

Новые иммунологические методы диагностики аутоиммунного полиэндокринного синдрома 1-го типа (первый опыт в России)

Л.С. СОЗАЕВА^{1*}, М.Е. КАРМАНОВ², Л. БРЕЙВИК³, Э. ХУСБИ³, к.м.н. М.А. КАРЕВА¹

¹ФГБУ «Эндокринологический научный центр», Москва, Россия; ²ФГБУ «Российская детская клиническая больница», Москва, Россия; ³Университет Бергена, Норвегия

Оценивали роль аутоантител (АТ) к интерферонам (ИФН)- ω и - α_2 в диагностике аутоиммунного полигланулярного синдрома 1-го типа (АПС 1), а также специфичность и чувствительность метода НЕК-Blue cell» для определения этих АТ. В исследование были включены 34 пациента с АПС 1 и 21 пациент с очаговой алопецией. Среди пациентов с АПС 1 высокие титры антител к ИФН- ω обнаружены в 100%, а АТ к ИФН- α_2 — в 97% случаев. У всех пациентов с очаговой алопецией соответствующие АТ отсутствовали. Таким образом, определение АТ к ИФН- ω и - α_2 с использованием клеток НЕК-Blue является высокоспецифичным и высокочувствительным методом диагностики АПС 1.

Ключевые слова: аутоиммунный полигланулярный синдром 1-го типа, алопеция, тимома, интерфероны- ω и - α_2 , метод НЕК-blue cells.

The new immunological methods for diagnostics of type 1 autoimmune polyendocrine syndrome (the first experience in Russia)

L.S. SOZAEVA¹, M.E. KARMANOV², L. BREIVIK³, E. HUSBI³, M.A. KAREVA¹

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia; ²Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia; ³University of Bergen, Norway

This study was designed to ascertain the role of anti-interferon (IFN)- ω and - α_2 antibodies (AB) in diagnostics of type 1 autoimmune polyglandular syndrome (APS-1) and evaluate specificity and sensitivity of the HEK-Blue cells method used to detect these antibodies. The study included 34 patients presenting with APS-1 and 21 patients with focal alopecia. All 100% of the patients with APS-1 exhibited high titers of anti IFN- ω antibodies; 97% of them had anti IFN- α_2 antibodies. These antibodies were not found in the patients with focal alopecia. It is concluded that the measurement of anti IFN- α and α_2 antibodies with the use of HEK-Blue cells is a highly specific and sensitive method for diagnostics of APS-1.

Keywords: type 1 autoimmune polyglandular syndrome, alopecia, thymoma, interferon - ω and α_2 , HEK-Blue cells method.

doi: 10.14341/probl20156134-8

Аутоиммунный полигланулярный синдром 1-го типа (АПС 1) — это редкое моногенное заболевание, связанное с мутациями в гене «аутоиммунного регулятора» (*AIRE* — *autoimmune regulator*) [1, 2]. Мутации в гене *AIRE* приводят к нарушению образования белка аутоиммунного регулятора, функция которого до конца не известна, и патогенез заболевания не ясен, однако предполагается, что данный белок участвует в регуляции процессов негативной селекции Т-лимфоцитов в центральных органах иммунной системы. Отсутствие белка «аутоиммунного регулятора» приводит к снижению экспрессии аутоантигенов в тимусе и нарушению негативной селекции Т-лимфоцитов, что способствует развитию различных аутоиммунных компонентов этого заболевания: хронического кожно-слизистый кандидоза (ХКСК), гипопаратиреоза (ГПТ), первичной хронической надпочечниковой недостаточности (ХНН), алопеции, витилиго, гипоплазии зубной эмали, аутоиммунной энтеропатии, инсулинзависимого сахарного диабета, аутоиммунного тиреоидита, пер-

вичного гипогонадизма, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного кератита и блефарита и т.д. [1, 3, 4].

Диагностика заболевания основана на обнаружении у пациента как минимум двух из трех «основных» компонентов заболевания («классическая диада или триада»: ХКСК, ГПТ и ХНН), а также при наличии одного из трех компонентов в случае, если у родственника первого порядка доказано это заболевание. В течение многих лет заболевание может протекать монокомпонентно, что может затруднять клиническую диагностику. Исследование гена *AIRE* позволяет подтвердить диагноз АПС 1 в нетипичных случаях или еще до того, как манифестировали основные клинические компоненты.

В России исследование гена *AIRE* проводится с 2002 г. Наличие частой мутации Arg257Stop, характерной для российской популяции, позволяет во многих случаях путем исследования одного экзона обнаружить мутацию и поставить диагноз. Однако в 30% аллелей встречаются другие мутации, и в этих случаях необходимо полное секвенирование гена,

что является более долгим по срокам выполнения и дорогостоящим методом диагностики. В 5—8% аллелей мутации не удастся обнаружить даже при исследовании всего гена [5].

В настоящий момент разработаны и широко применяются новые иммунологические методы диагностики АПС 1 — определение антител к интерферонам (ИФН) 1 типа (ИФН- α и - ω) [6].

Интерфероны 1-го типа, как и все остальные цитокины, участвуют в иммунных процессах, происходящих в организме, отличаются от других интерферонов рецептором, с которым они взаимодействуют [7, 8]. Аутоантитела (АТ) к ИФН- α и - ω) впервые были выявлены у пациентов с тимоматами и миастенией А. Меагер и соавт. [9]. Исследование АТ к данным цитокинам у пациентов с АПС 1 впервые было проведено также под руководством А. Меагер. Исследователи выявили высокие титры этих антител у всех пациентов с АПС 1, тогда как ни у одного из пациентов с АПС 2 или изолированными аутоиммунными заболеваниями эти антитела обнаружены не были. У пациентов с тимоматами антитела к ИФН- α и - ω обнаруживались в более низких титрах и в меньшем проценте случаев (60%) [6, 10].

В дальнейшем проводились многочисленные работы по изучению аутоантител к ИФН- α и - ω , и было доказано, что они являются высокоспецифичными и высокочувствительными маркерами АПС 1 [9, 11—14].

Очаговая (гнездная) алопеция — аутоиммунное заболевание, которое встречается, по разным данным, у 0,9—6,9% людей в общей популяции. Этиология заболевания до конца не ясна. По тяжести проявлений выделяют одноочаговую, многоочаговую формы, которые относят к легким, и тяжелые формы — субтотальное и тотальное выпадение волос на голове, универсальную форму с выпадением волос на всем теле, а также ресниц и бровей. Описаны генетические предрасполагающие факторы (гаплотипы HLA II класса, полиморфизмы в генах *AIRE*, *FLG*, *MX1*, *PTPN22* и др.), факторы окружающей среды. Корреляций между тяжестью течения и конкретными полиморфизмами не установлено [15—18]. Очаговая алопеция может также развиваться при других аутоиммунных заболеваниях — ревматоидном артрите, системной красной волчанке, аутоиммунных заболеваниях эндокринной системы, в том числе при АПС 1-го типа, при котором частота алопеции достигает 30% [15, 19]. Выявление случаев АПС 1 среди пациентов с изолированной очаговой алопецией является актуальной и трудной клинической задачей.

Цель данного исследования — определить значение аутоантител к ИФН в диагностике АПС 1, а также установить специфичность и чувствительность метода НЕК-Blue cells для определения анти-

тел к ИФН- ω и - α_2 для диагностики АПС 1 и изолированной очаговой алопеции.

Материал и методы

Мы включили в исследование две группы пациентов: группа А — пациенты с АПС 1, группа В — пациенты с очаговой алопецией без АПС 1.

Группа А — пациенты с АПС 1, которые участвовали в исследовании, состоят в Российском регистре пациентов с АПС 1, который ведется в Институте детской эндокринологии ЭНЦ с 2000 г. Пациенты наблюдаются постоянно в Институте детской эндокринологии ЭНЦ (Москва), Российской республиканской детской больнице (РДКБ, Москва), а также эндокринологами в разных регионах РФ. В данное исследование были включены 34 пациента с АПС 1 (20 женщин и 14 мужчин в возрасте от 7 до 28 лет, средний возраст 23 года). Диагноз АПС 1 был установлен на основании клинической картины (два и более основных компонента заболевания) и/или наличия мутаций в гене *AIRE*.

В группу В — включен 21 пациент с очаговой алопецией (12 женщин и 9 мужчин в возрасте от 4 до 43 лет, средний возраст 12,5 года), которые наблюдаются в Институте детской эндокринологии ЭНЦ и у которых на момент последнего осмотра не выявлено ни одного из основных клинических компонентов АПС 1.

Всем пациентам из групп А и В был проведен анализ клинических проявлений, исследование антител к ИФН- ω и - α_2 . Всем пациентам из группы А и 6 пациентам из группы В был проведен анализ гена *AIRE* (частично данные по выявленным мутациям в гене *AIRE* были опубликованы нами ранее) [14].

Исследование АТ к ИФН- α_2 и - ω и проводилось методом НЕК-blue cells assay (метод разработан группой ученых под руководством проф. Е. Нусебуе, Норвегия [5]) с использованием культуры клеток человеческой эмбриональной почки, трансфектированных специфическими плазмидами. 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.

Исследование антител методом проводилось в лаборатории Университета Бергена (Норвегия).

Расчет чувствительности и специфичности метода проводилось стандартными методами.

Результаты

Группа А

В результате анализа фенотипа пациентов с АПС 1 триада основных компонентов выявлена у 21 (62%) из 34 пациентов, диада — у 9 (26%). На основании генетического исследования диагноз установлен 4 (12%) пациентам, которые имели только один основной компонент (изолированный или в сочетании с другими «малыми» компонентами). У всех пациентов с АПС 1 обнаружена хотя бы одна мутация в гене *AIRE* (у 31 пациента — в двух аллелях, у 3 — в одном аллеле). В 67% аллелей выявлена частая мутация *R257X*, в 29% — другие мутации, в 4% — мутаций не обнаружено. У 44% пациентов из данной группы наблюдалась очаговая алопеция.

Высокие титры антител к ИФН- ω обнаружены у 34 (100%) пациентов с подтвержденным АПС 1, к ИФН- α_2 — у 33 (97%). Пациентка, у которой антитела к ИФН- α_2 не были выявлены при положительных антителах к ИФН- ω , соответствует по клиническим критериям диагнозу АПС 1, но заболевание имеет относительно мягкое медленно прогрессирующее течение: гипопаратиреоз манифестировал в 6 лет, надпочечниковую недостаточность установили в 17 лет, никогда не отмечалось признаков кандидоза, имеет 2 здоровых детей, в возрасте 28 лет новых компонентов не было выявлено. При генетическом анализе у данной пациентки найдена только одна частая мутация *R257X*, во втором аллеле мутация не обнаружена.

Данные представлены в **таблице**.

Группа В

При анализе клинической картины среди пациентов с алопецией у 13 из 21 пациента не было других нарушений, у 6 также был выявлен хронический аутоиммунный тиреоидит, 3 страдали сахарным диабетом 1-го типа, у 1 пациента отмечалось витилиго. Алопеция легкой степени (одно- и многоочаговая) была у 11 (52%) пациентов, тяжелой степени (субтотальная, тотальная, универсальная) у 10 (48%). У 6 пациентов проведено исследование гена *AIRE*, в результате которого мутации не были найдены.

Антитела к ИФН- ω и ИФН- α_2 не были обнаружены ни у одного пациента из группы с очаговой алопецией (**см. табл. 1**).

Специфичность методов определения антител к ИФН- ω и - α_2 составляет 100%. Чувствительность метода определения антител к ИФН- ω достигает 100%, что выше, чем чувствительность метода определения антител к ИФН- α_2 (97%). Прогностическая значимость положительного результата этих двух методов также достигает 100%, а прогностическая значимость отрицательного результата метода определения антител к ИФН- ω (100%) выше, чем метода определения антител к ИФН- α_2 (95%) (**см. табл. 1**).

Обсуждение

Основными методами диагностики АПС 1 в РФ в настоящий момент являются клиническая и генетическая диагностика заболевания, тогда как иммунологические методы диагностики не применяются. Исследование гена *AIRE* на наличие одной частой мутации *R257X* позволяет установить диагноз у 50% российских пациентов с АПС 1, у которых эта мутация выявляется в гомозиготном состоянии, и у 20% предположить с высокой вероятностью, когда данная мутация определяется в одном аллеле [5]. Таким образом, примерно в половине случаев диагностики АПС 1 требуется проведения полного секвенирования гена *AIRE*, что делает это исследование существенно дороже и продлевает сроки его выполнения.

Определение антител к ИФН- ω является высокоспецифичным и высокочувствительным методом диагностики АПС 1. В данном исследовании показано, что все российские пациенты с АПС 1, включенные в исследование, имели высокие титры этих антител.

В настоящий момент разработано и применяется в лабораторной клинической практике несколько методов определения нейтрализующих антител к ИФН- ω , в том числе экспресс-метод НЕК-blue cells assay, который является сравнимым по специфичности и чувствительности и может применяться в клинической практике. Использование метода определения антител к ИФН- ω позволяет за 2 дня установить диагноз пациентам с изолированными и нетипичными формами АПС 1.

Результаты, полученные в российской группе пациентов, полностью совпадают с международными результатами и еще раз подтверждают чувствительность и специфичность нового метода диагностики АПС 1.

Распространенность очаговой алопеции в общей популяции в различных странах варьирует от 0,9 до 6,9%, у пациентов с АПС 1 от 30 до 40% [15, 19]. Хотя АПС 1 встречается гораздо реже, чем очаговая алопеция, но при обследовании пациента с алопецией невозможно с уверенностью сказать, что в дальнейшем у него не сформируются другие компоненты АПС 1. Ранее наша научная группа проводила молекулярно-генетическое исследование гена *AIRE* у пациентов с изолированной аутоиммунной алопецией. В исследовании были 12 пациентов, у которых мутаций в гене *AIRE* обнаружено не было [20]. Мы пришли к выводу, что мутации в гене *AIRE* и АПС 1 не являются частой причиной изолированной алопеции. Также в некоторых зарубежных работах проводилось исследование гена *AIRE* у пациентов с изолированной очаговой алопецией и было выявлено несколько полиморфизмов в этом гене, которые чаще встречались у данной группы пациентов, но не было обнаружено мутаций [16, 17].

Клиническая и иммунологическая характеристика пациентов с АПС 1 и пациентов с очаговой алопецией

Клинические проявления	N (%)	АТ к ИФН- ω	АТ к ИФН- α_2
Группа А. АПС 1 (n=34):		100%	97%
«триада» ¹	21 (62)		
«диада» ²	9 (26)		
один «большой компонент» ³	2 (6)		
ХНН	28 (82)		
ХКСК	30 (88)		
ГПТ	28 (82)		
алопеция	15 (44)		
другие компоненты ⁴	31 (91)		
Группа В. Очаговая алопеция (n=21):		0%	0%
легкая форма алопеции ⁵	11 (52)		
тяжелая форма алопеции ⁶	9 (48)		
хронический аутоиммунный тиреоидит	6 (21)		
сахарный диабет 1-го типа	3 (14)		
витилиго	1 (5)		
Чувствительность и специфичность, %:			
чувствительность		100	97
специфичность		100	100
Прогностическая значимость положительного результата, %		100	100
Прогностическая значимость отрицательного результата, %		100	95

Примечание. ¹ — наличие у пациента хронической надпочечниковой недостаточности, гипопаратиреоза, хронического кожно-слизистого кандидоза; ² — наличие у пациента 2 из 3 больших компонентов (хроническая надпочечниковая недостаточность, гипопаратиреоз, хронический кожно-слизистый кандидоз); ³ — из классической «триады» компонентов у пациента присутствует только один. ⁴ другие компоненты — все компоненты за исключением тех, которые входят в классическую «триаду». ⁵ — одно- или многоочаговая формы. ⁶ — субтотальная, тотальная и универсальная формы.

В нескольких крупных исследованиях доказано самостоятельное значение аутоантител к ИФН- ω и - α_2 в диагностике АПС 1, при этом эти антитела не выявлялись при других аутоиммунных заболеваниях [6, 9, 12]. В нашем исследовании данные антитела также не выявляются у пациентов с очаговой алопецией без АПС 1. Это позволяет использовать этот метод для поиска редких форм АПС 1 среди пациентов с очаговой алопецией.

Заключение

Определение антител к ИФН- ω является новым диагностическим критерием АПС 1. Метод с использованием клеток НЕК-Blue эффективен для диагностики классических и нетипичных форм АПС 1, является высокоспецифичным (специфичность 100%) и высокочувствительным (чувствительность 100%) и может также применяться для обследования пациента с предполагаемым диагнозом АПС 1, семьи пациента и скрининга на этот синдром среди пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями.

Внедрение в клиническую практику в России данного метода исследования позволит проводить раннюю диагностику АПС 1 у пациентов с нетипичными клиническими вариантами заболевания, у родственников пациентов с АПС 1 и у пациентов с неустановленными мутациями в гене *AIRE* в более короткие сроки.

Благодарности

Мы благодарим всех врачей за активное участие и помощь в обследовании пациентов, в частности коллектив эндокринологического отделения ФГБУ «Российская детская клиническая больница» (Л.В. Арзамасцева, Н.В. Полякова, Е.В. Кувалдина)

Особую благодарность за участие в исследовании выражаем пациентам и их родственникам.

Работа выполнена в рамках программы помощи детям с эндокринной патологией «Альфа-Эндо» при финансовой поддержке «Альфа-групп» и фонда «The “CAF” Foundation for Philanthropy Support and Development».

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahonen P. Autoimmune polyendocrinopathy — candidosis — ectodermal dystrophy (apeced): autosomal recessive inheritance. *Clin Genet.* 2008;27(6):535-542.
doi: 10.1111/j.1399-0004.1985.tb02037.x.
2. Jääskeläinen J, Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy — candidosis —ectodermal dystrophy (apeced) — a diagnostic and therapeutic challenge. *Pediatric Endocrinology Reviews.* 2009;7(2):95-108.
3. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24(1):571-606.
doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115601.
4. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* 2002;298(5597):1395-1401.
doi: 10.1126/science.1075958.
5. Orlova EM, Bukina AM, Kuznetsova ES, et al. Autoimmune polyglandular syndrome type I in russian patients: clinical variants and autoimmune regulator mutations. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(6):449-457.
doi: 10.1159/000313585.
6. Meager A, Visvalingam K, Peterson P, et al. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I. *Plos Med.* 2006;3(7):e289.
doi: 10.1371/journal.pmed.0030289.
7. Pestka S, Krause CD, Walter Mr, Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004;202(1):8-32.
doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x.
8. Vilcek J. Novel interferons. *Nat Immunol.* 2003;4(1):8-9.
doi: 10.1038/ni0103-8.
9. Meager A, Wadhwa M, Dilger P, 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;132(1):128-136.
doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02113.x.
10. Kisand K, Link M, Wolff ASB, et al. Interferon autoantibodies associated with aire deficiency decrease the expression of ifn-stimulated genes. *Blood.* 2008;112(7):2657-2666.
doi: 10.1182/blood-2008-03-144634.
11. Breivik L, Oftedal BEV, Bøewolff AS, et al. A novel cell-based assay for measuring neutralizing autoantibodies against type i interferons in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Clin Immunol.* 2014;153(1):220-227.
doi: 10.1016/j.clim.2014.04.013.
12. Meloni A, Fucas M, Cetani F, et al. Autoantibodies against type i interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type i. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4389-4397.
doi: 10.1210/jc.2008-0935.
13. Oftedal BE, Bøewolff AS, Bratland E, et al. Radioimmunoassay for autoantibodies against interferon omega; its use in the diagnosis of autoimmune polyendocrine syndrome type i. *Clin Immunol.* 2008;129(1):163-169.
doi: 10.1016/j.clim.2008.07.002.
14. Wolff ASB, Sarkadi AK, Maródi L, et al. Anti-cytokine autoantibodies preceding onset of autoimmune polyendocrine syndrome type i features in early childhood. *J Clin Immunol.* 2013;33(8):1341-1348.
doi: 10.1007/s10875-013-9938-6.
15. Нефёдова Е.Д. Гнездная алопеция: клинко-генетические предикторы тяжелого течения заболевания: Дис. ... канд. мед. наук. М. 2011. [Nefedova ED. *Gnezdnyaya alopetsiya: kliniko-geneticheskie prediktory tyazhelogo techeniya zabolevaniya* [PhD dissertation]. Moscow. 2011. (In Russ.)].
16. Pforr J, Blaumeiser B, Becker T. et al. Investigation of the p.ser278arg polymorphism of the autoimmune regulator (aire) gene in alopecia areata. *Tissue Antigens.* 2006;68(1):58-61.
doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00598.x.
17. Tazi-Ahnni R, Cork MJ, Gawkrödger DJ, et al. Role of the autoimmune regulator (aire) gene in alopecia areata: strong association of a potentially functional aire polymorphism with alopecia universalis. *Tissue Antigens.* 2002;60(6):489-495.
doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.600604.x.
18. Alzolibani AA, Zari S, Ahmed AA, Epidemiologic and genetic characteristics of alopecia areata (part 2). *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2012;21(1):15-19.
19. Islam N, Leung PSC, Huntley AC, Eric Gershwin M. The autoimmune basis of alopecia areata: a comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2015;14(2):81-89.
doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.014.
20. Орлова Е.М. Генетические основы и клинические варианты аутоиммунного полигланулярного синдрома I-го типа: Дис. ... канд. мед. наук. М. 2005. [Orlova EM. *Geneticheskie osnovy i klinicheskie varianty autoimmunnogo poliglandulyarnogo sindroma I tipa* [PhD dissertaton]. Moscow 2005. (In Russ.)].