

Созаева Лейла Салиховна

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

14.01.02 – Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Эндокринологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской
Федерации**

(Директор – академик И.И.Дедов)

Научный руководитель: **Петеркова Валентина Александровна**
член-корреспондент РАН, профессор, доктор
медицинских наук

Официальные оппоненты: **Саприна Татьяна Владимировна**
доктор медицинских наук, профессор кафедры
эндокринологии и диабетологии ГБОУ ВО
"Сибирский государственный медицинский
университет" Минздрава России

Шабашова Надежда Венедиктовна
доктор медицинских наук, профессор, профессор
кафедры клинической микологии, аллергологии и
иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный
государственный медицинский университет имени
И.И.Мечникова» Минздрава России

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Российский национальный
исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации**

**Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 года в ____ часов на
заседании диссертационного совета Д.208.126.01 в ФГБУ «Эндокринологический
научный центр» Минздрава России по адресу: 117036, г. Москва, ул.Дмитрия
Ульянова, д.11**

**С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ
«Эндокринологический научный центр» Минздрава России**

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук**

Суркова Елена Викторовна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1.Актуальность темы исследования

Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа (АПС 1 типа) - 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.

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 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 (ПГГ), апластическая анемия и др.). Три основных компонента не всегда присутствуют на момент манифестации заболевания, что может затруднять диагностику. Компоненты могут развиваться в любом возрасте, значительная часть пациентов может оставаться моносимптомной на протяжении многих лет, 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. Однако полное секвенирование гена *AIRE* является дорогостоящим методом. В последние годы много внимания уделяется изучению аутоантител к различным цитокинам. Особое значение приобрели антитела к интерферону- ω , которые, по данным зарубежных авторов, выявляются практически у всех пациентов с АПС 1 типа вне зависимости от клинической картины и длительности течения заболевания. 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, интерлейкин-22). В российской когорте пациентов эти виды антител не изучались.

Известно, что для данного заболевания характерна циркуляция в крови орган-специфических аутоантител в высоких титрах. 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 спектра орган-специфических 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.

1.2.Степень разработанности темы исследования

Многие аспекты АПС 1 типа 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.

1.3.Цель исследования:

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

1.4.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 (ИЛ-22) и интерлейкину-17F (ИЛ-17F), определить их диагностическое и прогностическое значение при АПС 1 типа, оценить корреляции с компонентами заболевания;
3. Исследовать антитела к антигену паращитовидных желез (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 (21-ОН) и пептиду, отщепляющему боковую цепь холестерина, (SCC), определить их диагностическую и прогностическую значимость в развитии первичной хронической надпочечниковой недостаточности, а также оценить корреляции с другими компонентами АПС 1 типа.

1.5.Научная новизна

Впервые в России проведено исследование антител к интерферонам- ω и - $\alpha 2$, интерлейкинам-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.

1.6.Теоретическая и практическая значимость

В работе показана высокая специфичность и чувствительность антител к интерферонам- 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 у пациентов с АПС 1 типа.

1.7.Основные положения, выносимые на защиту

1. Антитела к интерферону- ω являются специфичными (100%) и чувствительными (100%) маркерами АПС 1 типа, что позволяет использовать их для скрининговой диагностики пациентов с аутоиммунными заболеваниями для исключения стертых или атипичных форм АПС 1 типа. Специфичность антитела к интерферону- $\alpha 2$ составила 100%, а чувствительность 93,4%, что позволяет использовать эти антитела 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 (98,7%) при АПС 1 типа позволяет рассматривать их в качестве дополнительного маркера заболевания.

3. Выявлена статистически достоверная связь между антителами к NALP5 и гипопаратиреозом. Специфичность этих антител достигает 81,3%, также антитела к NALP5 имеют высокую прогностическую ценность положительного результата (93,2%), 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. Обнаружено, что частота гипопаратиреоза, а также частота обнаружения антител к NALP5 достоверно выше у пациентов женского пола. Таким образом, женский пол является предрасполагающим фактором для развития гипопаратиреоза у пациентов с АПС 1 типа.

4. Выявлена статистически достоверная связь между антителами к 21-гидроксилазе, SCC и первичной хронической надпочечниковой недостаточностью. Антитела к 21-гидроксилазе и SCC обладают высокой специфичностью (73,7% и 78,9%), высокой чувствительностью (86% и 73,7%) и высокой прогностической значимостью положительного результата (90,7% и 91,3%), что позволяет использовать их в качестве прогностического и диагностического маркера первичной хронической надпочечниковой недостаточности у пациентов с АПС 1 типа. Кроме того, антитела к SCC являются маркерами первичного гипогонадизма у пациенток с АПС 1 типа.

1.8. Внедрение в практику

Научные положения и практические рекомендации, изложенные в диссертации, внедрены в повседневную работу детского отделения опухолей эндокринной системы ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России.

1.9. Апробация полученных результатов и публикации

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

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, рекомендованных ВАК, а также 1 статья в иностранном журнале.

1.10. 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, глав собственных наблюдений, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и главы с приложениями. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 35 рисунками. Список использованной литературы включает 126 источников.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1. Материалы, 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 – хронического кожно-слизистого кандидоза, гипопаратиреоза, первичной хронической надпочечниковой недостаточности 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* (некоторым пациентам это исследование было проведено ранее). На основании этого исследования, согласно критериям диагностики АПС 1 типа, 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 гене *AIRE* мутации не выявлены, имеют только 1 основной компонент заболевания).

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.

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, 21-гидроксилазе, SCC), а также антител к интерлейкину-22 и интерлейкину-17F.

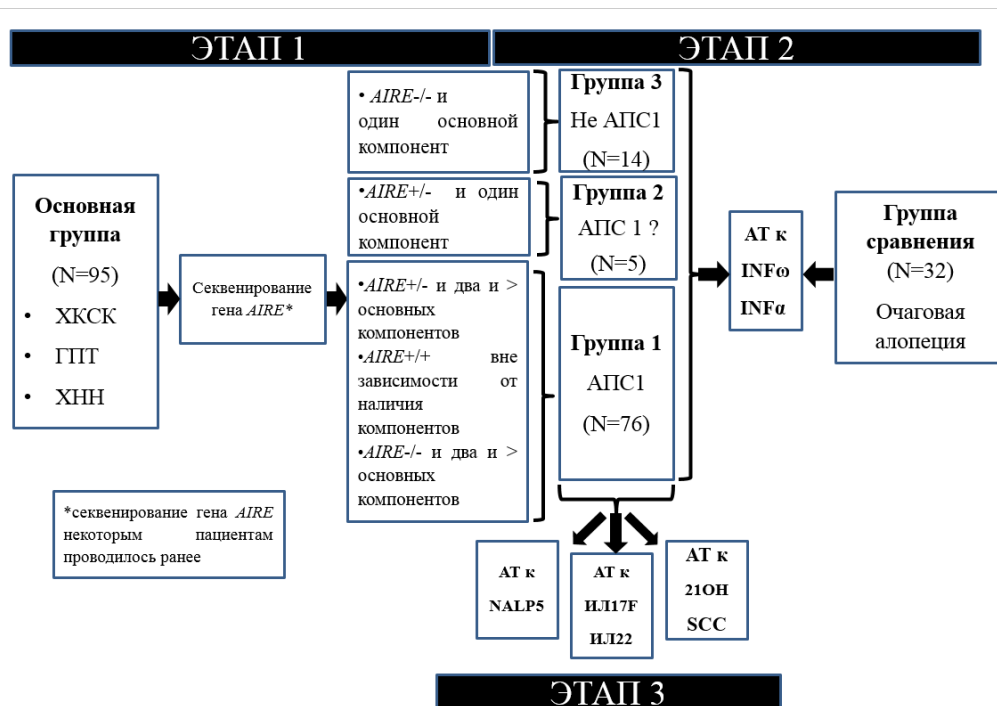


Рисунок 1. Дизайн исследования

2.2. Методы исследования

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 проводилась в доклиническую стадию при помощи пробы с синактеном (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 инфекции 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 значений 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 $\geq 7,0$ ммоль/л; 3. Глюкоза плазмы крови $\geq 11,1$ ммоль/л через 2 часа при проведении орального глюкозотолерантного теста; 4. HbA1c $\geq 6,5\%$. 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.

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 синбсов пациентов с подтвержденным АПС 1 типа. Также критерием диагностики являлось обнаружение двух патогенных мутаций в гене *AIRE* у пациентов даже в случае отсутствия каких-либо компонентов заболевания.

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), 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.).

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 секвенированы с использованием праймеров. 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).

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 HEK-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*. Уровень радиоактивности образцов измерялся в *срп* (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).

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

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

Исследование АТ к ИФН $\alpha 2$ и $-\omega$ также проводилось методом с использованием культуры клеток HEK-blue IFN- α/β . В основе метода лежит способность клеток синтезировать щелочную фосфатазу в присутствии интерферонов. В присутствии сыворотки пациента с высоким титром антител к интерферонам способность клетки синтезировать щелочную фосфатазу подавлялось, что в свою фиксировалось при помощи абсорбционного анализа с применением красителя.

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).

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

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. Оценка величины площади под кривой проводилось при помощи экспертной шкалы (таблица 1)

Таблица 1. 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

Для всех критериев и тестов критический уровень принимался равным 5%, т.е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

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 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 пациентов
- 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).

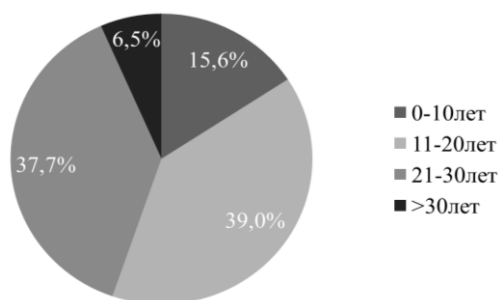


Рисунок 2. Распределение пациентов из основной группы по возрасту

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 ($p>0.05$).

Хронический кожно-слизистый кандидоз (ХКСК) - 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).

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

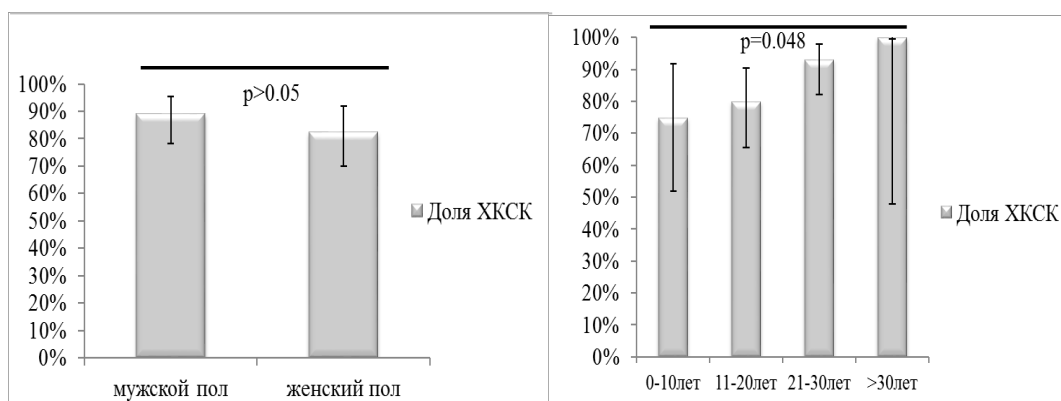


Рисунок 3. Частота ХКСК у пациентов женского и мужского пола в группе 1

Рисунок 4. Частота ХКСК в различных возрастных группах

Гипопаратиреоз (ГПТ) – 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).

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).

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

Хроническая первичная надпочечниковая недостаточность (ХНН) – 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).

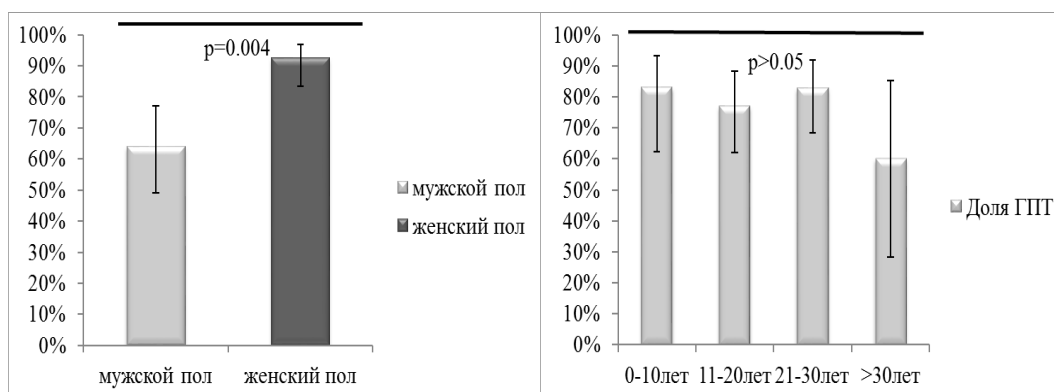


Рисунок 5. Частота ГПТ у пациентов женского и мужского пола в группе 1

Рисунок 6. Доля ГПТ в различных возрастных группах

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

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).

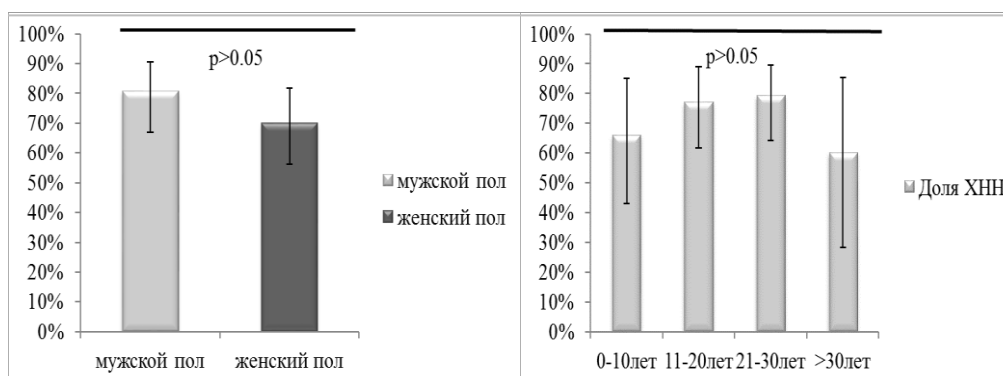


Рисунок 7. Частота ХНН у пациентов женского и мужского пола в группе 1

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 этих шести пациентов у пятерых пациентов первым компонентом заболевания был хронический кожно-слизистый кандидоз, а у 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, гипопаратиреоз и аутоиммунная энтеропатия в 5 лет, хроническая надпочечниковая недостаточность в 11 лет, пернициозная анемия в 17 лет и хронический кандидоз 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 гипопаратиреоз, надпочечниковая недостаточность и аутоиммунный гепатит, а в дальнейшем развились хронический кандидоз (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, в 5 лет были установлены пернициозная анемия и синдром мальабсорбции, а в 9 лет появились очаги витилиго и седые волосы. В 12 лет манифестировала надпочечниковая недостаточность, 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%(33/158) 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.

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, патогенность которой не доказана.

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 мутация R471C, патогенность которой не доказана.

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.

Хроническая надпочечниковая недостаточность наблюдалась у 11 пациентов, гипопаратиреоз - 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.

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 хронический аутоиммунный тиреоидит, три пациента наблюдались с витилиго, одна пациентка имела дефицит гормона роста, у одной пациентки был тиреотоксикоз, а у одной - синдром МакКьюна-Олбрайта-Брайцева. В этой группе два пациента имели сочетание алопеции одновременно с ХАИТ и витилиго.

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% (рисунок X)

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%.

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.

Антитела к интерферону- $\alpha 2$

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%). 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 гипопаратиреоза и хронического кандидоза, 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). В возрасте 8 лет пациенту был установлен гипопаратиреоз. 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 гипопаратиреоза в возрасте 8 лет, затем присоединились хронический кандидоз, надпочечниковая недостаточность и аутоиммунный тиреоидит в 14 лет, дистрофия роговицы – в 29 лет, а также у пациентки были мальабсорбция и гипоплазия зубной эмали. При молекулярно-генетическом исследовании гена *AIRE* 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 хронического кандидоза, который был выявлен в возрасте 2 лет, затем присоединились аутоиммунная энтеропатия – в 3 года, аутоиммунный гепатит – в 4 года, надпочечниковая недостаточность – 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 хронический кандидоз в возрасте 1 года, хроническая надпочечниковая недостаточность – 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 II-1, II-2 и II-4, а к

интерферону- $\alpha 2$ - у двух пациентов П-1 и П-4. У пациентов П-3 и П-5 значения индексов антител 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, и у всех пациентов были выявлены низкие значения этих антител.

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

Для метода определения антител к интерферону- $\alpha 2$ 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 (рисунок 9).

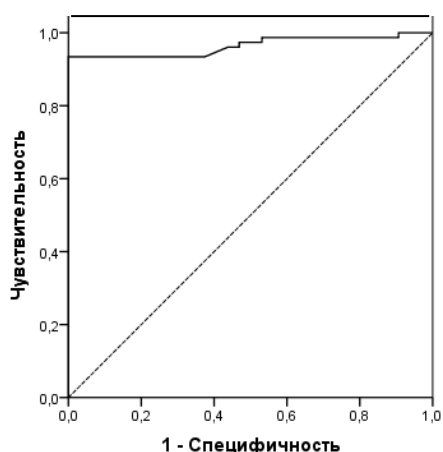


Рисунок 9. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к интерферону- $\alpha 2$ методом НЕК-blue IFN- α/β

3.3. Антитела к интерлейкину-22 и интерлейкину-17F

В группе 1 хронический кандидоз был выявлен у 65 человек (85,5%). Грибковое поражение ногтей имели 40,8% (31/76), а грибковое поражение слизистой полости рта - 56,6% (43/76). В этой группе также 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 хронического кандидоза, 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 хронического кандидоза был достоверно ниже возраста пациентов с ХКСК.

Частота хронического кандидоза 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 интерлейкину-22

Высокий уровень антител к интерлейкину-22 имели 98,7%(75/76) пациентов. Среди 65 пациентов, имеющих хронический кожно-слизистый кандидоз, индекс антител выше порогового значения был выявлен у 64 пациентов, однако у всех 11 пациентов без хронического кожно-слизистого кандидоза также выявлены высокие значения антител к интерлейкину-22 (коэффициент Спирмена -0.048, $p=0.43$) (рисунок 10).

Обнаружена отрицательная корреляция между величиной индекса антител и возрастом пациентов на момент забора образца крови (коэффициент корреляции -0,329, $p=0.01$). А среди пациентов с хроническим кожно-слизистым кандидозом, найдена достоверная отрицательная корреляция между величиной индекса антител к интерлейкину-22 и возрастом пациентов (коэффициент корреляции Спирмена -0.263, $p=0.04$) (рисунок 11).

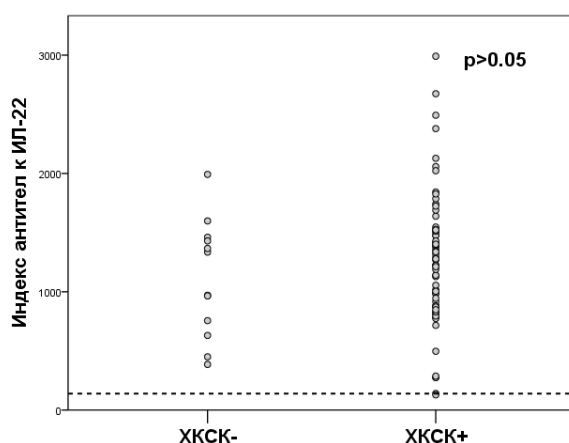


Рисунок 10. Антитела к ИЛ-22 у пациентов с АПС 1 типа с ХКСК и без ХКСК

Также выявлена достоверная связь между титром антител к интерлейкину-22 и длительностью течения хронического кандидоза на момент забора образца крови (коэффициент корреляции Спирмена -0.321, $p=0.021$) (рисунок 12).

В группе 1 среди пациентов с хроническим кандидозом было два пациента, которые не имели хронический кандидоз на момент забора образца крови: (пациенты № 31 и № 40). Оба пациента имели высокие уровни антител к интерлейкину-22. Впоследствии, у обоих пациентов манифестировал хронический кандидоз: через 8 лет у одного пациента и через 3 года у второго пациента.

В группе 1 было 11 пациентов с высокими уровнями антител к интерлейкину-22, но не было хронического кандидоза. Возраст этих пациентов значимо не отличался от возраста пациентов с высокими уровнями антител и хроническим кандидозом ($p=0.1$).

Антитела к интерлейкину-17F

Антитела к интерлейкину-17F выявлялись в этой группе реже, чем антитела к интерлейкину-22. Индексы антител к интерлейкину-17F, превышавшие пороговое значение, выявлены у 33 из 76 пациентов (43,4%). Среди всех пациентов с хроническим кандидозом высокий уровень антител был только у 43,1% (28/65) пациентов, а у остальных 56,9% (37/65) значения индекса антител к интерлейкину-17F были низкими (рисунок 13). При проведении статистического анализа корреляция между антителами к интерлейкину-17F и хроническим кандидозом обнаружена не была (коэффициент корреляции Спирмена 0,063, $p>0.05$).

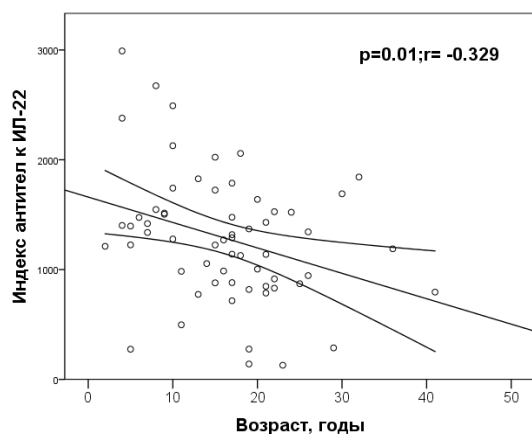


Рисунок 11. Зависимость величины индекса антител к ИЛ-22 от возраста у пациентов с ХКСК из группы 1.

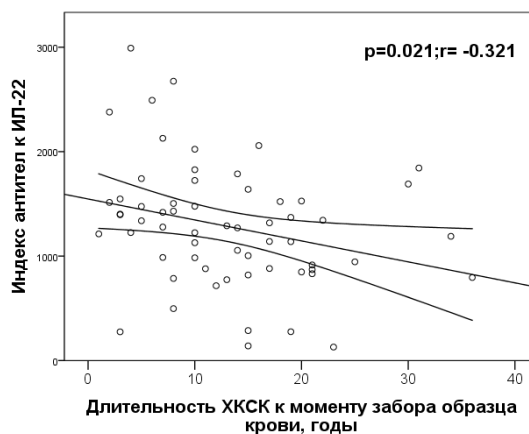


Рисунок 12. Зависимость величины индекса антител к ИЛ-22 от длительности ХКСК в группе 1.

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

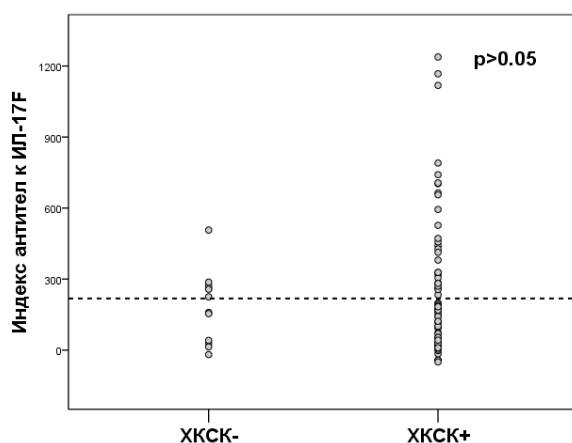


Рисунок 13. Антитела к ИЛ-17F у пациентов с АПС 1 типа с ХКСК и без ХКСК

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

3.4. Антитела к NALP5

Гипопаратиреоз встречался у 78,9%(60/76) пациентов в группе 1. Частота гипопаратиреоза среди женщин была гораздо выше, чем у мужчин: 92,5% (37/40) и 63,9% (23/36) соответственно ($p=0.004$). Медиана манифестации гипопаратиреоза составила 6(4;9) лет. Средний возраст пациентов, имеющих и не имеющих гипопаратиреоз, 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 гипопаратиреозом и у 18,8% (3/16) пациентов без гипопаратиреоза ($p<0.001$).

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 гипопаратиреоза оказалась статистически достоверной (коэффициент корреляции Спирмена 0.380, $p=0.001$) (рисунок 14).

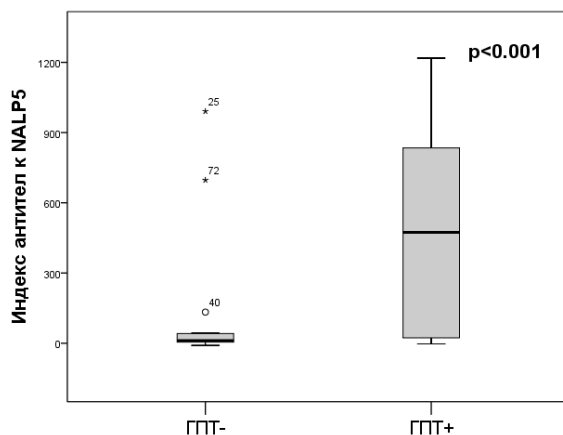


Рисунок 14. Индекс АТ к NALP5 у пациентов с ГПТ и без ГПТ в группе 1

Достоверность связи между прогнозируемой величиной (развитие гипопаратиреоза 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 (рисунок 15).

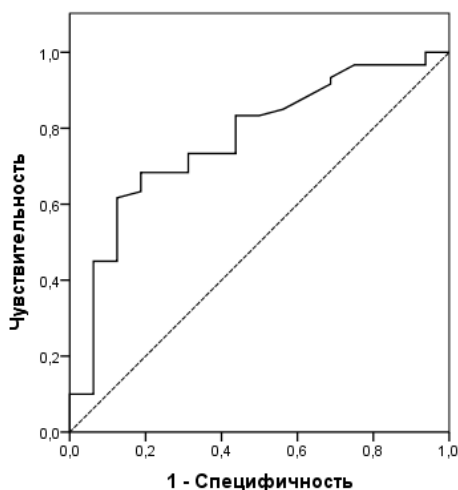


Рисунок 15. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к NALP5.

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 гипопаратиреоз) – коэффициент корреляции Спирмена составил 0,720, $p<0,001$ (рисунок 16).

Среди пациентов имеющих гипопаратиреоз проведен анализ зависимости уровня индекса антител к NALP5 от длительности течения компонента к моменту забора образца крови – статистически достоверная корреляция не обнаружена (коэффициент корреляции Спирмена 0.152, $p=0.086$) (рисунок 17).

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 18).

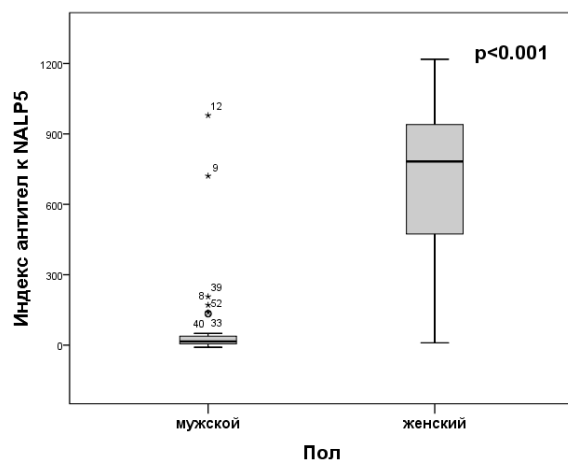


Рисунок 16. Зависимость индекса антител к NALP5 от пола пациентов в группе 1

В группе было два пациента с высоким уровнем антител к NALP5, у которых забор крови был проведен до манифестации гипопаратиреоза: пациент №33 и пациент №35. У обоих пациентов в дальнейшем развился гипопаратиреоз, и оба имели высокий уровень антител до манифестации компонента: у пациентки №33 развился гипопаратиреоз через 1 год после забора крови, уровень антител к NALP5 был крайне высоким. У пациента №35 гипопаратиреоз развился 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 гипопаратиреоза.

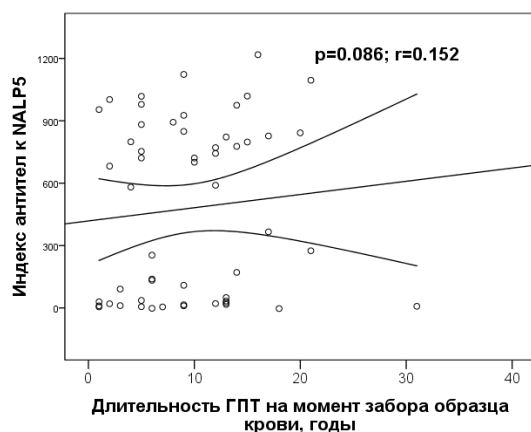


Рисунок 17. Зависимость индекса антител к NALP5 от длительности ГПТ у пациентов в группе 1.

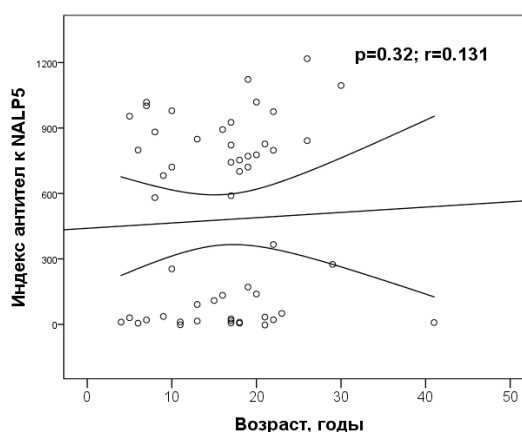


Рисунок 18. Зависимость индекса антител к NALP5 от возраста пациентов с ГПТ в группе 1.

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

пациентов с высоким уровнем антител к NALP5 с гипопаратиреозом ($18,9 \pm 7,5$ лет) были статистически не достоверны.

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).

Антитела к NALP5 и другие компоненты заболевания.

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. Был проведен дальнейший анализ этой связи, в ходе которого было выявлено, что 24 из 27 пациентов с признаками мальабсорбции был гипопаратиреоз, а у 3 пациентов без гипопаратиреоза 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 гипопаратиреоза. Кроме того, эпизоды мальабсорбции (диарея, обстипация) могут быть связаны с изменениями уровня кальция в крови на фоне гипопаратиреоза.

Пробуя анализировать связь между гипопаратиреозом, мальабсорбцией и антителами к NALP5, в группе 1 выделена подгруппа пациентов, у которых нет гипопаратиреоза или есть гипопаратиреоз, 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 гипопаратиреоз. 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 гипопаратиреоза, что очередной раз ставит под сомнение возможность связи между мальабсорбцией и антителами к NALP5.

Аспления – один из типичных компонентов АПС 1 типа, когда наблюдается аплазия селезенки не ясного генеза. Белок NALP5 экспрессируется в том числе в селезенке, 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). 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 19).

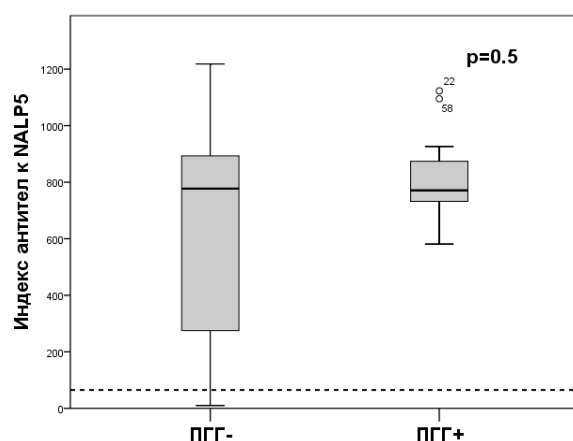


Рисунок 19. Индекс АТ к NALP5 у пациентов с АПС 1 типа с ПГГ и без ПГГ
 ----- Пороговое значение индекса антител к NALP5

3.5. Антитела к SCC и 21-гидроксилазе

В группе 1 было 75% (57/76) пациентов с хронической надпочечниковой недостаточностью. Медиана возраста манифестации надпочечниковой недостаточности составила 9 лет (5;12). Средний возраст пациентов с надпочечниковой недостаточностью составил $18,95 \pm 7,6$ лет, а без надпочечниковой недостаточности - $18,42 \pm 10$ 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 21-гидроксилазе

Высокие показатели индекса антител к 21-гидроксилазе были выявлены у 70% (56/80) обследованных пациентов. Среди 57 пациентов с хронической надпочечниковой недостаточностью у 49 (86%) был высокий уровень антител к 21-гидроксилазе, при этом только 8 (14%) человек с надпочечниковой недостаточностью имели нормальные значения индекса этих антител. Среди 19 пациентов без надпочечниковой недостаточности высокий показатель индекса антител был у 5 (26,3%) пациентов, а у остальных 14 (73,3%) пациентов – низкий. Частота высоких показателей титра антител у пациентов с надпочечниковой недостаточностью и у пациентов без надпочечниковой недостаточности 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 21-гидроксилазе и первичной хронической надпочечниковой недостаточностью (коэффициент корреляции Спирмена 0.432, $p<0.001$) (рисунок 20)

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. (рисунок 21).

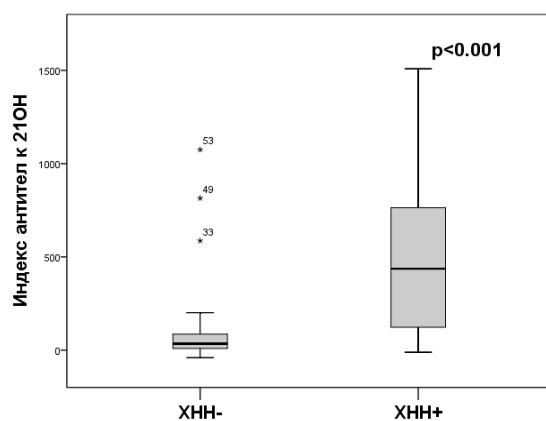


Рисунок 20. Индекс АТ к 21-гидроксилазе у пациентов с ХНН и без в группе 1

Проведен анализ взаимосвязи возраста пациентов и индекса антител к 21-гидроксилазе – выявлена достоверная отрицательная связь (коэффициент корреляции Спирмена составил -0.320, $p=0.005$) (рисунок 22).

Также проведен анализ связи величины индекса антител к 21-гидроксилазе и длительности надпочечниковой недостаточности на момент забора образца крови – выявлена достоверная отрицательная корреляция (коэффициент корреляции Спирмена составил -0.565, $p < 0.001$) (рисунок 23).

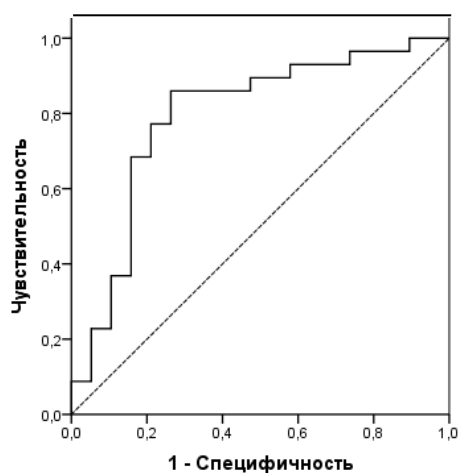


Рисунок 21. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к 21ОН

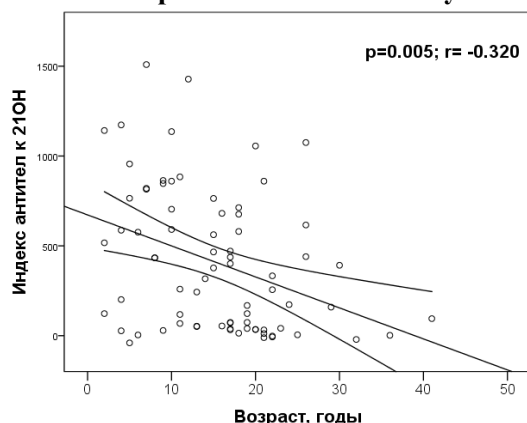


Рисунок 22. Зависимость величины индекса антител к 21ОН от возраста в группе 1.

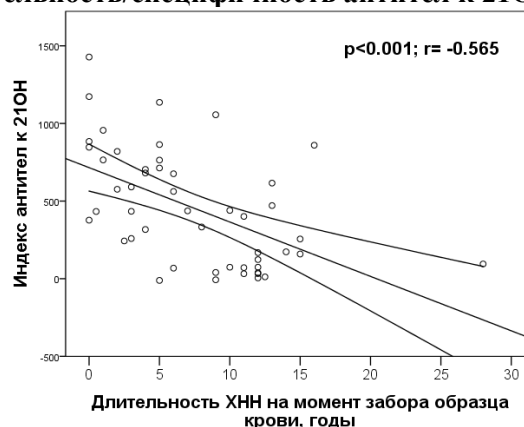


Рисунок 23. Зависимость величины индекса антител к 21ОН от длительности ХНН на момент забора образца сыворотки крови в группе 1.

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

Дополнительно исследование антител к 21-гидроксилазе было проведено у 10 пациентов с хронической надпочечниковой недостаточности 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.

Антитела к SCC

Повышенные титры антител к SCC выявлены у 60,5% (46/76) пациентов. Среди 57 пациентов с хронической надпочечниковой недостаточностью высокий титр антител к SCC выявлен у 42 пациентов (73,7%), а среди 19 пациентов без надпочечниковой недостаточности - у 5 пациентов (21,1%). Частоты высоких показателей титра антител у пациентов с надпочечниковой недостаточностью и без нее 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%.

При анализе взаимосвязи антител к SCC и надпочечниковой недостаточности выявлена статистически достоверная положительная корреляция (коэффициент корреляции Спирмена 0.393, $p < 0.001$) (рисунок 24).

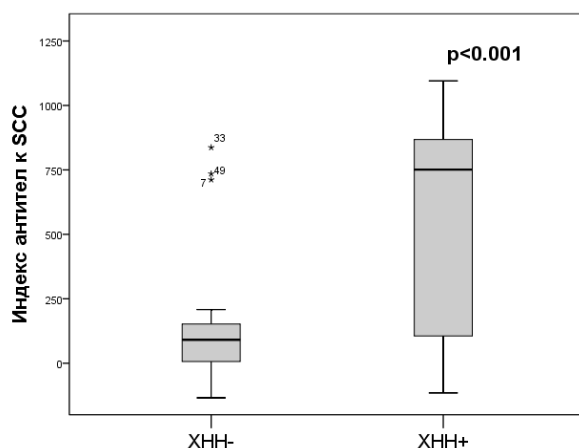


Рисунок 24. Индекс АТ к SCC у пациентов с ХНН и без в группе 1

Достоверность связи между развитием у пациента хронической надпочечниковой недостаточностью 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 (рисунок 25).

При проведении анализа взаимосвязи возраста пациентов и величины индекса антител достоверной корреляции выявлено не было (коэффициент корреляции Спирмена - 0.023, $p = 0.85$) (рисунок 26).

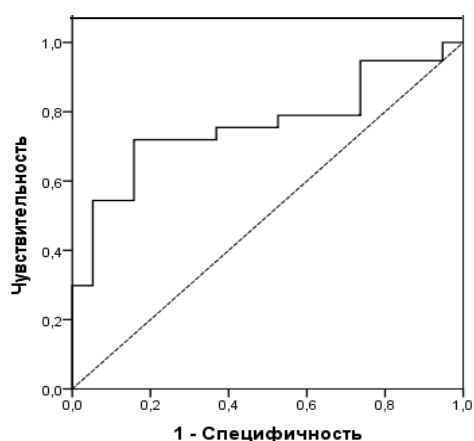


Рисунок 25. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к SCC

Также не выявлено корреляции между длительностью надпочечниковой недостаточности на момент забора крови и индексом антител к SCC у пациентов, имеющих надпочечниковую недостаточность (коэффициент корреляции Спирмена -0.123, $p=0.36$) (рисунок 27).

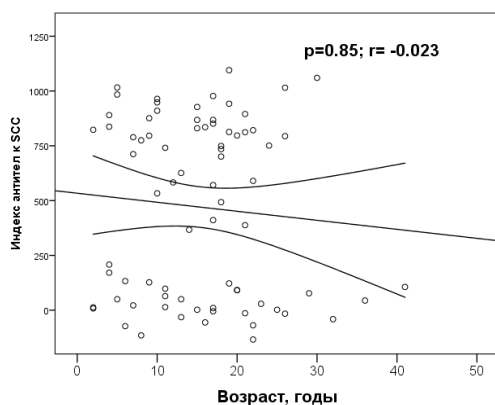


Рисунок 26. Зависимость титра антител к SCC от возраста пациентов в группе 1.

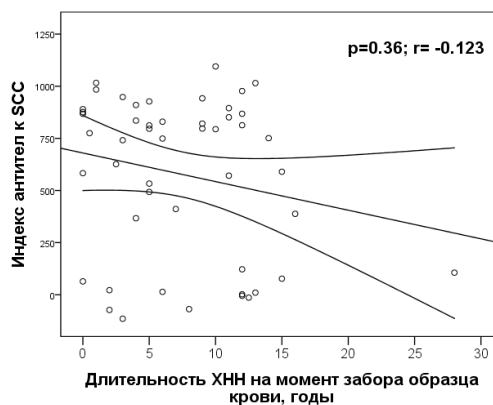


Рисунок 27. Зависимость величины индекса антител к SCC от длительности ХНН на момент забора образца крови в группе 1.

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). Высокие значения антител к SCC обнаружены у 91% пациенток с гипогонадизмом и у 53% пациенток без гипогонадизма. 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 Спирмена 0.397, $p=0.036$) (рисунок 28).

Достоверность связи между развитием первичного гипогонадизма 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 соответствует хорошей прогностической способности метода определения антител к SCC (рисунок 29).

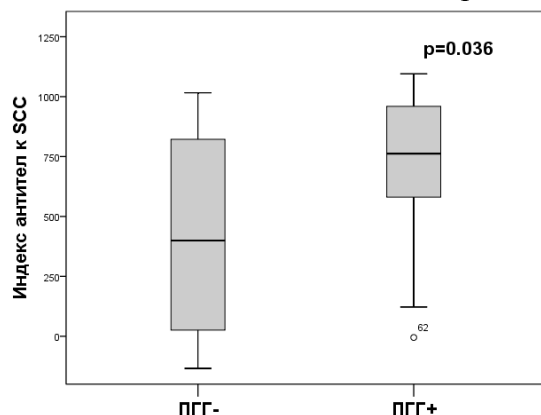


Рисунок 28. Антитела к SCC и первичный гипогонадизм у пациенток старше 16 лет.

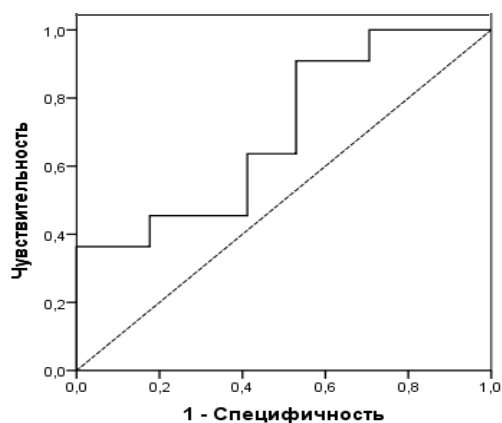


Рисунок 29. ROC-кривая соотношения чувствительность/специфичность антител к SCC

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 30).

В группе пациенток старше 16 лет с АПС 1 типа было 3 пациентки, 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.

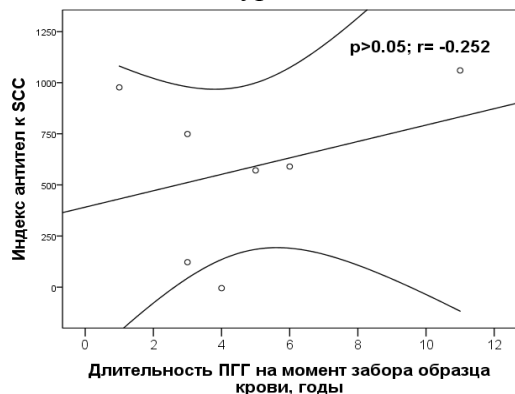


Рисунок 30. Зависимость индекса антител к SCC от длительности ПГГ на момент забора образца крови у пациенток старше 16 лет в группе 1

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе получены данные, указывающие на высокую специфичность и чувствительность метода исследования антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ у пациентов с аутоиммунным полигландулярным синдромом 1 типа, что позволяет предложить эти антитела в качестве диагностических маркеров заболевания и использовать как один из основных критериев диагностики АПС 1 типа. Исследование антител к интерферонам- ω и $-\alpha 2$ имеют особенно важное значение в диагностике аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа у пациентов со стертыми и неклассическими проявлениями заболевания.

Антитела к интерлейкину-22 и интерлейкину-17F по результатам нашего исследования не являются прогностическими маркерами хронического кожно-слизистого кандидоза, но высокая частота антител к интерлейкину-22 у пациентов с аутоиммунным полигландулярным синдромом 1 типа (98,7%) делает возможным использование этих антител в качестве дополнительного маркера заболевания.

Исследование орган-специфических аутоантител к 21-гидроксилазе, SCC, NALP5 показало, что они являются диагностическими и прогностическими маркерами ряда компонентов аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа (первичная хроническая надпочечниковая недостаточность, гипопаратиреоз, первичный гипогонадизм). Возможно использование данных маркеров для прогнозирования течения заболевания и определения риска развития отдельных компонентов у пациентов с аутоиммунным полигландулярным синдромом 1 типа.

5. ВЫВОДЫ

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

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Всем пациентам, имеющим только один из трех основных компонентов аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа, необходимо проведение исследования антител к интерферону- ω и интерферону- $\alpha 2$ с целью уточнения диагноза. Разработан алгоритм диагностики стертых форм аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа (рисунок 31)
2. Антитела к интерферону- ω и интерферону- $\alpha 2$ могут быть рекомендованы в качестве скринингового метода диагностики аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями, особенно при комбинации нескольких аутоиммунных заболеваний
3. Для прогнозирования развития гипопаратиреоза, первичной хронической надпочечниковой недостаточности и первичного гипогонадизма у пациентов с аутоиммунным полигландулярным синдромом 1 типа необходимо исследование спектра орган-специфических антител: к 21-гидроксилазе, SCC (пептиду, отщепляющему боковую цепь холестерина) и NALP5 (антигену парацитовидных желез).

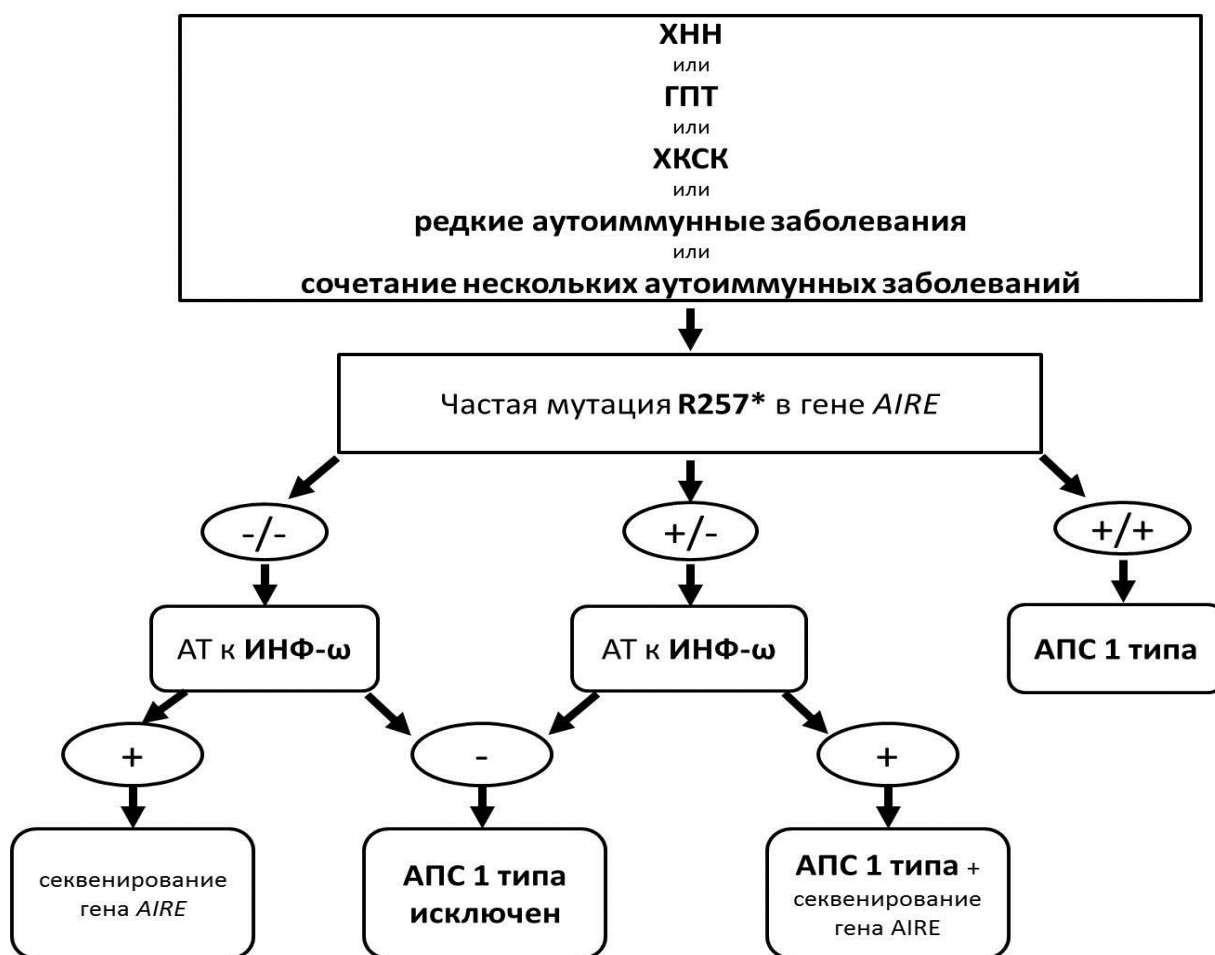


Рисунок 31. Алгоритм диагностики стертых форм АПС 1 типа

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Орлова Е.М., **Созаева Л.С.**, Карманов М.Е., Брейвик Л., Хусби Э.С., Карева М.А. Новые иммунологические методы диагностики Аутоиммунного полигладулярному синдрому 1 типа (первый опыт в России). // Проблемы эндокринологии, 2015 № 5, стр 9-13
2. **Созаева Л.С.**, Орлова Е.М., Офтедаль Б., Карева М.А., Петеркова В.А., Дедов И.И. Хусби Э.С. Антитела к NALP5 и их значение в развитии гипопаратиреоза у пациентов с аутоиммунным полигладулярным синдромом 1-го типа. // Проблемы эндокринологии, 2016 №2, стр 25-30.
3. Михина М.С., Молашенко Н.В., Трошина Е.А., Орлова Е.М., **Созаева Л.С.** Особенности течения аутоиммунного полигладулярного синдрома 1-го типа. // Клиническая медицина, 2015 №8, стр 55-59
4. B.E. Oftedl, A.Hellesen, M.M. Erichsen, E.Bratland, A.Vardi, J.Perheentupa, E. H.Kemp, T.Fiskerstrand, M.K. Viken, A.P. Weetman, S. J. Fleishman, S.Banka, W. G. Newman, W.A.C. Sewell, **L.S.Sozaeva**, T.Zayats, K.Haugarvoll, E.M. Orlova, J.Haavik, S.Johansson, P.M. Knappskog, K.Løvås,A.S.B. Wolff,J.Abramson, E.S. Husebye. Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases. // Immunity. Volume 42, Issue 6, 16 June 2015, Pages 1185–1196
5. **Созаева Л.С.** Новые иммунологические методы диагностики аутоиммунного полиэндокринного синдрома 1 типа (обзор литературы). // Проблемы эндокринологии, 2015 № 3, стр 43-46
6. Орлова Е.М., **Созаева Л.С.**, Маказан Н.В.. Гипопаратиреоз. // Доктор.ру. №11 (99), 2014
7. E.Orlova, **L.Sozaeva**, L.Zilberman, G.Svetlova, M.Kareva, O.Ivanova, V.Peterkova, High prevalence of diabetes mellitus among patients with APS type 1 in Russia. //53rd Annual ESPE Meeting, Dublin, Ireland, Hormone Research in Paediatrics 2014; 82 (suppl 1): 270
8. **L.Sozaeva**, E.Orlova, S.Mikhailova, N.Pechatnicova; A.Maschan. Cerebellar ataxia in a patient with autoimmune polyglandular syndrome type 1. // Hormone Research in Paediatrics, vol. 80, Suppl. 1, 2013: 85
9. . Orlova E.M., **Sozaeva L.S.**, Kareva M.A., Zilberman L.I. Autoimmune polyglandular syndrome type 1 in Russia: clinical experience in 112 patients. // Hormone Research in Paediatrics 2015; 84 (suppl 1): 155
10. **Sozaeva L.S.**, Orlova E.M., Kareva M.A. Recombinant Parathyroid Hormone (1-34) replacement treatment of Hypoparathyroidism in the alfacalcidol-resistant patient with severe Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome type 1. // Hormone Research in Paediatrics 2015; 84 (suppl 1): 132
11. **Созаева Л.С.** Аутоиммунный полигладулярный синдром 1 типа: значение антител к цитокинам и органам-мишеням для диагностики и прогноза заболевания. // Сборник тезисов VII Всероссийского конгресса эндокринологов 2016, стр 346.
12. **Созаева Л.С.**, Орлова Е.М., Карева М.А., Хусби Э.С. Антитела к интерферонам и интерлейкинам у пациентов с аутоиммунным полигладулярным синдромом 1 типа, их диагностическая ценность, значение в развитии хронического кожно-слизистого кандидоза. // Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии(XIX Кашкинские чтения). Проблемы медицинской микологии. Том 18 № 2, 2016г, стр.115

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 – лютеинизирующий гормон

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТТГ – тиреотропный гормон

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХАИТ – хронический аутоиммунный тиреоидит

ХНН – первичная хроническая надпочечниковая недостаточность

ХКСК – хронический кожно-слизистый кандидоз

21ОН – 21-гидроксилаза

НbA1c – гликированный гемоглобин A1c

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)-leucine-rich-repeat protein- антиген паразитовидных желез

SCC – англ. cholesterol Side-Chain Cleavage enzyme - фермент, отщепляющий боковую цепь холестерина