

На правах рукописи

Ткаченко Ольга Юрьевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И
ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА
КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ
АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научный руководитель:

Эмануэль Владимир Леонидович – доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Гайковая Лариса Борисовна - доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского, заведующая центральной клинико-диагностической лабораторией;

Моисеева Ольга Михайловна - доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник, руководитель научно-исследовательского отдела некоронарогенных заболеваний сердца, директор Института сердца и сосудов.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «13» октября 2020 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: <https://www.ngserm.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Антифосфолипидный синдром (АФС) представляет собой антителоопосредованное аутоиммунное заболевание, которое клинически проявляется рецидивирующими артериальными/венозными тромбозами и/или патологией беременности [Насонов Е.Л., 2006]. Лабораторное подтверждение диагноза АФС требует использования панели серологических и коагуляционных тестов, включая выявление волчаночного антикоагулянта (ВАК), а также определения аутоантител классов IgG и IgM к кардиолипину (аКЛ) и бета-2 гликопротеину I (β 2ГП1). В соответствии с классификационными критериями 2006 года, стойко персистирующие средние и высокие уровни аутоантител, а также положительный ВАК при повторном выявлении через 12 недель позволяют поставить диагноз АФС [Miyakis S., 2006]. Следует отметить, что кроме аКЛ и β 2ГП1, описано около 20 антигенных мишеней семейства антифосфолипидных антител (АФА), однако на данный момент их диагностическая значимость требует уточнения [Bertolaccini M., 2011].

Серологическая диагностика АФС затруднена тем фактом, что АФА относятся к аутоантителам, которые можно сравнительно часто обнаружить у здоровых лиц [Petri M., 2000; Shi W., 1990]. Встречаемость АФА в общей популяции достигает 3%, а в пожилом возрасте превышает 12%. Низкие уровни АФА отмечаются при многих заболеваниях, однако их носительство не сопровождается увеличением риска тромбозов [Abdel-Wahab N., 2016; A. Tinkani, 2010]. Появление этих неспецифических реакций может быть объяснено особенностями взаимодействия аутоантител с различными эпитопами молекулы β 2ГП1, а также недостатками иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления АФА, обусловленного полярной структурой фосфолипидов [Bertolaccini M., 2005; Devreese, K.M.J., 2014; Meroni P.L., 2013].

Несмотря на то, что подозрение на АФС часто возникает в терапевтической и акушерской практике, реальная заболеваемость АФС составляет только около 2 случаев на 100 тысяч населения, а распространенность не превышает 50 случаев на 100 тысяч населения [Cervera R., 2009]. В большой когорте пациентов с тромбозом, обследованных на наличие наследственных и приобретенных форм тромбофилий, АФС удалось подтвердить только у 10,5% пациентов [Goldman-Mazur, S., 2019].

С другой стороны, наиболее частой причиной инвалидизации среди пациентов с АФС являются тромботические осложнения. У 24-48% больных развивается тромбоз глубоких вен (ТГВ) и в 45% случаев – артериальные тромбозы (АТ), представленные преимущественно транзиторными ишемическими атаками и инсультами [Cervera R., 2015]. Основными причинами смерти при АФС являются тромбоэмболические осложнения, а именно, инсульт, инфаркт миокарда, легочную эмболию или катастрофический АФС (36,5%), инфекции (26,9%) и кровотечения (10,7%). По данным многоцентрового проспективного исследования, включавшего 1000 больных АФС, повторные тромботические осложнения развились только у 16,6% пациентов в течение

первых 5 лет и составили 21% в течение всего 10-летнего периода наблюдения. Из 188 беременностей, возникших за время исследования, благополучно разрешились 72,9%. При этом было зарегистрировано 93 (9,3%) смертей (72 женщины и 21 мужчина), что выше, чем уровень смертности при СКВ (6,8%) за такой же период времени [Cervera R.,2015].

Таким образом, совершенствование серологической диагностики, а также прогнозирование тромботического риска при АФС для индивидуализации терапии заболевания является актуальной задачей. В настоящее время выработан ряд методов оценки предрасположенности к тромбозам у больных АФС, к которым относятся выявление серологического профиля антител, включающего несколько АФА и ВАК (так называемая «тройная позитивность») и использование расчетных клиничко-лабораторных индексов тромботического риска [Otomo, K., 2012; Sciascia S., 2013]. Высокие уровни аКЛ и а β 2ГП1 ассоциированы с клиническими проявлениями АФС. Под высокими уровнями подразумевается концентрация аутоантител более 40 GPL/MPL – Ед/мл [Miyakis S.,2006]. Многие исследования показали, что высокие уровни чаще приводят к тромбозам, чем низкие уровни АФА [Galli M., 2008; Verro P., 1998]. У женщин с АФС высокие уровни АФА представляют собой значительный фактор риска неблагоприятного исхода беременности [Galli, M., 2004; Ruffatti, A., 2001]. Однако основной проблемой ведения больных АФС является отсутствие адекватного метода выявления лабораторных маркеров, которые позволяют прогнозировать риск сердечно-сосудистых заболеваний и акушерской патологии.

Для выявления АФА были разработаны новые методы, обладающие более совершенными аналитическими характеристиками по сравнению с традиционным ИФА. Преимущество этих методов заключается в увеличении плотности антигенных эпитопов, а также оптимизации ориентации аутоантигенов на подложке [Olsen N.J.,2017]. Одним из таких методов является мультиплексный лайн-дот (МЛД) с использованием гидрофобной твердой фазы, которая улучшает связывания аутоантител с антигенами АФА [Egerer K.,2011; Roggenbuck D.,2016]. Также МЛД позволяет выявлять многообразие серологических реакций по отношению к нейтральным и отрицательно-заряженным фосфолипидам и ко-факторным белкам. С помощью МЛД можно обнаружить до 20 антигенных мишеней АФА, исследовать минорные АФА для определения риска развития тромбозов, а также уточнить клиническое значение феномена множественной серологической позитивности [Egerer K.,2011;Roggenbuck D.,2016].

Наличие генетической предрасположенности необходимо для последующего развития АФС, кроме того, синтез АФА детерминирован генами группы HLA II класса [Sebastiani G.D., 2003]. Существует значительное количество зарубежных исследований иммуногенетических характеристик АФС, в которых показана зависимость между синтезом аКЛ и а β 2ГП1 с аллелями HLA-DRB1*0402 и DRB1*0403 локуса DRB1*04 [Iuliano, A., 2019]. В то же время, иммуногенетических исследований, посвященных АФС, в отечественной популяции проведено крайне мало, кроме того остается плохо

изученной взаимосвязь HLA-DRB1 локуса и спектра синтезируемых АФА, а также возникновение клинической симптоматики на фоне различных иммуногенотипов.

Таким образом, актуальные проблемы диагностики АФС связаны с высокой распространенностью низких уровней аутоантител, плохой стандартизацией метода ИФА, сложностью выявления пациентов группы высокого риска с помощью традиционных лабораторных подходов. Возникает необходимость оптимизации серологического тестирования, а именно использование возможностей новых иммунологических методов выявления АФА. Оценка комплекса иммунологических и иммуногенетических характеристик пациентов с АФС представляется наиболее перспективным подходом к выявлению пациентов с высоким риском развития тромботических и акушерских проявлений.

Степень разработанности темы

Антифосфолипидные антитела (АФА) представляют собой семейство аутоантител, направленных против фосфолипидов, фосфолипид-белковых комплексов и фосфолипид-связывающих белков [Насонов Е.Л., 2006; Meroni P.L., 2015]. Патогенетически значимые АФА реагируют со скрытым эпитопом белков ко-факторов, наиболее значимым из которых является $\beta 2$ ГП1 [Ağar Ç., 2010]. Доказана способность АФА активировать клеточный и плазменный гемостаз, систему комплемента, а также индуцировать прямое антителоопосредованное повреждение плаценты [Meroni P.L., 2008]. К наиболее изученным АФА относятся $\alpha \beta 2$ ГП1 IgG/IgM, α КЛ IgG/IgM и ВАК, которые включены в лабораторные критерии АФС [Miyakis S., 2006].

Помимо классических лабораторных маркеров, при АФС обнаруживаются так называемые «некритериальные» АФА, которые не вошли в диагностические критерии заболевания. К ним относят антитела к другим кофакторным белкам - аннексину V (Ан V) и протромбину (Пт), а также антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам - к фосфатидилглицеролу (Фг), фосфатидилинозитолу (Фи), фосфатидилсерину (Фс), фосфатидиловой кислоте (Фк), и нейтрально заряженным фосфолипидам - фосфатидилэтаноламину (Фэ), фосфатидилхолину (Фх) [Bertolaccini M., 2011; Misasi R., 2015]. Данные антитела имеют самостоятельное диагностическое и/или прогностическое значение. Антитела к протромбину в комплексе с фосфатидилсерином (Фс-Пт) обуславливают активность ВАК и ассоциированы с риском развития тромбозов [Reynaud, Q., 2014]. Выявление антител к АнV повышает риск развития осложнений беременности, особенно на фоне СКВ [Bizzaro, N. A, 2005; Sater M.S., 2011]. При патологии беременности и транзиторной ишемической атаке помимо классических АФА часто выявляются антитела к Фс и Фи [Ziporen, L., 1998; Egerer, K., 2011].

Альтернативой метода ИФА для детекции спектра АФА является метод МЛД. Метод МЛД характеризуется единовременным выявлением нескольких видов АФА и использованием гидрофобной твердой фазы для сорбции антигенов [Roggenbuck, D., 2012]. Диагностическая эффективность МЛД была подробно рассмотрена в ряде исследовательских работ [Egerer K., 2011; Egerer

К., 2011; Roggenbuck D.,2012; Roggenbuck D.,2016]. Важным преимуществом метода МЛД является детекция широкого спектра АФА, включающего 10 основных разновидностей (аКл, а β 2ГП1, антител к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр) классов IgG и IgM. В качестве твердой фазы в МЛД используется мембрана из поливинилиденфторида (ПВДФ мембрана). В отличие от планшетного ИФА, гидрофобные свойства этой твердой фазы позволяют достичь более высокой плотности фосфолипидов. Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что МЛД преимущественно детектирует антитела против домена 1 β 2ГП1 [Mahler M.,2012]. Поскольку β 2ГП1 взаимодействует с отрицательно заряженными иммобилизованными анионными фосфолипидами посредством домена 5, домен 1 открыт для взаимодействия с АФА. Антитела против домена 1 β 2ГП1 обнаруживаются значительно чаще у пациентов с развернутой клинической картиной АФС, чем у бессимптомных носителей АФА или у пациентов с инфекционными заболеваниями, что позволяет их рассматривать в качестве основного патогенетического фактора АФС [Mahler M.,2012].

Иммуногенетика не только обуславливает предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям, но также детерминирует синтез аутоантител и определяет варианты клинических проявлений. Большое количество научных работ посвящено исследованиям аллелей высокого и низкого риска HLA классов I и II при аутоиммунных заболеваниях. Некоторые аллели HLA класса II позволяют эффективнее связывать аутоантигены и, таким образом, обуславливают уникальный паттерн синтеза аутоантител. Данные ассоциации были обнаружены для антинуклеарных антител при СКВ, антител к трансаминазе 2 при целиакии, антител к циклическому цитруллинированному пептиду при ревматоидном артрите, антител к цитоплазме нейтрофилов при васкулитах, анти-GAD65 и анти-IA-2A при диабете 1 типа [Björck S., 2011; Howson J.M.M. , 2011; Lyons P.A., 2012; . Okada Y.,2014]. Работ по взаимосвязи между иммуногенетическими особенностями и синтезом АФА до настоящего времени крайне мало, а обнаруженные закономерности являются важными для определения риска клинических проявлений АФС.

Таким образом, современный уровень разработки темы позволяет исследовать иммунологические и иммуногенетические факторы риска АФС. Несмотря на широкое применение ИФА, использование новых методов, таких как МЛД, может повысить информативность лабораторной диагностики. Остается невыясненной диагностическая роль данного метода в детекции низких и высоких уровней АФА. Актуальным остается вопрос использования некритериальных АФА, таких как антитела к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр, в качестве независимых факторов риска клинических проявлений АФС. Следует уточнить клиническую значимость множественной серологической позитивности, включающей как критериальные, так и некритериальные АФА. В патогенезе многих аутоиммунных заболеваний было показано влияние иммуногенетических факторов на синтез аутоантител, но возможность

использования генетического тестирования в диагностических целях при АФС еще не ясна.

Цель исследования – охарактеризовать иммунологические и иммуногенетические факторы риска для ранней идентификации и оптимизации серологической диагностики пациентов с высокой вероятностью развития рецидивирующих тромботических осложнений и патологии беременности при антифосфолипидном синдроме.

Задачи исследования

1. Сопоставить встречаемость низких и высоких уровней антифосфолипидных антител в группах пациентов с рецидивирующими тромбозами различных локализаций, патологией беременности и системной красной волчанки, измеренных с помощью иммуноферментного анализа и мультиплексного лайн-дота, и оценить их связь с клиническими проявлениями антифосфолипидного синдрома;

2. Проанализировать спектр антифосфолипидных антител, детектируемых с помощью мультиплексного лайн-дота, в группах пациентов с рецидивирующими тромбозами различных локализаций, патологией беременности, и изучить возможность его применения в качестве фактора риска развития антифосфолипидного синдрома;

3. Проанализировать спектр антифосфолипидных антител, детектируемых с помощью мультиплексного лайн-дота, у пациентов с системной красной волчанкой и изучить его роль в оценке риска развития антифосфолипидного синдрома;

4. Сравнить спектр некритериальных антифосфолипидных антител, измеренных методом мультиплексного лайн-дота, у пациентов с венозными и артериальными тромбозами, а также их рецидивами при системной красной волчанке;

5. Исследовать встречаемость генов локуса HLA-DRB1 у пациентов с системной красной волчанкой и их связь с клиническими проявлениями и синтезом антител.

Научная новизна работы

Впервые были сопоставлены аналитические характеристики классического метода ИФА и нового метода МЛД для детекции АФА. Было установлено, что МЛД характеризуется более высокой аналитической чувствительностью и выявляет преимущественно высокие уровни АФА по сравнению с ИФА, что позволяет поставить диагноз подтвержденного АФС и выделить группу высокого риска развития осложнений.

Также оригинальность диссертационного исследования состоит в определении феномена множественной серологической позитивности, включающей как критериальные аКл и аβ2ГП1, так и некритериальные антитела к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр, у пациентов с СКВ в зависимости от тромбозов в анамнезе, и выявлена роль множественной позитивности в оценке риска возникновения тромбозов и их рецидивов. Было установлено, что выявление некритериальных АФА методом МЛД позволяет дифференцировать пациентов с СКВ и артериальными тромбозами от

пациентов с СКВ и венозными тромбозами. Было выявлено прогностическое значение некритериальных АФА, а именно антител к Фс и Фи, которые являются независимым фактором риска тромбозов и их рецидивов.

Были получены уникальные данные о взаимосвязи между аллелями гена HLA-DRB1, тромбозами и АФА среди пациентов с СКВ в российской популяции. Впервые было показано, что наличие аллелей HLA-DRB1*04 и HLA-DRB1*13 ассоциировано с повышенным риском синтеза АФА и развитием тромботических осложнений.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты диссертационного исследования указывают на целесообразность более широкого применения нового метода МЛД для детекции АФА. Было обнаружено, что МЛД обладает более совершенными аналитическими характеристиками и мультиплексным подходом к измерению АФА, что позволяет выявить в 1,5 раза больше пациентов с первичным антифосфолипидным синдромом. У пациентов с разными клиническими проявлениями АФС были выявлены значимые отличия в спектре некритериальных антител к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр, измеренных с помощью МЛД. Так, для АФС с тромботическими проявлениями характерны аФк и аФс классов IgG/IgM, а при патологии беременности чаще выявляются аАн V и аФх классов IgG/IgM. Была выявлена диагностическая роль некритериальных АФА в диагностике тромботических состояний и их рецидивов. Антитела к Фс и Фи чаще выявляются при тромбозах глубоких вен и инсультах, а также информативны в прогнозировании риска развития рецидивирующих тромботических осложнений при СКВ. Установлено, что феномен множественной серологической позитивности, а именно выявление >4 АФА класса IgG, достоверно чаще обнаруживается у пациентов с СКВ и тромбозами, чем у пациентов с СКВ без тромбозов в анамнезе. В ходе диссертационного исследования было выполнено иммуногенетическое исследование АФС в российской популяции. Было показано, что наличие DRB1*04 и DRB1*13 аллелей локуса HLA-DRB1 обуславливает синтез аКЛ и аβ2ГП1 и ассоциировано с развитием тромботических осложнений у пациентов с СКВ. Полученные данные меняют представления о взаимосвязи иммунологических и иммуногенетических факторов риска развития АФС при СКВ. Полученные результаты являются основой для разработки новых подходов к комплексной лабораторной диагностике АФС.

Внедрение полученных результатов в рутинную практику специализированных иммунологических лаборатории, а также в клиническую практику ревматологов, акушеров-гинекологов, кардиохирургов, кардиологов, сосудистых хирургов, гематологов, неврологов позволит использовать возможности новых методов определения АФА для подтверждения диагноза АФС, а так же для прогнозирования риска развития клинических осложнений заболевания.

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели был проведен анализ литературы, включающий 179 работ отечественных и зарубежных авторов, посвященных

проблеме оценки риска развития клинических проявлений АФС. В диссертационное исследование включено 246 человек, в том числе пациенты с ишемическим инсультом в возрасте моложе 50 лет (n=44), пациентки с привычным невынашиванием беременности (n=45), пациенты с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей (n=27), пациенты с СКВ (n=100), здоровые доноры (n=30). Лабораторные исследования были выполнены на высокотехнологичном оборудовании. Измерение аКЛ и аβ2ГП1 проводилось с помощью ИФА тест-систем разных производителей. Спектр антител к отрицательно-заряженным и нейтральным фосфолипидам, а также кофакторным белкам, а именно антитела к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр, был детектирован с помощью МЛД. ВАК был измерен в соответствии с рекомендациями Международного общества по тромбозу и гемостазу 2012 года[114]. Пациентам с СКВ было проведено типирование генов по локусу HLA-DRB1. Выполнен сбор и систематизация данных. Результаты были получены с помощью современных методов статистического анализа, включая параметрические и непараметрические методы, корреляционный анализ Спирмена, Каппа статистика, логистический регрессионный анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. Метод мультиплексного лайн-дота за счет использования гидрофобной твердой фазы обеспечивает оптимизацию антигенных свойств фосфолипидов, что позволяет достичь повышенной частоты выявления высоких уровней антифосфолипидных антител, ассоциированных с тромбозами и акушерской патологией.

2. Мультиплексный метод детекции антифосфолипидных антител позволяет выявлять феномен множественной серологической позитивности, указывающий на высокий риск развития тромбозов и их рецидивов при антифосфолипидном синдроме и системной красной волчанке.

3. Выявление DRB1*04 и DRB1*13 аллелей генов HLA-DRB1 связано с синтезом антител к кардиолипину и бета-2 гликопротеину 1 и является неблагоприятным фактором для развития тромбозов при антифосфолипидном синдроме.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности и обоснованность результатов данного диссертационного исследования обеспечена достаточным объемом выборок обследованных пациентов (n=246). Результаты научной работы получены с помощью широкого спектра серологических, коагулологических и молекулярно-генетических методов исследования. Достоверность выводов подтверждена статистическим анализом полученных данных.

Результаты данного исследования были доложены и обсуждены на 10 Международном Конгрессе по Аутоиммунным Заболеваниям (Лейпциг, 2016), I конгрессе «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016), IV Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины - возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2017), Всероссийском конгрессе с международным участием «Дни ревматологии в Санкт-Петербурге – 2017» (Санкт-Петербург, 2017), 11 Международном

Конгрессе по Аутоиммунным Заболеваниями (Лиссабон, 2018), Всероссийском конгрессе с международным участием «Дни ревматологии в Санкт-Петербурге – 2018» (Санкт-Петербург, 2018), III конгрессе «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2018), Симпозиуме по аутоантителам (Дрезден, 2019).

Личный вклад автора

Диссертант лично осуществлял все этапы планирования и организации исследовательской работы, разработал дизайн исследования. В экспериментальной части диссертационной работы автор самостоятельно выполнил преаналитический, аналитический этапы серологических и молекулярно-биологических лабораторных исследований. Самостоятельно проведен сбор информации для составления базы данных пациентов. Автор организовал сбор и обработку медицинской информации, выполнил математико-статистическую обработку и анализ полученных результатов. Автором самостоятельно написан текст диссертации и автореферата, подготовлена электронная версия доклада для апробации и защиты.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практику лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, клинко-диагностической лаборатории Научно-методического центра молекулярной медицины и в учебную программу кафедры лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, включая 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований, и 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, включенных в глобальные индексы цитирования (SCOPUS и Web of Science).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, трех глав (обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований и обсуждения полученных результатов), заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы (включает 20 отечественных и 159 зарубежных источника). Работа иллюстрирована 5 рисунками и 22 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационная работа основана на обследовании 246 человек. Характеристики основных и контрольных групп пациентов, а также критерии включения представлены в Таблице 1.

Таблица 1 - Характеристики основных и контрольной групп пациентов

Группа пациентов	Возраст	Критерии включения
Пациенты с острыми ишемическими инсультами (n=44)	34-50 лет	Острый ишемический инсульт, отсутствие кардиальной патологии
Пациентки с привычным невынашиванием беременности (n=45)	24-40 лет	> 2 выкидышей раннего срока в анамнезе
Пациенты с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей (n=27)	26-50 лет	> 2 инструментально подтвержденных тромбозов глубоких вен нижних конечностей
Пациенты с системной красной волчанкой (n=100)	23-52 лет	Соответствие критериям SLICC 2012, подострое или острое течение, длительность заболевания >5 лет
Здоровые доноры (n=30)	36-52 лет	Отсутствие системных заболеваний соединительной ткани, инфекций, онкологии

Для исследования клинической значимости результатов детекции АФА были оценены тест-системы различных производителей. Были использованы ИФА тест-системы Anti-beta-2-Glycoprotein screen, Anti-Cardiolipin IgG (Euroimmun, Германия), в дальнейшем именуемые Производитель 1 (ПР1); ИФА тест-системы Anti-beta-2-Glycoprotein screen, Anti-beta-2-Glycoprotein IgG, Anti-beta-2-Glycoprotein IgM, Anti-Cardiolipin IgG, Anti-Cardiolipin IgM (Orgentec Diagnostica, Германия) - Производитель 2 (ПР2).

Для единовременного измерения аКл, аβ2ГП1, антител к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр использовался МЛД тест-системы Anti-Phospholipid Dot (Medipan, Германия) - Производитель 3 (ПР3). Все коммерческие тест-системы были использованы в соответствии с инструкцией производителей. Согласно рекомендациям по детекции АФА для твердофазных тест-систем, произведен расчет внутрилабораторного референтного интервала (РИ) непараметрическим методом 99 перцентиль для каждой из тест-систем. Измерение АФА было проведено в течение 2-3 дней после взятия крови, все пробы были проанализированы в дублях.

Полученные результаты измерений ИФА тест-систем в оптических единицах были преобразованы в условные единицы на миллилитр (УЕ/мл), а результаты МЛД были представлены в денситометрических единицах оптической плотности (ОП). ВАК был измерен в соответствии с рекомендациями Международного общества по тромбозу и гемостазу 2012 года [Moore G.W.,2014].

Для определения встречаемости основных аллелей HLA-DRB1 в популяции Северо-Западного региона Российской Федерации нами были проанализированы частоты аллелей среди лиц, обследованных в лаборатории тканевого типирования НИИ онкологии им. Раисы Горбачевой ФГБОУ ВО

ПСПБГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России (n=1800) методом аллель-специфической амплификации и секвенирования с помощью диагностических наборов PROTRANS S4 HLA-DRB1* Cylerstrips (Protrans, Германия). Для дополнительного генетического анализа использовалась геномная ДНК, которая была экстрагирована колоночным методом наборами QIAGEN «QIAamp DNA Blood Mini Kit» (Дюссельдорф, Германия) из цельной крови. Для типирования генов по локусу HLA-DRB1 применялся набор реагентов HLA-ДНК-ТЕХ для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК для типирования гена DRB1 (ДНК-Технология, Россия).

Перед проведением всех статистических операций все выборки проверялись на нормальность распределения. Количественные характеристики групп пациентов, включенных в исследование, были представлены с помощью показателей описательной статистики (медиана, стандартное отклонение, 25 и 99-й перцентиль). Так как результаты измерений АФА показали ненормальное распределение, референтный интервал был рассчитан с помощью метода 25 и 99-й перцентиль. Для оценки сходимости тест-систем разных производителей был использован коэффициент Каппа Коэна. Данные были описаны как числа и проценты для номинативных переменных и медианы с межквартильными диапазонами для количественных переменных. U-критерий Манна-Уитни или Крускала-Уоллиса использовался для сравнения переменных с ненормальным распределением. Для проверки различий между группами применялся точный критерий Фишера. Корреляция переменных была выполнена с помощью корреляционного анализа Спирмена. Также был проведен логистический регрессионный анализ между одной дихотомической зависимой переменной (тромбоз, артериальный тромбоз, тромбоз глубоких вен, рецидив тромботических событий) и одной или несколькими независимыми переменными, включая аКЛ, аβ2ГП1, антитела к Фа, Фэ, Фг, Фи, Фс, Ан V, Пт IgG/IgM, а также ВАК, пол, возраст, ожирение, SLEDAI и продолжительность заболевания. Значения $P < 0,05$ считались статистически значимыми. Для всех статистических расчетов использовалось статистическое программное обеспечение GraphPad 8.3.0.

Результаты и их обсуждения

Сравнение разных тест-систем в группах с ранним ишемическим инсультом, рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и привычным невынашиванием беременности

Для определения встречаемости в биообразцах пациентов с ранними ишемическими инсультами, ТГВ и патологией беременности аβ2ГП1, аКл IgG, аКл IgM были измерены на ИФА тест-системах ПР1 и ПР2, а также с помощью МЛД (Таблица 2). При использовании ИФА тест-систем ПР1 аКл и аβ2ГП1 детектировались в 30,5 % образцах, на тест-системах ПР2 АФА были обнаружены у 38% пациентов. Методом МЛД аКл и аβ2ГП1 были выявлены у 30 % пациентов. У пациенток с патологией беременности АФА выявляли чаще, чем в других группах пациентов.

Таблица 2 - Встречаемость АФА (аβ2ГП1, аКЛ) в группах пациентов с ранним ишемическим инсультом, с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и привычным невынашиванием беременности, измеренных тест-системами разных производителей

ПР	АФА	Пациентки с невынашиванием беременности (n=45)	Пациенты с тромбозом глубоких вен (n=27)	Пациенты с ишемическим инсультом (n=44)
ПР1	аКЛ	19 (42%)	3 (11,1%)	1 (2,2%)
	аβ2ГП1	8 (18%)	1 (3,7%)	3 (6,8%)
ПР2	аКЛ	11 (24%)	2 (7,4%)	14 (31,8%)
	аβ2ГП1	16 (35%)	2 (7,4%)	10 (22,7%)
МЛД	аКЛ	11(24%)	6 (22,2%)	2 (4,5%)
	аβ2ГП1	11(24%)	5 (18,5%)	10 (22,7%)
ВАК		11 (24%)	1 (3,7%)	3 (6,8%)

Примечание: ПР1 - Euroimmun (Германия), ПР2 - Orgentec Diagnostica (Германия), МЛД - Medipan (Германия); ВГРИ – верхняя граница референтного интервала: рассчитана непараметрическим методом 99 перцентиль при детекции АФА в группе 30 здоровых доноров, ВАК – волчаночный антикоагулянт, аКЛ – антитела к кардиолипину, аβ2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину

Так как авторы международных критериев АФС указывают на клиническое значение только высоких уровней антител (ВУ АТ), была проанализирована встречаемость АФА, учитывая только ВУ АТ для ИФА тест-систем и МЛД (Рисунок 1).

А)

Б)

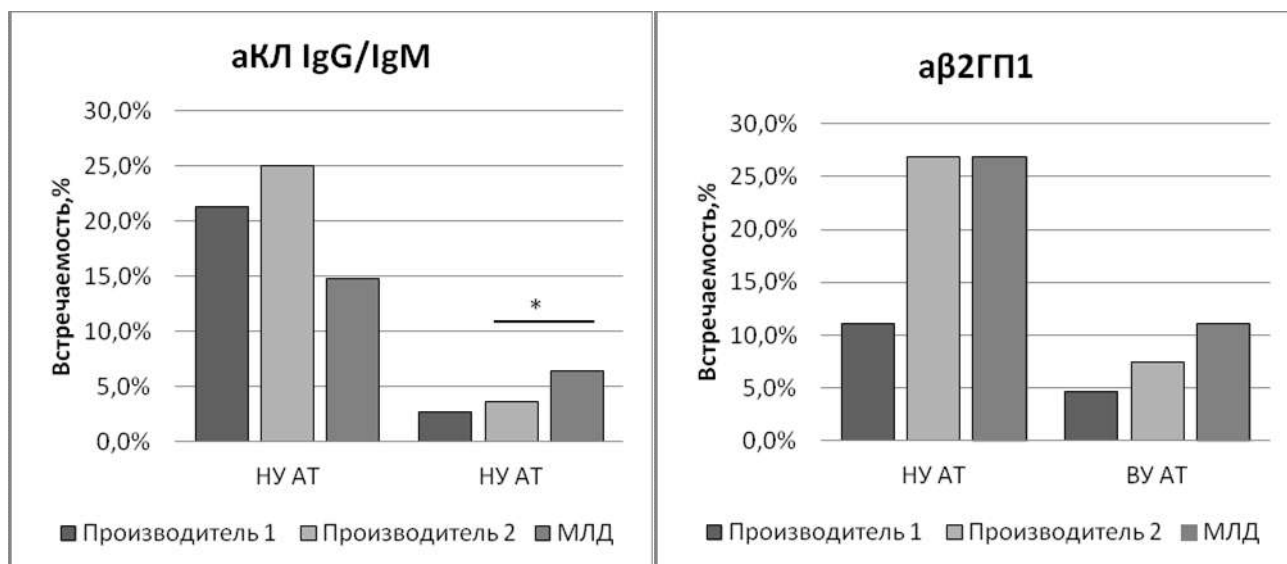


Рисунок 1 – А) Встречаемость антител к кардиолипину IgG/IgM, измеренного ИФА тест-системами производителя 1, производителя 2 и МЛД; Б) Встречаемость антител к бета-2 гликопротеину 1, измеренного ИФА тест-системами производителя 1, производителя 2 и МЛД

Примечание: НУ АТ – низкие уровни антител, ВУ АТ – высокие уровни антител, аКЛ - антитела к кардиолипину, аβ2ГП1 - антитела к бета-2 гликопротеину 1, МЛД – мультиплексный лайн-дот

Частота выявления ВУ АТ, измеренных методом ИФА с помощью тест-систем ПР1 и ПР2, составила 7,3% и 11% соответственно, а методом МЛД – 17,4%. Ввиду небольшого объема выборки положительных пациентов

статистически достоверными являются данные, полученные в результате детекции аКл IgG методом МЛД по сравнению с ИФА тест-системами ПР2 ($p=0,03$). Таким образом, новый метод МЛД позволяет добиться более высокой эффективности при детекции АФА.

Так как одним из преимуществ МЛД является возможность обнаружения 10 видов АФА, была оценена частота выявления как $\alpha 2$ ГП1, аКл, так и антител к Фк, Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Ан V и Пр (Рисунок 2).

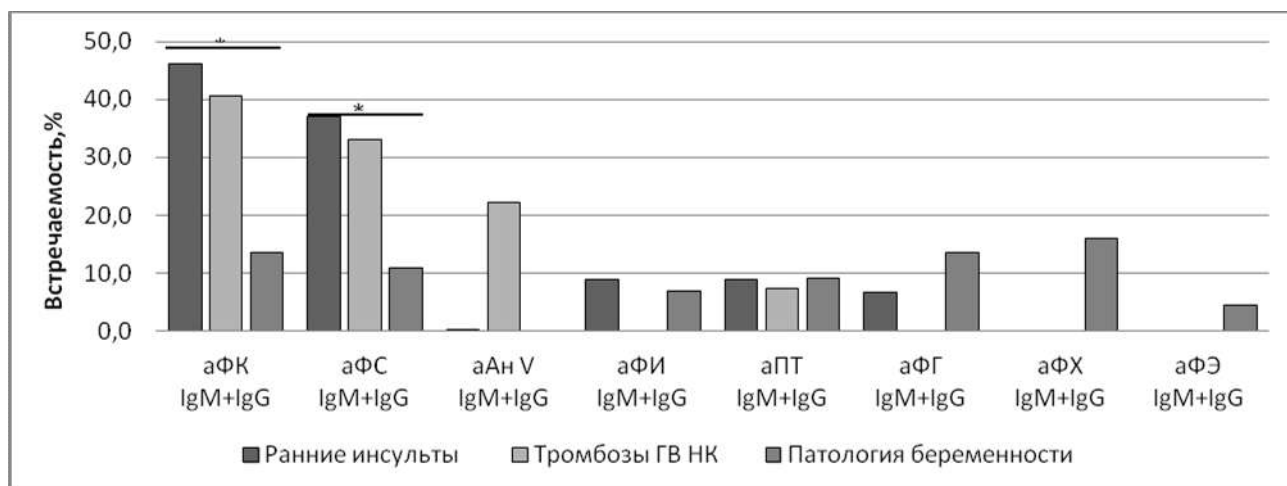


Рисунок 2 - Встречаемость аФК, аФС, аАн V, аФИ и других АФА в группах пациентов с патологией беременности, тромбозами глубоких вен, ранними инсультами

Примечание: аФК – антитела к фосфатидной кислоте, аФС – антитела к фосфатидилсерину, аАн V – антитела к аннексину V, аФИ – антитела к фосфатидилинозитолу, аПТ – антитела к протромбину, аФГ – антитела к фосфатидилглицеролу, аФХ – антитела к фосфатидилхолину, аФЭ – антитела к фосфатидиэтаноламину, тромбозы ГВ НК – тромбозы глубоких вен нижних конечностей

В общей когорте пациентов чаще всего обнаруживались $\alpha 2$ ГП1, аКл, антитела к Фс, Ан V, Фк. У пациентов с тромботическими проявлениями (тромбозы глубоких вен нижних конечностей и ранние инсульты) значительно чаще детектировались антитела к Фк IgG и IgM, к Фс IgG и IgM (точный критерий Фишера, $p=0,01$, $OD=0,23$; $p=0,01$, $OD=0,23$). В группе пациентов с ТГВ НК среди некритериальных АФА чаще детектировались антитела к Фк (40%), Фс (33%), Ан V (22,1%), Пт (7,4%). У пациентов с ранними инсультами преобладали антитела к Фк (46,2%), Фс (37,2%), к Ан V (13,3%), Фи (8,9%), Пт (8,9%), Фг (6,7%). У пациенток с акушерской патологией встречались антитела к Ан V (26%), Фх (15,9%), Фг (13,6%), Пт (9,4%), Фи (6,8%), Фэ (4,5%).

Спектр АФА, выявленный с помощью метода МЛД, был проанализирован в группе пациенток с привычным невынашиванием беременности. Для этого пациентки с патологией беременности были разделены на группы с тройной позитивностью АФА (ВАК(+), аКЛ(+), $\alpha 2$ ГП1(+)), с двойной позитивностью АФА (ВАК(+), аКЛ(-), $\alpha 2$ ГП1(+)), и монопозитивностью АФА ((ВАК(+), аКЛ(-), $\alpha 2$ ГП1(-)/ ВАК(-), аКЛ(+), $\alpha 2$ ГП1(-)/ ВАК(-), аКЛ(-), $\alpha 2$ ГП1(+)). Было показано, что метод МЛД выявляет больше пациентов с тройной позитивностью АФА, тем самым позволяя более эффективно оценить риск развития патологии беременности и выделить группу наибольшего риска осложнений (Рисунок 3).

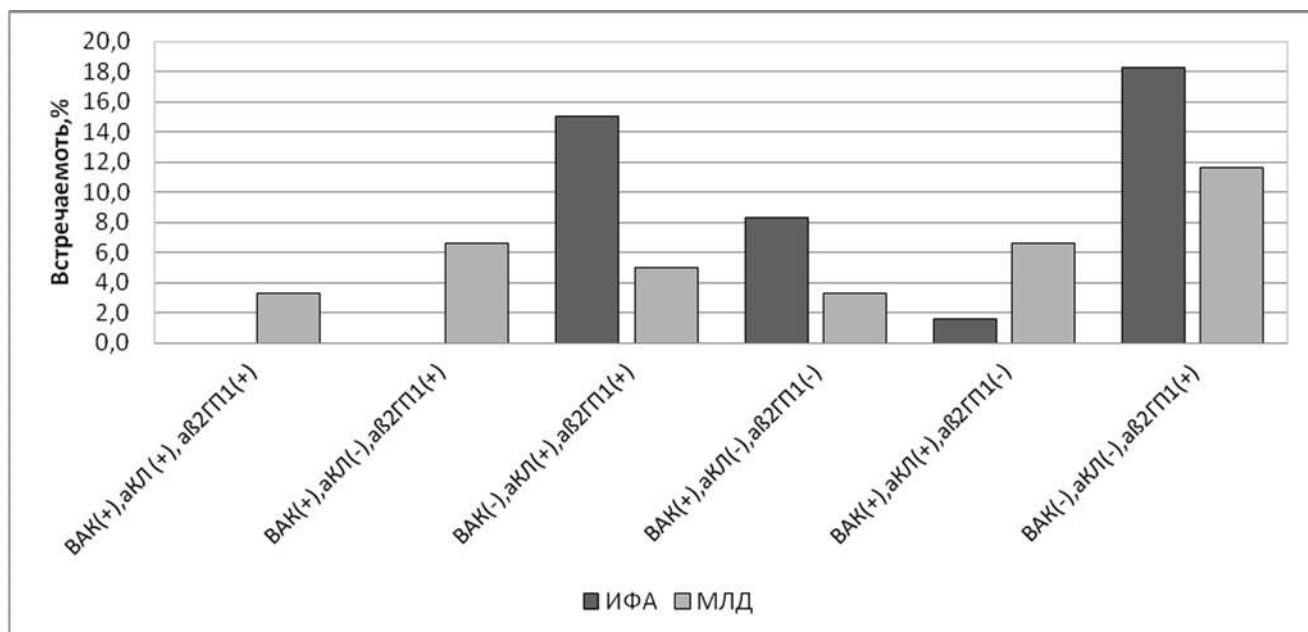


Рисунок 3 - Оценка риска развития осложнений у пациенток с акушерской патологией (n=45)

Примечание: ВАК – волчаночный антикоагулянт, аКЛ – антитела к кардиолипинам, аβ2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину 1, ИФА - иммуноферментный анализ, МЛД - мультиплексный лайн-дот

Принимая во внимание лабораторные критерии АФС, требующие по крайней мере один положительный АФА, комбинированная чувствительность ПР1 составила 31,78% со специфичностью 95%, а комбинированная чувствительность ПР2 – 48% со специфичностью 97%. Комбинированная чувствительность МЛД составила 42% со специфичностью 98%. Самым чувствительным АФА, определенным методом МЛД, был аβ2ГП1 IgG.

Сравнение и аналитические характеристики разных тест-систем для детекции АФА у пациентов с системной красной волчанкой

В течение исследования было обследовано 100 пациентов с СКВ. Диагноз СКВ был основан на стандартных клинических, лабораторных, рентгенологических и гистопатологических данных в соответствии с классификацией SLICC 2012 года. У пациентов с СКВ-ТГВ/АТ в анамнезе (n=45) чаще выявлялись аКл IgG (38 %, p<0,05) и аβ2ГП1 IgG (47%, p<0,05), определяемые с помощью ИФА, и аКл IgG (38 %, p<0,05) и аβ2ГП1 IgG (38%, p<0,05), измеренные с помощью МЛД, по сравнению с пациентами с СКВ без тромбозов (12/9% аКл IgG, 16/9% аβ2ГП1 IgG методами ИФА/МЛД) (Таблица 3). Также в группе СКВ-ТГВ/АТ чаще определялся ВАК (56%, p<0,05) по сравнению с группой СКВ без тромбозов (31%). Относительно других критериальных АФА, выявленных с помощью ИФА и МЛД, не было установлено существенных различий между группами пациентов СКВ-ТГВ/АТ и СКВ.

Таблица 3 - Встречаемость аКЛ, аβ2ГП1, ВАК в группах СКВ-ТГВ/АТ и СКВ

	СКВ (n=100)	СКВ- ТГ/АТ (n=45)	СКВ без тромбозо в (n=55)	ЗД (n=30)	Р	Р	Р
					СКВ-ТГВ/АТ vs без тромбозов	СКВ-ТГВ/АТ vs ЗД	СКВ без тромбоз ов vs ЗД
ИФА							
аβ2ГП1 IgG	30 (30%)	20 (44%)	10 (18%)	0	<0,0001	<0,0001	<0,0001
аКЛ IgG	25 (25%)	18 (40%)	7 (13%)	0	<0,0001	<0,0001	<0,0001
аβ2ГП1 IgM	24 (24%)	12 (26%)	12 (22%)	2 (6%)	н/з	<0,0001	<0,0001
аКЛ IgM	26 (26%)	12 (26%)	14 (25%)	3 (10%)	н/з	<0,0001	<0,0001
МЛД							
аβ2ГП1 IgG	27 (27%)	20 (44%)	7 (13%)	0	<0,0001	<0,0001	<0,001
аКЛ IgG	14 (14%)	10 (22%)	4 (7%)	1 (3%)	< 0,05	<0,0001	< 0,05
аβ2ГП1 IgM	22 (22%)	13 (28%)	9 (16%)	1 (3%)	н/з	<0,0001	<0,0001
аКЛ IgM	10 (10%)	7 (15%)	3 (5%)	0	н/з	<0,001	< 0,05
ВАК	42 (42%)	24 (53%)	18 (32%)	5 (16%)	н/з	<0,0001	<0,0001

Примечание: аКЛ IgG – антитела к кардиолипину класса IgG, аКЛ IgM – антитела к кардиолипину класса IgM, аβ2ГП1 IgG – антитела к бета-2-гликопротеину IgG, аβ2ГП1 IgM – антитела к бета-2 гликопротеину IgM, ВАК – волчаночный антикоагулянт, СКВ – системная красная волчанка, ИФА – иммуноферментный анализ, МЛД – мультиплексный лайн-дот, н/з – статистически не значимо

Далее была проанализирована встречаемость АФА в группах СКВ-ТГВ/АТ и СКВ без тромбозов, учитывая НУ АТ и ВУ АТ для ИФА тест-систем и МЛД. В группе СКВ без тромбозов анализ чувствительности этих двух методов при разных уровнях ВГРИ не показал значимых различий. Но в группе СКВ-ТГВ/АТ при анализе ВУ АТ новый метод МЛД показал ту же чувствительность, что и ИФА для аКЛ IgG и IgM, но оказался в три раза чувствительнее при детекции аβ2ГП1 IgM (p=0,04, OR=0,17) и IgG (p=0,04, OR=0,23) (Рисунок 4).

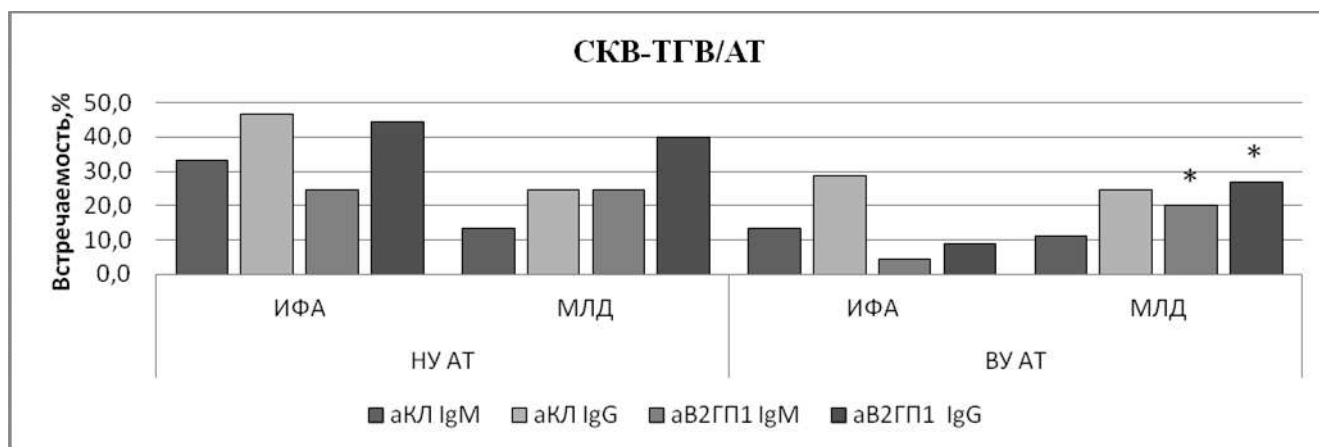


Рисунок 4 - Встречаемость низких (НУ АТ) и высоких уровней (ВУ АТ) АФА (аКЛ, аβ2ГП1) в группе СКВ-ТГВ/АТ, *p<0,05 при сравнении показателя с встречаемостью ВУ АТ, измеренных методом ИФА

Примечание: аКЛ IgG – антитела к кардиолипину класса IgG, аКЛ IgM – антитела к кардиолипину класса IgM, аβ2ГП1 IgG – антитела к бета-2-гликопротеину IgG, аβ2ГП1 IgM – антитела к бета-2 гликопротеину IgM, МЛД – мультиплексный лайн-дот

Таким образом, новый метод МЛД обеспечивает более высокую эффективность детекции высоких уровней аβ2ГП1 при развернутой

клинической картине АФС, но не у пациентов с СКВ без клинических проявлений АФС.

Далее был проанализирован спектр некритериальных антител, детектируемый методом МЛД, в группах СКВ-ТГВ/АТ и СКВ без тромбозов. В группе СКВ-ТГВ/АТ преобладали антитела к Фс IgG (20%), Фс IgM (20%), Фк IgM (20%), Фк IgG (13,3%), Фи IgG (20%). Антитела к Фи IgG и Фс IgG встречались значительно чаще в группе СКВ-ТГВ/АТ по сравнению с группой СКВ без тромбозов ($p=0,04$, $OR=5,19$; $p=0,02$, $OR=6,93$) (Рисунок 5).

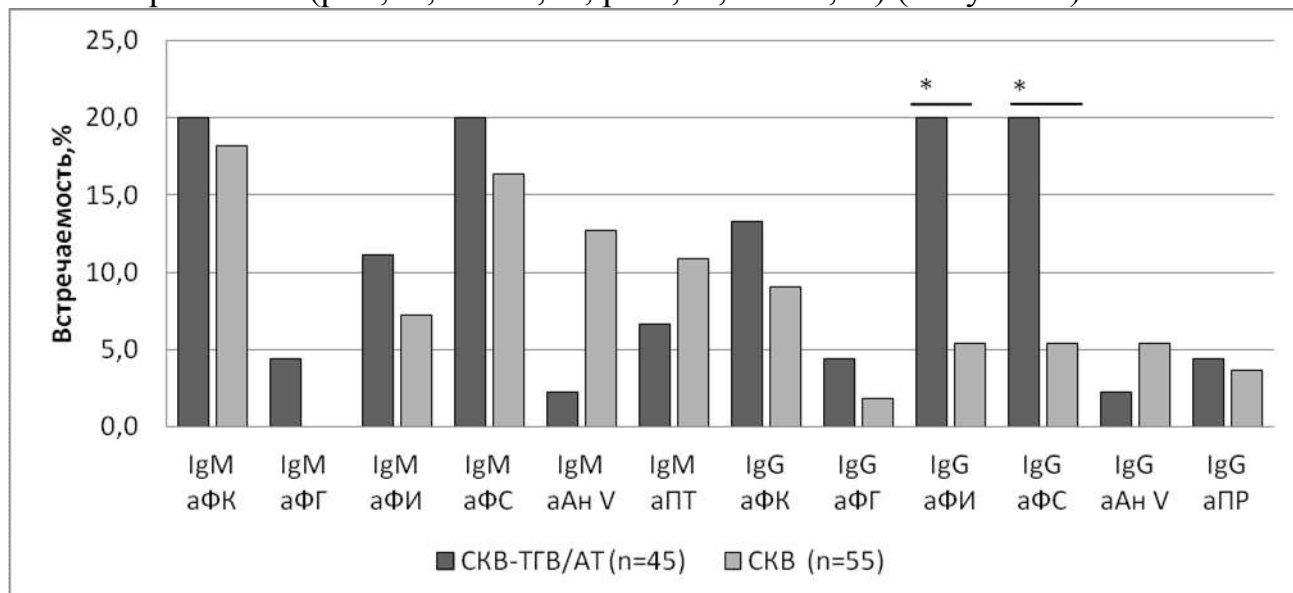


Рисунок 5 - Встречаемость других АФА, измеренных методом МЛД в группах СКВ-ТГВ/АТ и СКВ.
Примечание: аФК – антитела к фосфатидной кислоте, аФС – антитела к фосфатидилсерину, аАн V – антитела к аннексину, аФИ – антитела к фосфатидилинозитолу, аПТ – антитела к протромбину, аФГ – антитела к фосфатидилглицеролу, аФХ – антитела к фосфатидилхолину, аФЭ – антитела к фосфатидиэтаноламину

Были определены аналитические характеристики ИФА тест систем для детекции АФА в группе СКВ. Специфичность АФА тест-систем варьировала в диапазоне от 98% до 100%. Самым чувствительным АФА, определенным методом ИФА, является аβ2ГП1 IgG с чувствительностью 33%. Комбинированная чувствительность МЛД составила 52% со специфичностью 98%. Самым чувствительным АФА, определенным методом МЛД, был аβ2ГП1 IgG.

Оценка спектра антифосфолипидных антител при системной красной волчанке

Феномен множественной положительности критериальных АФА - аКЛ, аβ2ГП1, ВАК - был оценен у пациентов с СКВ-ТГВ/АТ и СКВ без тромбозов. С помощью методов ИФА/ВАК и МЛД/ВАК была проанализирована позитивность по трем АФА и по двум АФА. По результатам исследований ИФА/ВАК у 25% пациентов с СКВ была обнаружена положительность по трем маркерам, в то время как по результатам тестирования МЛД/ВАК - у 19% пациентов, но достоверного различия между двумя методами измерения АФА обнаружено не было ($p > 0,05$). Также не было значимых различий в анализе позитивности по двум маркерам (9% по ИФА/ВАК vs 14% по МЛД/ВАК, $p > 0,05$). Три положительных маркера, измеренные как с помощью ИФА/ВАК и

МЛД/ВАК, чаще обнаруживались у пациентов с СКВ-ТГВ/АТ, чем у пациентов с СКВ без тромбозов (46% против 9% ИФА/ВАК, $p < 0,0001$; 31% против 9% по МЛД/ВАК, $p = 0,001$). В данном контексте позитивность по двум АФА чаще выявлялась в случае МЛД/ВАК (18% vs 7% по МЛД/ВАК, $p < 0,05$; 6% vs 10% по ИФА/ВАК, $p > 0,05$). Далее был проанализирован спектр некритериальных АФА, определенный с помощью МЛД. У пациентов с СКВ-ТГВ/АТ более 4 АФА класса IgG выявлялись чаще, чем у пациентов без тромбозов в анамнезе (25% vs 4%, $p < 0,001$).

Таким образом, был выполнен анализ логистической регрессии между одной дихотомической зависимой переменной (тромбоз, артериальный тромбоз, тромбоз глубоких вен, рецидив тромбоза) и одной или несколькими независимыми переменными, включая аКЛ, а β 2ГП1, антитела к Фк, Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Ан V, Пр IgG/IgM, ВАК, а также пол, возраст, ожирение, индекс активности заболевания СКВ (SLEDAI) и продолжительность заболевания (Таблица 4).

Таблица 4 - Логистический регрессионный анализ антифосфолипидных антител (АФА), измеренный методом МЛД у пациентов с СКВ с тромбозом и без него.

(А)		Коэффициент	СО	ОШ	95% ДИ	P значение
Тромбоз						
	аФс IgG	1,27	0,59	3,58	1,12, 11,34	0,03
АТ						
	аФи IgG	1,64	0,69	5,14	1,33, 19,83	0,02
	Возраст	0,06	0,02	1,06	1,01, 1,11	0,01
ТГВ						
	аФи IgG	1,36	0,62	3,88	1,14, 13,22	0,03
	Ожирение	1,00	0,59	2,72	1,00, 7,39	0,05
Рецидив						
	аФс IgG	1,17	0,61	6,85	2,08, 22,58	0,00
	Возраст	0,04	0,02	1,04	1,00, 1,08	0,03
Тромбоз						
	>4 АФА IgG	2,39	1,14	10,80	1,16, 101,54	0,04
	Возраст	0,04	0,02	1,03	1,00, 1,07	0,04
	ВАК	1,27	0,44	2,21	0,94, 5,21	0,07
АТ						
	>4 АФА IgG	2,68	0,91	14,57	2,46, 86,27	0,00
	age	0,07	0,02	1,06	1,02, 1,12	0,00
ТГВ						
	>4 аАФА IgG	1,76	0,88	5,83	1,04, 32,41	0,0439
	Ожирение	0,99	0,51	5,69	0,99, 7,24	0,05
Рецидив						
	>4 АФА IgG	3,58	1,15	35,90	3,76, 342,78	0,00
	Возраст	0,05	0,02	1,05	1,01, 1,09	0,01

Примечание: аФс – антитела к фосфатидилсерину, аФи – антитела к фосфатидилинозитолу, СО – стандартная ошибка, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал

По результатам логистического регрессионного анализа антитела к Фс IgG является независимым фактором риска тромбоза (отношение шансов [ОШ] 3,6) и рецидивирующего тромбоза (ОШ 6,9) с возрастом в качестве кофактора, в то время как антитела к Фи IgG являются фактором риска для артериального (ОШ 5,1) и венозного тромбоза (ОШ 3,9) с возрастом и ожирением в качестве кофакторов. Кроме того, наличие более чем 4 АФА IgG, выявленных с помощью МЛД, оказалось независимым фактором риска (ОШ 10,9) для тромбоза с возрастом и ВАК в качестве кофакторов. Для показателя «>4 АФА» значение ОШ было выше для АТ (ОШ 14,6) с возрастом в качестве кофактора, чем для ТГВ (ОШ 5,8) с ожирением в качестве кофактора. При рецидивирующем тромбозе значение ОШ для переменной «> 4 АФА IgG» составило 35,9 с возрастом в качестве кофактора.

Клиническое значение определения генов локуса DRB1 при системной красной волчанке

Анализ популяционной частоты генов HLA-DRB1 в Северо-Западном регионе показал, что аллельные гены HLA-DRB*15, HLA-DRB*07, HLA-DRB*13, HLA-DRB*11, HLA-DRB1*01 встречаются чаще всего. Среди больных СКВ HLA-DRB1*15 выявляются у 17,39% (n = 40) пациентов, из которых 2,2% - гомозиготы (n = 5), а DRB1*03 встречаются в 16,52% (n = 38), из которых 0,4% - гомозиготы (n=1), DRB1*07 - в 13,47% (n = 31), из которых 0,8% (n = 2) гомозиготы, DRB*11 - в 12% (n=29). Таким образом, только DRB1*03 имеет статистически значимую связь с заболеваемостью СКВ по сравнению с контрольной группой (p <0,0001, OR 2,17) (Таблица 5).

Таблица 5 - Встречаемость аллелей HLA-DRB1 у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и контрольной группе

Аллельные гены HLA-DRB1	СКВ (n=115)	Контроль(n=1940)	P-значение	ОШ	95% ДИ
*01	21 (9,13%)	488 (12,58%)	0,15	0,69	0,44 - 1,10
*03	38 (16,52%)	324 (8,35%)	< 0,0001	2,17	1,50 - 3,13
*04	24 (10,43%)	405 (10,43%)	0,91	0,99	0,64 - 1,54
*07	31 (13,47%)	535 (13,78%)	0,97	0,97	0,65 - 1,43
*08	10 (4,34%)	147 (3,78%)	0,80	1,15	0,59 - 2,22
*09	1 (0,43%)	74 (1,9%)	0,17	0,22	0,03 - 1,62
*10	0	44 (1,13%)	0,19	0,18	0,01 - 3,04
*11	29 (12,6%)	472 (12,16%)	0,92	1,04	0,69 - 1,55
*12	4 (1,73%)	93 (2,4%)	0,67	0,72	0,26 - 1,97
*13	22 (9,56%)	494 (12,73%)	0,19	0,72	0,46 - 1,13
*14	0	66 (1,7%)	0,08	0,12	0,01 - 2,01
*15	40 (17,39%)	602 (15,52%)	0,50	1,14	0,80 - 1,63
*16	6 (2,61%)	152 (3,92%)	0,40	0,65	0,28 - 1,50

Примечание: HLA - человеческий лейкоцитарный антиген; СКВ - системная красная волчанка; ОШ - отношение шансов; ДИ – доверительный интервал

Далее были проанализированы различия в профиле аутоантител у пациентов с СКВ и различными аллельными вариантами (Таблица 6).

Таблица 6 - Ассоциации антинуклеарных и антифосфолипидных антител и HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*15 среди пациентов с СКВ

HLA-DRB1 AT	DRB1*03/DRB1*X (n=38)		DRB1*04/DRB1*X (n=24)		DRB1*07/DRB1*X (n=31)		DRB1*13/DRB1*X (n=22)		DRB1*15/DRB1*X (n=40)	
	n, (%)	P	n, (%)	P	n, (%)	P	n, (%)	P	n, (%)	P
AT к дсДНК	18(47)	0,20	5 (20)	0,33	17(54)**	0,0027	12(54)	0,09	16(40)	0,12
AT к гист	5(13)	1,00	2(8)	0,75	8(25)*	0,01	6(27)*	0,02	4(10)	1,00
AT к нукл.	9(23)	0,072	3(12,5)	0,77	10(32)**	0,005	5(22)	0,54	9(22)	0,14
AT к Ro52	18(47)*	0,02	3 (12,5)	0,39	9(29)	0,82	7(31)	0,61	16(40)*	0,01
AT к SSa 60	18(47)**	<0,0001	2(8)	0,27	7(22)	1,00	7(31)	0,43	16(40)**	0,0045
AT к RNP/Sm	6(15)	1,00	3 (12,5)	0,91	5(16)	0,78	7(31)*	0,025	7(17,5)	0,31
аβ2ГП1 IgG	9 (23,6)	0,84	11(45)*	0,03	10(32)	0,15	12(54)**	0,003	6(15)	0,06
аβ2ГП1 IgM	8 (21)	0,64	7 (29)	0,16	4(13)	0,79	8(36)*	0,04	7(17,5)	0,06
аКЛ IgG	9(23,6)	0,36	10(41)*	0,04	11(35)	0,02	9(40)	0,05	4(10)	1,00
аКЛ IgM	7(18,4)	1,000	10(41)*	0,02	7(22,5)	1,34	8 (36)	0,09	5(12,5)	0,58
ВАК	12(31)	0,03	10 (41)	0,23	9 (29)	0,66	10(45)	0,13	6(15)	0,22

Примечание: AT – антитела, AT к дсДНК- антитела к двуспиральной ДНК, AT к гист. - антитела к гистонам, AT к нукл. - антитела к нуклеосомам, AT к Ro52 - антитела к Ro-52, AT к SSa60 - антитела к SSa60, AT к RNP / Sm - антитела к RNP/ Sm, аβ2ГП1 - антитела к бета-2 гликопротеину 1, аКЛ - антитела к кардиолипинам, ВАК - волчаночный антикоагулянт

Аллельные варианты DRB1*03/*03 или *03/*X и DRB1*15/*15 или *15/*X связаны с наличием антител к Ro52 и SSa60. В случае выявления генотипа DRB1*07/*07 или *07/X отмечался повышенный риск синтеза антител к дсДНК антител к гистонам, антител к нуклеосомам. У пациентов с СКВ и АФА (аβ2ГП1 IgG, аКЛ IgG и IgM) чаще обнаруживались HLA-DRB1*04. HLA-DRB1*13 был связан с аβ2ГП1 IgG и IgM.

ВЫВОДЫ

1. Мультиплексный лайн-дот чаще выявляет высокие уровни антифосфолипидных антител по сравнению с иммуноферментным анализом, что позволяет увеличить число случаев лабораторного подтвержденного антифосфолипидного синдрома;

2. Анализ спектра антифосфолипидных антител показывает, что при раннем ишемическом инсульте, тромбозах глубоких вен чаще выявляются антитела к фосфатидной кислоте и к фосфатидилсерину классов IgG/IgM, при патологии беременности - антитела к аннексину и фосфатидилхолину IgG/IgM;

3. Выявление более 4-х антифосфолипидных антител класса IgG методом мультиплексного лайн-дота в спектре антифосфолипидных антител при системной красной волчанке ассоциировано с тромботическими осложнениями;

4. Антитела к фосфатидилсерину и фосфатидилинозитолу, выявленные с помощью метода мультиплексного лайн-дота, являются независимыми факторами риска развития тромбозов и их рецидивов;

5. При системной красной волчанке выявление классических антител определяется с одинаковой частотой у пациентов как с артериальными, так и с венозными тромбозами, при этом антитела к фосфатидилинозитолу, фосфатидилсерину, фосфатидиловой кислоте, фосфатидилэтаноламину, аннексину V и протромбину, фосфатидилглицеролу чаще встречаются у пациентов с артериальными, чем с венозными тромбозами;

6. У пациентов с системной красной волчанкой и тромбозами чаще детектируются аллельные формы HLA-DRB1*04 и HLA-DRB1*13, и, таким образом, HLA-DRB1 можно рассматривать как фактор, влияющий на развитие клинических проявлений антифосфолипидного синдрома.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, кардиохирургов, кардиологов, неврологов, ангиохирургов:

1. Мультиплексный лайн-дот для детекции антифосфолипидных антител следует использовать в качестве подтверждающего теста в комплексной серологической диагностике антифосфолипидного синдрома;
2. Для прогнозирования развития рецидивирующих тромбозов при антифосфолипидном синдроме и системной красной волчанке следует оценивать спектр антифосфолипидных антител, включающий антитела к кардиолипину, бета-2 гликопротеину I, фосфатидилинозитолу, фосфатидилсерину, фосфатидиловой кислоте, фосфатидилэтаноламину, аннексину V, протромбину классов IgG и IgM;
3. Для идентификации пациентов с высокой вероятностью развития тромбозов при системной красной волчанке в качестве дополнительного исследования рекомендуется использовать типирование генов по локусу HLA-DRB1;

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективой дальнейшего изучения темы является проведение проспективного исследования теста МЛД у пациентов с различными клиническими формами антифосфолипидного синдрома, увеличение групп обследованных лиц, включение в исследование бессимптомных носителей антифосфолипидных антител. Кроме того, рекомендуется измерение антител к домену 1 и домену 5 бета-2 гликопротеина 1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности «Клиническая лабораторная диагностика»

1. Ткаченко, О.Ю. Практические подходы к лабораторной оценке риска рецидивирующих тромбозов при антифосфолипидном синдроме // Лапин С.В., Мазинг А.В., Эмануэль В.Л./ Медицинский алфавит.- 2019.- Т.4.- №35. - С.16-22.

2. Ткаченко, О.Ю. Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител/ Лапин С.В., Мазинг А.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян А.А.//Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. - Т. 62. - № 1. - С.40-44.

3. Ткаченко, О.Ю. Анализ спектра антифосфолипидных антител у пациентов с тромбозами и привычным невынашиванием беременности /Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян А.А., Роггенбук Д. // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20. - № 5. - С.753-762.

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по другим специальностям

4. Ткаченко, О.Ю. Новые методы выявления антифосфолипидных антител /Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Мазинг А.В., Блинова Т.В., Бутина С.Е., Эмануэль В.Л.// Доктор.Ру.- 2019. - № 10 (165).- С. 57-62.

5. Белолипецкая Е.А. Влияние различных схем иммуносупрессивной терапии на динамику показателей клинико-иммунологической активности у больных системной красной волчанкой с антифосфолипидным синдромом/ Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Мазуров В.И., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Инамова О.В. // Терапия. - 2019. - Т.5. - №6. - С.19-26.

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень SCOPUS и Web of Science:

6. Tkachenko, O. Profiling of non-criteria antiphospholipid antibodies in patients with SLE: differentiation of thrombotic SLE patients and risk of recurrence of thrombosis/S Lapin, A Mazing, V Emanuel, E Belolipetskaia, I Beliaeva, V Myachikova, A Maslyanskiy, B. Gilburd, P Schierack, D Roggenbuck // Lupus.- 2020 – V.29. – №5. – P.490-498.

7. Tkachenko O. Evans syndrome and systemic lupus erythematosus with antiphospholipid syndrome treated with Bortezomib in combination with plasma exchange/ Tkachenko O, Lapin S, Maslyansky A, Myachikova V, Mikhailova L, Gilburd B // Clin Immunol. – 2019. - №199. - P. 44-46.

8. Tkachenko O. Influence of HLA-DRB1 susceptibility alleles on the autoantibodies spectrum of systemic lupus erythematosus in European part of Russia/ Tkachenko O, Lapin S, Maslyansky A, Myachikova V, Guseva V, Belolipetskaia E, Beliaeva I, Mazurov V, Ivanova N, Mikhailova L, Gilburd B.// Autoimmun Rev. - 2019 – V.5. - №18 – P.558-560.

9. Musaelyan A. Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review. Musaelyan A, Lapin S, Nazarov V, Tkachenko O, Gilburd B, Mazing A, Mikhailova L, Shoenfeld Y. // Autoimmun Rev. – 2018. – V.17. – №9. – P.926-934.

Другие публикации и тезисы

10. Белолипецкая, Е.А. Влияние иммуносупрессивной терапии на клинико-иммунологическую активность больных системной красной волчанкой с антифосфолипидным синдромом/ Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Мазуров В.И., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Инамова О.В.// Фарматека. – 2017. – № S4. – С.46-51.

11. Гусева В.И. Клиническое значение определения генов локуса HLA-DRB1 при ревматоидном артрите// Гусева В. И., Лапин С. В., Мячикова В. Ю., Маслянский А. Л., Чухловин А. Б., Иванова Н. Е., Ткаченко О.Ю., Блинова Т. В., Тотолян А. А. / Медицинская иммунология.- 2019.- Т.21 -№2.- С. 333-340.

12. Белолипецкая Е.А. Значение определения аллельных генов HLA-DRB1 и спектра антифосфолипидных антител для прогнозирования ответа на иммуносупрессивную терапию у пациентов с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом / Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Мазуров В.И., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Трофимов Е.А., Инамова О.В.// Эффективная фармакотерапия. – 2018. – № 4. – С.16-21.

13. Ткаченко, О.Ю. Сравнительный анализ информативности тест-систем разных производителей для определения антифосфолипидных антител для диагностики антифосфолипидного синдрома (тезисы)/ Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В // Медицинская иммунология. - 2015.- Т. 17. - № 5. - С. 145.

14. Ткаченко, О.Ю. Детекция антифосфолипидных антител новым методом иммуноблоттинга/ Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В. (тезисы) // Медицинская иммунология – 2017 - Т. 19. № 5. - С. 372.

15. Белолипецкая Е.А. Взаимосвязь клинической активности системной красной волчанки с наличием антифосфолипидных антител / Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Инамова О.В.// Дни ревматологии в Санкт-Петербурге - 2017 сборник тезисов Всероссийского конгресса с международным участием под редакцией Мазурова В.И., Трофимовой Е.А./ 2017. – С.38-39.

16. Белолипецкая Е.А. Роль антител к фосфатидилсерин-протромбиновому комплексу и аннексину V в диагностике антифосфолипидного синдрома у больных с системной красной волчанкой/ Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Инамова О.В.// Дни ревматологии в Санкт-Петербурге - 2017 сборник тезисов Всероссийского конгресса с международным участием под редакцией Мазурова В.И., Трофимовой Е.А./ 2017. – С.38-39.

17. Белолипецкая Е.А. Клиническое значение определения аллельных генов локуса HLA DRB1 у больных с системной красной волчанкой / Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Инамова О.В.// Дни ревматологии в Санкт-Петербурге - 2017 сборник тезисов Всероссийского конгресса с международным участием под редакцией Мазурова В.И., Трофимовой Е.А./ 2017. – С.40-41.

18. Долгова Ю.С. Встречаемость антифосфолипидных антител при наличии отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза и отягощенного тромботического анамнеза (тезисы)/ Еремеева Д.Р., Зайнулина М.С., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю // Акушерство и гинекология Санкт-Петербурга. – 2018. – №2. – С.7-7а.

19. Белолипецкая Е.А. Клинико-иммунологические особенности течения системной красной волчанки с антифосфолипидным синдромом у больных с артериальными тромбозами / Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Инамова О.В.// Дни ревматологии в Санкт-Петербурге - 2018 сборник тезисов Всероссийского конгресса с международным участием под редакцией Мазурова В.И., Трофимовой Е.А./ 2018. – с.25-27.

20. Белолипецкая Е.А. Клиническое значение определения генов локуса HLA-DRB1 у больных с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом/ Белолипецкая Е.А., Беляева И.Б., Мазуров В.И., Лапин С.В., Ткаченко О.Ю., Гусева В.И., Инамова О.В.// Боткинские чтения - сборник тезисов Всероссийского конгресса под редакцией Мазурова В.И., Трофимовой Е.А./ 2018. – с.42-43.

Список сокращений

аβ2ГП1 - антитела к бета-2 гликопротеину 1
Ан V - антитела к аннексину V
аКЛ - антитела к кардиолипину
АПТВ - активированное парциальное тромбопластиновое время
АТ - артериальные тромбозы
АТ к Ro52 – антитела к Ro52
АТ. к гист. – антитела к гистонам
АТ. к RNP/Sm – антитела к RNP/Sm
АТ. к SSa60 - антитела к SSa60
АТ. к дсДНК – антитела к двуспиральной ДНК
АТ. к нукл. – антитела к нуклеосомам
АФА - антифосфолипидные антитела
АФС - антифосфолипидный синдром
Фи - фосфатидилинозитол
Фк - фосфатидная кислота
Фс - антитела к фосфатидилсерину
Фс-Пт - протромбин в комплексе с фосфатидилсеринном
Фх - фосфатидилхолин
Фэ - фосфатидилэтаноламин
β2ГП1 - бета-2 гликопротеин 1
ВАК - волчаночный антикоагулянт
ВАФС – вторичный антифосфолипидный синдром
ВТЭ – венозная тромбоэмболия
ВУ АТ – высокие уровни антител
ПАФС – первичный антифосфолипидный синдром
ПР1 – производитель 1
ПР2 – производитель 2
ПР3 – производитель 3