекции антител, связанных со специфичным белком, которые мечены метионином- S^{23} . Белок получают путем транскрипции РНК из плазмидной ДНК, содержащей специфический вектор и дальнейшей трансляцией РНК в протеин в среде из смеси аминокислот без метионина, в которую добавляется метионин- S^{23} . Метод отличается высокой точностью, позволяет определять антитела не только к ИФН, но также цитокинам и органам-мишеням. В исследование было включено 32 пациента из Норвегии, 7 пациентов из Швеции, 6 пациентов из Финляндии и 3 пациента из Северной Америки. Также были включены здоровые люди, пациенты с изолированной надпочечниковой недостаточностью, сахарным диабетом 1 типа, пациенты с синдромом Дауна и здоровые родственники пациентов с АПС 1 типа. Все 48 пациентов с АПС 1 типа имели высокий титр антител к ИФН- ω , тогда как у остальных пациентов и здоровых людей антитела к ИФН- ω не были обнаружены. Радиоиммунный метод также показал себя высокоспецифичным и высокочувствительным методом диагностики антител к интерферонам [49].

Недостатком метода является необходимость в использовании радиоактивного препарата.

После того, как диагностическое значение антител к ИФН- ω у пациентов с АПС 1 типа было доказано несколькими крупными исследованиями, возник вопрос, как рано у пациентов с АПС 1 типа появляются эти антитела в крови, и можно ли обнаружить эти антитела у новорожденных детей с генетически подтвержденным диагнозом АПС 1 типа? В исследование было включено 13 пациентов в возрасте до 5 лет, у трех из которых при наличии двух мутаций в гене *AIRE* отсутствовали на момент исследования какие-либо клинические проявления. В данном исследовании принимали участие также и российские пациенты. В работе было показано, что у некоторых пациентов антитела в ИФН- ω выявляются уже на 6-7 месяце жизни даже при отсутствии клиники заболевания, что позволяет использовать этот метод для доклинической диагностики заболевания и приравнивает его ценность к генетическим методам диагностики [50].

Под руководством Е.Нусебуе был разработан новый простой и сравнительно недорогой метод исследования антител к ИФНам – метод, основанный на клеточной культуре НЕК-Blue IFN- α/β (метод с использованием культуры клеток человеческой эмбриональной почки, трансфектированных специфическими плазмидами) – метод используется для определения антитела к ИФН 1 типа. Проводилось сравнение радиоиммунного анализа и метода с использованием клеточной культуры НЕК-Blue IFN- α/β : специфичность и чувствительность двух методов оказались сопоставимыми [51].

Использование метода определения антител к ИФН- ω позволяет в короткие сроки установить диагноз пациентам с изолированными и нетипичными формами АПС 1 типа. В настоящий момент разработано и применяется в лабораторной клинической практике несколько методов определения нейтрализующих антител к ИФН- ω , в том числе экспресс-метод с использованием клеточной культуры НЕК-Blue INF- α/β .

1.4. Компоненты заболевания и орган-специфические антитела

1.4.1. Хронический кожно-слизистый кандидоз

Хронический кожно-слизистый кандидоз (ХКСК) является одним из трех основных компонентов АПС 1 типа и встречается в 70-75 % (41,42) случаев АПС 1 типа, а по данным финских исследователей, у пациентов старше 50 лет кандидоз встречается у 100% пациентов [5]. Проявления кандидоза могут варьировать от кандидоза слизистой полости рта, онихомикоза, покраснений и изъязвлений в уголках рта до распространенного поражения кожи и кандидозного эзофагита [41,52,53]. В финской когорте пациентов показано, что ХКСК может приводить к карциномам слизистой полости рта и пищевода. Среди 92 финских пациентов карцинома слизистой полости рта была выявлена у 6 пациентов (средний возраст составил 37 лет, 10% от всех пациентов старше 25 лет), причем у двух пациентов это явилось причиной смерти. Четверо из этих шести пациентов регулярно курили сигареты в течение 15 и более лет. Развитие карциномы авторы связывают с локальным хроническим воспалительным процессом [54]. Интересно, что глубокие микозы у пациентов с АПС 1 типа никогда не развиваются и причина развития именно поверхностного кандидоза оставалась не известна.

Долгое время патогенез ХКСК при АПС 1 типа оставался не ясен. В последние годы появились предположения о том, что ХКСК также может иметь аутоиммунную природу. Такое предположение было сделано в связи с открытием нового класса антител, антител к ИЛ-17 типа, которые вырабатываются особым классом Т-лимфоцитов – Т-лимфоцитами 17 типа [55]. Аутоантитела к нескольким цитокинам ИФН- ω и - α , а также ИЛ12 были впервые описаны А. Меагер у пациентов с тимомой и миастенией, у которых также частым симптомом является хронический кожно-слизистый кандидоз [46]. Основываясь на этой находке, Р.Д. Бурбело и др. было проведено исследование пациентов с тимомой на предмет выявления антител к 39 различным цитокинам. По данным

этого исследования также была подтверждена связь между кандидозом и наличием АТ к интерлейкинам (ИЛ-А, ИЛ-17F и ИЛ22) [56].

Традиционно CD4Т-эффекторы подразделяли на Т-хелперы 1 типа (Тх1) и Т-хелперы 2 типа (Тх2). Тх1 секретируют ИФН- γ , и основной их функцией является борьба с внутриклеточными патогенами (вирусы, внутриклеточные бактерии). Дифференцировка Тх1 связана с такими транскрипторными факторами как STAT1, T-bet, Stat4, IL-12. Тх2 секретируют ИЛ4, ИЛ5, ИЛ13, и основной их функцией является борьба с внеклеточными патогенами: бактериями, простейшими, гельминтами. Дифференцировка Тх2 связана с другими транскрипторными факторами: ИЛ4, STAT6, GATA-3. Свои же собственные цитокины регулируют активность, развитие и дифференцировку Тх посредством отрицательных и положительных обратных связей [57,58].

Позднее был открыт новый тип Тх, так называемые Тх 17 типа (Тх17). Название они свое получили от главного секретируемого ими цитокина, ИЛ- 17А. Известно, что они секретируют не только ИЛ-17А, но также ИЛ-17F, ИЛ-21, ИЛ-22. Именно к этим интерлейкинам и обнаруживаются антитела у пациентов с АПС 1 типа и тимоматами. Функция Тх17 связана с борьбой с патогенами, с которыми не в состоянии бороться Тх1 и Тх2, а также вырабатываемые ими цитокины могут индуцировать воспалительные и аутоиммунные реакции в тканях. Созревание Тх17 не связано с транскрипторными факторами Тх1 и Тх2 (STAT1, STAT4, STAT6, T-bet). Для превращения нативных Т-лимфоцитов в Тх17 необходимо воздействие комбинации ИЛ-6 и ТФР-бета (тромбоцитарный фактор роста-бета), также на развитие и созревание Тх17 оказывают влияние другие транскрипторные факторы (STAT3, ROR-гамма). В исследованиях на животных моделях было показано участие Тх17 и Тх17-ассоциированных цитокинов в противoinфекционном иммунном ответе, в аутоиммунных процессах, в реакции «трансплантат против хозяина», в аллергических реакциях. Предполагается, что Тх17 участвуют в развитии таких аутоиммунных заболеваний как псориаз, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, бронхиальная астма, а также в борьбе

с некоторыми бактериальными инфекциями, а также, что важно, они участвуют в противогрибковой защите слизистых оболочек и кожи [55].

К.Kisand было показано, что для пациентов с АПС 1 типа также характерны высокие титры антител к ИФН типа 1, а также к ИЛ-17А, ИЛ-17F, ИЛ-22, и установлена связь между наличием аутоантител к этим интерлейкинам и кандидозной инфекцией [9]. Было обследовано 162 пациента с АПС 1 типа, а также гетерозиготные носители и здоровые родственники пациентов с АПС 1 типа. Антитела к ИЛ-17А были обнаружены в 41% пациентов с АПС 1 типа, антитела к ИЛ-17F - в 75%, ИЛ-22 – в 87%, в то время как здоровые и гетерозиготные носители мутаций не имели этих антител. Наличие антител к этим цитокинам достоверно коррелировало с ХКСК. Статистически значимые различия были получены для антител к ИЛ-22 и ИЛ-17F, но не для ИЛ-17А. Этой группой ученых также было установлено, что у пациентов с ХКСК количество ИЛ-17F- и ИЛ-22- секретирующих Т-лимфоцитов было снижено по сравнению с пациентами без ХКСК, при этом количество ИЛ-17А–секретирующих клеток достоверно не отличалось между пациентами с ХКСК и без ХКСК. Аутоантитела к другим интерлейкинам обнаружены не были. В том же году была опубликована работа A.Puel и др., в которую было включено 33 пациента с АПС 1 типа, 103 человека с другими аутоиммунными эндокринопатиями и 37 здоровых людей [59]. Как и в предыдущем исследовании, у пациентов с ХКСК и АПС 1 типа чаще обнаруживались высокие титры нейтрализующих антител к ИЛ-17А, ИЛ-17F и ИЛ-22, чем у пациентов без ХКСК; ни у одного пациента с другими аутоиммунными заболеваниями (103 пациента) и ни у одного здорового человека (37 человек) эти антитела не определялись. Исследователями из Норвегии проводилось исследование 25 норвежских пациентов с АПС 1 типа и 69 здоровых доноров на наличие антител к ИЛ-17F и ИЛ-22 [60]. Исследование проводилось радиоиммунным методом, и особенностью его было то, что антитела определялись не только к мономерам интерлейкинов (ИЛ-22, ИЛ-17F), но и к димерам (ИЛ-22:ИЛ-22, ИЛ-17F:ИЛ-17F) и гетеромерам (ИЛ-22: ИЛ-17F). Для этого исследования были синтезированы молекулы интерлейкинов, помеченные

радиоизотопом, а также для повышения эффективности исследования были синтезированы димеры интерлейкинов (двойные молекулы). За счет этого было достигнуто повышение чувствительности исследования. Также исследователи синтезировали химерные интерлейкины (гетеромеры), что позволяло определить антитела сразу к двум типам интерлейкинов. Исследователями были выявлены высокие титры антител к ИЛ-22 и ИЛ-17F, но их специфичность и чувствительность отличалась. Так, чувствительность метода по обнаружению антител к ИЛ-17F достигала 36,4 %, а специфичность 100%, в случае же антител к ИЛ-22 чувствительность была выше и достигала 76,2%, а специфичность была довольно низкой и достигала только 25%. Антитела к димерам в обоих случаях определялись в большем проценте случаев и повышали чувствительность метода до 69,2% для антител к ИЛ-17F и до 81% для антител к ИЛ-22.

Считается, что T α 17-ассоциированные цитокины обладают противогрибковой активностью в отношении грибка *Candida albicans*. Тот факт, что ХКСК наблюдается также при мутациях в гене STAT3 (является транскрипторным фактором T α 17 и регулирует их развитие и синтез цитокинов) и CARD9 (регулирует синтез ИЛ17) еще раз позволил предположить, что T α 17-ассоциированные цитокины участвуют в борьбе с грибковой инфекцией, также было показано, что противогрибковая активность этих цитокинов осуществляется путем индукции выработки антимикробных пептидов в кератиноцитах [55,58,59].

Проводилось также исследование слюны пациентов с АПС 1 типа и было выявлено, что слюна пациентов, имеющих кандидозную инфекцию, обладает сниженной способностью к ингибированию роста грибка *Candida albicans*, что не отмечено в слюне пациентов с АПС 1 типа без кандидоза. Было выявлено, что слюна пациентов с кандидозом содержит меньшие концентрации вещества цистатин SA1. *In vitro* было показано, что цистатин SA1 способен ингибировать рост грибка *Candida albicans*. Авторы предположили, что причиной снижения концентрации цистатина SA1 может быть аутоиммунный процесс против определенных структур слюнных желез, отвечающих за выработку этого протеина, но исследования для подтверждения этой теории не проводились [61].

Таким образом, многочисленными исследованиями было показано, что процессы, лежащие в основе патогенеза ХКСК, так же как и в основе других компонентов АПС 1 типа, имеют аутоиммунную природу.

1.4.2. Гипопаратиреоз

Гипопаратиреоз (ГПТ) – один из трех основных клинических компонентов АПС 1 типа, который встречается по разным данным у 77-83% пациентов, а у пациентов с АПС 1 типа старше 50 лет встречается в 88% [5,62,63].

Изолированный первичный ГПТ крайне редок, и в связи с этим любого пациента с этим заболеванием необходимо с высокой вероятностью рассматривать как пациента с АПС 1 типа. ГПТ чаще всего является первым эндокринным заболеванием, развивающимся у большинства пациентов с АПС 1 типа. Случаев описания манифестации ГПТ после 40 лет нет. Клиническая картина ГПТ складывается из проявлений и осложнений гипокальциемии: судороги, парестезии, кальцификаты во внутренних паренхиматозных органах. Повышение температуры тела при острых инфекционных заболеваниях может ускорить проявление клиники явной гипокальциемии.

Найдено несколько антигенов, аутоантитела к которым могут быть ответственны за развитие этого компонента. Так, активирующие антитела к кальций-чувствительному рецептору (CaSR) были впервые выявлены в 1996г Y.Li и др. Была исследована кровь 25 пациентов с гипопаратиреозом и 22 здоровых людей. У 17 из 25 пациентов причиной ГПТ был АПС 1 типа, а у 8 человек отмечалось сочетание гипопаратиреоза и аутоиммунного тиреоидита. Среди них 56% пациентов с ГПТ имели высокие титры антител к CaSR, в то время как в группе контроля эти антитела не были найдены ни у одного человека[64]. Но исследование этих антител было также проведено другой группой ученых на 44 пациентах с АПС 1 типа, и связи между выявлением антител к CaSR и ГПТ обнаружено не было [65]. Антитела к CaSR, но обладающий блокирующей способностью, также были обнаружены при аутоиммунной гипокальциурической гиперкальциемии[66].

NALP5 (англ.NAHT(neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (MHC class 2 transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospira anserina*) and TP1 (telomerase-associated protein)-lucine-rich-repeat protein) был обнаружен М. Alimohammadi и др. в качестве антигена паразитовидных желез. Было обследовано 87 пациентов с АПС 1 типа, из которых 73 имело ГПТ. Среди пациентов имеющих ГПТ антитела были обнаружены в 49% случаев, в то время как у пациентов с АПС 1 типа без ГПТ данные антитела обнаружены не были ни у одного пациента [67] Такая же взаимосвязь выявлена в работе А.Meloni, в которой эти антитела были выявлены у 64,3% пациентов с гипопаратиреозом и не были обнаружены у пациентов без гипопаратиреоза [68].

1.4.3.Хроническая первичная надпочечниковая недостаточность

ХНН является третьим по частоте компонентом АПС 1 типа и вторым эндокринным компонентом после ГПТ, встречается у 54-67 % пациентов, а среди лиц старше 50 лет - у 84 % [5,62,63].

Предполагается, что клинические проявления недостаточности коры надпочечников не проявляются до уничтожения более 90% функциональных клеток коры[41]. Характерные клинические симптомы включают усталость, тягу к соленой пище, гипотонию, потерю веса и повышенную пигментацию кожи и слизистых оболочек. Лабораторно выявляются электролитные расстройства (гипонатриемия, гиперкалиемия, повышение уровня АКТГ, ренина), в доклиническую стадию зачастую для верификации диагноза требуется проведение теста с синактеном [69]. Дефицит глюкокортикоидов и минералокортикоидов может развиваться как и одновременно, так и в разной последовательности друг от друга. Криз надпочечниковой недостаточности является основной причиной смерти пациентов даже с ранее диагностированным АПС 1 типа.

У пациентов с АПС 1 типа и ХНН в крови обнаруживаются те же антитела, что и при изолированной надпочечниковой недостаточности, а именно, антитела к

21-гидроксилазе (21ОН) и ферменту, отщепляющему боковую цепь холестерина (SCC - англ. Side Chain Cleavage Enzyme).

21-гидроксилаза (21ОН) является ферментом стероидогенеза и было показано, что антитела к 21ОН выявляются у пациентов с аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью [70]. Так, S.Chen и др. провели исследование по определению антител к 21ОН у 11 пациентов с АПС 1 типа, 24 пациентов с АПС 2 типа, 64 пациентов с изолированной ХНН и выявили высокие титры АТ у 64% пациентов с АПС 1 типа, 96% пациентов с АПС 2 типа, 64 % пациентов с изолированной ХНН [71]. C.Betterle и др. показали в своей работе, что распространенность антител к 21ОН у пациентов с аутоиммунной ХНН варьирует от 92% (пациенты с манифестацией ХНН менее двух лет назад) до 78% (при манифестации более двух лет назад). Антитела к 21ОН были обнаружены у 78 % пациентов с АПС 1 типа, 91% пациентов с АПС 2 типа и у 75% пациентов с изолированной ХНН. На момент манифестации заболевания Антитела к 21ОН были обнаружены у 100% пациентов с АПС 1,2 и 4 типов и у 80% пациентов с изолированной ХНН [72].

Также C.Betterle была опубликована статья по 633 пациентам с различными формами первичной надпочечниковой недостаточности. Среди них 103 пациента неаутоиммунной формой надпочечниковой недостаточности (туберкулез надпочечников, X-сцепленная адренолейкодистрофия, врожденная гипоплазия надпочечников с мутацией в гене *DAX1*) ни у одного не было выявлено антитела к 21-ОН [73]. Такие же результаты получены в работе А. Falorni и др.: среди 10 обследованных пациентов с неиммунной формой первичной надпочечниковой недостаточности (3 пациента с X-сцепленной адренолейкодистрофией, 5 с туберкулезом надпочечников и 2 после двусторонней адреналэктомии) не было выявлено высоких титров антител к 21-гидроксилазе [74].

Также выявлена связь между ХНН и антителами к SCC. Антитела к SCC были выявлены у 67 % пациентов с АПС 1 типа с ХНН [75].

К.Krohn и др. на пациентах с АПС 1 типа показали, что 17 α -гидроксилаза также является одним из антигенов надпочечников и антитела к этому ферменту

играют роль в развитии надпочечниковой недостаточности [76]. Также было показано, что антитела к данному антигену играют роль не только в развитии ХНН, но также и в развитии преждевременном истощении яичников. Так, в работе G. Reatom и др. было установлено, что антитела к 17 α -гидроксилазе, SCC и стероид-продуцирующим клеткам встречаются чаще у пациенток с ХНН и первичным гипогонадизмом, чем у пациенток с ХНН с нормальной функцией яичников [77].

1.4.4. Аутоиммунный гепатит

Аутоиммунный гепатит является одним из ранних проявлений АПС 1 типа. Болезнь может иногда может иметь молниеносное течение и требовать иммуносупрессивной терапии, но часто заболевания протекает с повышением трансаминаз без клинической картины и может самостоятельно проходить [78]. Все аутоиммунные гепатиты подразделяют на 2 типа в том числе в зависимости от наличия или отсутствия специфических аутоантител к клеткам печени. Аутоиммунный гепатит при АПС 1 типа отличается течением и набором обнаруживаемых антител от аутоиммунного гепатита 1 и 2 типов, что говорит о том, что при этом заболевании таргетные антигены отличны от обычных форм аутоиммунных гепатитов [79]. При АПС 1 типа обнаруживаются антитела к следующим антигенам: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 и AADC [79].

Впервые CYP1A2 был идентифицирован как антиген печени у пациентов с АПС 1 типа в 1997 году и был выявлен у одного пациента из шести, имевших гепатит [80]. Теми же авторами позже была опубликована работа с описанием антигенов печени CYP1A2 и CYP2A6, к которым вырабатываются антитела при аутоиммунном гепатите у пациентов с АПС 1 типа [81]. В данное исследование было включено 11 пациентов с АПС 1 типа, среди которых у троих был диагностирован аутоиммунный гепатит, при этом у одного наблюдалось фульминантное течение, а у двоих – лишь повышение трансаминаз без клинически значимых проявлений. В качестве группы контроля обследовали здоровых родственников пациентов и пациентов с другими аутоиммунными

заболеваниями. В работе P.Obermayer-Straub было обследовано 64 пациента с АПС 1 типа, из которых восемь пациентов имели гепатит. В качестве группы контроля обследованы пациенты с аутоиммунным гепатитом без АПС 1 типа, а также здоровые люди. В этом исследовании было выявлено, что антитела к СYP1A2 являются высокоспецифичными (100%), но чувствительность их оказалась невысокой (50%). Антитела к СYP2B6 были специфичными для пациентов с АПС 1 типа, но не коррелировали с клинической картиной. Антитела ни к СYP1A2, ни к СYP2B6 у пациентов с аутоиммунным гепатитом, не связанным с АПС 1 типа, и у здоровых индивидуумов обнаружены не были. Это позволило предположить то, что СYP1A2 является одним из таргетных антигенов, антитела к которым играют роль в развитии аутоиммунного гепатита при АПС 1 типа [82].

AADC (англ. Aromatic-L-Amino-acidDeCarboxylase) впервые был описан как возможный антиген при сахарном диабете у пациентов с АПС 1 типа [83,84]. E.S.Husebye и др. провели исследование антител к AADC среди 69 пациентов с АПС 1 типа, 118 пациентов с СД 1 типа, 91 здорового человека. Исследователями была обнаружена достоверная связь между антителами к AADC и аутоиммунным гепатитом и витилиго. Из 12 пациентов с повышенными уровнями трансаминаз 92% имели высокие титры антител к AADC, а из восьми пациентов с гистологически подтвержденным гепатитом 88% имели высокие титры антител к AADC, в то время как пациенты с нормальными уровнями печеночных трансаминаз были положительными только в 42%. Из 15 пациентов с витилиго 80% пациентов имели АТ к AADC, а без витилиго - 43%. Достоверных различий между пациентами имеющими и не имеющими сахарный диабет получено не было. У здоровых людей, а также пациентов с сахарным диабетом 1 типа, данный тип антител обнаружен не был [85].

Похожие результаты были получены и в работе S.Dal Pra и др. В это исследование помимо пациентов с АПС 1 типа были включены также пациенты с изолированной аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью, СД 1 типа, целиакией, АПС 2 типа, аутоиммунным тиреоидитом и витилиго. АТ к AADC

были обнаружены у 75% пациентов с АПС 1 типа, которые имели витилиго или гепатит и у 40% без этих компонентов. АТ к ААДС также были обнаружены у 3% пациентов с изолированной ХНН и у 3% пациентов с АПС 2 типа [86].

1.4.5. Гипогонадизм

Первичный гипогонадизм затрагивает более 60% пациенток с АПС 1 типа и может манифестировать рано с задержки полового развития или протекать по типу преждевременной менопаузы. Недостаточность функции яичек бывает реже и затрагивает приблизительно 10% пациентов мужского пола и развивается, как правило, во зрелом возрасте.

Учитывая участие в синтезе половых гормонов большого количества ферментов, предполагается большое количество антигенов, антитела к которым ответственны за развитие этого компонента. Основными антигенами в настоящий момент считаются SCC и 17 α -гидроксилаза.

SCC (англ. cholesterol Side-Chain Cleavage enzyme - фермент, отщепляющий боковую цепь холестерина), 17 α -гидроксилаза и стрероидсекретирующие клетки - антигены представленные в надпочечниках и гонадах. В нескольких работах были представлены материалы, показывающие достоверные корреляции между содержанием в сыворотке пациента антител к этим антигенам и наличием преждевременной яичниковой недостаточности [77,87,88]. Итальянская группа ученых опубликовала работу, в которой изучалась яичниковая недостаточность у пациенток с аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью. В исследовании приняли участие 258 пациенток: 163 пациентки с АПС 2 типа, 49 с АПС 1 типа, 18 с АПС 4 типа (пациенты с сочетанием нескольких аутоиммунных эндокринных компонентов за исключением ХНН, ГПТ и заболеваний щитовидной железы) и 28 с изолированной аутоиммунной надпочечниковой недостаточностью. Все пациентки были старше 14 лет, средний возраст манифестации яичниковой недостаточности был 28,5 лет, а надпочечниковой недостаточности - 26,7 лет. Яичниковая недостаточность была диагностирована у 40,8% пациенток с АПС 1 типа, 33,3% - с АПС 4 типа, 16%- с АПС 2 типа и ни у одной пациентки с

изолированной ХНН. Проводилось исследование антител к стероид-продуцирующим клеткам, 17 α -гидроксилазе, SCC. Антитела к стероидпродуцирующим клеткам выявлены у 72% пациенток с гипогонадизмом и у 25,7% без гипогонадизма, при этом у 58% пациенток с АПС 1 типа, 39% пациенток с АПС 4, 32,7% с АПС 2 типа, 3,6% с изолированной ХНН. У пациентов, манифестация первичной яичниковой недостаточности у которых произошла менее 5 лет назад, данные антитела были обнаружены у 92,3%, а у пациенток, у которых течение заболевания составляет более 5 лет, антитела были обнаружены у 72%. Антитела к 17 α -гидроксилазе или SCC выявлялись у 90,3% пациенток с первичным гипогонадизмом. Сорок одна пациентка без яичниковой недостаточности моложе 40 лет наблюдалась в течение 9 лет. За период наблюдения гипогонадизм развился у 38% пациенток с положительными антителами к 17 α -гидроксилазе и SCC и ни у одной пациентки, не имеющей повышенный титр этих антител. Авторы пришли к выводу, что эти антитела могут служить предикторами развития яичниковой недостаточности среди пациентов с аутоиммунной ХНН [77].

Исследование антител к SCC, 17 α -гидроксилазе и 21-гидроксилазе проводилось финскими учеными в группе, состоящей из 67 пациентов (50 с АПС 1 типа, 9 с изолированной аутоиммунной ХНН и 9 с АПС 2 типа) и 11 здоровых людей. Среди 50 пациентов с АПС 1 типа 24 были женского пола. Тринадцать пациенток (13/24) с АПС 1 типа имели гипергонадотропный гипогонадизм, и у всех определялись аутоантитела хотя бы к одному из названных ферментов, а среди 11 пациенток (11/24) с АПС 1 типа без гипогонадизма антитела выявлялись у 55%. Была выявлена достоверная корреляция между развитием первичной яичниковой недостаточности и наличием антител к SCC или хотя бы к одному из этих трех антигенов [87].

Интересная корреляция была обнаружена M.Alimohammadi и др. между антителами к NALP5 и развитием первичного гипогонадизма у девушек с АПС 1 типа. Правда у всех девушек с гипогонадизмом и положительными антителами к NALP5 был также ГПТ. Такая взаимосвязь между женским полом,

гипогонадизмом и положительными антителами к NALP5 была объяснена экспрессией NALP5 у мужчин только в паращитовидных железах, а у женщин как в паращитовидных железах, так и яичниках [67].

1.4.6. Сахарный диабет

Для пациентов с АПС 1 типа характерен инсулинозависимый диабет, который развивается у 8-18% пациентов [5,62,63,68]. Многочисленными исследованиями показано, что у пациентов с АПС 1 типа и изолированным СД 1 типа определяются одни и те же аутоантитела: АТ к глутаматдекарбоксилазе (GAD), тирозинфосфатазе (IA2), инсулину (IAA), островковым клеткам поджелудочной железы (ICA). У пациентов с АПС 1 типа получены те же результаты, что и у пациентов с СД 1 типа: АТ к IA2 и IAA являются более специфическими, но менее чувствительными, в то время как АТ к GAD и ICA – более чувствительными и менее специфичными [75,89,10]. Работ по исследованию антител к цинковому транспортеру у пациентов с АПС 1 типа опубликовано не было.

Необходимо отметить, что GAD экспрессируется также в клетках нервной ткани, где этот фермент участвует в синтезе гамма-аминомасляной кислоты, и антитела к нему могут выявляться у пациентов при аутоиммунных заболеваниях нервной системы, таких как мозжечковая атаксия, синдром «ригидного человека» [90]. Это может объяснять то, почему АТ к GAD являются менее специфичными для диагностики и прогноза СД 1 типа у пациентов с АПС 1 типа.

1.4.7. Гипотиреоз и гипертиреоз

Гипотиреоз при АПС 1 типа встречается по данным разных авторов от 0 до 17% [63,68,89]. При этом у пациентов часто обнаруживаются антитела к тиреопероксидазе или тиреоглобулину без клинико-лабораторных признаков гипотиреоза [68]. По данным финских исследователей средний возраст манифестации компонента составляет 26,5 лет, а у пациентов старше 50 лет гипотиреоз наблюдается у 31% [5].

Гипертиреоз является крайне редким компонентом и описан лишь в единичных случаях [63].

1.4.8.Мальабсорбция

Мальабсорбция, или аутоиммунная энтеропатия, является частым компонентом АПС 1 типа и встречается среди пациентов с АПС 1 типа от 9% до 26% [5,62,63]. Мальабсорбция осложняет течение заболевания в целом в связи с нарушением всасывания препаратов заместительной терапии. В патогенезе мальабсорбции при АПС 1 типа может играть роль не только аутоиммунное поражение ЖКТ, а также ряд других факторов. Кишечный кандидоз может вызывать тяжелую диарею. Кандидозный энтерит может быть диагностирован, когда признаки мальабсорбции исчезают на фоне противогрибковой терапии. Кроме того, хроническая диарея может быть результатом гипокальциемии у пациентов с гипопаратиреозом. Аутоиммунное поражение ЖКТ может быть серьезной проблемой для пациентов с АПС 1 типа и в некоторых случаях требует проведения цитостатической терапии [5,41,78].

Было выявлено, что основным антигеном, к которому определяются антитела, при аутоиммунной мальабсорбции является триптофан-гидроксилаза.

Триптофан-гидроксилаза (ТРН) экспрессируется в серотонин-продуцирующих клетках центральной нервной системы и кишечника. В кишечнике ТРН и серотонин представлены в энтерохромаффинных клетках слизистой, а также в нервных клетках подслизистого и межмышечного нервного сплетения [91,92]. Отсутствие энтерохромаффинных клеток в биоптатах кишечника пациентов с АПС 1 типа позволили предположить, что аутоантитела к этому антигену могут вызывать кишечную дисфункцию у этих пациентов. Было показано, что у 89% пациентов с АПС 1 типа и с кишечной дисфункцией был повышенный титр антител к ТРН, в то время как только 34% пациентов с АПС 1 типа без кишечной дисфункции имели эти антитела. Антитела к ТРН не были обнаружены у пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями эндокринной системы и у здоровых людей, однако они могут выявляться у пациентов с

болезнью Крона, острым колитом, синдромом раздраженной кишки [93]. R.Scarpa и др. провели исследование с определением антител к ТРН у пациентов с АПС 1 типа [94]. Положительный титр антител 58% пациентов (37/64) имели, среди пациентов с кишечной дисфункцией положительный титр антител к ТРН был у 91% (11/12), а без кишечной дисфункции - у 50% (26/52). Биопсия кишечника была проведена 16 пациентам с положительными антителами (8 пациентов с дисфункцией кишечника и 8 – без дисфункции кишечника) и двум пациентам с отрицательными антителами к ТРН. Результаты гистологического исследования кишечника у восьми пациентов с положительными антителами и кишечными расстройствами выявили лимфоцитарную инфильтрацию и отсутствие энтерохромаффинных клеток. У восьми пациентов с положительными антителами, но без кишечных расстройств, при гистологическом исследовании также были обнаружены признаки воспалительной инфильтрации на разных стадиях и уменьшение количества энтерохромаффинных клеток. У пациентов с отрицательным титром антител гистологическое исследование патологии не выявило. Таким образом, антитела к ТРН показали себя надежными диагностическими и прогностическими маркерами развития кишечной дисфункции у пациентов с АПС 1 типа.

Также есть данные об участии в развитии аутоиммунной энтеропатии антител к глутаматдекарбоксилазе и гистидиндекарбоксилазе [75,95].

В работе A.Soderbergh обследовано 90 пациентов, выявлена достоверная корреляция между антителами к GAD, триптофангидроксилазе и мальабсорбцией [75].

В работе F.Skoldberg 197 пациентам (пациенты с АПС 1 типа, болезнью Аддисона, болезнью Хашимото, было проведено исследование АТ к гистидиндекарбоксилазе [95]. Это фермент, участвующий в синтезе гистамина и экспрессирующийся в гистамин-секретирующих энтерохромаффин-подобных клетках, которые располагаются не в кишечнике, а в слизистой желудка [96,97]. Гистидиндекарбоксилаза экспрессируется также в головном мозге и в тучных клетках, и по структуре схожа с GAD и AADC [98]. В данном исследовании

выявлены достоверные корреляции между обнаружением этих антител и наличием у пациентов кишечной дисфункции и хронического гепатита, с другими компонентами заболевания достоверных взаимосвязей выявлено не было. У одного из пациентов с кишечной дисфункцией и высоким титром антител к гистидиндекарбоксилазе было проведено гистологическое исследование биоптата слизистой желудка: выявлено отсутствие гистамин-секретирующих энтерохромаффин-подобных клеток, что могло быть следствием их аутоиммунного повреждения.

1.4.9.Тубулоинтерстициальный нефрит

Тубулоинтерстициальный нефрит - очень редкий компонент АПС 1 типа. В финской популяции он описан у 9% пациентов с АПС1 типа, а в российской группе пациентов описан только у одного пациента [5].

Антитела к дистальной части нефрона у пациентов с АПС 1 типа описаны у пациентов с почечной недостаточностью [99]. Из 30 пациентов с АПС 1 типа 5 человек имели почечную недостаточность, которая варьировала от умеренной до тяжелой; у 3 пациентов бы подтвержден тубулоинтерстициальный нефрит. Все 3 пациента имели высокие титры антитела к дистальной части нефрона, в то время как у всей группы антитела определялись только в 30% случаев. В виду того, что группа пациентов с тубулоинтерстициальным нефритом мала, а эти же антитела были выявлены и у других пациентов, то авторы не пришли к однозначному заключению о роли этих антител в развитии нефрита, было предположено, что эти антитела могут появляться вторично после первичного поражения почек вследствие инфекции, аутоиммунной реакции или травмы камнями почек.

1.4.10.Заболевания легких

В 2003 г была впервые описана пациентка с фатальной первичной легочной гипертензией и АПС 1 типа. АПС 1 типа был установлен на основании клинической картины, а генетическое исследование гена *AIRE* проведено посмертно и выявлена гомозиготная мутация R257X; первичная легочная

гипертензия была доказана при помощи инвазивных и неинвазивных инструментальных методов. Причиной смерти пациентки стала сердечно-легочная недостаточность вследствие не поддающейся терапии легочной гипертензии. При проведении HLA-типирования был выявлен гаплотип, ассоциированный с первичной легочной гипертензией. Несмотря на то, что первичная артериальная гипертензия не была до этого описана у пациентов с АПС 1 типа, авторы связали ее с аутоиммунным процессом, т.к. известно, что первичная легочная гипертензия может сочетаться с системными заболеваниями соединительной ткани, этиология которых также аутоиммунная [100]. А.К.Shum и др. описали нескольких пациентов с АПС 1 типа с хроническими интерстициальными заболеваниями легких [101]. В работе было показано, что пациенты с АПС 1 типа и хроническими интерстициальными заболеваниями легких имеют положительные антитела к специфическому легочному протеину BPIFB1 (англ. Bacterial/Barrelability-Increasing Fold Containing B1). В исследование было включено 104 пациента с АПС 1 типа, из которых у 6 пациентов были интерстициальные заболевания легких. Всем пациентам проводились дыхательные тесты, рентгенография грудной клетки, пяти пациентам проведена биопсия легочной ткани, три пациента умерли от дыхательной недостаточности. У 100% пациентов с интерстициальными заболеваниями легких выявлены высокие титры антител к BPIFB. Во всей группе пациентов с АПС 1 типа антитела выявлены в 9,6% случаев (10 человек, включая 6 пациентов с интерстициальными заболеваниями легких). Также исследователями было показано, что эти антитела встречаются у 14,6% пациентов с сочетанием системными заболеваниями соединительной ткани и интерстициальными заболеваниями легких, а также у 12% пациентов с идиопатическими интерстициальными заболеваниями легких. Результаты исследования свидетельствуют о том, что антитела к BPIFB могут играть важную роль в патогенезе дыхательной дисфункции при АПС 1 типа.

Описаны также и другие антитела, которые могут участвовать в патогенезе хронических заболеваний легких у пациентов с АПС 1 типа - антитела к KCNRG

(англ. potassium(K) ChaNnel ReGulator - регулятор калиевых каналов). Они впервые описаны в работе Alimohammadi и др. [102]. В исследование было включено 8 пациентов с АПС 1 типа и хроническими респираторными заболеваниями. У четверых пациентов заболевание носило тяжелый характер, и двое из них умерли по причине легочной недостаточности. Этим пациентам проводились легочные тесты, рентгенография грудной клетки и биопсия ткани легкого, и у всех были выявлены воспалительные изменения бронхиол. Четыре пациента имели эпизоды бронхиальной обструкции средней тяжести. Кроме того, определение этих антител проводилось 102 пациентам с АПС 1 типа без симптомов поражения органов дыхания. Высокие титры антител к KCNKG имели 88% (7/8) пациентов с АПС 1 типа и симптомами поражения легких, и только один из 102 пациентов с АПС 1 типа без респираторных симптомов имел высокий титр этих антител, что также позволило предположить значение этих антител в патогенезе заболеваний легких у пациентов с АПС 1 типа.

1.4.11. Алопеция и витилиго

Одним из частых компонентов является алопеция, которая проявляется у 30-40% пациентов [62,63,68].

Hedstrand et al провели исследование антител к тирозингидроксилазе у пациентов с АПС 1 типа и выявили достоверную связь между наличием этих антител и алопецией. Из всей группы пациентов с алопецией положительные антитела были у 62%, а в группе без алопеции в 35% случаев. Статистически значимой разницы между наличием антител к тирозингидроксилазе у пациентов с витилиго и без витилиго авторами обнаружено не было [103], в то время как другими исследователями связь между антителами к тирозингидроксилазе, витилиго и алопецией была выявлена у пациентов и с изолированной алопецией, и с витилиго без АПС 1 типа [104].

Также показано, что у пациентов с АПС 1 типа и витилиго выявление антител к транскрипционным факторам SOX9 и SOX10 достоверно выше, чем у пациентов без витилиго [105]. Эти антитела исследовали у 91 пациента с АПС 1

типа. Антитела к SOX9 были обнаружены у 14 (15%) пациентов, а к SOX10 у 20 (22%), причем у всех пациентов, у которых определялись антитела к SOX9, также выявлены антитела к SOX10. А среди 19 пациентов с витилиго АТ к SOX10 определялись у 12 (63%).

1.4.12. Гипопитуитаризм

Еще одним эндокринным компонентом АПС 1 типа является гипопитуитаризм. Он встречается по разным данным у 7-12% [106,107]. Самый высокий процент гипопитуитаризма описан у пациентов с АПС 1 типа из Сардинии - у 38,4 % (у 5 пациентов из 13) [108]. В этом исследовании в частности проводился анализ на наличие антител к антигенам гипоталамо-гипофизарной области у пациентов с АПС 1 типа и оценка соответствия результатов исследования клинической картине заболевания. Было показано, что у этой группы пациентов определяются антитела к следующим антигенам: гормон роста, лютеинизирующий гормон, соматолиберин, гонадотрофы, гипоталамические нейроны, секретирующие соматолиберин. Однако функциональная и патологическая значимость этих антител осталась не ясна.

В работе S.Bensing исследовались антитела к TDRD6 (англ. Tudor Domain Containing Protein 6), антигену, экспрессия которого происходит в основном в яичках, но также и в гипофизе [99]. Они были выявлены у 49% пациентов (42/86), при этом только у двух из 6 пациентов с дефицитом гормона роста, но не выявлялись у пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями и у здоровых людей. Статистически значимого различия между наличием антител у пациентов с дефицитом гормона роста и без него выявлено не было.

В литературе также описан ряд антител к антигенам, экспрессирующимся в гипофизе: α -енолазе, TSGA10 (англ. Testis-Specific Gene A10). Антитела к этим антигенам достоверно чаще встречаются у пациентов с АПС 1 типа, однако влияние их на развитие гипопитуитаризма не доказано и достоверных связей с какими-либо клиническими проявлениями не выявлено [109,110].

1.4.13.Пернициозная анемия

Пернициозная анемия (В12-дефицитная анемия) является нередким компонентом АПС 1 типа. Среди российских пациентов он встречается в 13% случаев, а по данным финских ученых у пациентов старше 50 лет встречается в 31% случаев [5,63]. В12-дефицитная анемия является результатом хронического аутоиммунного гастрита. Предполагается, что в патогенезе заболевания лежит аутоиммунный процесс, направленный против париетальных клеток желудка и внутреннего фактора Касла [5]. Есть работы, в которых данные антитела обнаруживают у пациентов с пернициозной анемией без АПС 1 типа [111–113]. В работе R.Perniola было обследовано 11 пациентов с АПС 1 типа, и среди них антитела к париетальным клеткам желудка и внутреннему фактору Касла были обнаружены в трех случаях [88]. У всех трех пациентов был атрофический гастрит, но только у один пациент на тот момент страдал пернициозной анемией .

1.4.14.Неврологические расстройства

При АПС 1 типа могут иметь место различные неврологические расстройства. Периферическая нейропатия, дегенерации спинного мозга и личностные дефекты могут быть следствием дефицита витамина В12 [41]. Также описаны аутоиммунные заболевания нервной системы, не связанные с дефицитом витамина В12, в частности прогрессирующая мышечная атрофия и мозжечковая атаксия, в сыворотке которых определялись антитела к GAD и клеткам Пуркинье [114,115]. Есть описание пациентки с мозжечковой атаксией, которая наблюдалась с 4 лет по поводу гипопаратиреоза, в 9 лет перенесла синдром Миллера с полным восстановлением всех функций. В последующем у нее развилась алопеция и хронический кандидоз, а в 19 лет манифестировала В12-дефицитная анемия, но неврологических расстройств не отмечалось ни во время манифестации В12-дефицитной анемии, ни в течение последующих 6 лет. В возрасте 19 лет у пациентки манифестировали признаки мозжечковой атаксии на фоне нормального уровня гемоглобина и витамина В12. На МРТ-снимках головного мозга выявилась субатрофия червя мозжечка. В сыворотке пациентки

не были обнаружены антитела к GAD, глиадину, а также к ряду антител, характерных для паранеопластического синдрома, но были выявлены антитела к мозжечковым клеткам Пуркинье и нейронам ствола головного мозга. С выявлением этих антител авторы связали развитие неврологической симптоматики. Пациентке было проведено лечение препаратами внутривенного иммуноглобулина с хорошим эффектом, что еще раз подтвердило аутоиммунный генез этого состояния[114].

В литературе описаны случаи мозжечковой атаксии с атрофией коры мозжечка пациентов без АПС 1 типа. Имеются описания обнаружения антител к GAD при атрофии коры мозжечка [116,117]. Есть описание 77-летней пациентки с мозжечковой атаксией и высоким уровнем антител к глиадину и атрофией коры мозжечка по данным МРТ, которая получала терапию внутривенными препаратами иммуноглобулина с умеренным положительным эффектом [117]. После смерти пациентки в возрасте 85 лет было проведено гистологическое исследование ткани мозжечка и выявлено снижение количества клеток Пуркинье, что авторы связали с их аутоиммунным поражением.

1.4.15. Другие компоненты

При АПС 1 типа наблюдается еще ряд других компонентов. Аспления, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, кожный васкулит, аутоиммунная гемолитическая анемия, склеродермия, метафизарная остеодистрофия, боковой амиотрофический склероз, ретиальная пигментная дегенерация, кольцевидная эритема с лихорадкой и целиакия были описаны ранее у пациентов с АПС 1 типа [5,62,63,106]. Патогенез некоторых компонентов не ясен и не всегда удастся обнаружить антитела, с которыми можно связать развитие того или иного компонента.

Несмотря на то, что проведено не так мало исследований, посвященных аутоантителам при АПС 1 типа, данные этих исследований зачастую противоречивы, а малое количество пациентов, особенно с редкими

компонентами не всегда позволяет прийти к достоверным выводам. В связи с тем, что прогностическая и диагностическая роль некоторых аутоантител при АПС 1 типа дискуссионна, необходимо дальнейшее проведение дополнительных исследований в этой области на более крупных когортах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

В исследовании были сформированы 2 группы пациентов: основная группа и группа сравнения. В основную группу было включено 95 пациентов, в группу сравнения - 32 пациента (рисунок 1).

Всем пациентам проводилась клинико-лабораторная верификация или исключение основных и малых компонентов АПС 1 типа.

Критерии включения пациентов в основную группу:

-Наличие одного из трех основных компонентов АПС 1 типа - ХКСК, ГПТ, ХНН с ранее установленной аутоиммунной этиологией (в том числе ранее установленным АПС 1 типа) или с неустановленной этиологией. Исключались пациенты, у которых была выявлена на момент включения в исследование какая-либо другая генетическая причина заболевания, кроме АПС 1 типа.

Критерии включения пациентов в группу сравнения:

-Наличие очаговой алопеции и отсутствие трех основных компонентов АПС 1 типа.

Пациенты с очаговой алопецией были выбраны в качестве группы сравнения при проведении исследования антител к интерферонам в связи с аутоиммунным генезом заболевания, высокой частотой данного компонента при АПС 1 типа и высокой частотой этого заболевания в популяции.

Этап 1. На первом этапе исследования всем пациентам с одним и более основными компонентами АПС 1 типа было выполнено молекулярно-генетическое исследование гена *AIRE* (части пациентов это исследование было проведено ранее). На основании этого исследования, согласно критериям диагностики АПС 1 типа [41], пациенты были поделены на 3 группы. Группа 1 – пациенты с АПС 1 типа. Группа 2 – пациенты с возможным диагнозом АПС 1

типа, у которых диагноз вероятен, но клиническая и генетическая характеристика не полностью соответствует критериям диагностики АПС 1 типа (пациенты с 1 основным компонентом и одной патологически значимой мутацией в гене *AIRE*, сочетание одного основного компонента с хотя бы одним малым компонентом). Группа 3 – пациенты, которые не соответствуют критериям диагноза АПС 1 типа (в *AIRE* мутации отсутствуют, имеют только 1 основной компонент).

В группе сравнения (пациенты с очаговой алопецией) исследование гена *AIRE* не проводилось, так как было показано ранее нашей исследовательской группой, что у пациентов с очаговой алопецией без основных компонентов АПС 1 типа мутации в гене *AIRE* не выявляются [7].

Этап 2. На втором этапе исследования всем пациентам, в том числе и пациентам из группы сравнения, проведено определение антител к интерферонам- ω и интерферонам- $\alpha 2$. Дополнительно, для более точной оценки специфичности антител к интерферонам, исследование этих антител проведено также пациентам с очаговой алопецией.

Этап 3. На третьем этапе всем пациентам из группы 1 (пациенты с АПС 1 типа) проведено определение орган-специфических антител (антител/ к NALP5, 21OH, SCC, ИЛ 22 и ИЛ 17F).

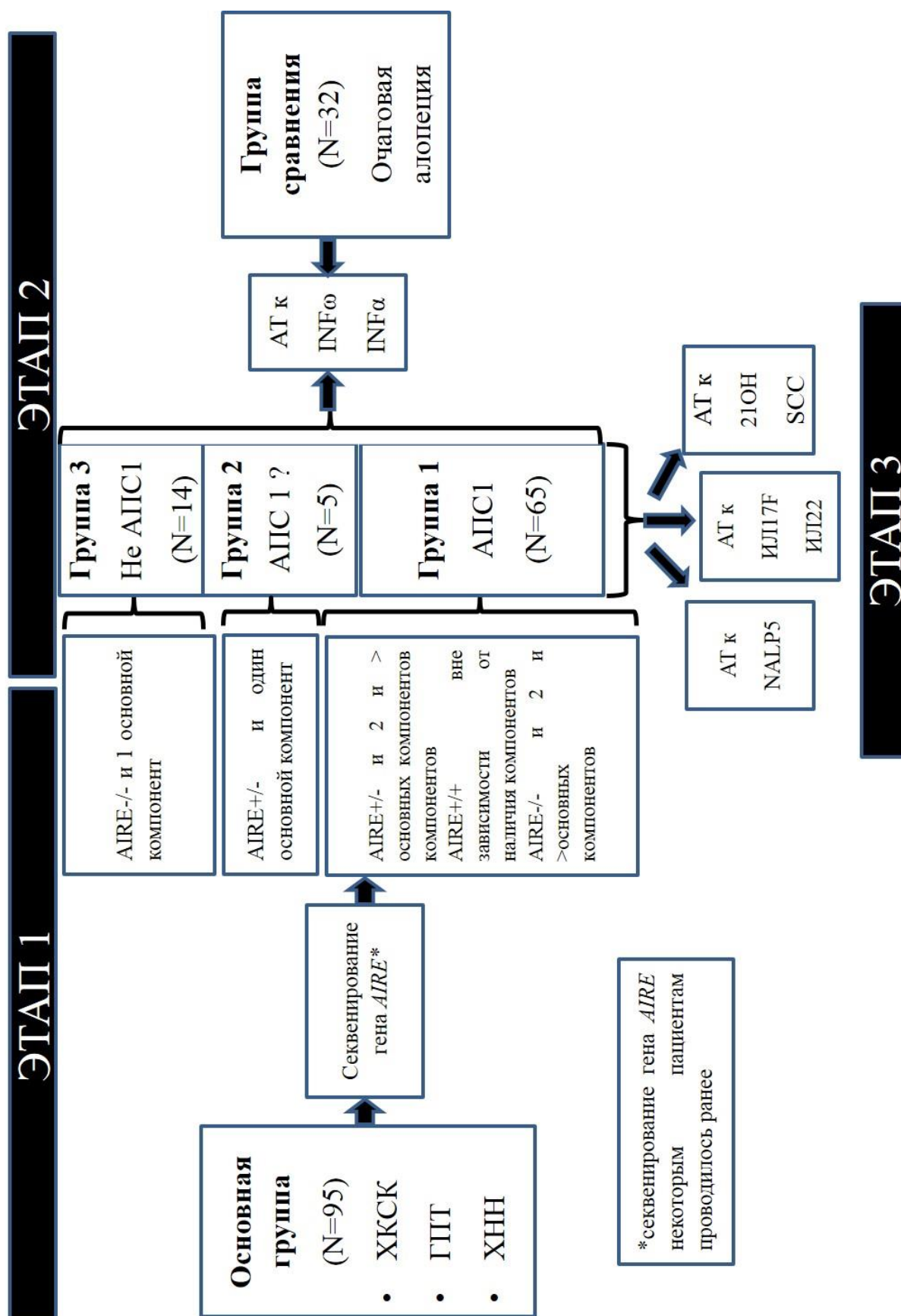


Рисунок 1. Дизайн исследования

2.2.Методы исследования

2.2.1.Диагностика компонентов АПС 1 типа

Первичная хроническая надпочечниковая недостаточность диагностировалась на основании низкого уровня кортизола крови и клинической картины адреналового криза с гиперкалиемией, гипонатриемией, высоким уровнем АКТГ плазмы крови и ренина плазмы. Некоторым пациентам диагностика заболевания проводилась в доклиническую стадию при помощи пробы с синакеном (уровень стимулированного кортизола менее 500 нмоль/л подтверждал диагноз). ГПТ устанавливался на основании выявления гипокальциемии, гиперфосфатемии, низкого уровня паратгормона на фоне нормальной функции почек. Диагностика ХКСК основывалась на выявлении специфических для этой ИФНекции изменений ногтей, кожи и слизистых. Аутоиммунный гепатит устанавливался на основании хронического повышения трансаминаз с клиническими проявлениями гепатита или без них у пациентов, которым были исключены вирусные, лекарственно-ассоциированные гепатиты и болезнь Вильсона-Коновалова. Мальабсорбция устанавливалась пациентам, имеющим хроническую диарею или хроническую обстипацию. Первичный гипогонадизм устанавливался на основании клинических данных (первичная или вторичная аменорея), повышении ЛГ и ФСГ, низком уровне эстрадиола. Дефицит гормона роста устанавливался на основании задержки роста, низких значения ИФР-1, отсутствии выброса гормона роста более 10 нг/мл на СТГ-стимуляционных тестах с клофелином и инсулином. Гипоплазия зубной эмали выявлена у пациентов на основании обнаружения специфических изменений зубной эмали при осмотре стоматологом. Сахарный диабет 1 типа устанавливался пациентам согласно следующим критериям: 1.Симптомы диабета и случайное выявление гликемии $\geq 11,1$ ммоль/л 2. Тощаковая глюкоза плазмы крови ≥ 7.0 ммоль/л; 3. Глюкоза плазмы крови ≥ 11.1 ммоль/л через 2 часа при проведении орального глюкозотолерантного теста; 4. HbA1c $\geq 6.5\%$ [118][119]. Пернициозная анемия

устанавливалась на основании специфических изменений (крупные, с измененной формой эритроциты) в клиническом анализе крови, а также выявлении низкого уровня витамина В12 в крови. ХАИТ устанавливался на основании клинической картины, снижении уровня свободного Т4, повышении ТТГ, повышении антител к тиреопероксидазе, специфических изменений щитовидной железы по данным УЗИ. Синдром сухого глаза устанавливался на основании результатов теста Ширмера. Хронический блефарит, хронический конъюнктивит, пигментная ретинопатия устанавливались на основании офтальмологического осмотра. Редкие компоненты заболевания (изолированная красноклеточная аплазия, аплазия селезенки, мозжечковая атаксия, метафизарная дисплазия, тубулоинтерстициальный нефрит) требовали проведения дополнительных специфических исследований с привлечением других специалистов.

2.2.2.Диагностика АПС 1 типа

Критериями диагностики АПС 1 типа являлось обнаружение у пациента двух из трех основных компонентов заболевания - хронический кожно-слизистый кандидоз (ХКСК), гипопаратиреоз (ГПТ) или первичная хроническая надпочечниковая недостаточность (ХНН), или одного из трех основных компонентов в случае наличия сибсов пациентов с подтвержденным АПС 1 типа[120][41]. Также критерием диагностики являлось обнаружение двух патогенных мутаций в гене *AIRE* у пациентов даже в случае отсутствия каких-либо компонентов заболевания[41].

2.2.3.Молекулярно-генетическое исследование гена *AIRE*.

Молекулярно-генетическое исследование гена *AIRE* было выполнено в Центре Медицинской Генетики и Молекулярной Медицины в Университетском госпитале Хаукланд, г.Берген (под руководством PhD Per M. Knappskog). Некоторым пациентам исследование гена было проведено ранее в лаборатории наследственных болезней обмена веществ в ФГБНУ Медико-Генетический Научный Центр, Москва (под руководством д.м.н. Захаровой Е.Ю.), а также в лаборатории отделения наследственных эндокринопатий в ФГБУ

Эндокринологический Научный Центр (под руководством д.м.н. Тюльпакова А.Н.)[43]

ДНК пациентов было выделено из образцов крови с ЭДТА согласно стандартным протоколам. Все 14 экзонов гена *AIRE* были амплифицированы при помощи ПЦР из ДНК пациента и секвенировали с использованием праймеров (таблица 1). Условия ПЦР: 1X буфер Amplitaq Gold, 1,5 ммоль $MgCl_2$, 0,4 ммоль дезоксинуклеотидтрифосфата, 0,2 Ед Amplitaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,6 мкмоль каждого праймера, и 50-100 нг геномной ДНК на 25мкл реакционной смеси. Температура была 95°C в течение 20 сек, 58°C в течение 20 сек, и 72°C в течение 30 сек (32 цикла). Перед секвенированием, продукты ПЦР очищали с использованием ExoSAP-IT согласно протоколу производителя (USB Corp., Cleveland, OH). Образцы были секвенированы с использованием стандарта BigDye terminator v.1.1 и анализированы на секвенаторе ABI 3100 (Applied Biosystems).

Таблица 1. Праймеры, использованные для секвенирования гена *AIRE*

| Название праймера | Последовательность (5' → 3') | размер | |
|----------------------|---------------------------------|------------------|-----|
| | | продукта (bp) | ПЦР |
| AIREex1F | CAA GCG AGG GGC TGC CAG TG | | |
| AIREex1R | GGA TCT GGA GGG GCG GGG TC | | 296 |
| AIREex2F | ACC ACC TGA CTC CAC CAC AAG CC | | |
| AIREex2R | TCA GGG TTT TCT CCA GGG GTA GGG | | 545 |
| AIREex3F | GTG ATG TTC CAG GAC CGT CTT G | | |
| AIREex3R | AGA CCC GCC CGC CTA CTT | | 528 |
| AIREex4F | TGA AGT AGG CGG GCG GGT CTC | | |
| AIREex4R | CAG GGG CGA CTG GCA AGA TCA | | 454 |
| AIREex5F | TTG GGT GCA CAC ACG AAC A | | |
| AIREex5R | GGC AGA AAC TCT GGC TAC CTG A | | 454 |
| AIREex6F | CAC CCT GGG GCC TAC ACG ACT | | |
| AIREex6R | GAA GAG GGG CGT CAG CAA TGG | | 401 |
| AIREex7F | CCA GGA ACA GCG TTG CCT C | | |
| AIREex7R | CGG TGC TCA TCC CTG AGT GCC | | 318 |
| AIREex8F | CAG GTG GTC AGG GCA GAA TTT CA | | 493 |

| | | |
|----------|--------------------------------|-----|
| AIREex8R | AGG CTG GGC AGC AGG TGT G | |
| AIREex9F | ATC TCT CTG CTG TGC CTC GGT TC | |
| AIREex9R | TGG GCA TGG GGG ACA TAG TG | 384 |
| AIREex10 | TGC CAC AGC CTT TCC CAC TCA GT | |
| AIREex10 | CCT CCC GGA GCC TTT CTC GC | 478 |
| AIREex11 | GCC TGA GGG TGC TTG GGT CG | |
| AIREex11 | GGG GTG TGG TTG TGG GCT GTA TG | 433 |
| AIREex12 | CCC CCA CTC ACC ACC CAC G | |
| AIREex12 | GGG AGC CCT GGC AGG ACT CTC | 497 |
| AIREex13 | CCC CAG CCC CAT CAT GCC | |
| AIREex13 | TGG TGG GTG GAG CAG GGA CAG | 384 |
| AIREex14 | TGG ATG GTG ACT TCT TGT AAC GA | |
| AIREex14 | ACC TCC CGA GTT CAA GTG ATT C | 497 |

2.2.4. Исследование антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$, ИЛ-22, ИЛ17F, 21ОН, SCC, NALP5

Для проведения иммунологических тестов в данной работе использовалось 2 метода: радиоиммунный анализ (определение антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$, ИЛ-22, ИЛ17F, 21ОН, SCC, NALP5) и метод, основанный на клеточной культуре НЕК-blue IFN- α/β (определение антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$).

Радиоиммунный анализ проводился с использованием меченных S^{35} рекомбинантных человеческих аутоантигенов экспрессированных при помощи транскрипции и трансляции *in vitro*. Использовалась библиотека кодирующей ДНК человека. При помощи ПЦР с использованием специальных праймеров, выделялась кодирующая ДНК необходимого антигена. Из этой кодирующей ДНК формировались плазмидные векторы, которые смешивались с ретикулат-лизатной системой, которая включала в себя лизат ретикулоцитов, реакционный буфер, смесь аминокислот без метионина, метионин с S^{35} , ингибитор РНКазы, очищенную от нуклеаз воду. Для получения меченого S^{35} антигена смесь выдерживали в термостате в течение 2 часов при 30° . Меченные S^{35} рекомбинантные аутоантигены инкубировались с сывороткой пациентов в течение 12 часов при температуре 4° . Выделение образовавшихся иммунных

комплексов антиген-антитело производилось при помощи преципитации с белком сефароза-А. Эти комплексы выделялись с использованием микротитровальных планшетов с фильрофальными бумажками. Фильровальные бумажки этих планшетов проходили множество промывок. Определение уровня радиоактивности каждой фильровальной бумажки проводилось при помощи жидкостного сцинтиляционного счетчика (PerkinElmer). Уровень радиоактивности измерялся в cpm (англ. count per minute - распад в минуту). Исследование каждого образца проводилось дважды, в качестве положительного контроля использовалась сыворотка пациента с установленным высоким титром антител, а в качестве негативного контроля – сыворотка здоровых доноров, взятая из биобанка Университетской Больницы Бергена. Уровень антител (индекс АТ) определялся по формуле (1).

$$\text{Индекс АТ} = \frac{\text{cpm образца} - \text{cpm негативного контроля}}{\text{cpm позитивного контроля} - \text{cpm негативного контроля}} \times 100 \quad (1)$$

Метод определения антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ с использованием клеточной культуры НЕК-blue.

Исследование АТ к ИФН $\alpha 2$ и $-\omega$ также проводилось методом с использованием культуры клеток НЕК-blue IFN- α/β (метод разработан группой ученых под руководством профессора E.S.Husebye, Норвегия [51]) с использованием культуры клеток человеческой эмбриональной почки, трансфектированных специфическими плазмидами (в данном исследовании использовалась клеточная культура НЕК-Blue IFN- α/β). В основе метода лежит способность трансфектированных клеток синтезировать щелочную фосфатазу в присутствии интерферонов. Клетки имеют рецепторы к интерферонам и систему биосинтеза щелочной фосфатазы, которые кодируются плазмидами, содержащими специфические векторы. В присутствии сыворотки пациента с высоким титром антител к интерферонам способность клетки синтезировать щелочную фосфатазу подавляется, что в свою очередь можно зафиксировать при помощи абсорбционного анализа с применением красителя. Протокол исследования: к 6 мкл сыворотки пациента добавлялся исследуемый

интерферон I типа, эта смесь разводилась при помощи буфера до 60 мкл и инкубировалась в течение 30 мин. 20 мкл полученного раствора добавлялось в планшет вместе с, примерно, 50 000 клеток НЕК-blue. Планшеты инкубировались в течение 21 часа при температуре 37°C для достаточной секреции щелочной фосфатазы, которая в данных клетках происходила под воздействием интерферонов, у пациентов с отсутствием антител к интерферонам.

Полученная надосадочная жидкость инкубировалась со 180 мкл красителя QUANTI-Blue (Invivogen) в течении 2 часов при температуре 37°C. Количество секретированной щелочной фосфатазы измерялось при помощи спектрометра с определением оптической плотности исследуемой жидкости на длине волны 650нм (Abs650). Ингибирование интерферонов было представлено в виде процента нейтрализации (индекс АТ) и высчитывалось по формуле (2).

$$\text{Индекс АТ} = \frac{\text{Abs650 негативный контроль} - \text{Abs650 образец}}{\text{Abs650 негативный контроль} - \text{Abs650 позитивный контроль}} \quad (2)$$

2.3. Статистический анализ результатов

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета статистических программ SPSS Statistics 17.0. Данные представлены в виде средней со стандартной ошибкой и в виде медианы с интерквартильным размахом. Достоверность различия частот определялась путем построения таблиц сопряженности и с использованием χ^2 Пирсона. Для сравнения средних в двух независимых выборках использовался U-критерий Манна-Уитни. Для анализа связи двух признаков использовался анализ ранговой корреляции по Спирмену. Для определения клинической значимости тестов использовался ROC-анализ с построением ROC-кривой и определением показателя доли площади под кривой. Для всех критериев и тестов критический уровень принимался равным 5%, т.е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Характеристика пациентов

В основную группу были включены 95 пациентов, имеющих хотя бы один основной компонент АПС 1 типа. Медиана возраста этих пациентов составила 18 [12;24] лет. Количество пациентов мужского пола соответствовало количеству пациентов женского пола (ж:м=48:47=1,02:1).

Доля надпочечниковой недостаточности среди этих пациентов составила – 72,6% (69/95), ХКСК – 69,5% (66/95), ГПТ- 69,5% (66/95). Два и более основных компонента имели 71,6 (68/95) пациентов. Другие заболевания и малые компоненты АПС 1 типа были у 68,4% (65/95) пациентов и среди них встречались следующие состояния: алопеция, гипоплазия зубной эмали, ХАИТ, первичный гипогонадизм, сахарный диабет 1 типа, дефицит гормона роста, аутоиммунный гепатит, пернициозная анемия, кольцевидная эритема, птоз, мальабсорбция, хронический блефарит, пигментный ретинит, витилиго, аспления, синдром сухого глаза, метафизарная дисплазия, мозжечковая атаксия, тубулоинтерстициальный нефрит (ХПН), изолированная красноклеточная аплазия.

При проведении секвенирования гена *AIRE* выявлено 16 различных мутаций (R257*, A58V, C302Y, p.Leu323serfs*51, W78R, R139*, c1053_1060del, A399P, 13bpdel, del->520STOPP*, C434*, K221*, T16M, L13P, P326L, A493T), а также 2 полиморфизма R471C и S278R.

У 76,8% (73/95) пациентов выявлены две мутации, только одна мутация выявлена у 8,4% (8/95) пациентов, мутаций не выявлено (за исключением полиморфизмов) у 14,7% (14/95) пациентов.

На основании критериев диагностики АПС 1 типа были выделены 3 группы пациентов (рисунок 1):

- Группа 1 – пациенты, полностью соответствующие критериям диагностики АПС 1 типа – 76 человек
- Группа 2 – пациенты, у которых вероятен АПС 1 типа, но они не полностью соответствуют критериям диагностики АПС 1 типа (в нашем исследовании в эту группу попали пациенты с одним основным компонентом заболевания и одной гетерозиготной мутацией в гене *AIRE*) – 5 пациентов
- Группа 3 – пациенты, которым АПС 1 типа исключен (пациенты с одним основным компонентом АПС 1 типа, у которых не обнаружено мутаций в гене *AIRE* и нет сочетания основного компонента с малыми) – 14 пациентов.

В группу сравнения было включено 32 пациента с очаговой алопецией.

Группа 1

Группу 1 составили 76 пациентов с АПС 1 типа, отобранные согласно стандартным критериям диагностики по клиническим и генетическим данным.

Группа пациентов с АПС 1 типа представляет относительно молодую когорту пациентов, где средний возраст пациентов составил 18,8 лет, медиана возраста - 19 лет (12;25). При распределении пациентов по декадам жизни (0-10 лет, 11-20 лет, 21-30 лет, >30 лет) наибольшее количество пациентов оказалось в декаде от 11 до 20 лет (рисунок 2).

Соотношение пациентов мужского пола к пациентам женского пола составило 1:1,1. Количество компонентов заболевания варьировало в пределах от 1 до 11, медиана количества компонентов составила 4 (3;6). Все три основных компонента наблюдались у 51,4% (39/76) пациентов, два и/или три основных компонента - у 89,5% (68/76), только два больших компонента - у 38,2% (29/76), только один – у 10,5% (8/76).

В группе 1 было четыре пациента, имеющих только один единственный компонент заболевания. Все эти пациенты имели изолированный ГПТ. Медиана возраста в этой группе была ниже, чем во всей когорте пациентов, и составила 9,5 (5,2;23,5) лет, а возраст манифестации заболевания был сопоставим с возрастом

манифестации первого компонента во всей группе – медиана составила 5(3,5;7,2) года, средний возраст 5,2(0,3-15) лет ($p>0.05$).

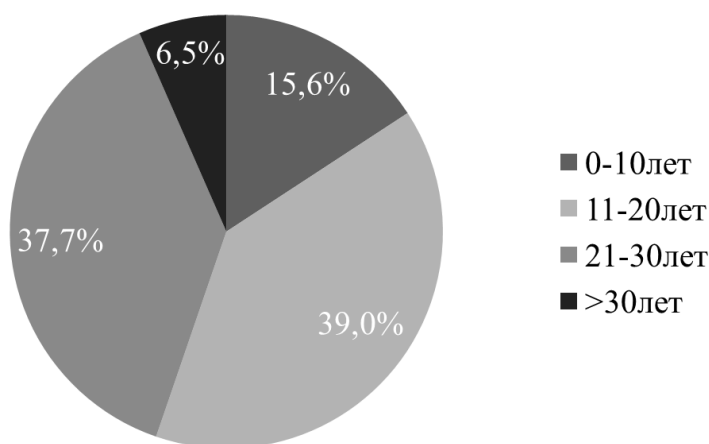


Рисунок 2. Распределение пациентов из основной группы по возрасту.

Полная клиническая характеристика всех пациентов из группы 1 представлена в приложении А (таблица А1).

Хронический кожно-слизистый кандидоз - самый частый компонент в группе 1, который встречался у 85,5% (65/76) пациентов, при этом первым компонентом он являлся у 63,2% (48/76). Средний возраст манифестации ХКСК составил 4,1 (0,3-20) года, медиана - 3 года (1;5). А частота ХКСК среди пациентов мужского и женского пола была сопоставима ($p>0.05$) и составила 82,5% (33/40) и 88,9% (32/36) соответственно (Рисунок 3).

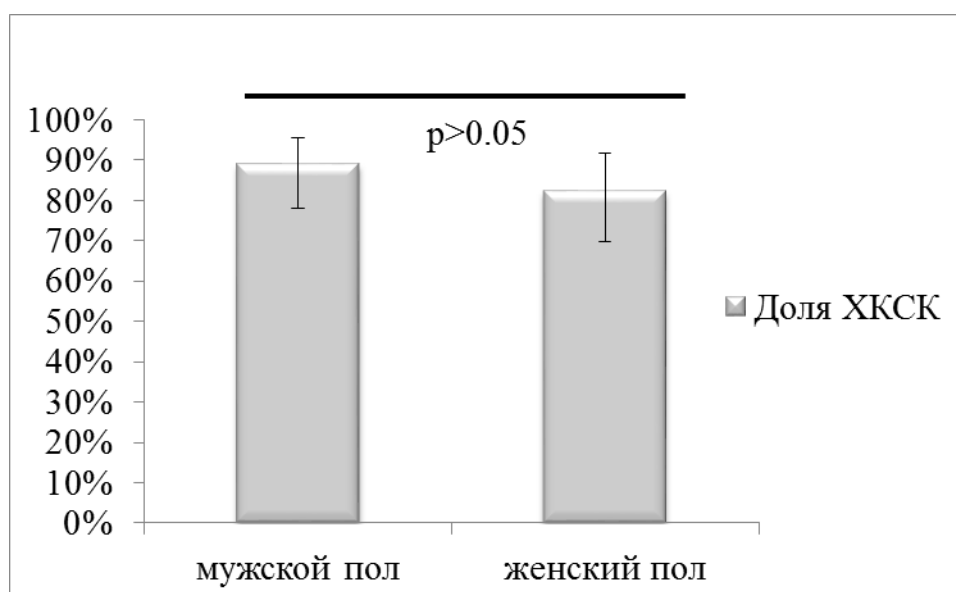


Рисунок 3. Частота ХКСК у пациентов женского и мужского пола в группе 1.

В группе 1 частота ХКСК увеличивалась с возрастом (рисунок 4). Связь между возрастом и частотой ХКСК оказалась статистически достоверной ($p=0.048$).

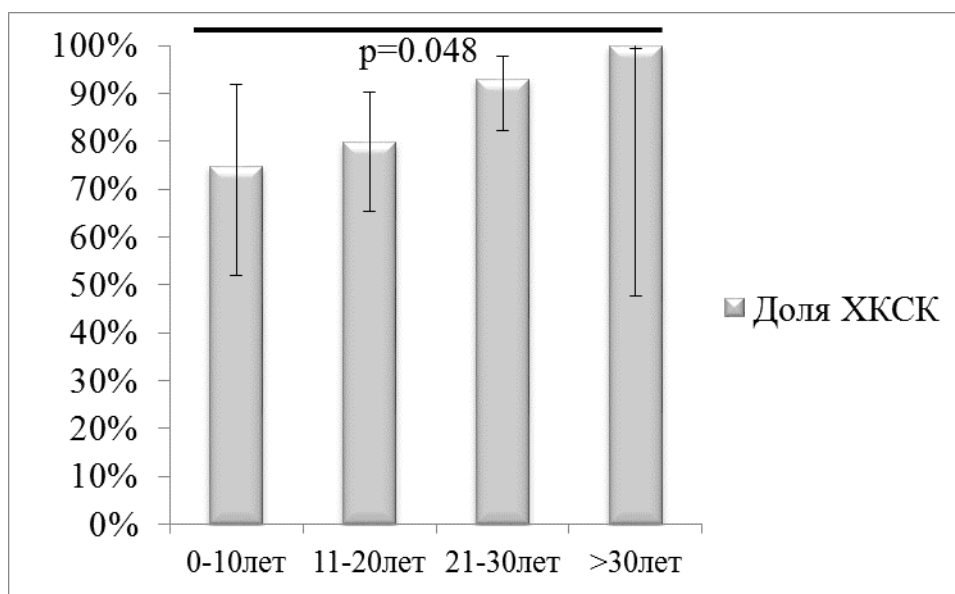


Рисунок 4. Частота ХКСК в различных возрастных группах

Гипопаратиреоз – это второй по частоте компонент заболевания в группе 1. Он встречался у 78,9% пациентов (60/76). У трети пациентов заболевание манифестировало с ГПТ - 29% (22/76). Частота ГПТ среди женщин была гораздо выше, чем частота этого компонента у мужчин: 92,5% (37/40) и 63,9 % (23/36) соответственно ($p=0.004$) (рисунок 5).

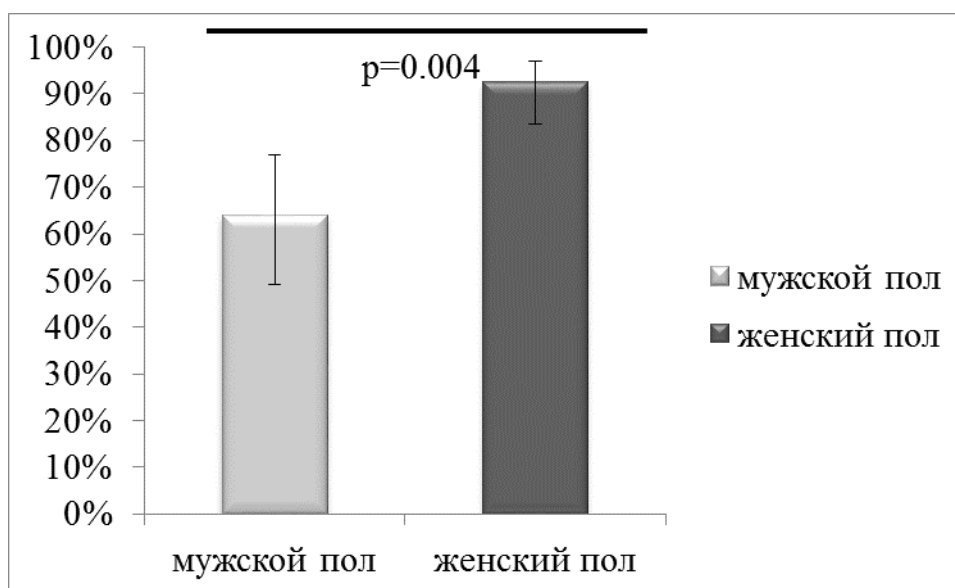


Рисунок 5. Частота ГПТ у пациентов женского и мужского пола в группе 1.

Средний возраст манифестации ГПТ составил 6,7 (2-15) года, медиана - 6 (4;9) лет.

При распределении пациентов с АПС 1 типа по возрасту и наличию ГПТ особенностей выявлено не было – частота ГПТ достаточно высокая во всех возрастных декадах, различия не являются статистически достоверными ($p>0.05$) (рисунок 6).

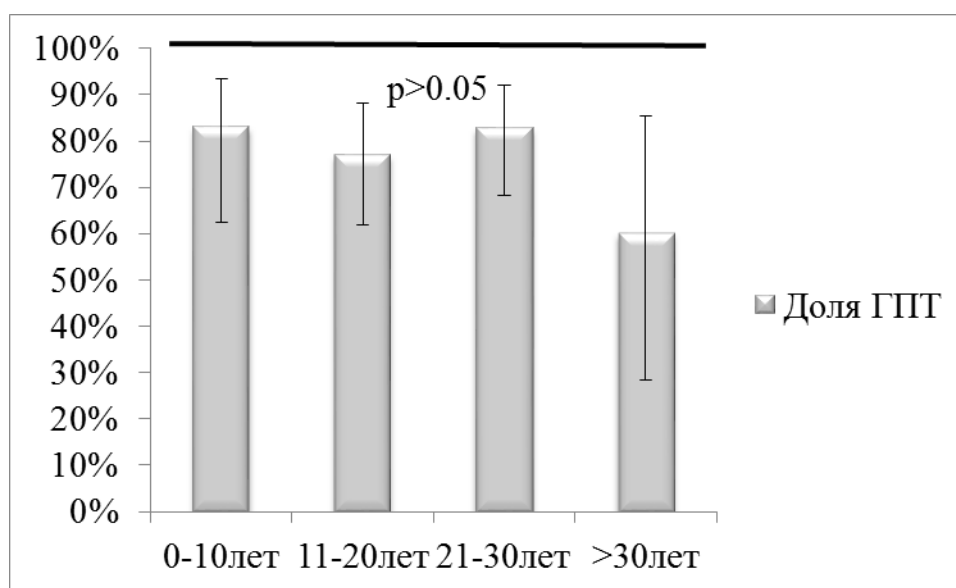


Рисунок 6. Доля ГПТ в различных возрастных группах

Хроническая первичная надпочечниковая недостаточность – это третий по частоте компонент в группе 1 - встречалась у 75% (57/76) пациентов. В качестве первого компонента заболевания надпочечниковая недостаточность встречалась у 9,2% (7/76) пациентов. Частота надпочечниковой недостаточности среди женщин и мужчин была сопоставима и составила 70% (28/40) и 80,5% (29/36) соответственно ($p>0.05$) (рисунок 7).

Средний возраст манифестации ХНН составил 8,8 (3-22) года, медиана - 9 (5;12) лет.

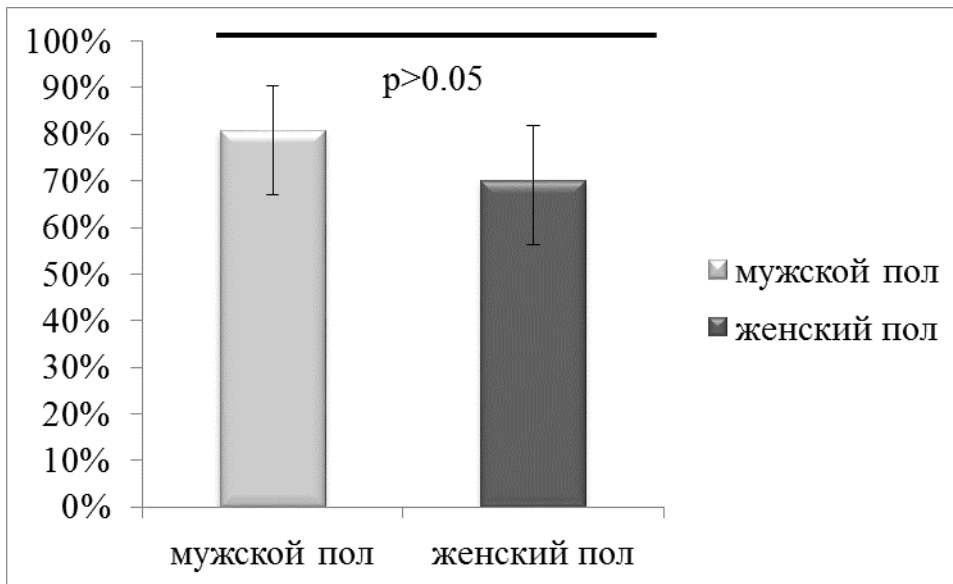


Рисунок 7. Частота ХНН у пациентов женского и мужского пола в группе 1.

При распределении пациентов по возрастным декадам и наличию ХНН отмечалась тенденция к нарастанию доли надпочечниковой недостаточности с возрастом в первых трех декадах, но различия не были достоверными ($p > 0.05$) (рисунок 8).

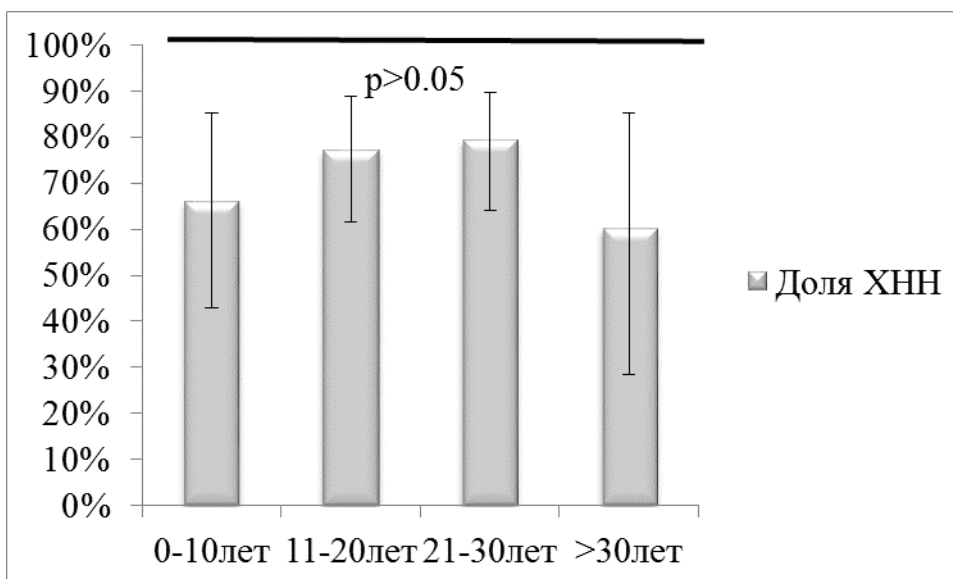


Рисунок 8. Доля ХНН в различных возрастных группах

Возраст манифестации первого компонента варьировал в широких пределах от 0,3 до 15 лет, а медиана этого показателя составила 3 года (1;5). В данной группе есть шесть пациентов, у которых заболевание манифестировало до 1 года.

Среди них у пятерых пациентов проявившимся до 1 года первым компонентом заболевания оказался ХКСК, а одного пациента - пигментный ретинит.

У трех пациентов (5%) заболевание манифестировало не с основных компонентов, а с малых (пигментная ретинопатия – пациент №8, глухота – пациент №19, мальабсорбция – пациент №18).

У пациента №8 заболевание манифестировало с пигментной ретинопатии, которая возникла в возрасте до 1 года и привела к полной слепоте. В дальнейшем присоединились другие компоненты заболевания: алопеция, ГПТ и аутоиммунная энтеропатия в 5 лет, ХНН в 11 лет, пернициозная анемия в 17 лет и ХКСК в 22 года. Диагноз был установлен на основании клинической картины и подтвержден молекулярно-генетически (гомозиготная мутация R257* гене *AIRE*).

Пациентка № 18 наблюдалась в течение нескольких лет по поводу изолированной мальабсорбции, которая манифестировала в возрасте 4 лет. В 7 лет присоединились ГПТ, ХНН и аутоиммунный гепатит, а в дальнейшем развились ХКСК (18 лет) и первичный гипогонадизм (14 лет). При молекулярно-генетическом исследовании гена *AIRE* выявлены две компаунд-гетерозиготные мутации R257* и E298K.

Течение заболевания у пациента № 19 имело неклассический характер. Тугоухость впервые появилась в возрасте 3 лет после перенесенной острой респираторной вирусной инфекции, генез ее не ясен, но, учитывая диагноз, можно связать ее с аутоиммунным тимпанитом на фоне АПС 1 типа (специальные исследования, доказывающие аутоиммунный генез этого компонента, не были доступны для проведения). В возрасте 5 лет были установлены пернициозная анемия и синдром мальабсорбции, а в 9 лет появились очаги витилиго и седые волосы. В 12 лет манифестировала ХНН, в этом же возрасте впервые выявлена гипоплазия зубной эмали. В возрасте 13 лет на основании повышения уровня гликированного гемоглобина (6,1%) и проведенного орального глюкозотолерантного теста (гликемия 8,4 на 120 минуте теста) установлено нарушение толерантности к углеводам. В течение последних 2х лет наблюдения нарушение углеводного обмена не прогрессировало, при этом у пациента

отмечалась тенденция к снижению секреции инсулина и с-пептида, а в иммунологическом анализе крови был высокий титр антител к тирозинфосфатазе и цинковому транспортеру-8. Диагноз пациенту был подтвержден обнаружением в гене *AIRE* двух мутаций: R257* и P326L.

Генетическая характеристика пациентов из группы 1

Молекулярно-генетическое исследование гена *AIRE* проведено всем пациентам из группы 1. Мутация R257* выявлена в 76,3% (116/152) аллелей, не выявлено мутаций в 2%(3/152) аллелей, в 21,7%(33/152) аллелей были обнаружены другие мутации. Помимо мутации R257* у пациентов из группы 1 встречались следующие 14 мутаций: A58V, C302Y, p.Leu323serfs*51, W78R, R139*, c1053_1060del, A399P, 13bpdel, del->520STOPP*, C434*, K221*, T16M, L13P, P326L. Среди них 9 ранее не описанных мутаций.

Группа 2

В группу 2 были включены 5 пациентов, у которых диагноз АПС 1 типа был вероятен, но не полностью соответствовал критериям диагностики заболевания (приложение А, таблица А2).

Пациентка № II-1, 5 лет, наблюдалась по поводу ГПТ с 3 лет. В гене *AIRE* выявлена гетерозиготная мутация C302Y. Ранее был показан доминантно-негативный потенциал этой мутации [121].

Пациентка № II-2, 11 лет, наблюдалась с ГПТ с 2 лет. У нее выявлена гетерозиготная мутация R257*, других компонентов заболевания на момент последнего обследования не было.

Пациент № II-3, 22 года, наблюдался по поводу изолированного ГПТ, который был установлен в возрасте 14, из других компонентов АПС 1 типа у пациента была выявлена только гипоплазия зубной эмали. В гене *AIRE* выявлена гетерозиготная мутация R257*, а также полиморфизм R471C.

Пациент № II-4, 20 лет, наблюдался по поводу ХКСК, первые признаки которого появились еще до года, а также алопеции, манифестировавшей в 13 лет. В гене *AIRE* выявлена гетерозиготная мутация R257*.

Пациентка № II-5, наблюдалась по поводу ХНН с 4 лет, других компонентов заболевания на момент последнего обследования в возрасте 27 лет не было обнаружено. В гене *AIRE* была выявлена мутация A493T, патологическая значимость которой не известна, а также полиморфизм R471C. Эти изменения пациентки находятся в одном аллеле, что подтверждено обнаружением той же мутации и того же полиморфизма у здоровой матери пациентки.

Группа 3

Группу 3 составили 14 пациентов, у которых был только один из трех основных компонентов, и не было найдено мутаций в гене *AIRE*. Средний возраст пациентов составил 13,5 (3-26) лет (медиана возраста – 14 (10;17) лет. Соотношение пациентов женского пола к пациентам мужского пола составило 1:2,8.

ХНН наблюдалась у 11 пациентов, ГПТ - у 3. Других компонентов и аутоиммунных заболеваний эти пациенты не имели.

У пациентов из группы 3 при секвенировании гена *AIRE* патологически значимых мутаций обнаружено не было. Выявлено два полиморфизма S278R и R471[R,C]. У двух пациентов с ХНН выявлен полиморфизм R471C в гетерозиготном положении, у одного пациента с ГПТ выявлен полиморфизм S278R в гетерозиготном положении, также этот полиморфизм выявлен в гомозиготном положении еще у одного пациента с ГПТ.

Всем пациентам мужского пола, которые имели ХНН, была исключена X-сцепленная адренолейкодистрофия биохимическим методом (определение концентрации очень длинноцепочечных жирных кислот в крови). Десяти пациентам с ХНН из группы 3 дополнительно было проведено исследование антител к 21ОН: семь пациентов имели высокие титры антител. Среди троих пациентов с низкими титрами антител к 21ОН двоим была установлена врожденная гипоплазия надпочечников, доказанная обнаружением мутаций в гене *DAX1*. У обоих пациентов с выявленными мутациями в *DAX-1* была поздняя манифестация ХНН (13 и 11 лет), поэтому в первую очередь исключались деструктивные формы (аутоиммунная, X-АЛД) ХНН.

Группа сравнения (пациенты с очаговой алопецией)

Средний возраст пациентов составил 13(4-38) лет, а медиана возраста 12,5 (9;16). Соотношение пациентов мужского пола к пациенткам женского пола составило 1:1,7.

У 56,3% (18/32) пациентов помимо алопеции были проявления других аутоиммунных и неаутоиммунных заболеваний: у 13 пациентов был ХАИТ, 3 пациента наблюдались с витилиго, 1 пациентка имела СТГ-дефицит, у одной пациентки был тиреотоксикоз, а у одной - синдром Мак-Кьюна-Олбрайта-Брайцева (МОБ) (рисунок 9). У двух пациентов с алопецией было сочетание одновременно с ХАИТ и витилиго.

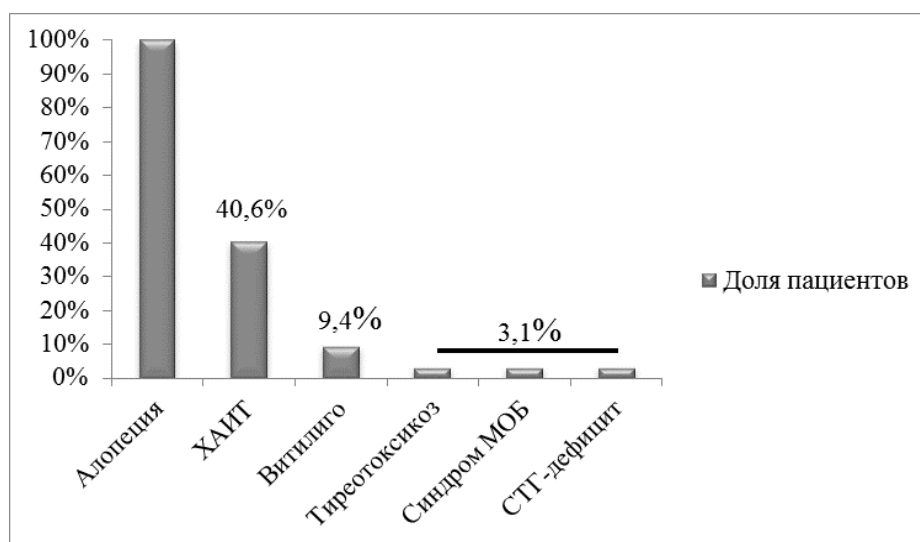


Рисунок 9. Клиническая характеристика пациентов группы сравнения (пациенты с алопецией).

3.2. Антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$

Антитела к интерферону- ω

Определение антител к интерферону- ω при помощи клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β проводилось у всех пациентов из группы 1 и группы 3. У всех пациентов из группы 1 индекс антител оказался выше порогового значения – 100% (ДИ: 95,3% - 100,0%), а у пациентов из группы 3 у всех оказался ниже – 0% (ДИ: 0,2% - 23,2%). Чувствительность метода – 100%, специфичность - 100%.

Определение антител к интерферону- ω при помощи РИА проведено у 36 пациентов из группы 1 и у 8 пациентов из группы 3. Как и при использовании клеточной культуры НЕК-blue, так и при помощи РИА индекс антител у всех пациентов из группы 1 был высоким (100%, ДИ: 90,3% - 99,9%), а у всех пациентов из группы 3 низким (0% ДИ: 0,3% - 36,9%). Чувствительность метода – 100%, специфичность - 100%.

Антитела к интерферону- $\alpha 2$

У 47,5 %(36/76) пациентов из группы 1 и 35,7% (5/14) пациентов из группы 3 исследование проводилось двумя методами и во всех случаях результаты совпали.

Определение антител к интерферону- $\alpha 2$ при помощи клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β проводилось у всех пациентов из группы 1 и у 11 пациентов из группы 3. У 93,4% (ДИ: 87,1% - 97,0%) пациентов из группы 1 индекс антител оказался выше порогового значения, а у пациентов из группы 3 у всех оказался ниже – 0% (ДИ: 0,2% - 28,5%). Чувствительность метода составила – 93,4%, а специфичность - 100%.

Определение антител к интерферону- $\alpha 2$ при помощи РИА проведен у 33 пациентов из группы 1 и у 2 пациентов из группы 3. Индекс антител у всех пациентов из группы 1 был высоким – 100%(ДИ: 89,4% - 99,9%), а у всех пациентов из группы 2 низким – 0% (ДИ: 1,3% - 84,2%) (рисунок X). Чувствительность метода – 100%, специфичность - 100%.

Низкие титры аутоантител к интерферону- $\alpha 2$ имели пациенты № 16, 51, 65, 68, 69, 70. Следует отметить, что пациентке № 65 исследование проводилось также с использованием РИА, при помощи которого был выявлен высокий титр антител к интерферону- $\alpha 2$.

Пациент № 16 (мужской пол, 5 лет). Пациент наблюдался по поводу ГПТ и ХКСК, которые были впервые выявлены в возрасте 3 лет. На момент последнего обследования других компонентов АПС 1 типа обнаружено не было. Диагноз был подтвержден молекулярно-генетически - в гене *AIRE* выявлена гомозиготная мутация R257*. При проведении иммунологических исследований у пациента

выявлен высокий титр антител к интерферону-ω, а также к интерлейкинам-22 и -17F. Титры антител к NALP, 21-гидроксилазе и SCC были низкими.

Пациент № 51 (женский пол, 13 лет). Пациенту ГПТ был установлен в возрасте 8 лет. Других компонентов АПС 1 типа заболевания к 13 годам не манифестировало. Диагноз подтвержден обнаружением гомозиготной мутации R257* в гене *AIRE*. В сыворотке крови пациентки был выявлен высокий титр антител к 21-гидроксилазе, интерлейкину-22 и интерферону-ω, а титры антител к NALP5, SCC были низкими.

Пациент № 68 (женский пол, 31 год). Заболевание манифестировало с ГПТ в возрасте 8 лет, затем присоединились ХКСК, ХНН и ХАИТ в 14 лет, дистрофия роговицы – в 29 лет, а также у пациентки были мальабсорбция и гипоплазия зубной эмали. При молекулярно-генетическом исследовании выявлена гомозиготная мутация R257*. В иммунологическом анализе крови: высокие титры аутоантител к 21-гидроксилазе, интерлейкину-22 и NALP5, низкие титры к интерлейкину-17F и SCC.

Пациент № 69 (родная сестра пациентки №70). Заболевание манифестировало с ХКСК, который был выявлен в возрасте 2 лет, затем присоединились аутоиммунная энтеропатия – в 3 года, аутоиммунный гепатит – в 4 года, ХНН – в 5 лет, а также гипоплазия зубной эмали. В гене *AIRE* выявлена гомозиготная мутация R257*. В иммунологическом анализе крови - высокий титр аутоантител к интерферону-ω, 21-гидроксилазе, NALP5, интерлейкину-22 и низкий титр аутоантител к интерлейкину-17F, SCC.

Пациент № 70 (женский пол, 3 года, родная сестра пациента № 71). АПС 1 типа манифестировал в возрасте 8 месяцев с проявлений кольцевидной эритемы, затем присоединился ХКСК в возрасте 1 года, ХНН – в 3 года и гипоплазия зубной эмали. Генотип соответствует генотипу старшей сестры – гомозиготная мутация R257* в гене *AIRE*. Иммунологические показатели отличаются от показателей сестры: высокие титры аутоантител к интерферону-ω, 21-гидроксилазе, интерлейкинам-22 и -17F, низкие титры аутоантител к SCC и NALP5.

Группа 2.

Исследование антител к интерферону- ω и интерферону- $\alpha 2$ проведено пациентам из группы 2. Высокий индекс антител к интерферону- ω был у пациентов П-1, П-2 и П-4, а к интерферону- $\alpha 2$ - у двух пациентов П-1 и П-4. У пациентов П-3 и П-5 значения индексов антител и к интерферону- ω и к интерферону- $\alpha 2$ были низкими.

Пациенты с алопецией.

Исследование антител к интерферону- ω было проведено у 32 пациентов с очаговой алопецией (21 пациенту при помощи клеточной культуры НЕК-blue, 12 пациентам при помощи РИА, из них 1 пациенту исследование проводилось двумя методами) – значения этих антител были низкими у всех пациентов в этой группе. Дополнительно 21 пациенту с очаговой алопецией проведено исследование антител к интерферону- $\alpha 2$ при помощи клеточной культуры НЕК-blue – также у всех пациентов выявлены низкие значения этих антител.

Для определения практической ценности прогноза определения антител к интерферонам- ω с использованием клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β и антител к интерферонам- $\alpha 2$ при помощи РИА проведение ROC-анализа не требовалось, в связи с тем, что чувствительность и специфичность методов составили 100%.

Для метода определения антител к интерферонам- $\alpha 2$ с использованием клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β был проведен ROC-анализ. При построении ROC-кривой доля площади под кривой составила 0.964, что соответствует отличной прогностической способности метода. (таблица 2, таблица 3, рисунок 10)

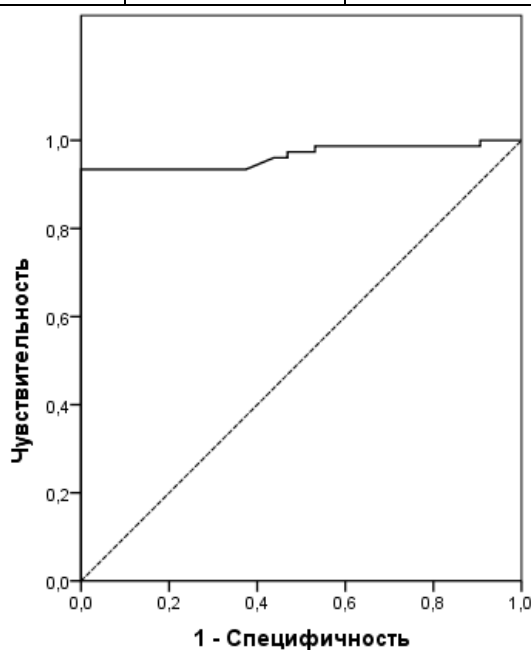
Таблица 2. Экспертная шкала для значений площади под кривой для ROC-анализа

| Интервал площади под кривой | Качество показателя |
|-----------------------------|---------------------|
| 0,9-1,0 | Отличное |
| 0,8-0,9 | Очень хорошее |
| 0,7-0,8 | Хорошее |

| | |
|---------|----------------------|
| 0,6-0,7 | Среднее |
| 0,5-0,6 | Неудовлетворительное |

Таблица 3. Параметры ROC-анализа для антител к ИФР- $\alpha 2$

| Доля площади под кривой | Стандартная ошибка | Асимптотическая значимость | Асимптотический 95% Доверительный интервал | |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|--|-----------------|
| | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| 0,964 | 0,017 | 0,000 | 0,930 | 0,998 |

Рисунок 10. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к интерферону- $\alpha 2$ методом НЕК-blue IFN- α/β .

3.3.Антитела к ИЛ-22 и ИЛ-17F

В группе 1 ХКСК был у 65 человек (85,5%). Из них грибковое поражение ногтей имели 40,8% (31/76), а грибковое поражение слизистой полости рта - 56,6% (43/76). Среди них есть пациенты, которые имели кандидоз как слизистых, так и ногтей – 27,6% (21/76). Слабые клинические проявления кандидоза (поражение только одного или двух ногтей, без кандидоза слизистых оболочек) были у 3 пациентов (№19,30,53). Эзофагогастродуоденоскопия проводилась 11 пациентам, имеющим жалобы на боли в эпигастрии, изжогу, нарушение глотания, и у 6 из них был выявлен кандидозный эзофагит.

Медиана возраста манифестации хронического кандидоза составила 3,5 (1;5) года. Средний возраст пациентов, имеющих и не имеющих ХКСК, составил 19,5 ($\pm 8,2$) и 15 ($\pm 7,4$) соответственно и различие между ними было достоверным ($p=0.037$), т.е. возраст пациентов без ХКСК был достоверно ниже возраста пациентов с ХКСК.

Частота ХКСК среди пациентов мужского и женского пола была сопоставима ($p>0.05$) и составила 88,9%(32/36) и 82,5% (33/40) соответственно.

Антитела к ИЛ-22

Высокий уровень антител к ИЛ-22 имели 98,7%(75/76) пациентов. Среди 65 пациентов имеющих ХКСК индекс антител выше порогового значения был выявлен у 64 пациентов, однако у всех 11 пациентов без ХКСК также выявлены высокие значения антител к ИЛ22 (коэффициент Спирмена -0.048, $p=0.43$) (рисунок 11).

Обнаружена отрицательная корреляция между величиной индекса антител и возрастом пациентов на момент забора образца крови (коэффициент корреляции - 0,289, $p> 0.011$). А среди пациентов с ХКСК, найдена достоверная отрицательная корреляция между величиной индекса АТ к ИЛ-22 и возрастом пациентов (коэффициент корреляции Спирмена -0.329, $p=0.01$) (рисунок 12).

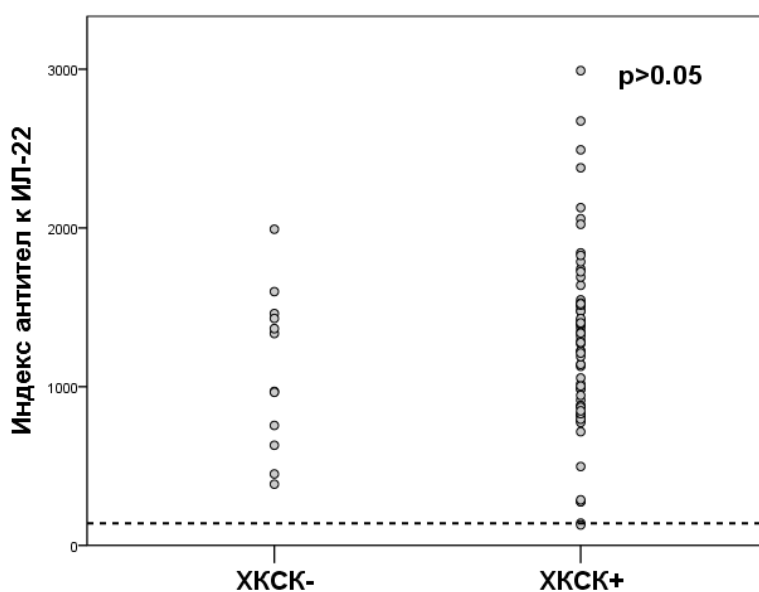


Рисунок 11. Антитела к ИЛ-22 у пациентов с АПС 1 типа с ХКСК и без ХКСК

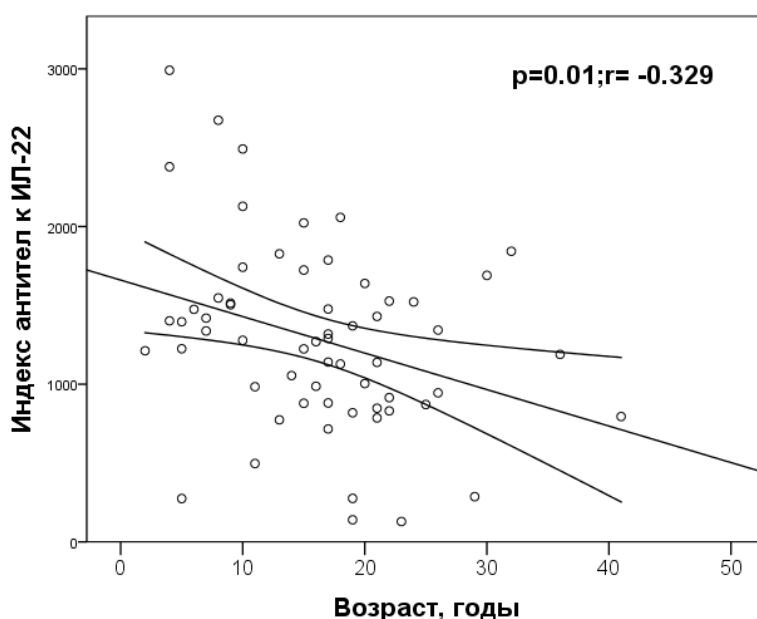


Рисунок 12. Зависимость величины индекса антител к ИЛ-22 от возраста у пациентов с ХКСК из группы 1.

Также выявлена достоверная связь между титром АТ к ИЛ-22 и длительностью течения ХКСК на момент забора образца крови (коэффициент корреляции Спирмена -0.321, $p=0.021$) (рисунок 13)

В группе 1 среди пациентов с ХКСК было два пациента, которые не имели ХКСК на момент забора образца крови: (пациенты № 31 и № 40). Оба пациента имели высокие уровни антител к ИЛ-22. Впоследствии, у обоих пациентов манифестировал ХКСК. У пациента № 31 манифестация произошла через 8 лет после забора образца крови, а у пациента №40 - через 3 года.

В группе 1 было 11 пациентов, у которых были обнаружены высокие уровни антител к ИЛ-22, но не было ХКСК. Средний возраст этих пациентов значимо не отличался от возраста пациентов с высокими уровнями антител и ХКСК ($p=0.1$).

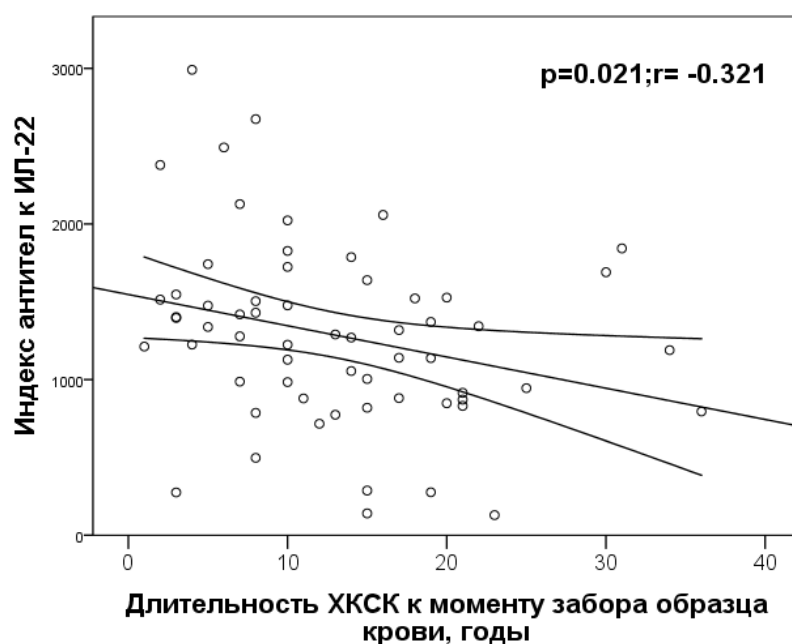


Рисунок 13. Зависимость величины индекса антител к ИЛ-22 от длительности ХКСК в группе 1.

Антитела к ИЛ-17F

Антитела к ИЛ-17F выявлялись в этой группе реже, чем антитела к ИЛ-22. Индексы антител к ИЛ-17F, превышавшие пороговое значение, выявлены у 33 из 76 пациентов (43,4%). Среди всех пациентов с ХКСК высокий уровень антител был только у 43,1% (28/65) пациентов, а у остальных 56,9% (37/65) значения индекса антител к ИЛ-17F были низкими (рисунок 14). При проведении статистического анализа корреляция между антителами к ИЛ-17F и ХКСК обнаружена не было (коэффициент корреляции Спирмена 0,063, $p > 0.05$).

Связь между величиной индекса антител ИЛ-17F и длительностью течения ХКСК на момент забора крови была статистически не достоверной (коэффициент корреляции Спирмена -0.266, $p > 0.05$). Но корреляция между величиной индекса антител ИЛ-17F и возрастом пациентов на момент забора крови статистически значима и имеет отрицательных характер (коэффициент корреляции Спирмена -0.302, $p = 0.008$).

Связи антител к ИЛ-22 и ИЛ-17F с другими компонентами заболевания найти не удалось.

Кроме того, исследование антител к ИЛ-17F и ИЛ-22 было проведено 8 пациентам из группы 3 (6 пациентов с ХНН и 2 пациента с ГПТ). Антитела к ИЛ-

ИЛ-17F не были выявлены ни у одного пациента. Но антитела к ИЛ-22 выше порогового значения были выявлены у одного пациента. Этот пациент наблюдался с надпочечниковой недостаточностью и вторичным гипогонадизмом вследствие мутации в гене *DAX1*, никаких аутоиммунных проявлений у него на момент обследования не было, и причина выявления высоких значений антител к ИЛ-22 остается не понятной.

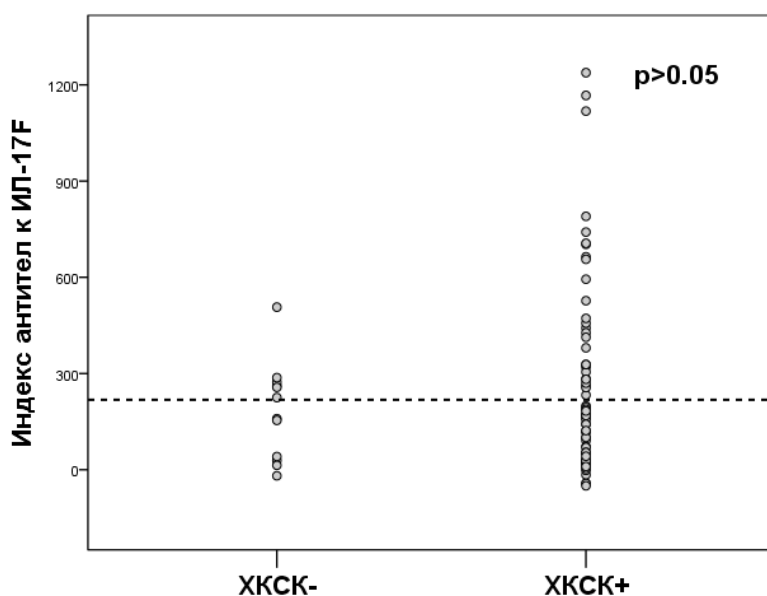


Рисунок 14. Антитела к ИЛ-17F у пациентов с АПС 1 типа с ХКСК и без ХКСК

3.4. Антитела к NALP5

ГПТ встречался у 78,9%(60/76) пациентов в группе 1. Частота ГПТ среди женщин была гораздо выше, чем у мужчин: 92,5% (37/40) и 63,9 % (23/36) соответственно ($p=0.004$). Медиана манифестации ГПТ составила 6(4;9) лет. Средний возраст пациентов, имеющих и не имеющих ГПТ, статистически не различался и составил 18,4(± 8) лет и 19,2($\pm 9,1$) лет соответственно ($p= 0.737$).

Антитела к NALP5 были выявлены у 68,3% (41/60) пациентов с ГПТ и у 18,8% (3/16) пациентов без ГПТ ($p<0.001$) (рисунок 15).

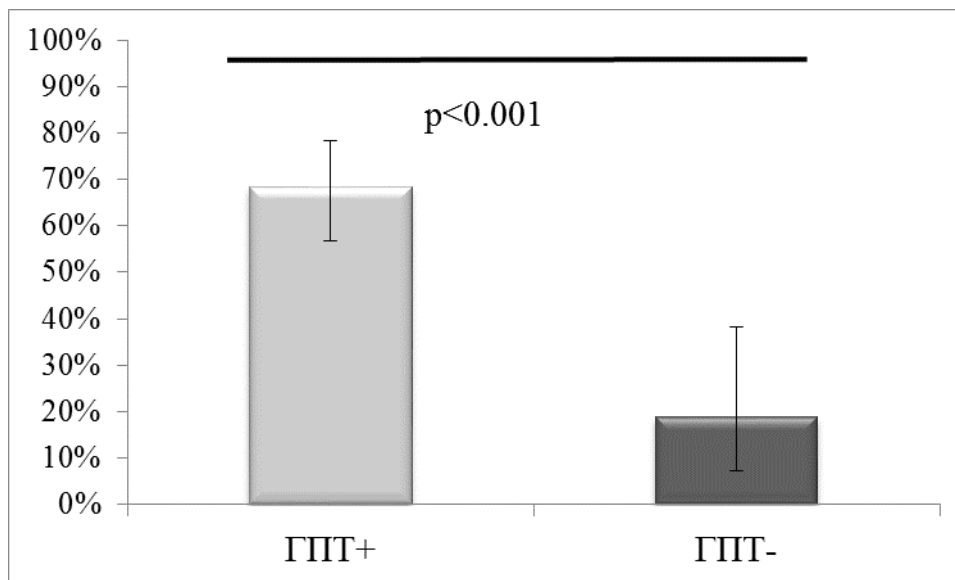


Рисунок 15. Доля пациентов с высокими индексами антител к NALP5 у пациентов с ГПТ и без ГПТ в группе 1

Чувствительность метода составила 68,3%, специфичность – 81,3%, прогностическая ценность положительного результата – 93,2%, а прогностическая ценность отрицательного результата – 40,6%.

Корреляция между величиной индекса антител и наличием ГПТ оказалась статистически достоверной (коэффициент корреляции Спирмена 0.380, $p=0.001$) (рисунок 16).

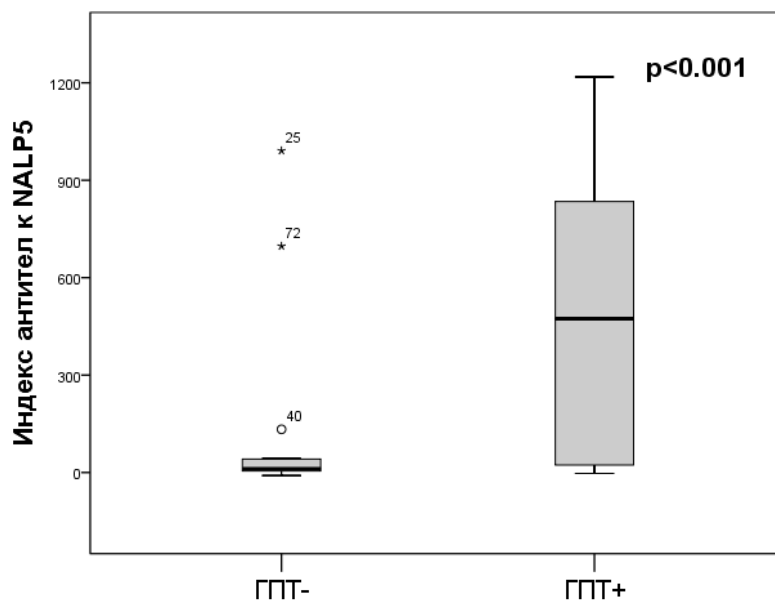


Рисунок 16. Индекс АТ к NALP5 у пациентов с ГПТ и без ГПТ в группе 1

Достоверность связи между прогнозируемой величиной (развитие ГПТ у пациента) и ее прогнозом по антителам к NALP5 была вычислена при помощи линейной регрессии ($p=0.003$), а для анализа практической ценности прогноза был использован ROC-анализ. При построении ROC-кривой доля площади под кривой составила 0.769, что соответствует хорошей прогностической способности метода определения антител к NALP5. (таблица 4, таблица 5, рисунок 17)

Таблица 4 Экспертная шкала для значений площади под кривой для ROC-анализа

| Интервал площади под кривой | Качество показателя |
|-----------------------------|----------------------|
| 0,9-1,0 | Отличное |
| 0,8-0,9 | Очень хорошее |
| 0,7-0,8 | Хорошее |
| 0,6-0,7 | Среднее |
| 0,5-0,6 | Неудовлетворительное |

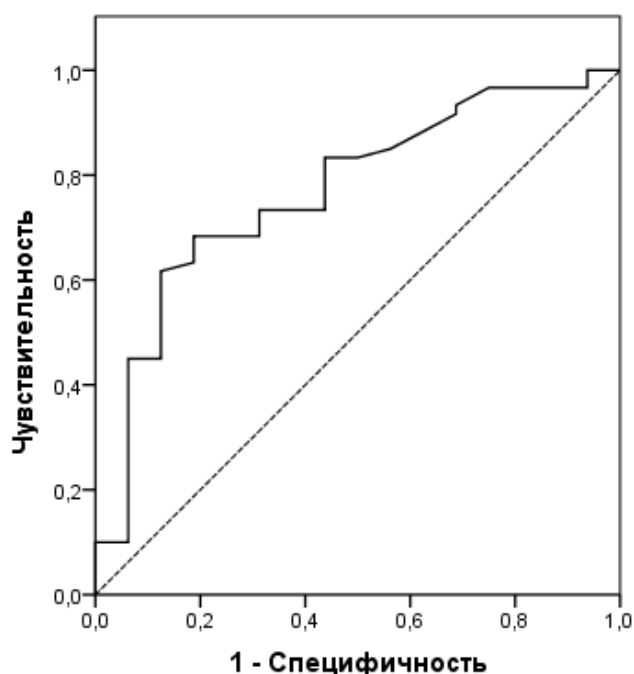


Рисунок 17. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к NALP5.

Таблица 5. Параметры ROC-анализа для антител к NALP5

| Доля площади под кривой | Стандартная ошибка | Асимптотическая значимость | Асимптотический 95% Доверительный интервал | |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|--|-----------------|
| | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| 0,769 | 0,066 | 0,001 | 0,640 | 0,898 |

Также была выявлена достоверная связь между величиной индекса антител и полом. Индекс антител был гораздо выше у лиц женского пола по сравнению с лицами мужского пола (сравнение проводилось в группе пациентов, имеющих ГПТ) – коэффициент корреляции Спирмена составил 0,720, $p < 0.001$ (рисунок 18).

Среди пациентов имеющих ГПТ проведен анализ зависимости уровня индекса антител к NALP5 от длительности течения компонента к моменту забора образца крови – была выявлена статистически не достоверная корреляция (коэффициент корреляции Спирмена 0.152, $p = 0.086$) (рисунок 19).

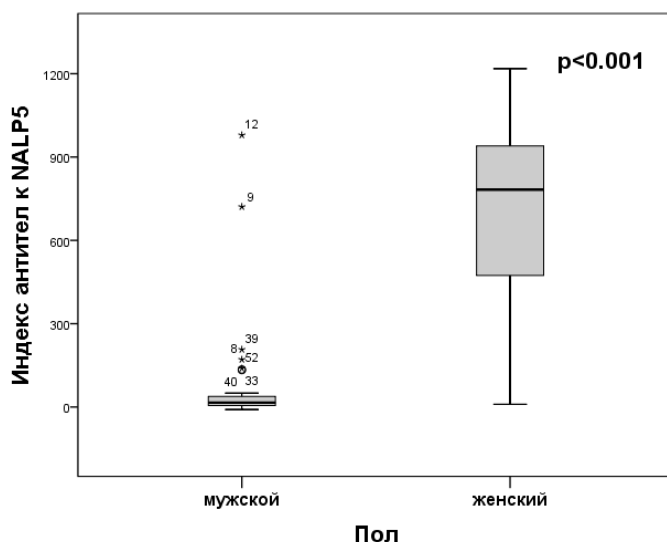


Рисунок 18. Зависимость индекса антител к NALP5 от пола пациентов в группе 1

В группе 1 не было выявлено корреляции между величиной индекса антител к NALP5 и возрастом пациентов (коэффициент корреляции Спирмена 0.131, $p = 0.32$) (рисунок 20).

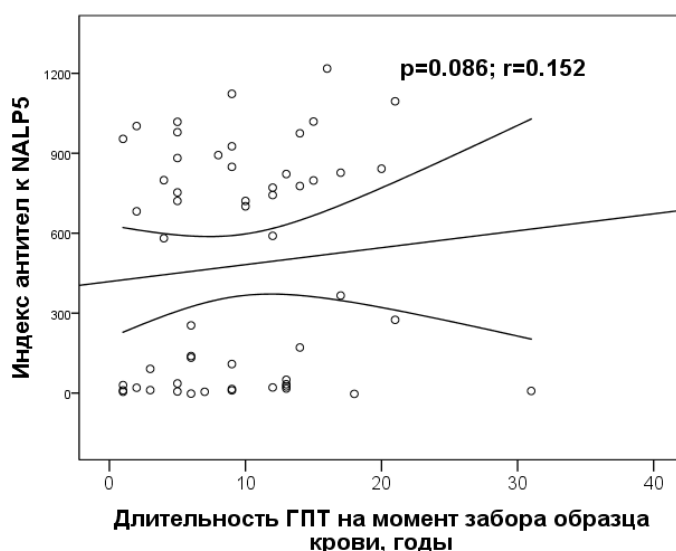


Рисунок 19. Зависимость индекса антител к NALP5 от длительности ГПТ у пациентов в группе 1.

В группе было два пациента с высоким уровнем антител к NALP5, у которых забор крови был проведен до манифестации ГПТ: пациент №33 и пациент №35 (приложение А, таблица А1). У обоих пациентов в дальнейшем развился ГПТ, и оба имели высокий уровень антител до манифестации компонента: пациентка №33 развила ГПТ через 1 год после забора крови, уровень антител к NALP5 был крайне высоким. Пациент №35 развил клинику ГПТ только через 7 лет после забора крови и индекс его антител был выше порогового значения, но не достигал таких высоких показателей как у пациента №33. Возможно, на момент забора крови у пациента №35 только начинался аутоиммунный процесс, направленный против паращитовидных желез, и этим можно объяснить такой большой промежуток времени между обнаружением антител к NALP5 и развитием ГПТ.

В группе 1 было 3 пациента, которые имели высокие уровни антител к NALP5, но не имели ГПТ (пациенты №27, №42, №75). Различия в среднем возрасте пациентов с высоким уровнем антител к NALP5 без ГПТ ($17 \pm 5,6$ лет) и пациентов с высоким уровнем антител к NALP5 с ГПТ ($18,9 \pm 7,5$ лет) были статистически не достоверны.

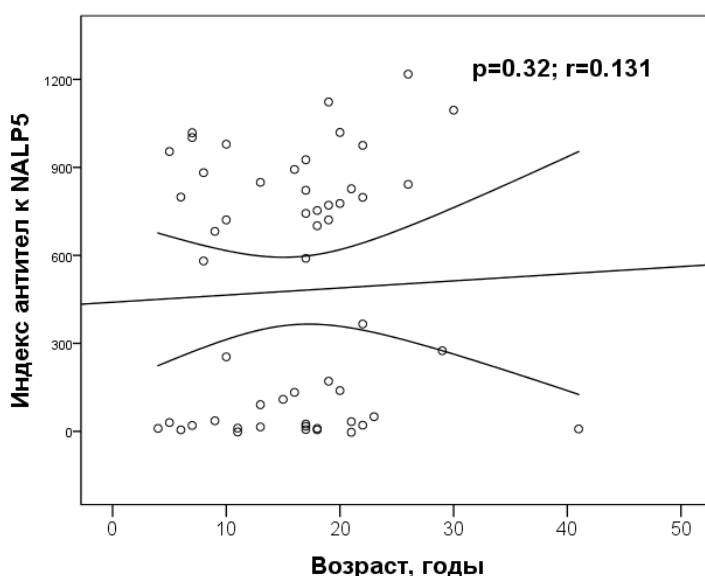


Рисунок 20. Зависимость индекса антител к NALP5 от возраста пациентов с ГПТ в группе 1.

Антитела к NALP5 и другие компоненты заболевания.

При проведении корреляционного анализа связи антител к NALP5 с другими компонентами заболевания выявлена достоверная связь с мальабсорбцией. Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,293 ($p = 0.08$). Всего в группе 1 33,8%(27/80) пациентов с мальабсорбцией. Медиана возраста манифестации мальабсорбции составила 6 лет (от 1 до 19 лет).

Учитывая то, что NALP5 не экспрессируется в тонкой и толстой кишке, а его экспрессия в поджелудочной железе очень мала, то вероятность связи между титром антител к NALP5 и мальабсорбцией была маловероятна [67]. Был проведен дальнейший анализ этой связи, в ходе которого было выявлено, что 24 из 27 пациентов с признаками мальабсорбции был ГПТ, а у 3 пациентов без ГПТ не было и антител к NALP5. Таким образом, полученная связь не верна и может не относиться к наличию или отсутствию у пациентов мальабсорбции, а зависеть от наличия только ГПТ. Кроме того, эпизоды мальабсорбции (диарея, обстипация) могут быть связаны с изменениями уровня кальция в крови на фоне ГПТ.

Пробуя анализировать связь между ГПТ, мальабсорбцией и антителами к NALP5, в группе 1 выделена подгруппа пациентов, у которых нет ГПТ или есть

ГПТ, но он манифестировал позже, чем мальабсорбция – 21 пациент. В этой подгруппе оказалось 6 пациентов с мальабсорбцией. Из этих шестерых пациентов только у троих были положительные антитела к NALP5, и все эти три пациента в дальнейшем в ходе наблюдения развили ГПТ. В связи с малочисленностью выборки пациентов с мальабсорбцией в этой подгруппе проведение статистических расчетов невозможно, необходимо проанализировать более многочисленную когорту пациентов с АПС 1 типа. Но нужно отметить, что в группе 1 нет пациентов с мальабсорбцией, у которых были бы высокие уровни антител к NALP5 и не было бы ГПТ, что очередной раз ставит под сомнение возможность связи между мальабсорбцией и антителами к NALP5.

Аспления – один из типичных компонентов АПС 1 типа, когда наблюдается постепенное «рассасывание» селезенки, механизм которого не ясен, хотя, предположительно, также связан с образованием аутоантител. Белок NALP5 экспрессируется в том числе в селезенке [67], и у двух пациентов с асплией выявлен высокий титр антител к NALP5, однако эти пациенты также имели гипопаратиреоз.

Ранее было показано, что NALP5 экспрессируется и в гонадах, а также есть публикации, указывающие на связь между антителами к NALP5 и первичным гипогонадизмом (ПГГ) [67][122]. В связи с тем, что первичный гипогонадизм при АПС 1 типа часто встречается у пациентов женского пола и реже среди пациентов мужского пола (среди обследованных пациентов нет мужчин с гипогонадизмом), анализ зависимости гипогонадизма от наличия антител к NALP5 был проведен среди лиц женского пола. Из всех пациентов была отобрана группа, состоящая из 28 пациенток старше 16 лет. Первичный гипогонадизм наблюдался у 39,3 % (11/28) женщин старше 16 лет. В этой группе средний возраст пациенток ($24,4 \pm 4,2$ лет) достоверно не отличался от среднего возраста пациенток, не имеющих первичного гипогонадизма ($23,7 \pm 4,3$ лет) ($p=0.67$). Высокие показатели антител к NALP5 были выявлены у 100% (11/11) пациенток с первичным гипогонадизмом, но и среди пациенток без гипогонадизма они определялись в большом проценте

случаев – 88,2% (15/17). Различия оказались статистически недостоверными ($p=0.5$) (рисунок 21).

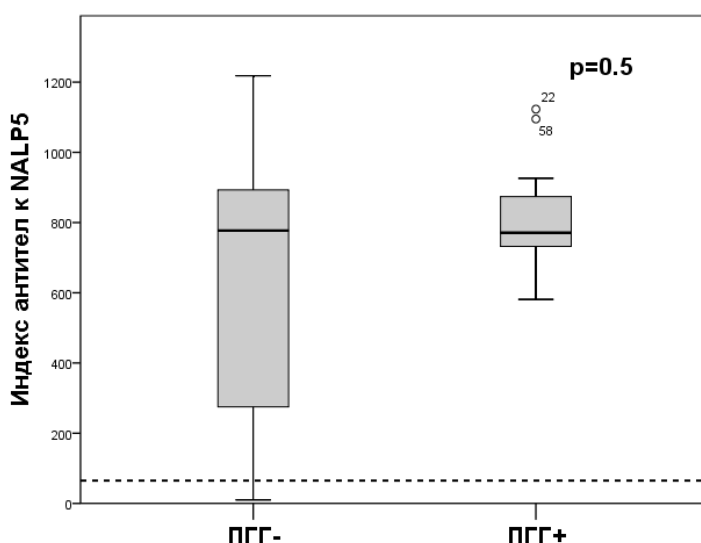


Рисунок 21. Индекс АТ к NALP5 у пациентов с АПС 1 типа с ПГГ и без ПГГ

----- Пороговое значение индекса антител к NALP5

ПГГ- первичный гипогонадизм

Клинический случай

Пациент № 27.

Пациент мужского пола 26 лет наблюдался эндокринологом с диагнозом АПС 1 типа. Диагноз был подтвержден молекулярно-генетически – в гене *AIRE* выявлена гомозиготная мутация R257*. С 4х лет у пациента отмечался рецидивирующий кандидоз слизистой полости рта, с 12-13 лет – очаговая алопеция, с 13 лет - надпочечниковая недостаточность. С 16 лет пациент наблюдался по поводу ГПТ, который был установлен на основании выявления сниженного ионизированного кальция сыворотки до 0,95 ммоль/л и повышения уровня фосфора сыворотки крови до 1,7 ммоль/л, уровень паратиреоидного гормона на тот момент не измерялся. Пациенту был назначен дигидротахистерол, который в дальнейшем был заменен на окальцидол. Судорог у пациента никогда не было. На фоне самостоятельной отмены пациентом терапии в течение 4

месяцев уровень ионизированного кальция оставался на нижней границе нормы, клинических проявлений гипокальциемии не было. Наличие у пациента ГПТ было поставлено под сомнение. Во время обследования в возрасте 25 лет уровень общего кальция сыворотки крови был 1,52 ммоль/л, ионизированного кальция – 0,82 ммоль/л, фосфора -0,72 ммоль/л (на фоне терапии α кальцидолом в дозе 1,5 мкг/сут); обращало на себя внимание также снижение уровня калия сыворотки крови до 2,8 ммоль/л. Уровень же паратиреоидного гормона был выше нормы - 10,42 пмоль/л (1,6 – 6,9). Пациенту было рекомендовано исследование уровня витамина Д, которое проведено не было.

Повышенный уровень паратиреоидного гормона, низкий уровень фосфора, невыраженная гипокальциемия говорили больше в пользу дефицита витамина Д, нежели в пользу ГПТ. У пациента никогда не было признаков хронического запора или хронической диареи, в связи с чем диагноз мальабсорбция ему не устанавливался, но мальабсорбция могла бы объяснить снижение уровня кальция, фосфора и калия одновременно.

Для уточнения диагноза пациенту было проведено исследование антител к NALP5. Исследование проводилось дважды (в 23 года и в 25 лет), и оба раза уровни антител были низкими.

В связи с повышенным уровнем паратиреоидного гормона, отсутствием повышения фосфора сыворотки крови, а также отсутствием антител к основному антигену паращитовидных желез (NALP5) было решено, что у пациента в настоящий момент нет ГПТ. К терапии было рекомендовано добавить препараты негидроксилированного витамина Д (холекальциферол) для восполнения дефицита витамина Д.

3.5.Антитела к SCC и 21ОН

В группе 1 было 75% (57/76) пациентов с ХНН. Медиана возраста манифестации ХНН составила 9 лет (5;12). Средний возраст пациентов с ХНН составил $18,95 \pm 7,6$ лет, а без ХНН - $18,42 \pm 10$ лет. Различия в показателе среднего возраста были статистически не достоверными ($p > 0.05$). Частота

надпочечниковой недостаточности среди женщин и мужчин была сопоставима и составила 70% (28/40) и 80,5% (29/36) соответственно ($p>0.05$)

Антитела к 21ОН

Высокие показатели индекса антител к 21ОН были выявлены у 70% (56/80) обследованных пациентов. Среди 57 пациентов с ХНН у 49 (86%) был высокий уровень антител к 21ОН, при этом только 8 (14%) человек с ХНН имели нормальные значения индекса этих антител. Среди 19 пациентов без ХНН высокий показатель индекса антител был у 5 (26,3%) пациентов, а у остальных 14 (73,3%) пациентов – низкий (рисунок 22). Частоты высоких показателей титра антител у пациентов с ХНН и у пациентов без ХНН различались статистически достоверно ($p<0.001$).

Чувствительность метода составила 86%, специфичность – 73,7%, прогностическая ценность положительного результата – 90,7%, прогностическая ценность отрицательного результата – 63,6%.

Выявлена достоверная корреляция между титром антител к 21ОН и ХНН (коэффициент корреляции Спирмена 0.432, $p<0.001$)(рисунок 23)

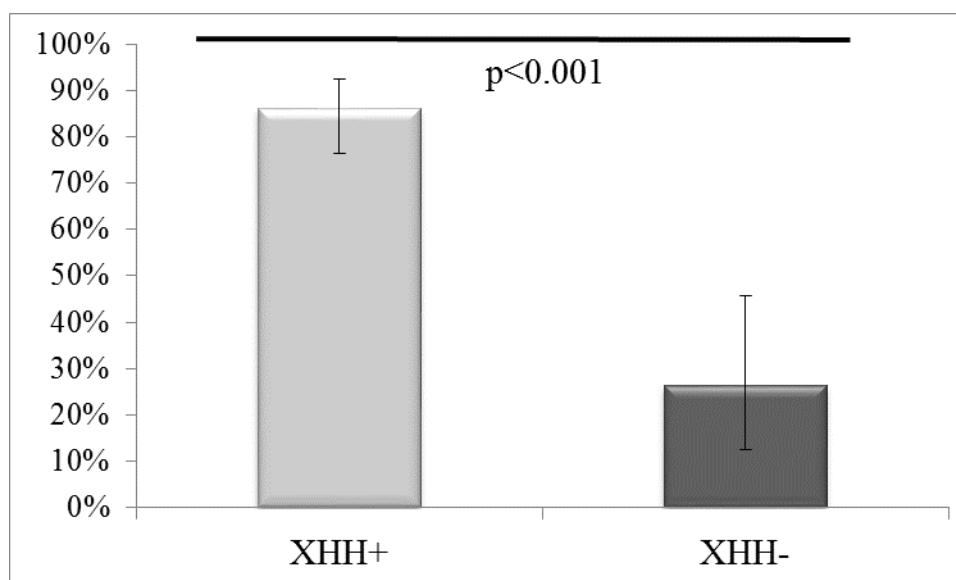


Рисунок 22. Антитела к 21ОН у пациентов с ХНН и без ХНН.

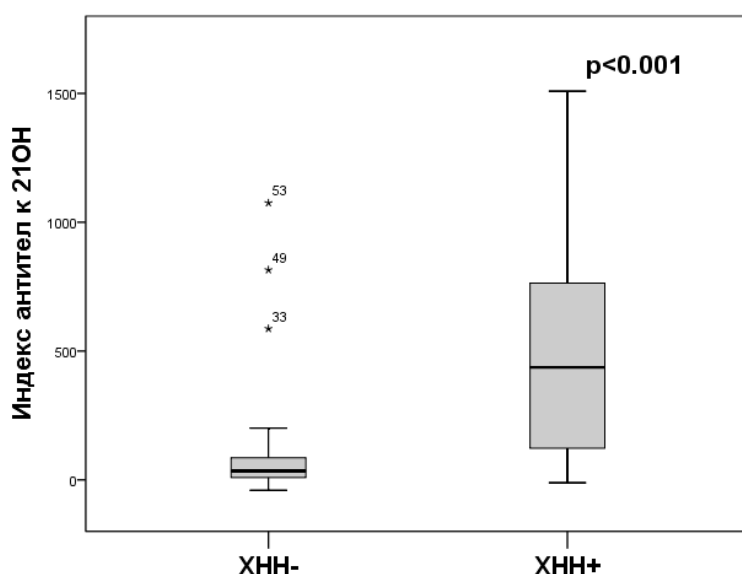


Рисунок 23. Индекс АТ к 21ОН у пациентов с ХНН и без в группе 1

Достоверность связи между развитием у пациента ХНН и ее прогнозом по антителам к 21ОН была вычислена при помощи линейной регрессии ($p=0.001$), а для анализа практической ценности прогноза был использован ROC-анализ. При построении ROC-кривой доля площади под кривой составила 0.792, что соответствует хорошей прогностической способности метода определения антител к 21ОН. (таблица 6, таблица 7, рисунок 24)

Таблица 6. Экспертная шкала для значений площади под кривой для ROC-анализа

| Интервал площади под кривой | Качество показателя |
|-----------------------------|----------------------|
| 0,9-1,0 | Отличное |
| 0,8-0,9 | Очень хорошее |
| 0,7-0,8 | Хорошее |
| 0,6-0,7 | Среднее |
| 0,5-0,6 | Неудовлетворительное |

Таблица 7. Параметры ROC-анализа для антител к 21ОН

| Доля площади под кривой | Стандартная ошибка | Асимптотическая значимость | Асимптотический 95% Доверительный интервал | |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|--|-----------------|
| | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| 0,792 | 0,066 | 0,000 | 0,663 | 0,922 |

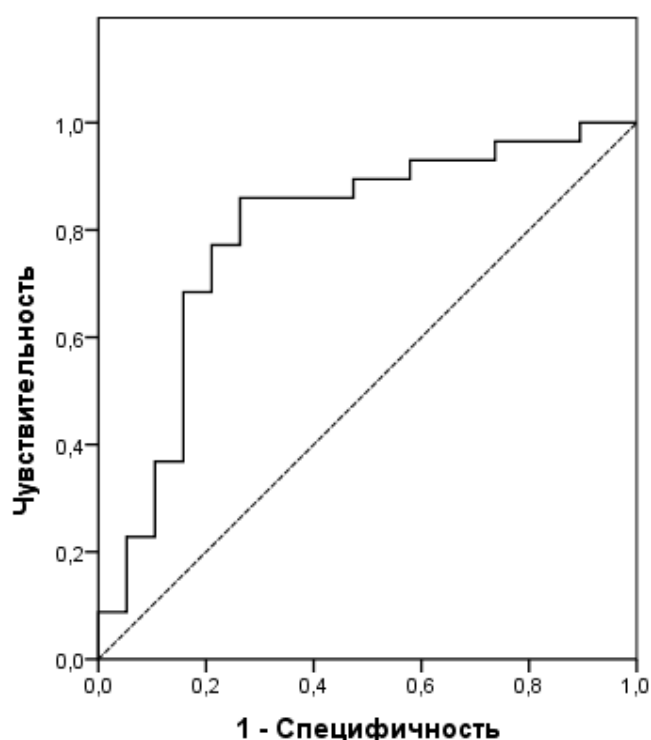


Рисунок 24. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к 21ОН

Проведен анализ взаимосвязи возраста пациентов и индекса антител к 21ОН – выявлена достоверная отрицательная связь (коэффициент корреляции Спирмена составил -0.320 , $p=0.005$) (рисунок25).

Также проведен анализ связи величины индекса антител к 21ОН и длительность ХНН на момент забора образца крови - выявлена достоверная отрицательная корреляция (коэффициент корреляции Спирмена составил -0.565 , $p<0.001$) (рисунок 26).

Средняя длительность течения ХНН на момент проведения исследования у 8 пациентов, у которых отсутствовали антитела к 21ОН, составила 10 лет (от 5 до 16 лет).

Дополнительно исследование антител к 21ОН было проведено у 10 пациентов с ХНН из группы 3, из них у 7 пациентов выявлены высокие значения этих антител. Среди трех пациентов, у которых антитела не были обнаружены, двое имели врожденную гипоплазию надпочечников в следствие мутации в гене *DAX1*, т.е. этиология их заболевания была не аутоиммунной.

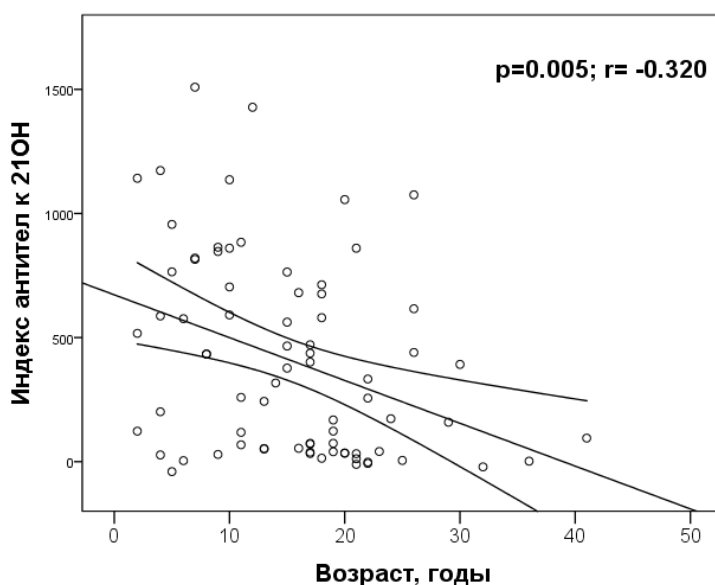


Рисунок 25. Зависимость величины индекса антител к 21ОН от возраста в группе 1.

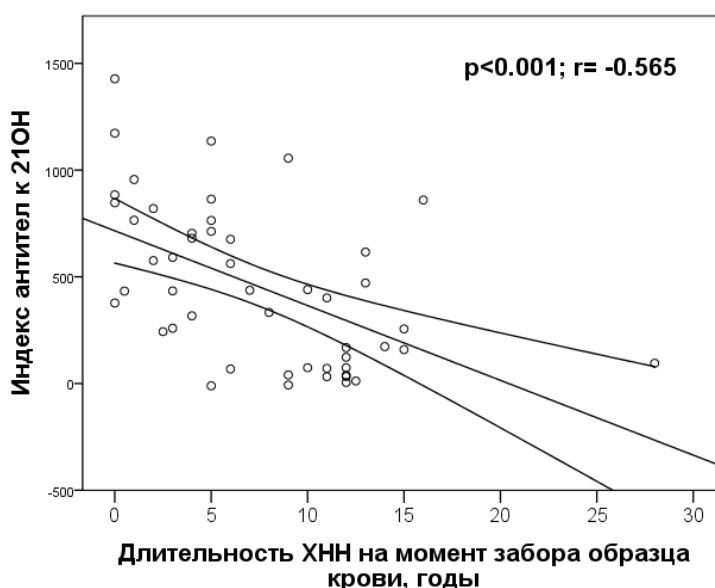


Рисунок 26. Зависимость величины индекса антител к 21ОН от длительности ХНН на момент забора образца сыворотки крови в группе 1

Антитела к SCC

Повышенные титры антител к SCC выявлены у 60,5% (46/76) пациентов. Среди 57 пациентов с ХНН высокий титр антител к SCC выявлен у 42 пациентов (73,7%), а среди 19 пациентов без ХНН - у 5 пациентов (21,1%) (рисунок 27). Частоты высоких показателей титра антител у пациентов с ХНН и без ХНН различаются статистически достоверно ($p<0.001$).

Чувствительность метода составила 73,7%, специфичность – 78,9%, прогностическая ценность положительного результата – 91,3%, прогностическая ценность отрицательного результата – 50%.

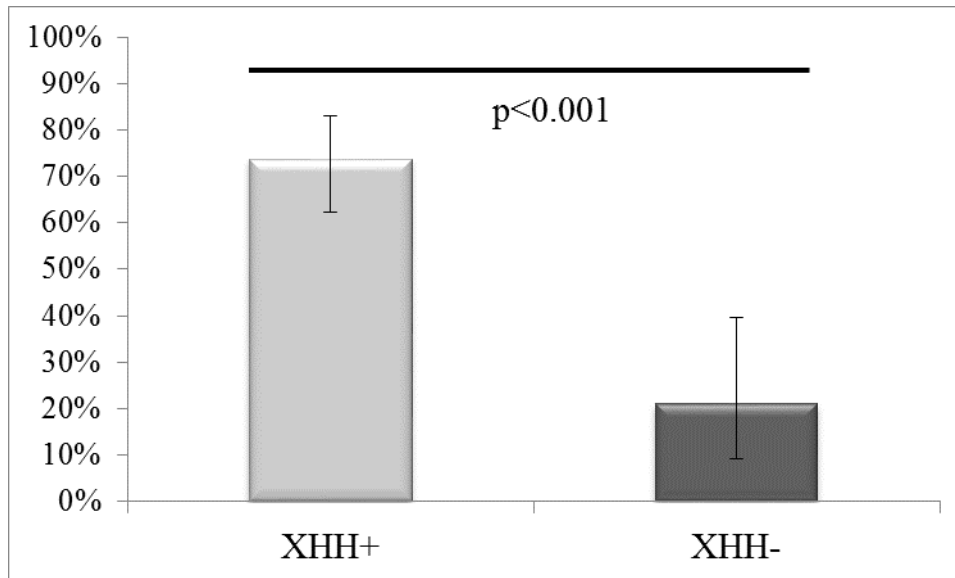


Рисунок 27. Антитела к SCC у пациентов с ХНН и без ХНН.

При анализе взаимосвязи антител к SCC и ХНН выявлена статистически достоверная положительная корреляция (коэффициент корреляции Спирмена 0.393, $p < 0.001$) (рисунок 28).

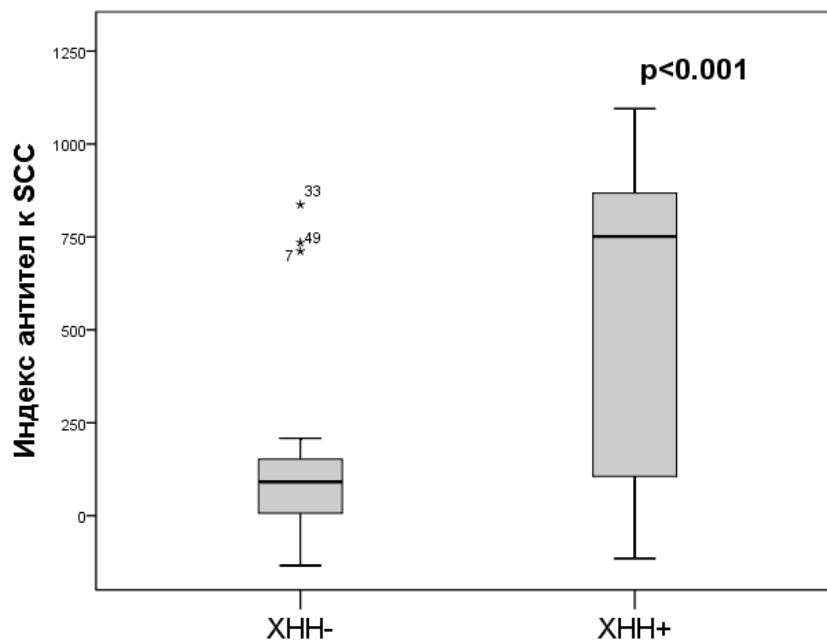


Рисунок 28. Индекс АТ к SCC у пациентов с ХНН и без в группе 1

Достоверность связи между развитием у пациента ХНН и ее прогнозом по антителам к SCC была вычислена при помощи линейной регрессии ($p=0.0001$), а для анализа практической ценности прогноза был использован ROC-анализ. При построении ROC-кривой доля площади под кривой составила 0.762, что соответствует хорошей прогностической способности метода определения антител к SCC (таблица 8, таблица 9, рисунок 29).

Таблица 8 Экспертная шкала для значений площади под кривой для ROC-анализа

| Интервал площади под кривой | Качество показателя |
|-----------------------------|----------------------|
| 0,9-1,0 | Отличное |
| 0,8-0,9 | Очень хорошее |
| 0,7-0,8 | Хорошее |
| 0,6-0,7 | Среднее |
| 0,5-0,6 | Неудовлетворительное |

Таблица 9. Параметры ROC-анализа для антител к SCC

| Доля площади под кривой | Стандартная ошибка | Асимптотическая значимость | Асимптотический 95% Доверительный интервал | |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|--|-----------------|
| | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| 0,762 | 0,056 | 0,001 | 0,652 | 0,872 |

При проведении анализа взаимосвязи возраста пациентов и величины индекса антител достоверной корреляции выявлено не было (коэффициент корреляции Спирмана -0.023, $p=0.85$) (рисунок 30).

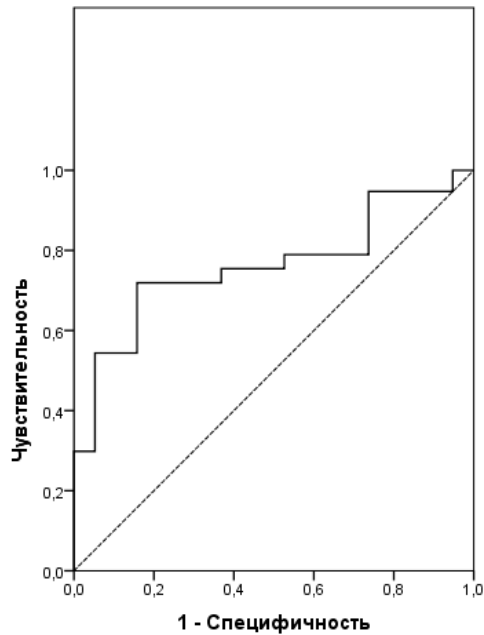


Рисунок 29. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к SCC

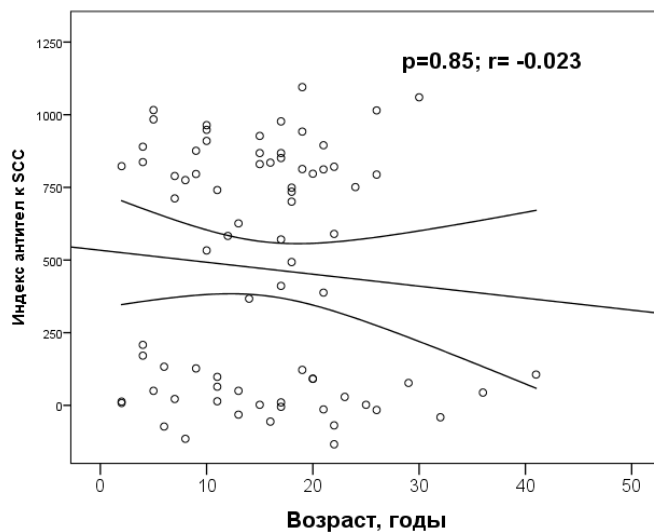


Рисунок 30. Зависимость титра антител к SCC от возраста пациентов в группе 1.

Также не выявлено корреляции между длительностью ХНН на момент забора образца крови и индексом антител к SCC у пациентов, имеющих ХНН (коэффициент корреляции Спирмена -0.123, $p=0.36$) (рисунок 31).

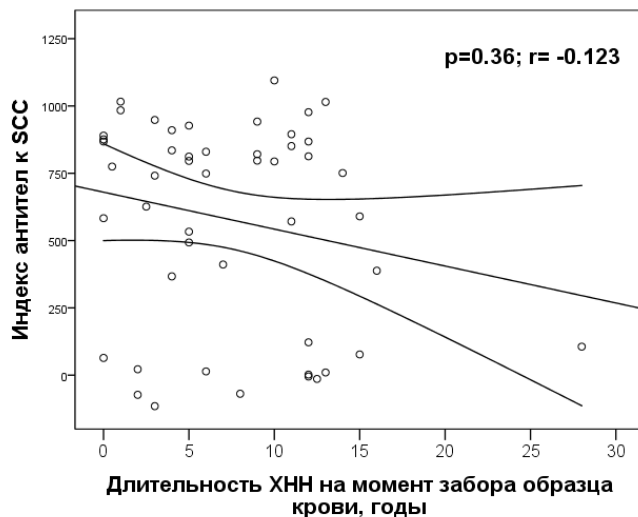


Рисунок 31. Зависимость величины индекса антител к SCC от длительности ХНН на момент забора образца крови в группе 1

Антитела к SCC и гипогонадизм

С учетом того, что SCC помимо надпочечников экспрессируется также в других стероидопродуцирующих тканях (яички и яичники), было решено провести анализ корреляции между антителами к SCC и первичным гипогонадизмом. В связи с тем, что первичный гипогонадизм при АПС 1 типа часто встречается у пациентов женского пола и крайне редок среди пациентов мужского пола (в группе 1 нет пациентов мужского пола с гипогонадизмом), исследование было проведено на лицах женского пола. Из группы 1 была отобрана подгруппа, состоящая из 28 пациенток старше 16 лет. Среди этих пациенток первичный гипогонадизм наблюдался у 39,3 % (11/28). В этой подгруппе средний возраст пациенток имеющих первичный гипогонадизм ($24,4 \pm 4,2$ лет) достоверно не отличался от среднего возраста пациенток не имеющих первичного гипогонадизма ($23,7 \pm 4,3$ лет) ($p=0.67$).

Выявлена достоверная связь между наличием гипогонадизма и антителами к SCC (коэффициент корреляции Спирмана 0.397, $p=0.036$) (рисунок 32)

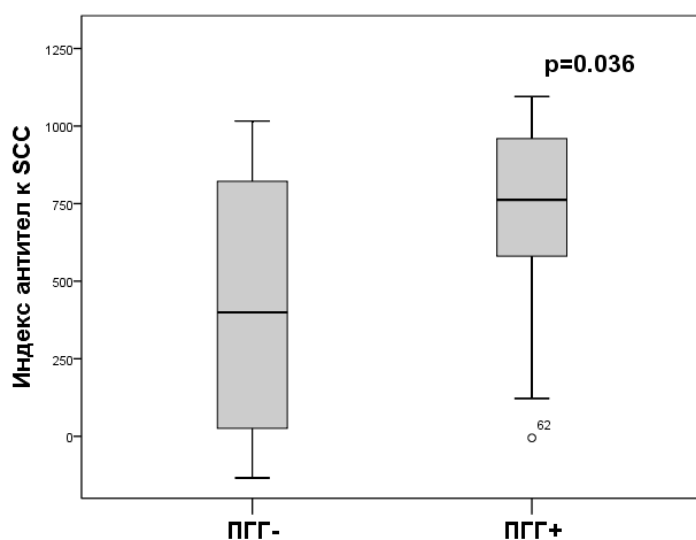


Рисунок 32. Антитела к SCC и первичный гипогонадизм у пациентов женского пола старше 16 лет.

*ПГГ – первичный гипогонадизм

Достоверность связи между развитием ПГГ и его прогнозом по антителам к SCC была вычислена при помощи линейной регрессии ($p=0.001$), а для анализа практической ценности прогноза был использован ROC-анализ. При построении ROC-кривой доля площади под кривой составила 0.701, что ниже, чем соответствующих данных, что соответствует хорошей прогностической способности метода определения антител к SCC (таблица 10, таблица 11, рисунок 33).

Таблица 10 Экспертная шкала для значений площади под кривой для ROC-анализа

| Интервал площади под кривой | Качество показателя |
|-----------------------------|----------------------|
| 0,9-1,0 | Отличное |
| 0,8-0,9 | Очень хорошее |
| 0,7-0,8 | Хорошее |
| 0,6-0,7 | Среднее |
| 0,5-0,6 | Неудовлетворительное |

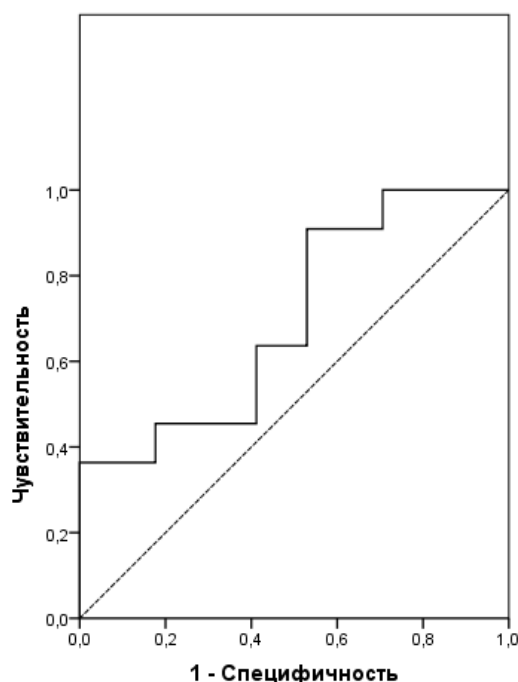


Рисунок 33. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к SCC

Таблица 11. Параметры ROC-анализа для антител к SCC

| Доля площади под кривой | Стандартная ошибка | Асимптотическая значимость | Асимптотический 95% Доверительный интервал | |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|--|-----------------|
| | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| 0,701 | 0,102 | 0,078 | 0,500 | 0,901 |

Корреляция между величиной индекса антител и длительностью первичного гипогонадизма на момент забора образца крови оказалась статистически недостоверной (коэффициент корреляции Спирмена $-0,252$, $p > 0.05$) (Рисунок 34).

В группе 1 было 3 пациента, у которых на момент забора образца сыворотки крови не было гипогонадизма, но впоследствии он развился в среднем в течение 6 лет (от 3 до 10 лет) (пациенты №24, 37, 43). У всех трех пациенток был высокий уровень антител к SCC. У пациенток, которые не имели первичного гипогонадизма на момент забора образца крови, средний возраст на тот момент составил $14,7 \pm 6$ лет, а у пациенток, которые уже имели первичный гипогонадизм, средний возраст составил $20 \pm 4,4$ лет. Обращает на себя внимание, что пациентки, которые не имели на тот момент гипогонадизма младше пациенток с

гипогонадизмом, но статистический анализ провести невозможно из-за малочисленности выборки пациентов.

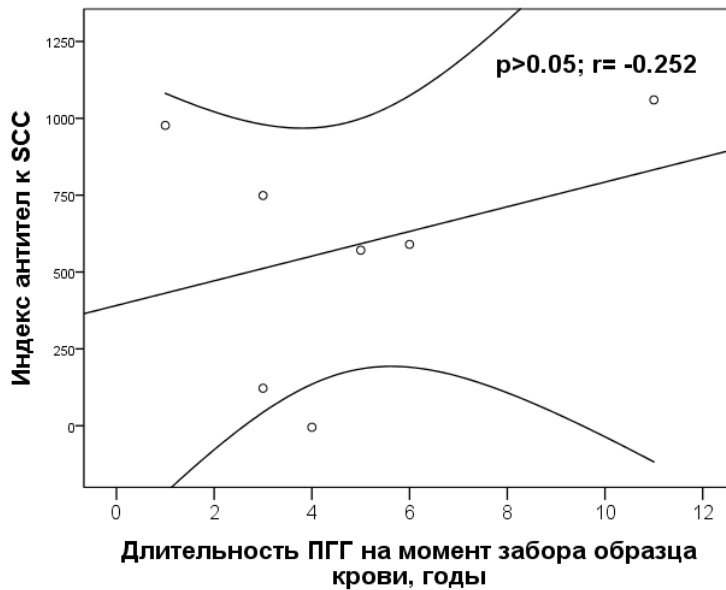


Рисунок 34. Зависимость индекса антител к SCC от длительности ПГГ на момент забора образца крови у пациенток старше 16 лет в группе 1

Клинические случаи

Пациент №13.

Пациент мужского пола, 12 лет. Наблюдался в ФГБУ ЭНЦ по поводу АПС 1 типа. Диагноз был подтвержден молекулярно-генетически – в гене *AIRE* выявлена гомозиготная мутация R257*. Манифестация заболевания произошла в возрасте 5 лет с ГПТ, ХКСК и витилиго, а в 8 лет к клинической картине заболевания присоединились сахарный диабет 1 типа и мальабсорбция. С 9 лет у пациента отмечается постоянное незначительное повышение трансаминаз (АЛТ до 78 Ед/л, АСТ до 61 Ед/л), тогда же установлен хронический аутоиммунный тиреоидит в стадии субклинического гипотиреоза. С 9 лет у пациента склонность к гипогликемиям несмотря на уменьшение дозы инсулина, тяга к соленой пище. При обследовании выявлено умеренное повышение уровня АКТГ до 54 пг/мл (<46), повышение уровня прямого ренина крови до 254 мМЕ/мл (2,8-39,9), умеренное снижение уровня натрия до 134 ммоль/л (136-145), повышение уровня калия крови до верхней границы - 5 ммоль/л (3,5-5,1). Была проведена проба с

синактеном, которая исключила первичную надпочечниковую недостаточность (повышение уровня кортизола крови до 628 нмоль/л). Пациенту не было назначено заместительной гормональной терапии надпочечниковой недостаточности. В течение последующих 2-3 мес у пациента сохранялась тяга к соленой пище, уровень ренин крови сохранялся повышенным (230 мМЕ/мл). Пациенту был проведен иммунологический анализ крови для выявления антител к антигенам надпочечников – были выявлены высокие показатели индексов антител к 21ОН и SCC. Учитывая клиническую картину, повышение уровня ренина плазмы, высокие показатели индексов антител к антигенам надпочечников, пациенту был установлен диагноз «Хроническая надпочечниковая недостаточность, изолированный минералокортикоидный дефицит». Была назначена терапии флудрокортизоном. В дальнейшем у пациента присоединилась глюкокортикоидная недостаточность, и была назначена терапия препаратами гидрокортизона. Таким образом, манифестация ХНН у пациента началась с минералокортикоидной недостаточности с дальнейшим присоединением глюкокортикоидной недостаточности. Выявление повышенного уровня антител к 21ОН и SCC позволили установить диагноз в доклиническую стадию, которую не удалось установить даже при помощи пробы с синактеном, в связи с атипичной манифестацией ХНН (начало заболевания с дефицита минералокортикоидов).

Пациент №52

Пациент мужского пола, 24 года. С 4 лет наблюдался по поводу ХКСК, с 11 лет у пациента тотальная алопеция. Диагноз АПС 1 типа был установлен на основании выявления гомозиготной мутации R257* в гене *AIRE*. В дальнейшем пациент в ФГБУ ЭНЦ наблюдался нерегулярно. В возрасте 17 лет пациенту проведена проба с синактеном – уровень кортизола повысился до 1520 нмоль/л, первичная надпочечниковая недостаточность была исключена. В возрасте 21 года пациент обследован по поводу слабости, снижения массы тела, тяге к соленой пище, потемнения кожных покровов. Выявлено повышение уровня АКТГ до 1037 пг/мл (7-66) и активности ренина плазмы до 12 нг/мл/час(0,5/1,9), в связи с чем

пациенту установлена первичная хроническая надпочечниковая недостаточность и назначена заместительная гормональная терапия глюко- и минералокортикоидными препаратами. При проведении иммунологического исследования крови из образцов крови нашего биобанка, высокие уровни антитела к 21ОН выявлены у пациента уже в образце, взятом в возрасте 15 лет. От появления высокого титра антител к 21ОН до манифестации заболевания прошло минимум 6 лет. Антитела, исследованные в возрасте 15 лет, могли бы стать предиктором развития ХНН, и за состоянием здоровья пациента был бы установлен более тщательный контроль, что позволило бы верифицировать диагноз на еще доклинической стадии.

3.6.Обсуждение результатов исследований

АПС 1 типа – заболевание, характеризующееся значительной клинической полиморфностью, что приводит к ряду проблем в диагностике этого заболевания, возникающих даже у опытных клиницистов. Во-первых, не всегда пациенты соответствуют классическим критериям диагностики, заболевание может протекать в стертой форме с наличием только одного основного компонента, не всегда возможно выявить мутации в гене *AIRE*. Во-вторых, отсутствие взаимосвязи спектра клинических проявлений и мутаций в гене *AIRE*, различное течение заболевания у пациентов даже в пределах одной семьи, вероятность манифестации компонентов заболевания в различной последовательности и в разном возрасте делает прогноз течения заболевания невозможным. В данной диссертационной работе была задана цель найти решение этих проблем. Были изучены новые маркеры, с помощью которых возможна диагностика как самого заболевания в целом, так и отдельных его компонентов. Учитывая то, что самыми частыми компонентами этого заболевания являются ХКСК, ГПТ и ХНН, также была проведена оценка прогностической значимости маркеров этих компонентов АПС 1 типа. Исследования антител к интерферонам, интерлейкинам, NALP5 и SCC у пациентов с АПС 1 типа в России проведены впервые.

Исследование проведено на уникальной группе пациентов с АПС 1 типа, одной из самых больших в мире, что позволило сделать статистически достоверные выводы и разработать практические рекомендации по диагностике и наблюдению за этими пациентами. Многочисленная выборка пациентов со столь редким заболеванием делает данное исследование ценным не только для российской, но и для мировой медицинской науки.

Антитела к интерферонам- ω и - $\alpha 2$

В исследовании получены результаты, указывающие на высокую специфичность и чувствительность антител к интерферонам для АПС 1 типа, в особенности, антител к интерферону- ω . Факт того, что чувствительность метода определения антител к интерферону- ω составила 100% (ДИ: 95,3% - 100,0%), а специфичность - 100% (ДИ: 92,3% - 99,9%), обосновывает необходимость проведения исследования этих антител с диагностической целью у пациентов с подозрением на наличие у них АПС 1 типа. Этот метод оказался сопоставимым по диагностической значимости с молекулярно-генетическим исследованием гена AIRE, а в некоторых случаях является даже более информативным. Примером этому служит группа 2 (пациенты с сомнительным диагнозом), в которой антитела к интерферону- ω были выявлены у трех пациентов, имевших только один основной компонент заболевания и только одну гетерозиготную мутацию в гене AIRE, что позволило установить им диагноз АПС 1 типа. Принимая во внимание то, что заболевание полиморфно, и манифестация его компонентов может быть растянута на десятки лет, кроме того, некоторые пациенты могут иметь только один компонент в течение всей жизни, а также невозможность во всех случаях обнаружения двух мутаций при помощи прямого секвенирования, то можно предположить, что эти три пациента – это пациенты со стертой формой АПС 1 типа или пока еще с неполной клинической картиной. Обнаружение антител к интерферону- ω является ключевым критерием в диагностике АПС 1 типа у этих пациентов и определяет необходимость динамического наблюдения по алгоритму, разработанному для пациентов с АПС 1 типа.

Положительные антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ в группе 2 выявлены у пациентов № II-1, II-2 и II-4. У пациентки № II-1 из компонентов заболевания есть только ГПТ, но учитывая ее молодой возраст (4 года), можно предположить, что другие компоненты у девочки еще не успели развиваться. У этой пациентки выявлена только одна мутация в гене *AIRE* - C302Y. Эта мутация была описана ранее коллегами из Университета Бергена совместно с нашей исследовательской группой, и был подтвержден ее доминантно-негативный потенциал. Учитывая то, что белок *AIRE* является транскрипционным фактором, было изучено влияние гетерозиготных мутаций с предполагаемым доминантным эффектом на функцию белка *AIRE* путем определения экспрессии мРНК генов, зависимых и независимых от *AIRE*. Для мутации C302Y показано снижение экспрессии мРНК генов, зависимых от белка *AIRE*, и не было никаких изменений в экспрессии мРНК в независимых от *AIRE* генах [121]. Таким образом, учитывая наличие у пациентки ГПТ, одной доминантной негативной мутации в гене *AIRE*, положительные антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$, даже несмотря на то, что она полностью не соответствует классическим критериям диагностики АПС 1 типа, ее можно отнести к пациентам с АПС 1 типа и продолжить наблюдение за ней согласно стандартам, разработанным ранее [7].

Пациенты № II-2 (11 лет, изолированный ГПТ) и № II-4 (20 лет, ХКСК, очаговая алопеция) также имеют положительные антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$, но имеют только одну частую мутацию R257X в гетерозиготном положении в гене *AIRE*, что осложняет диагностику. Следует заметить, что пациентка № II-2 достаточно молодая, и у нее возможно развитие других компонентов заболевания в дальнейшем. Что касается пациента II-4, то интересно, что он имеет необычное сочетание двух компонентов, характерных для АПС 1 типа: помимо одного основного компонента, ХКСК, изолированная форма которого встречается крайне редко и, как правило, сопутствует иммунодефицитным состояниям, есть также один малый, но очень специфичный для пациентов с АПС 1 типа, компонент – гипоплазия зубной эмали. Принимая во внимание то, что антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ очень специфичны для этого заболевания, то этим двум

пациентам также был установлен АПС 1 типа. А отсутствие у них мутаций во втором аллеле можно объяснить тем, что обнаружение крупных делеций и интронных мутаций затруднено путем прямого секвенирования и, возможно, что у этих пациентов есть мутации такого рода и их не удалось обнаружить при помощи использованных методов.

У пациентов № II-3 и II-5 по-прежнему не подтвержден вопрос о наличии у них АПС 1 типа, так как пациенты имеют только по одному основному компоненту заболевания и только по одной мутации в гене *AIRE*, а антитела к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ у них не определяются. Пациент № II-3 имеет два компонента заболевания: один основной (ГПТ) и один малый (гипоплазия зубной эмали). При исследовании гена *AIRE* выявлены две мутации: частая для российской популяции мутация R257X в гетерозиготном положении и мутация R471C. Родители пациента здоровы, мать является носителем мутации R471C, а отец – R257X. Учитывая то, что мутация R471C не проявляет способность к нарушению экспрессии мРНК *AIRE*-зависимых генов [121], то это изменение, предположительно, является полиморфизмом. В нескольких публикациях обсуждается вопрос о том, является ли все-таки данная замена патогенной или нет, окончательного ответа на сегодняшний день нет. Нельзя не отметить то, что среди наших пациентов эта же мутация встречается у пациентки II-5 с ХНН, а также у двух пациентов с изолированной ХНН из группы 3, у которых выявлены высокие титры антител к 21ОН, и, возможно, эта мутация в некоторых случаях может приводить к аутоиммунным реакциям, но причина и механизм этих реакций пока не ясны до конца.

Пациентка II-5 имеет два компонента заболевания: ХНН и ХАИТ. Она является носителем мутации R471C и также мутации A493T, патогенность которой не известна. У матери пациентки, которая соматически здорова, выявлены аналогичные изменения в гене *AIRE*, что свидетельствует о том, что обе мутации R471C и A493T находятся в одном аллеле. У отца пациентки мутаций не обнаружено.

Таким образом, мы можем предположить, что аутоантитела к интерферону- ω

специфичны для АПС 1 типа, ассоциированного с мутациями гена AIRE, но не определяются у пациентов с аутоиммунным поражением эндокринных органов другой этиологии. Однако, необходимо дальнейшее наблюдение за пациентами II-3 и II-5 с целью обнаружения новых симптомов заболевания и уточнения механизмов развития заболевания.

Антитела к интерферону- $\alpha 2$ также оказались высокоспецифичными для АПС 1 типа и не определились ни у одного пациента из группы 3 (пациенты без АПС 1 типа) и из группы с очаговой алопецией. Их специфичность составила 100% (ДИ: 89,1% - 99,9%). При помощи РИА антитела к интерферону- $\alpha 2$ выявлены у всех пациентов, а при помощи метода с использованием клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β не выявлены у 6 пациентов. Чувствительность этих двух методов оказалась разной и составила 100,0% (ДИ: 89,4% - 99,9%) и 92,1% (ДИ: 85,3% - 96,2%) соответственно. При этом антитела к интерферону- $\alpha 2$ при помощи метода с использованием клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β определялись у всех пациентов из группы 1 (АПС 1 типа), а при помощи РИА только у 33 пациентов из группы 1. Различие в количестве обследованных пациентов могло повлиять на чувствительность этих методов. Следует указать, что среди шести пациентов с отрицательными антителами к интерферону- $\alpha 2$, только одному было проведено исследование методом РИА, и было выявлено высокое значение у него индекса этих антител. Сложно сделать вывод, является ли РИА действительно более чувствительным методом определения антител к интерферонам, необходимо исследование антител к интерферону- $\alpha 2$ при помощи этого метода остальным пятерым пациентам, у которых антитела при помощи клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β не выявлены, что в рамках этого исследования не было возможности провести.

Полученные в работе результаты по антителам к интерферонам подкрепляются данными других авторов, которые получили аналогичные результаты: антитела к интерферону- ω более чувствительны по сравнению с антителами к интерферону- $\alpha 2$, но оба этих метода специфичны для пациентов с АПС 1 типа и не встречаются у пациентов с другими аутоиммунными

заболеваниями, у здоровых людей и у здоровых носителей гетерозиготных мутаций в гене *AIRE*. Исключение составляют пациенты с тимоматами, для которых эти антитела и были впервые описаны. Однако при тимоматах антитела к интерферонам встречаются реже и индексы антител не достигают таких высоких значений, каких достигают при АПС 1 типа. В клетках тимомы нарушена экспрессия гена *AIRE*, чем можно объяснить такое совпадение в обнаружении этих антител у пациентов и с тимоматами, и с АПС 1 типа. В данной работе исследование антител у пациентов с тимоматами не проводилось.

Принимая во внимание такую высокую специфичность антител к интерферонам- ω и - α_2 , как по результатам этой работы, так и по данным других исследователей, решено предложить обнаружение этих антител в качестве дополнительного критерия диагностики АПС 1 типа. Более точным методом оказался метод определения антител к интерферону- ω , так как антитела к этому классу интерферонов выявляются у всех пациентов с АПС 1 типа. Учитывая наличие нескольких пациентов в группе 1, у которых антитела к интерферону- α_2 не были обнаружены, то использование этого метода будет ограниченным: и не может быть самостоятельным методом диагностики, его необходимо использовать только вместе с определением антител к интерферону- ω . Обнаружение положительных антител к интерферону- α_2 будет свидетельствовать о наличии у пациента АПС 1 типа, но отсутствие этих антител не будет полностью исключать диагноз.

Следует отметить, что методы определения этих антител достаточно просты, и их выполнение возможно в кратчайшие сроки (2-3 дня). Недостатком РИА является необходимость работы с радиоактивными препаратами и трудности с их поставкой и хранением. Более доступным методом является метод с использованием клеточной культуры НЕК-blue IFN- α/β : Анализ требует только наличие коммерчески доступных интерферонов и клеточной культуры, а также стандартного лабораторного оснащения для работы с клеточными культурами.

Таким образом, благодаря высокой специфичности и чувствительности обнаружение высоких титров антител к интерферонам- ω и - α_2 может быть

диагностическим маркером АПС 1 типа и по точности не уступает молекулярно-генетическому исследованию гена *AIRE*. Определение антител к интерферонам, а в особенности к интерферону- ω , можно использовать как недорогой и быстрый способ диагностики АПС 1 типа. Конечно, этот метод не исключает необходимости дальнейших генетических тестов у пациентов с высокими антителами, так как не позволяет проводить медико-генетического консультирования семьи, но благодаря этим антителам может быть уменьшено количество людей, которым необходимо провести генетический анализ, т.е. пациентам, у которых антитела к интерферонам отсутствуют, можно исключить диагноз АПС 1 типа без проведения исследования гена *AIRE*. Также эти антитела могут быть полезны пациентам соответствующим критериям диагностики не полностью. Как показало данное исследование, это могут быть пациенты, которым не удалось обнаружить вторую мутацию в гене *AIRE*, или пациенты с доминантно-негативными мутациями, которые по последним данным встречаются не так редко, как предполагалось ранее [121]. В этих случаях, использование антител к интерферонам- ω и - $\alpha 2$ в качестве дополнительного диагностического критерия могло бы помочь в диагностике АПС1 типа.

Антитела к интерлейкинам

Среди группы цитокинов, антитела к которым могут обнаруживаться у пациентов с АПС 1 типа, помимо интерлейкинов- ω - $\alpha 2$, интерес представляют интерлейкины 17 типа, которые секретируются особой субпопуляцией Т-лимфоцитов - Т-хелперами 17 типа, и играют важную роль в неспецифическом противогрибковом иммунитете слизистых и кожи.

В данной работе оценена значимость антител к некоторым интерлейкинам 17 типа, а именно к ИЛ-17F и ИЛ-22.

В группе пациентов с АПС 1 типа (группа 1) антитела к ИЛ-22 встречаются практически у всех пациентов, за исключением одного, вне зависимости от наличия или отсутствия кандидоза. Таким образом, статистически достоверной корреляции между обнаружением этих антител и развитием ХКСК нет. Однако в генетически сходной финской когорте пациентов (наиболее частая мутация среди

финнов и россиян одинаковая - R257X), к 40 годам ХКСК развивается у 100% пациентов. То же самое отмечено в группе 1, где все пациенты старше 30 лет страдают хронической кандидозной инфекцией. Учитывая то, что российская группа пациентов с АПС 1 типа – это молодая группа, вероятно, что у тех пациентов, которые на момент проведения исследования не имели признаков грибкового поражения, кандидоз может манифестировать в дальнейшем. Это предположение может объяснить циркуляцию антител к ИЛ-22 в крови большинства пациентов.

Учитывая частоту, с которой антитела к ИЛ-22 встречаются у пациентов с АПС 1 типа (98,7%), они могут быть использованы в качестве дополнительного маркера заболевания. Однако эти антитела были выявлены в группе 3 (без АПС 1 типа) у одного из восьми обследованных. Также высокие значения антител к ИЛ-22 были обнаружены у здорового сына пациентки с АПС 1 типа и здорового брата пациента с АПС 1 типа. Оба ребенка были носителями гетерозиготной мутации R257X в гене *AIRE* и не имели каких-либо проявлений заболевания (эти данные не представлены в диссертации). Обнаружение антител к ИЛ-22 у пациентов, не имеющих АПС 1 типа, делает их менее специфичными, но позволяет их использовать как дополнительный метод диагностики вместе с антителами к интерферонам.

Имеют ли клиническое значение антитела к ИЛ-17F, остается не ясным. Высокие значения этих антител встречаются гораздо реже (43,4%), но не встречаются ни у одного пациента из группы 3 (без с АПС 1 типа). Корреляции с каким-либо компонентом заболевания в группе пациентов с АПС 1 типа не обнаружено. Ранее, в нескольких работах было показано, что циркуляция антител к ИЛ-17F и ИЛ-22 в крови пациентов с АПС 1 типа и у пациентов с тимоматами коррелирует с наличием ХКСК [123][124][125]. Кроме того, антитела к этим цитокинам исследовались у пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями и у здоровых индивидуумов и не были обнаружены ни у одного исследуемого в этих группах. Это характеризовало наличие антител к ИЛ-22 и ИЛ-17F как

специфичный признак не только для кандидоза, но и как специфичный признак для заболеваний с нарушенной экспрессией гена *AIRE*.

Результаты данной работы вступают в относительное противоречие с данными других авторов, так как антитела к ИЛ-22 обнаруживаются не только у всех пациентов в группе 1 с АПС 1 типа (вне зависимости от наличия или отсутствия кандидоза), но и у нескольких здоровых людей. Обнаружение этого противоречия очень важно, с учетом того, что все исследования с участием пациентов с АПС 1 типа проводятся на маленьких группах и дополнительные данные, полученные на большой выборке пациентов всегда важны. В данной работе получены два принципиально важных результата. Во-первых, антитела к ИЛ-22 не обладают 100% специфичностью и могут определяться и у здоровых людей, в отличие от антител к интерферонам. Во-вторых, циркуляция этих антител характерна для большинства пациентов в российской популяции и возможно их применение в качестве дополнительного диагностического критерия. О связи этих антител с развитием ХКСК на основании наших данных нельзя утверждать, можно лишь предполагать об их прогностической значимости путем сравнения российской когорты пациентов с финской когортой, а также на основании того, что у всех пациентов старше 30 лет наблюдается ХКСК.

Антитела к NALP5.

Для изучения второго по частоте компонента АПС 1 типа, гипопаратиреоза, в группе 1 были исследованы антитела к NALP5 - белку, который экспрессируется в основном в паращитовидных железах.

В данной работе получена статистически достоверная связь между выявлением антител и наличием у пациентов гипопаратиреоза. Специфичность (81,3%) антител и прогностическая ценность положительного результата (93,2%) оказались высокими. Радиоиммунный метод, который использовался для обнаружения антител, имел высокую прогностическую ценность положительного результата (93,2%), но низкую прогностическую ценность отрицательного результата (40,6%), что говорит о том, что отсутствие у пациента антител к NALP5 не исключает возможность развития гипопаратиреоза, но если антитела

будут обнаружены, то вероятность развития гипопаратиреоза очень высока. Хорошая прогностическая способность метода была дополнительно подтверждена проведением ROC-анализа и построением ROC-кривой, доля площади под которой составила 0,769. Это еще раз подтверждается наличием в группе 1 двух пациентов с высокими значениями антител к NALP5, у которых на момент забора крови не было гипопаратиреоза, но этот компонент впоследствии в процессе наблюдения у них развился.

Интерес представляет тот факт, что по данным других авторов антитела к NALP5 не выявляются у пациентов с ГПТ без АПС 1 типа [68]. В группе 3 двум пациентам с ГПТ дополнительно исследовались эти антитела и выявлены не были (данные в диссертацию не вошли), что подтверждает то, что антитела к NALP5 не только специфичны для гипопаратиреоза, они специфичны именно для пациентов с АПС 1 типа.

Также в группе 1 обнаружена зависимость величины индекса антител к NALP5 от пола: у лиц женского пола индекс антител к NALP5 был значимо выше, чем у пациентов мужского пола. Кроме того, частота гипопаратиреоза также была выше среди женщин. Обнаруженная связь говорит о зависимости фенотипа пациентов с АПС 1 типа от пола, но причина влияния женского пола на развитие гипопаратиреоза пока остается не ясной. Похожие данные получены в работе Gylling M. Исследование проводилось в группе из 90 финских пациентов с АПС 1 типа, среди которых у 14 не было гипопаратиреоза, а из этих 14 пациентов 13 были мужского пола.

В литературе есть сообщения о связи между обнаружением антител к NALP5 и наличием синдрома преждевременного истощения яичников. Зависимость развития первичного гипогонадизма от наличия антител к NALP5 была выявлена в работе Brozzetti A [122]. Взаимосвязь между синдромом преждевременного истощения яичников и выявлением высоких титров антител к NALP5 была объяснена тем, что NALP5 также может экспрессироваться и в яичниках. В этой работе у всех девушек с синдромом преждевременного истощения яичников и положительными антителами к NALP5 был также выявлен

гипопаратиреоз, поэтому достоверность этого вывода была сомнительной. В нашей работе в группе пациентов с АПС 1 типа (группа 1) такую связь обнаружить не удалось. Возможно, что антитела к NALP5 играют роль в развитии первичного гипогонадизма, но их роль не первична и существуют другие факторы, приводящие к гипогонадизму.

С учетом того, что NALP5 также может экспрессироваться и в селезенке, то возможна связь между развитием аплазии селезенки и обнаружением антител к NALP5. В группе 1 были две пациентки, у которых развилась аплазия селезенки, и обе пациентки имели высокие титры антител к NALP5. Но эти пациентки также имели и гипопаратиреоз, с чем могло быть связано повышение уровня этих антител. Для доказательства участия антител к NALP5 в патогенезе аплазии селезенки необходимо исследование данных антител на большей когорте пациентов, т.к. этот компонент АПС 1 типа является крайне редким. В литературе связь аплазии селезенки с антителами к NALP5 также не описано и даже не изучалась, что опять же связано с редкостью этого заболевания и еще большей редкостью этого компонента.

Антитела к 21ОН и SCC.

Антитела к 21ОН являются хорошо известными диагностическими маркерами аутоиммунной надпочечниковой недостаточности [70–72].

Антитела к 21ОН известны своей специфичностью по отношению к ХНН не только при АПС 1 типа, но и при изолированной аутоиммунной надпочечниковой недостаточности, а также при АПС 2 типа [73]. Такие же результаты получились при дополнительном исследовании этих антител в группе 3. У 7 пациентов из 10 с ХНН, которым удалось провести исследование, были выявлены антитела к 21ОН и в то же время исключены другие причины ХНН, что позволяет предположить у них течение изолированной аутоиммунной надпочечниковой недостаточности. У двух пациентов с отрицательными антителами была подтверждена врожденная гипоплазия надпочечников путем обнаружения мутации в гене *DAX1*. У одного пациента к моменту проведения работы обнаружить причину ХНН не удалось.

У российских пациентов с АПС 1 типа на большой выборке это исследование ранее не проводилось. Ранее восемь российских пациентов с АПС 1 типа участвовали в международном исследовании, из них троим было проведено исследование антител к 21-гидроксилазе, 17 α -гидроксилазе и SCC[126]. Исследование антител к 21ОН и SCC является безусловно полезным методом для подтверждения аутоиммунного генеза ранее установленной изолированной надпочечниковой недостаточности и даст возможность исключить у этих пациентов другие неиммунные формы ХНН (адренолейкодистрофия, врожденная гипоплазия надпочечников, туберкулез надпочечников и т.д.). Однако, остается вопрос, могут ли антитела к 21-ОН служить не только диагностическим маркером уже имеющейся ХНН у пациентов с болезнью Аддисона, но и прогностическим маркером развития ХНН у пациентов с АПС 1 типа? Нами выявлена статистически достоверная связь между выявлением антител к 21ОН и наличием у пациентов ХНН, что соответствует данным предыдущих исследований [62,73,87]. Используемый в данной работе радиоиммунный метод обнаружения антител к 21ОН имел высокую прогностическую ценность положительного результата (90,7%), при не очень высокой прогностической ценности отрицательного результата (63,6%), что говорит о том, что положительный результат означает очень высокую вероятность ХНН у пациента с АПС 1 типа. Случаи, когда антитела к 21ОН отрицательные, но у пациента имеется надпочечниковая недостаточность, могут быть связаны с несколькими факторами:

1. Снижение количества антител в сыворотке пациентов со временем. Анализ связи между длительностью течения ХНН и уровнем индекса антител к 21ОН показал, что у пациентов с длительным течением заболевания индекс антител ниже. Также выявлена достоверная отрицательная корреляция между величиной индекса антител и возрастом пациентов. А 8 пациентов с ХНН, у которых антитела к 21ОН обнаружены не были, имели большую длительность течения ХНН на момент исследования – 10 лет. Это позволяет предположить, что по мере истощения антигенного потенциала органа, титр антител к 21ОН может снижаться.

2. Вовлеченность других аутоантител в патогенезе развития надпочечниковой недостаточности, например, антител к SCC;

3 Недостатки метода обнаружения антител, приводящие к ложно-отрицательным результатам. Но стоит заметить, что за время наблюдения (3 года) среди пациентов из группы 1, у которых не были обнаружены антитела к 21ОН, ХНН не манифестировала ни у одного пациента;

Обнаружение антител к SCC в группе 1 коррелировало с наличием у пациентов ХНН. Как и в случае с антителами к 21ОН, прогностическая значимость положительного результата метода определения антител к SCC была высокой, а прогностическая значимость отрицательного результата низкой, что может быть связано с теми же факторами, что и в случае с антителами к 21ОН.

Хорошая прогностическая способность методов определения антител к 21ОН и SCC для прогноза ХНН была подтверждена проведением ROC-анализа. А совместное определение антител к 21ОН и SCC приводит к увеличению точности прогнозирования развития у пациента надпочечниковой недостаточности.

Дополнительно, значимость антител к 21ОН и SCC в прогнозировании заболевания была продемонстрирована на 6 пациентах из группы 1, которые на момент забора крови не имели ХНН при высоких значениях антител к 21ОН (у всех 6 пациентов) и SCC (у 3 пациентов), у которых впоследствии развилась надпочечниковая недостаточность в течение 3,6[1,3;5,9] лет (среднее значение 2,5 года).

При анализе взаимосвязи антител к SCC с другими компонентами АПС 1 типа, была выявлена корреляции между обнаружением этих антител и наличием первичного гипогонадизма у пациенток в группе 1. Путем проведения ROC-анализа показана хорошая прогностическая способность этого метода. Такая зависимость была описана ранее другими авторами и объясняется экспрессией этого фермента в яичниках [77,87]. Ранее также было показано, что определение антител к SCC характерно для синдрома преждевременного истощения яичников, не ассоциированного с АПС 1 типа [77].

Возможность прогнозирования надпочечниковой недостаточности при помощи исследования антител к 21ОН и SCC позволит выделять среди всех пациентов с АПС 1 типа пациентов из группы очень высокого риска развития ХНН, что позволит более тщательно и чаще контролировать функцию надпочечников, выявлять заболевание на доклинической стадии и своевременно назначать заместительную терапию до развития жизнеугрожающего адреналового криза.

Исследование антител к SCC может быть полезным для прогнозирования первичного гипогонадизма у девушек с АПС 1 типа. И несмотря на то, что данный компонент заболевания не является жизнеугрожающим, но его прогнозирование может быть полезным для планирования семьи у пациенток с АПС 1 типа.

Заключение

В работе получены данные, указывающие на высокую специфичность и чувствительность обнаружения антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$, что позволяет предложить эти антитела в качестве диагностических маркеров и одного из основных критериев диагностики АПС 1 типа. Наряду с классическими критериями диагностики обнаружение антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ поможет в диагностике стертых форм АПС 1 типа, а также у пациентов, которым удалось обнаружить только одну мутацию в гене *AIRE*.

Антитела к ИЛ-22 и ИЛ-17F не являются прогностическими маркерами ХКСК. но высокая частота антител к ИЛ-22 у пациентов с АПС 1 типа (98,7%) делает возможным использование этих антител в качестве дополнительного маркера заболевания.

Исследование орган-специфических аутоантител к 21ОН, SCC, NALP5 показало, что они являются диагностическими и прогностическими маркерами ряда компонентов АПС 1 типа (ХНН, ГПТ, ПГГ). Возможно использование данных маркеров для прогнозирования течения заболевания и определения риска развития отдельных компонентов у пациентов с АПС 1 типа.

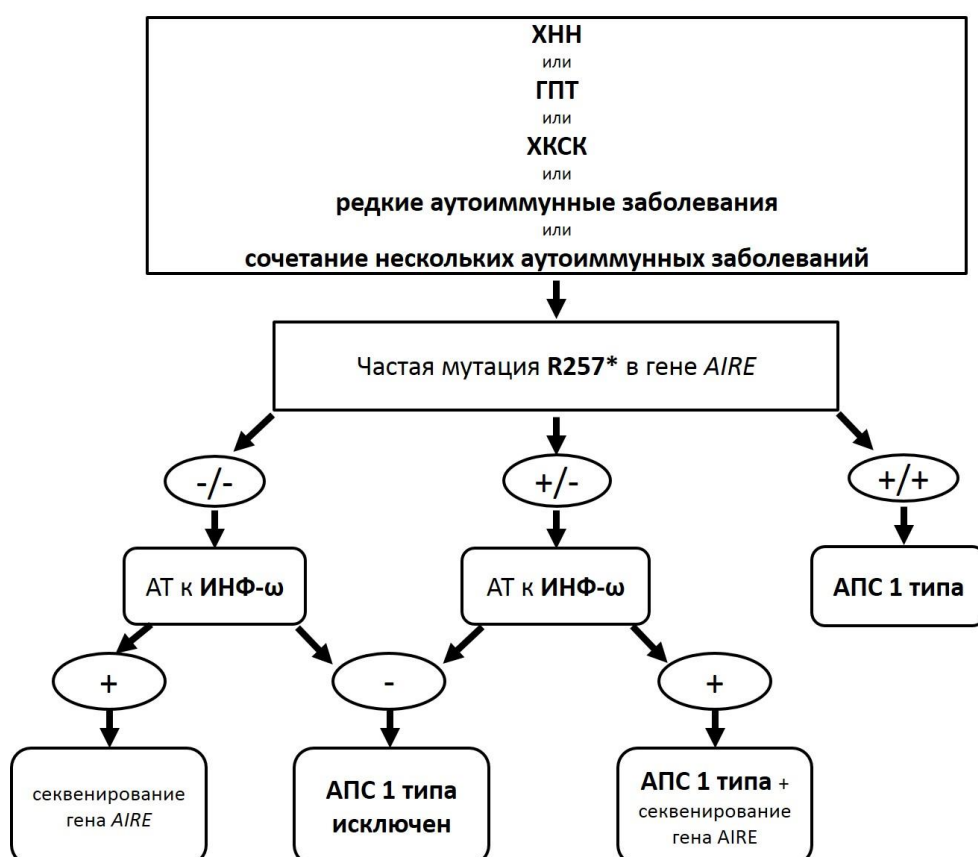
Выводы

1. Антитела к интерферонам- ω являются специфичными (100%) и чувствительными (100%) маркерами АПС 1 типа и могут применяться как основной метод диагностики мягких и стертых форм АПС 1 типа. Антитела к интерферонам- $\alpha 2$ также являются специфичными (100%) и чувствительными (93,4%) маркерами АПС 1. Возможно использование их в качестве дополнительного метода диагностики АПС 1 типа;
2. Корреляция между обнаружением антител к интерлейкину-22, интерлейкину-17F и наличием хронического кожно-слизистого кандидоза не обнаружена;
3. Антитела к NALP5 являются специфичными (81,3%) маркерами гипопаратиреоза у пациентов с АПС 1 типа и имеют высокую прогностическую ценность положительного результата (93,2%). Ассоциация антител к NALP5 с другими компонентами АПС 1 типа не обнаружена;
4. Антитела к 21-гидроксилазе и к SCC являются специфичными (73,7% и 78,9%) и чувствительными (86% и 73,7%) маркерами хронической первичной надпочечниковой недостаточности у пациентов с АПС 1 типа. Антитела к SCC являются также маркерами преждевременного истощения яичников у пациенток с АПС 1 типа.

Практические рекомендации

1. Всем пациентам, имеющим только один из трех основных компонентов АПС 1 типа, необходимо проведение исследования антител к интерферонам- ω и $\alpha 2$ с целью уточнения диагноза. Разработан алгоритм диагностики стертых форм АПС 1 типа;
2. Антитела к ИФН- ω и ИФН- $\alpha 2$ могут быть рекомендованы в качестве скринингового метода диагностики АПС 1 типа у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями, особенно при комбинации нескольких аутоиммунных заболеваний;
3. Для прогнозирования развития ГПТ, ХНН и первичного гипогонадизма у пациентов с АПС 1 типа необходимо исследование спектра орган-специфических антител: к 21ОН, SCC и NALP5 .

Алгоритм диагностики стертых форм АПС 1 типа



Список сокращений и условных обозначений

АКТГ – адренокортикотропный гормон
АПС 1 типа – аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа
АТ – антитела
ГПТ – гипопаратиреоз
ИЛ – интерлейкин
ИФН – интерферон
ИФР1 – инсулиноподобный фактор 1
ЛГ – лютиенизирующий гормон
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПГГ - первичный гипогонадизм
ТТГ – тиреотропный гормон
Тх – Т-лимфоциты-хелперы
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
ХАИТ – хронический аутоиммунный тиреоидит
ХНН – первичная хроническая надпочечниковая недостаточность
ХКСК – хронический кожно-слизистый кандидоз
21ОН – 21-гидроксилаза
AADC – англ. Aromatic-L-Amino-acidDeCarboxylase – ароматическая L-аминоациддекарбоксилаза
AVINA – англ. AntiViral Interferon Neutrolization Assay
BPIFB1 - англ. Bacterial/Bermeability-Increasing Fold Containing B1)
CaSR – кальций-чувствительный рецептор
GAD – глутаматдекарбоксилаза
HbA1c – гликированный гемоглобин A1c
IA2 – тирозинфосфатазе (
IAA – инсулин
ICA – островковым клеткам поджелудочной железы
KCNRG – англ. potassium (K) ChaNnel ReGulator - регулятор калиевых каналов
NALP5 – англ. NACHT (neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (MHC class 2 transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from Podospora anserina) and TP1 (telomerase-associated protein)-lucine-rich-repeat protein – антиген паразитовидных желез
TDRD6 – англ. Tudor Domain Containing Protein 6
TPH – триптофан-гидроксилаза
TSGA10 – англ. Testis-Specific Gene A10
SCC – англ. cholesterol Side-Chain Cleavage enzyme – фермент, отщепляющий боковую цепь холестерина

Список литературы

1. Myhre A.G. et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS I) in Norway // Clin. Endocrinol. (Oxf.). 2001. Vol. 54, № 2. P. 211–217.
2. Perheentupa J. APS-I/APECED: the clinical disease and therapy // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 2002. Vol. 31, № 2. P. 295–320, vi.
3. Rosatelli M.C. et al. A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients // Hum. Genet. 1998. Vol. 103, № 4. P. 428–434.
4. Zlotogora J., Shapiro M.S. Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews // J. Med. Genet. 1992. Vol. 29, № 11. P. 824–826.
5. Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006. Vol. 91, № 8. P. 2843–2850.
6. Perheentupa J., Miettinen A. Type 1 autoimmune polyglandular disease // Ann. Médecine Interne. 1999. Vol. 150, № 4. P. 313–325.
7. Орлова Е.М. Генетические основы и клинические варианты аутоиммунного полигланулярного синдрома 1 типа исс...канд.мед.наук // ЭНЦ РАМН. -М. - 2005 -151с.
8. Meager A. et al. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 // PLoS Med. 2006. Vol. 3, № 7. P. e289.
9. Kisand K. et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines // J. Exp. Med. 2010. Vol. 207, № 2. P. 299–308.
10. Gylling M. et al. ss-cell autoantibodies, human leukocyte antigen II alleles, and type 1 diabetes in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2000. Vol. 85, № 12. P. 4434–4440.

11. Peterson P. et al. Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED): a model disease to study molecular aspects of endocrine autoimmunity // Clin. Exp. Immunol. 2004. Vol. 135, № 3. P. 348–357.
12. Neufeld M., Maclaren N., Blizzard R. Autoimmune polyglandular syndromes // Pediatr. Ann. 1980. Vol. 9, № 4. P. 154–162.
13. Betterle C., Morlin L. Autoimmune Addison's disease // Endocr. Dev. 2011. Vol. 20. P. 161–172.
14. Neufeld M., Maclaren N.K., Blizzard R.M. Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune (PGA) syndromes // Medicine (Baltimore). 1981. Vol. 60, № 5. P. 355–362.
15. Thorpe E.S. Chronic tetany and chronic mycelial stomatitis in a child aged four and one-half years // Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 1929. Vol. 38, № 2. P. 328.
16. Leonard M.F. Chronic idiopathic hypoparathyroidism with superimposed Addison's disease in a child // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1946. Vol. 6, № 7. P. 493–506.
17. Whitaker J. et al. The syndrome of familial juvenile hypoadrenocorticism, hypoparathyroidism and superficial moniliasis // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1956. Vol. 16, № 10. P. 1374–1387.
18. Björnses P. et al. Genetic homogeneity of autoimmune polyglandular disease type I // Am. J. Hum. Genet. 1996. Vol. 59, № 4. P. 879–886.
19. Nagamine K. et al. Positional cloning of the APECED gene // Nat. Genet. 1997. Vol. 17, № 4. P. 393–398.
20. Heino M. et al. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. Vol. 257, № 3. P. 821–825.
21. Gardner J.M. et al. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells // Science. 2008. Vol. 321, № 5890. P. 843–847.
22. Poliani P.L. et al. Human peripheral lymphoid tissues contain autoimmune regulator-expressing dendritic cells // Am. J. Pathol. 2010. Vol. 176, № 3. P. 1104–1112.

23. Björnses P. et al. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 66, № 2. P. 378–392.
24. Peterson P., Org T., Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8, № 12. P. 948–957.
25. Ferguson B.J. et al. AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 3. P. 1723–1731.
26. Kyewski B., Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. Vol. 4, № 9. P. 688–698.
27. Liston A. et al. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4, № 4. P. 350–354.
28. Anderson M.S. et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein // *Science.* 2002. Vol. 298, № 5597. P. 1395–1401.
29. Malchow S. et al. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells // *Science.* 2013. Vol. 339, № 6124. P. 1219–1224.
30. Yang S. et al. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance // *Science.* 2015. Vol. 348, № 6234. P. 589–594.
31. Gaetani M. et al. AIRE-PHD fingers are structural hubs to maintain the integrity of chromatin-associated interactome // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 22. P. 11756–11768.
32. Abramson J. et al. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance // *Cell.* 2010. Vol. 140, № 1. P. 123–135.
33. Chignola F. et al. The solution structure of the first PHD finger of autoimmune regulator in complex with non-modified histone H3 tail reveals the antagonistic role of H3R2 methylation // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 9. P. 2951–2961.

34. Pitkänen J. et al. Cooperative activation of transcription by autoimmune regulator AIRE and CBP // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 333, № 3. P. 944–953.
35. Giraud M. et al. An RNAi screen for Aire cofactors reveals a role for Hnrnp1 in polymerase release and Aire-activated ectopic transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, № 4. P. 1491–1496.
36. Chuprin A. et al. The deacetylase Sirt1 is an essential regulator of Aire-mediated induction of central immunological tolerance // *Nat. Immunol.* 2015. Vol. 16, № 7. P. 737–745.
37. Laan M., Peterson P. The many faces of aire in central tolerance // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4. P. 326.
38. Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006. Vol. 91, № 8. P. 2843–2850.
39. Ahonen P. et al. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients // *N. Engl. J. Med.* 1990. Vol. 322, № 26. P. 1829–1836.
40. Betterle C., Greggio N.A., Volpato M. Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1 // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998. Vol. 83, № 4. P. 1049–1055.
41. Husebye E.S. et al. Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I // *J. Intern. Med.* 2009. Vol. 265, № 5. P. 514–529.
42. Perheentupa J. APS-I/APECED: the clinical disease and therapy // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2002. Vol. 31, № 2. P. 295–320, vi.
43. Orlova E.M. et al. Autoimmune polyglandular syndrome type 1 in Russian patients: clinical variants and autoimmune regulator mutations // *Horm. Res. Pædiatrics.* 2010. Vol. 73, № 6. P. 449–457.
44. Pestka S., Krause C.D., Walter M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors // *Immunol. Rev.* 2004. Vol. 202. P. 8–32.
45. Vilcek J. Novel interferons // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4, № 1. P. 8–9.

46. Meager A. et al. Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis // Clin. Exp. Immunol. 2003. Vol. 132, № 1. P. 128–136.
47. Kisand K. et al. Interferon autoantibodies associated with AIRE deficiency decrease the expression of IFN-stimulated genes // Blood. 2008. Vol. 112, № 7. P. 2657–2666.
48. Meloni A. et al. Autoantibodies against Type I Interferons as an Additional Diagnostic Criterion for Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type I // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008. Vol. 93, № 11. P. 4389–4397.
49. Oftedal B.E. et al. Radioimmunoassay for autoantibodies against interferon omega; its use in the diagnosis of autoimmune polyendocrine syndrome type I // Clin. Immunol. 2008. Vol. 129, № 1. P. 163–169.
50. Wolff A.S.B. et al. Anti-Cytokine Autoantibodies Preceding Onset of Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type I Features in Early Childhood // J. Clin. Immunol. 2013. Vol. 33, № 8. P. 1341–1348.
51. Breivik L. et al. A novel cell-based assay for measuring neutralizing autoantibodies against type I interferons in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type 1 // Clin. Immunol. 2014. Vol. 153, № 1. P. 220–227.
52. Зефирова Г.С., Гурьева И.В., Мирзоянц Г.Г., Петеркова В.А. Аутоиммунный ювенильный полиэндокринный (кандидо-эндокринный) синдром // Терапевтический архив. - 1983. - Том LV (№12). - с. 87-91.
53. Сергеев Ю.А. и др. Хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек: иммунный статус, гиперчувствительность и современные подходы к терапии // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2002. - №3. - с.40-44.
54. Rautemaa R. et al. Oral and oesophageal squamous cell carcinoma--a complication or component of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED, APS-I) // Oral Oncol. 2007. Vol. 43, № 6. P. 607–613.

55. Korn T. et al. IL-17 and Th17 Cells // *Annu. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 27. P. 485–517.
56. Burbelo P.D. et al. Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia // *Blood*. 2010. Vol. 116, № 23. P. 4848–4858.
57. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes // *Nature*. 1996. Vol. 383, № 6603. P. 787–793.
58. Harrington L.E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6, № 11. P. 1123–1132.
59. Puel A. et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I // *J. Exp. Med.* 2010. Vol. 207, № 2. P. 291–297.
60. Oftedal B.E.V. et al. Measuring autoantibodies against IL-17F and IL-22 in autoimmune polyendocrine syndrome type I by radioligand binding assay using fusion proteins // *Scand. J. Immunol.* 2011. Vol. 74, № 3. P. 327–333.
61. Lindh E. et al. Autoimmunity and cystatin SA1 deficiency behind chronic mucocutaneous candidiasis in autoimmune polyendocrine syndrome type 1 // *J. Autoimmun.* 2013. Vol. 42. P. 1–6.
62. Wolff A.S.B. et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 in Norway: phenotypic variation, autoantibodies, and novel mutations in the autoimmune regulator gene // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007. Vol. 92, № 2. P. 595–603.
63. Orlova E.M. et al. Autoimmune Polyglandular Syndrome Type 1 in Russian Patients: Clinical Variants and Autoimmune Regulator Mutations // *Horm. Res. Paediatr.* 2010. Vol. 73, № 6. P. 449–457.
64. Li Y. et al. Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism // *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 97, № 4. P. 910–914.

65. Kemp E.H. et al. Prevalence and Clinical Associations of Calcium-Sensing Receptor and NALP5 Autoantibodies in Finnish APECED Patients // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013. P. jc.2013-3723.
66. Kifor O. et al. A syndrome of hypocalciuric hypercalcemia caused by autoantibodies directed at the calcium-sensing receptor // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. Vol. 88, № 1. P. 60–72.
67. Alimohammadi M. et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and NALP5, a parathyroid autoantigen // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 358, № 10. P. 1018–1028.
68. Meloni A. et al. Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1: An Extensive Longitudinal Study in Sardinian Patients // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2012. Vol. 97, № 4. P. 1114–1124.
69. Фадеев В.В. Первичная хроническая надпочечниковая недостаточность (этиология, клиника, заместительная терапия). дисс...канд.мед.наук // ЭНЦ РАМН. -М. - 1998 -115с.
70. Winqvist O., Karlsson F.A., Kämpe O. 21-Hydroxylase, a major autoantigen in idiopathic Addison's disease // Lancet Lond. Engl. 1992. Vol. 339, № 8809. P. 1559–1562.
71. Chen S. et al. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996. Vol. 81, № 5. P. 1871–1876.
72. Betterle C. et al. Adrenal-cortex autoantibodies and steroid-producing cells autoantibodies in patients with Addison's disease: comparison of immunofluorescence and immunoprecipitation assays // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999. Vol. 84, № 2. P. 618–622.
73. Betterle C. et al. Addison's disease: a survey on 633 patients in Padova // Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc. 2013. Vol. 169, № 6. P. 773–784.
74. Falorni A. et al. High diagnostic accuracy for idiopathic Addison's disease with a sensitive radiobinding assay for autoantibodies against recombinant human 21-hydroxylase // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995. Vol. 80, № 9. P. 2752–2755.

75. Söderbergh A. et al. Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004. Vol. 89, № 2. P. 557–562.
76. Krohn K. et al. Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17 alpha-hydroxylase // Lancet Lond. Engl. 1992. Vol. 339, № 8796. P. 770–773.
77. Reato G. et al. Premature ovarian failure in patients with autoimmune Addison's disease: clinical, genetic, and immunological evaluation // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2011. Vol. 96, № 8. P. E1255-1261.
78. Kisand K., Peterson P. Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy: known and novel aspects of the syndrome: APECED: known and novel aspects of the syndrome // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2011. Vol. 1246, № 1. P. 77–91.
79. Gatselis N.K. Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics // World J. Gastroenterol. 2015. Vol. 21, № 1. P. 60.
80. Clemente M.G. et al. Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type 1 // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1997. Vol. 82, № 5. P. 1353–1361.
81. Clemente M.G. et al. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type 1 // Gastroenterology. 1998. Vol. 114, № 2. P. 324–328.
82. Obermayer-Straub P. et al. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy // Gastroenterology. 2001. Vol. 121, № 3. P. 668–677.
83. Rorsman F. et al. Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995. Vol. 92, № 19. P. 8626–8629.
84. Velloso L.A. et al. Autoantibodies against a novel 51 kDa islet antigen and glutamate decarboxylase isoforms in autoimmune polyendocrine syndrome type I // Diabetologia. 1994. Vol. 37, № 1. P. 61–69.

85. Husebye E.S. et al. Autoantibodies against aromatic L-amino acid decarboxylase in autoimmune polyendocrine syndrome type I // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1997. Vol. 82, № 1. P. 147–150.
86. Dal Pra C. et al. Autoantibodies to human tryptophan hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase // Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc. 2004. Vol. 150, № 3. P. 313–321.
87. Uibo R. et al. Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450scc, P450c17, and P450c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1994. Vol. 78, № 2. P. 323–328.
88. Perniola R. et al. Organ-specific and non-organ-specific autoantibodies in children and young adults with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) // Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc. 2000. Vol. 143, № 4. P. 497–503.
89. Proust-Lemoine E., Saugier-Verber P., Wémeau J.-L. Polyglandular autoimmune syndrome type I // Presse Médicale Paris Fr. 1983. 2012. Vol. 41, № 12 P 2. P. e651-662.
90. Solimena M., De Camilli P. Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in Stiff-Man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus // Trends Neurosci. 1991. Vol. 14, № 10. P. 452–457.
91. Boadle-Biber M.C. Regulation of serotonin synthesis // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1993. Vol. 60, № 1. P. 1–15.
92. Hufton S.E., Jennings I.G., Cotton R.G. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases // Biochem. J. 1995. Vol. 311 (Pt 2). P. 353–366.
93. Ekwall O. et al. Identification of tryptophan hydroxylase as an intestinal autoantigen // Lancet Lond. Engl. 1998. Vol. 352, № 9124. P. 279–283.
94. Scarpa R. et al. Tryptophan hydroxylase autoantibodies as markers of a distinct autoimmune gastrointestinal component of autoimmune polyendocrine syndrome type 1 // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013. Vol. 98, № 2. P. 704–712.

95. Sköldberg F. et al. Histidine decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is an autoantigen of gastric enterochromaffin-like cells // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. Vol. 88, № 4. P. 1445–1452.
96. Ono S., Hagen P. Pyridoxal phosphate: a coenzyme for histidine decarboxylase // Nature. 1959. Vol. 184(Suppl 15). P. 1143–1144.
97. Rubin W., Schwartz B. Electron microscopic radioautographic identification of the ECL cell as the histamine-synthesizing endocrine cell in the rat stomach // Gastroenterology. 1979. Vol. 77, № 3. P. 458–467.
98. Grzanna R. Histidine decarboxylase: isolation and molecular characteristics // Neurochem. Res. 1984. Vol. 9, № 7. P. 993–1009.
99. Kluger N. et al. Kidney involvement in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy in a Finnish cohort // Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. 2014. Vol. 29, № 9. P. 1750–1757.
100. Korniszewski L. et al. Fatal primary pulmonary hypertension in a 30-yr-old female with APECED syndrome // Eur. Respir. J. 2003. Vol. 22, № 4. P. 709–711.
101. Shum A.K. et al. BPIFB1 is a lung-specific autoantigen associated with interstitial lung disease // Sci. Transl. Med. 2013. Vol. 5, № 206. P. 206ra139.
102. Alimohammadi M. et al. Pulmonary autoimmunity as a feature of autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and identification of KCNRG as a bronchial autoantigen // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, № 11. P. 4396–4401.
103. Hedstrand H. et al. Identification of tyrosine hydroxylase as an autoantigen in autoimmune polyendocrine syndrome type I // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. Vol. 267, № 1. P. 456–461.
104. Rahoma S.F.E. et al. Epitopes, avidity and IgG subclasses of tyrosine hydroxylase autoantibodies in vitiligo and alopecia areata patients // Br. J. Dermatol. 2012. Vol. 167, № 1. P. 17–28.
105. Hedstrand H. et al. The transcription factors SOX9 and SOX10 are vitiligo autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 38. P. 35390–35395.

106. Betterle C., Greggio N.A., Volpato M. Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1 // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998. Vol. 83, № 4. P. 1049–1055.
107. Millar S., Carson D. Clinical phenotypes of autoimmune polyendocrinopathycandidiasis-ectodermal dystrophy seen in the Northern Ireland paediatric population over the last 30 years // *Ulster Med. J.* 2012. Vol. 81, № 3. P. 118–122.
108. Cocco C. et al. Novel neuronal and endocrine autoantibody targets in Autoimmune Polyendocrine Syndrome type 1 // *Autoimmunity*. 2012. Vol. 45, № 6. P. 485–494.
109. Bensing S. et al. Pituitary autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type 1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 3. P. 949–954.
110. Smith C.J.A. et al. TSGA10 - A target for autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and systemic lupus erythematosus // *Scand. J. Immunol.* 2011. Vol. 73, № 2. P. 147–153.
111. Ayesh M.H. et al. Association between vitamin B12 level and anti-parietal cells and anti-intrinsic factor antibodies among adult Jordanian patients with *Helicobacter pylori* infection // *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* 2013. Vol. 17, № 6. P. 629–632.
112. McNeil K. et al. Vitamin B12 deficiency with intrinsic factor antibodies in an infant with poor growth and developmental delay // *Paediatr. Child Health*. 2014. Vol. 19, № 2. P. 84–86.
113. Sedláková L., Dubská L., Průcha M. [Pernicious anaemia--diagnostic benefit of the detection of autoantibodies against intrinsic factor and gastric parietal cells antigen H⁺/K⁺ ATPase] // *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. Cas. Společnosti Epidemiol. Mikrobiol. České Lékařské Společnosti JE Purkyne*. 2010. Vol. 59, № 3. P. 126–132.
114. Berger J.R. et al. Neurologic consequences of autoimmune polyglandular syndrome type 1 // *Neurology*. 2008. Vol. 70, № 23. P. 2248–2251.
115. Sato K. et al. A novel missense mutation of AIRE gene in a patient with autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dystrophy

- (APECED), accompanied with progressive muscular atrophy: case report and review of the literature in Japan // *Endocr. J.* 2002. Vol. 49, № 6. P. 625–633.
- 116.Mandolesi L. et al. Cerebellar contribution to spatial event processing: involvement in procedural and working memory components // *Eur. J. Neurosci.* 2001. Vol. 14, № 12. P. 2011–2022.
 - 117.Nanri K. et al. Selective loss of Purkinje cells in a patient with anti-gliadin-antibody-positive autoimmune cerebellar ataxia // *Diagn. Pathol.* 2011. Vol. 6. P. 14.
 - 118.Craig M.E. et al. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents: Definition, epidemiology, and classification of diabetes // *Pediatr. Diabetes.* 2014. Vol. 15, № S20. P. 4–17.
 - 119.American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus // *Diabetes Care.* 2010. Vol. 33, № Supplement_1. P. S62–S69.
 - 120.Ahonen P. Autoimmune polyendocrinopathy--candidosis--ectodermal dystrophy (APECED): autosomal recessive inheritance // *Clin. Genet.* 1985. Vol. 27, № 6. P. 535–542.
 - 121.Oftedal B.E. et al. Dominant mutations in the autoimmune regulator *aire* are associated with common organ-specific autoimmune diseases // *Immunity.* 2015. Vol. 42, № 6. P. 1185–1196.
 - 122.Brozzetti A. et al. Autoantibody response against *nalp5/mater* in primary ovarian insufficiency and in autoimmune addison's disease // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. Vol. 100, № 5. P. 1941–1948.
 - 123.Burbelo P.D. et al. Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia // *Blood.* 2010. Vol. 116, № 23. P. 4848–4858.
 - 124.Puel A. et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I // *J. Exp. Med.* 2010. Vol. 207, № 2. P. 291–297.

- 125.Oftedal B.E.V. et al. Measuring autoantibodies against IL-17F and IL-22 in autoimmune polyendocrine syndrome type I by radioligand binding assay using fusion proteins // Scand. J. Immunol. 2011. Vol. 74, № 3. P. 327–333.
- 126.Cihakova D. et al. Novel AIRE mutations and P450 cytochrome autoantibodies in Central and Eastern European patients with APECED: AIRE Mutations in CEE APECED Patients // Hum. Mutat. 2001. Vol. 18, № 3. P. 225–232.

Приложения

Приложение А

Таблица А1. Клиническая, генетическая и иммунологическая характеристика пациентов из группы 1.

| Номер | Мутация 1 | Мутация 2 | Возраст | Пол | Компоненты (возраст манифестации компонента) | АТ к ИФН- α 1 | АТ к ИФН- α 2 | АТ к ИЛ-22 | АТ к ИЛ-17F | АТ к NALP5 | АТ к 21ОН | АТ к SCC |
|-------|-----------|-----------|---------|-----|--|----------------------|----------------------|------------|-------------|------------|-----------|----------|
| 1 | A58[A,V] | R257* | 22† | ж | ХКСК(1,5), ГПТ(4), ХНН(8),алопеция(5), ХАИТ(6) | + | + | + | + | + | - | - |
| 2 | A58[A,V] | R257* | 27 | ж | ГПТ(5) | + | + | + | + | + | - | - |
| 3 | R257* | R257* | 25 | ж | ХКСК(1), ГПТ(5), ХНН(13), алопеция(5), гипоплазия зубной эмали | + | + | + | - | + | - | + |
| 4 | R257* | R257* | 24 | м | ГПТ (8), ХНН (16), ХКСК (13), мозжечковая атаксия (19), гипоплазия зубной эмали (16) | + | + | + | + | - | - | + |
| 5 | R257* | R257* | 20 | ж | ГПТ(5), ХНН(6), ХКСК(7), ПГТ(14),гипоплазия зубной эмали (18) | + | + | + | - | + | + | + |
| 6 | R257* | R257* | 28 | ж | ГПТ(6), ХНН(7), ХКСК(5), СД(13), АГ(6), пернициозная анемия(20), ХАИТ(11), птоз, мальабсорбция(6) | + | + | + | + | + | - | - |
| 7 | R257* | R257* | 20 | ж | ХКСК(1.5), ГПТ(9), алопеция(17), хронический блефарит | + | + | + | - | - | - | + |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|------------------|--------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | R257* | R257* | 25 | м | пигментный ретинит (0.2), слепота, алопеция(5), ГПТ(5),мальабсорбция(5), ХНН (11), пернициозная анемия (17), ХКСК (22), гипокалиемия (13) | + | + | + | - | + | + | + |
| 9 | R257* | R257* | 12 | м | ХКСК (4), ГПТ(5), ХНН(7), алопеция (9) | + | + | + | + | + | + | + |
| 10 | R257* | R257* | 14 | м | ГПТ(4), ХКСК (11),витилиго(11) | + | + | + | + | - | - | - |
| 11 | R257* | R257* | 6 | ж | ГПТ (2) | + | + | + | + | + | - | - |
| 12 | R257* | R257* | 12 | м | ГПТ(5), мальабсорбция (7), СД(8), витилиго (9), ХАИТ(9), хроническое повышение трансаминаз(9), ХНН(10) | + | + | + | - | + | + | + |
| 13 | R257* | 967- 979del13bp | 25 | ж | ГПТ(8), ХНН(14) , СТГ-дефицит | + | + | + | + | + | + | - |
| 14 | T16[T,M] | 821 del G, | 20 | м | ГПТ(11), ХНН(13), СД(16), витилиго (17) | + | + | + | - | - | + | + |
| 15 | R257* | R257* | 10 | ж | ГПТ(3), ХНН(5), ХКСК(5), мальабсорбция (5), алопеция(8) | + | + | + | - | + | + | - |
| 16 | R257* | R257* | 5 | м | ГПТ(3) | + | - | + | + | - | - | - |
| 17 | R257* | E298K | 21 | ж | мальабсорбция (4), ГПТ(7), ХКСК (18), ХНН(7), АГ(7), ПГГ (14) | + | + | + | - | + | + | + |
| 18 | p.Leu323serfs*51 | P326L | 15 | м | глухота (3), пернициозная анемия(5), витилиго(9), ХНН(12), гипоплазия зубной эмали(12), птоз, мальабсорбция (5) | + | + | + | - | - | + | + |
| 19 | R257* | R257* | 25 | ж | ХКСК(8), ХНН(12), ГПТ(13), ХАИТ(14), ПГГ (15), | + | + | + | - | + | + | + |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 | R257* | R257* | 18 | м | ГПТ(4), ХКСК(4), ХНН(4), гипоплазия зубной эмали, алоpecia | + | + | + | + | - | + | - |
| 21 | R257* | W78R | 26 | ж | ХКСК(4), ГПТ(9), ХНН(9), алоpecia (15), ПГГ(19) | + | + | + | - | + | + | + |
| 22 | R257* | W78R | 26 | ж | ХКСК(4), ГПТ(10), ХНН(10), мальабсорбция(12), ПГГ (24), алоpecia(18), гипоплазия зубной эмали(24), hypokalemia (12), пигментный ретинит (26) | + | + | + | - | + | - | + |
| 23 | A58V | A58V | 42 | м | ХКСК(5), ГПТ(10), ХНН(13), алоpecia(18), гипоплазия зубной эмали | + | + | + | - | - | + | - |
| 24 | R139* | R139* | 24 | м | ГПТ(10), алоpecia(13), ХКСК (22) | + | + | - | - | - | - | - |
| 25 | R257* | | 16 | ж | ХКСК(5), ХНН(10), гипоплазия зубной эмали | + | + | + | + | + | + | + |
| 26 | R257* | R257* | 27 | ж | ХКСК(0.3), ГПТ(5), ХНН(5), мальабсорбция(14), долихоколон, рецидивирующий абсцесс щеки (23), аспления (18), гипоплазия зубной эмали, синдром сухого глаза(16), птоз (14), витилиго(15), ПГГ(16) | + | + | + | + | + | + | + |
| 27 | R257* | R257* | 26 | м | ХКСК(4), ХНН(13), алоpecia(12), пернициозная анемия(25) | + | + | + | + | - | + | + |
| 28 | R257* | p.Leu323serfs*51 | 17 | ж | ХКСК(9), ГПТ(10), ХНН(12), алоpecia (15), гипоплазия зубной эмали | + | + | + | - | + | + | + |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------|--------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 29 | R257* | R257* | 37 | м | ХКСК(2), алоpecia (12) | + | + | + | - | - | - | - |
| 30 | R257* | R257* | 33 | м | ХКСК(1), алоpecia (13) | + | + | + | + | - | - | - |
| 31 | R257* | c1053_1060del | 12 | ж | ХНН(10), ХКСК(10), алоpecia(10), ГПТ, ХАИТ, синдром сухого глаза, тиреотоксикоз | + | + | + | - | + | + | + |
| 32 | R257* | | 8 | м | ХНН(5), ГПТ(5) | + | + | + | + | - | + | + |
| 33 | R257* | R257* | 14† | м | ХКСК (3.5), алоpecia(6), мальабсорбция(7), пернициозная анемия(10), метафизарная дисплазия(11), ГПТ(11), СД(11), почечная недостаточность(14) | + | + | + | + | + | + | + |
| 34 | R257* | R257* | 19 | ж | ХНН(4), ГПТ(8), | + | + | + | - | + | + | + |
| 35 | R257* | R257* | 18 | ж | ХКСК(1), мальабсорбция(3), ГПТ(4), алоpecia(5), ХНН(6), ПГГ (18) | + | + | + | + | + | + | + |
| 36 | R257* | R257* | 15 | ж | ГПТ(4), ХНН(10), ХАИТ(9), гипоплазия зубной эмали | + | + | + | - | + | + | + |
| 37 | R257* | R257* | 18 | м | АГ(2), ХКСК(2), ГПТ(4), пернициозная анемия(12), алоpecia (14), | + | + | + | - | - | - | + |
| 38 | A399P and 13bp del | A399P and 13bp del | 21 | м | ХКСК(3), ГПТ(5), алоpecia (8), ХНН (8), пернициозная анемия (12) | + | + | + | - | - | + | + |
| 39 | R257* | p.Leu323serfs*51 | 12 | м | ГПТ(11), ХНН(11) | + | + | + | + | + | + | - |
| 40 | del ->520 STOPP* | del ->520 STOPP* | 12 | м | ХНН(4), алоpecia (5), ХКСК(6) | + | + | + | - | + | + | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|-------|-----|---|--|---|---|---|---|---|---|---|
| 41 | R257* | R257* | 27† | ж | ХКСК(2), ХНН(8), ГПТ(8), ПГТ, алопеция (12), метафизарная дисплазия(10), мальабсорбция(19), красно-клеточная аплазия(23) | + | + | + | - | + | + | + |
| 42 | W78R | W78R | 15 | м | ХКСК (5), алопеция (5), ХНН(10), хронический блефарит (11) | + | + | + | + | - | + | + |
| 43 | R257* | R257* | 11 | м | ХКСК(1), алопеция (7), ХНН(9), гипоплазия зубной эмали | + | + | + | + | - | + | + |
| 44 | R257* | R257* | 17 | м | ХКСК(0.3), АГ(4), ХНН(6), птоз (7) | + | + | + | + | - | + | - |
| 45 | R257* | R257* | 8† | м | ХКСК(2), ХНН(4), алопеция (4), кольцевая эритема(5), АГ(6), рецидивирующая пневмония | + | + | + | - | - | + | + |
| 46 | R257* | R257* | 21 | ж | ХКСК (5), ГПТ(6), ХНН(10), птоз, мальабсорбция (6) | + | + | + | + | + | + | + |
| 47 | R257* | R257* | 23 | ж | ХКСК(2), ГПТ(8), мальабсорбция(0) | + | + | + | + | + | - | - |
| 48 | R257* | R257* | 11 | ж | ГПТ(7), мальабсорбция(7) | + | + | + | + | + | - | - |
| 49 | R257* | C434* | 13† | ж | ХКСК(0), витилиго (4), АГ(5), ГПТ(5), пернициозная анемия (9) | + | + | + | + | + | + | + |
| 50 | R257* | R257* | 24 | м | ХКСК(4), алопеция(11), ХНН(22) | + | + | + | - | - | + | - |
| 51 | R257* | R257* | 13 | ж | ГПТ(8) | + | - | + | - | - | + | - |
| 52 | A58V | A58V | 21 | м | ХКСК(5), ГПТ(14), ХНН(11), мальабсорбция (14), гипоплазия зубной эмали | + | + | + | - | + | + | + |
| 53 | R257* | R257* | 27 | ж | ХКСК (1), СД (9), ГПТ (10), АГ (13), пернициозная анемия (10), алопеция (14) | + | + | + | - | + | + | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------------|-------|----|---|--|---|---|---|---|---|---|---|
| 54 | K221[K,*]; S278 [S,R] | R257* | 29 | ж | ХКСК (3), ГПТ (10), | + | + | + | - | - | - | - |
| 55 | R257* | R257* | 18 | м | ХНН (10), ГПТ (12), ХКСК (13) | + | + | + | + | - | + | + |
| 56 | R257* | R257* | 14 | м | ХКСК (1), ГПТ (5), ХНН (4), мальабсорбция, гипоплазия зубной эмали, эпилепсия(8) | + | + | + | + | - | + | - |
| 57 | R257* | R257* | 6 | м | ХКСК(0.9), ХНН(4), ГПТ(4), АГ(1.5) | + | + | + | + | - | + | + |
| 58 | R257* | T16M | 31 | ж | ХКСК(0.2), ГПТ(9), ХНН(9), алоpecia (20), ПГГ (19), мальабсорбция (26), ХАИТ (9) | + | + | + | - | + | + | + |
| 59 | R257* | R257* | 10 | м | ХНН(4), ГПТ(4), ХКСК(7), | + | + | + | - | + | + | + |
| 60 | R257* | R257* | 6 | ж | ХКСК(2), ГПТ(3.5) | + | + | + | + | + | - | - |
| 61 | R257* | T16M | 26 | м | ХКСК (6), пернициозная анемия(8), ХНН(10), алоpecia(20), хроническое повышение трансаминаз(10), синдром сухого глаза (20) | + | + | + | - | - | + | + |
| 62 | R257* | R257* | 19 | ж | ХКСК (1), ГПТ(4), ХНН(5), ПГГ | + | + | + | - | + | - | - |
| 63 | R257* | R257* | 15 | ж | ХКСК(3), ГПТ(10), алоpecia(10), гипоплазия зубной эмали, | + | + | + | + | + | - | - |
| 64 | R257* | R257* | 5 | м | ХКСК(1,5), лихорадка с сыпью(2), мальабсорбция(3) | + | + | + | - | - | + | + |
| 65 | R257* | | 28 | ж | ГПТ(6), ХНН(17) | + | + | + | - | + | + | + |
| 66 | | | 21 | ж | ГПТ(15), ХНН(15), ХКСК(15), мальабсорбция, алоpecia (15) | + | + | + | + | + | + | + |
| 67 | R257* | R257* | 12 | м | ХКСК(3), алоpecia(4), ХНН(6), мальабсорбция(7), гипоплазия | + | + | + | - | - | + | + |

| | | | | | зубной эмали, птоз | | | | | | | |
|----|-------|----------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 68 | R257* | R257* | 31 | ж | ГПТ(8), ХКСК(14), ХНН(14), гипоплазия зубной эмали, мальабсорбция, ХАИТ(14), дистрофия роговицы(29) | + | - | + | - | + | + | - |
| 69 | R257* | R257* | 8 | ж | ХКСК(2), ХНН(5), АГ(4), мальабсорбция(3), гипоплазия зубной эмали, ГПТ(3) | + | - | + | - | + | + | - |
| 70 | R257* | R257* | 3 | ж | ХКСК(1), ХНН(3), гипоплазия зубной эмали, кольцевая эритема(0.9) | + | - | + | + | - | + | - |
| 71 | R257* | L13[P,L] | 27 | м | ХКСК(4), ХНН(13), алопеция(16) | + | + | + | - | - | - | - |
| 72 | R257* | R257* | 23 | ж | ХКСК(1), ХНН(10) | + | + | + | - | + | - | + |
| 73 | R257* | A58[A,V] | 12 | ж | СД(12), ХКСК(3), ГПТ(4), ХНН(5) | + | + | + | - | + | + | + |
| 74 | R257* | R257* | 28 | ж | ХКСК(1), ГПТ(7), ХНН(7), мальабсорбция, аспления (19), синдром сухого глаза (10), алопеция, ПГГ(16) | + | + | + | + | + | + | + |
| 75 | R257* | R257* | 23 | м | ХКСК(1), ГПТ(3), алопеция (4), ХНН(5), птоз(6), | + | + | + | - | - | + | + |
| 76 | R257* | R257* | 5 | м | ХКСК(1), ХНН (4), ГПТ (4) | + | + | + | - | - | + | + |

† - пациенты, умершие к моменту публикации диссертации

Таблица А2. Клиническая, генетическая и иммунологическая характеристика пациентов из группы 2.

| Номер пациента | Мутация 1 | Мутация 2 | Возраст | Пол | Компоненты (возраст манифестации компонента) | АТ к ИФН- α 1 | АТ к ИФН- α 2 |
|----------------|-----------|-----------|---------|-----|---|----------------------|----------------------|
| II-1 | C302(C,Y) | - | 5 | ж | ГПТ(3) | + | - |
| II-2 | R257* | - | 11 | ж | ГПТ(2) | + | + |
| II-3 | R257* | R471[R,C] | 21 | м | ГПТ (12), гипоплазия зубной эмали | - | - |
| II-4 | R257* | - | 20 | м | ХКСК(0.8), алопеция(13) | + | + |
| II-5 | R471[R,C] | A493[T,A] | 25 | ж | ХНН(4) | - | - |