

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ЭКСТРЕННОЙ И РАДИАЦИОННОЙ
МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ А.М. НИКИФОРОВА»
МЧС РОССИИ

На правах рукописи

**ТКАЧЕНКО
ОЛЬГА ЮРЬЕВНА**

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ РИСКА КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ
АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук профессор
Эмануэль Владимир Леонидович

Санкт-Петербург - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА И ОЦЕНКЕ РИСКА ОСЛОЖНЕНИЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ	16
1.1 Антифосфолипидные антитела и их роль в лабораторной диагностике аутоиммунных заболеваний	16
1.2 Патогенетическое воздействие антифосфолипидных антител.....	24
1.3. Методы измерения антифосфолипидных антител.....	28
1.4 Роль HLA-DRB1 в формировании иммунного ответа при системной красной волчанке и антифосфолипидного синдрома.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1 Группы обследуемых лиц.....	37
2.2 Лабораторные методы исследования	39
2.3 Статистический анализ	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
3.1 Расчет референтных интервалов тест-систем разных производителей для детекции антифосфолипидных антител и волчаночного антикоагулянта	45
3.2 Встречаемость АФА в группах пациентов с тромбозами и невынашиванием беременности, системной красной волчанкой	47
3.3 Сравнение разных тест-систем в группах с ранним ишемическим инсультом, рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и привычным невынашиванием беременности	50
3.4 Сравнение и аналитические характеристики разных тест-систем для детекции АФА у пациентов с системной красной волчанкой.....	57

3.5 Оценка спектра антифосфолипидных антител при системной красной волчанке.....	63
3.6 Клиническое значение определения генов локуса DRB1 при системной красной волчанке.....	66
ОБСУЖДЕНИЕ	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	79
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	82
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Антифосфолипидный синдром (АФС) представляет собой антителоопосредованное аутоиммунное заболевание, которое клинически проявляется рецидивирующими артериальными/венозными тромбозами и/или патологией беременности [12]. 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 [112]. 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 [33].

Серологическая диагностика АФС затруднена тем фактом, что АФА относятся к аутоантителам, которые можно сравнительно часто обнаружить у здоровых лиц [133, 156]. 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 [21, 166]. 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 [34, 55, 106].

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 [47]. В большой когорте пациентов с тромбозом, обследованных на наличие наследственных и приобретенных форм тромбофилий, АФС удалось подтвердить только у 10,5% пациентов [71].

С другой стороны, наиболее частой причиной инвалидизации среди пациентов с АФС являются тромботические осложнения. У 24-48% больных развиваются тромбозы глубоких вен (ТГВ) и в 45% случаев – артериальные тромбозы (АТ), представленные преимущественно транзиторными ишемическими атаками и инсультами [49]. 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 [49].

Таким образом, совершенствование серологической диагностики, а также прогнозирование тромботического риска при АФС для индивидуализации терапии данного 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 клинико-лабораторных индексов тромботического риска [125, 153]. Высокие уровни аКЛ и а β 2ГП1 ассоциированы с клиническими проявлениями АФС. Под высокими уровнями подразумевается концентрация аутоантител более 40 GPL/MPL – Ед/мл [112]. Многие исследования показали, что высокие уровни чаще приводят к тромбозам, чем низкие уровни АФА [67,

173]. У женщин с АФС высокие уровни АФА представляют собой значительный фактор риска неблагоприятного исхода беременности [66, 147]. 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 [123]. Одним из таких методов является мультиплексный лайн-дот (МЛД) с использованием гидрофобной твердой фазы, которая улучшает связывания аутоантител с антигенами АФА [58, 142]. 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.

Наличие генетической предрасположенности необходимо для последующего развития АФС, кроме того, синтез АФА детерминирован генами группы HLA II класса [155]. 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 [90]. 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 [12, 105]. Патогенетически значимые АФА реагируют со скрытым эпитопом белков ко-факторов, наиболее значимым из которых является β 2ГП1[23]. Доказана способность АФА активировать клеточный и плазменный гемостаз, систему комплемента, а также индуцировать прямое антитело-опосредованное повреждение плаценты[107]. К наиболее изученным АФА относятся $\alpha\beta$ 2ГП1 IgG/IgM, α КЛ IgG/IgM и ВАК, которые включены в лабораторные критерии АФС [112].

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) [33, 111]. Данные антитела имеют самостоятельное диагностическое и/или прогностическое значение. Антитела к протромбину в комплексе с фосфатидилсеринем (Фс-Пт) обуславливают активность ВАК и ассоциированы с риском развития тромбозов [147]. Выявление антител к АнV повышает риск

развития осложнений беременности, особенно на фоне СКВ [40,158 При патологии беременности и транзиторной ишемической атаке помимо классических АФА часто выявляются антитела к Фс и Фи [58, 178].

Альтернативой метода ИФА для детекции спектра АФА является метод МЛД. Метод МЛД характеризуется одновременным выявлением нескольких видов АФА и использованием гидрофобной твердой фазы для сорбции антигенов [143]. Диагностическая эффективность МЛД была подробно рассмотрена в ряде исследовательских работ [57, 58, 143, 144]. 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 [99]. 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 [99].

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 трансглутаминазе 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 [38, 85, 97, 121]. Работ по взаимосвязи между иммуногенетическими особенностями и синтезом АФА 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.

Цели и задачи

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 а β 2ГП1, 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 а β 2ГП1 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, указывающей 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 объёмом 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 Заболеваниями (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, клинико-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 работ, включая 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА И ОЦЕНКЕ РИСКА ОСЛОЖНЕНИЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ

1.1 Антифосфолипидные антитела и их роль в лабораторной диагностике аутоиммунных заболеваний

АФС характеризуется сосудистым тромбозом и/или патологией беременности в сочетании со стойким наличием АФА [8]. Диагноз АФС устанавливается на основании клинических и лабораторных критериев. Первые диагностические критерии АФС были разработаны в 1987 году [79]. Первые классификационные критерии АФС были опубликованы в 1999 году экспертами международного симпозиума в японском городе Саппоро [176]. К клиническим критериям были отнесены: (1) объективно подтвержденный сосудистый тромбоз и (2) невынашивание беременности. Лабораторным критериям включали ВАК и β 2ГП1-зависимые аКЛ. В качестве диагностически значимых рассматривались только средние и высокие уровни аутоантител классов IgG и IgM. Повышенные уровни аКЛ должны были быть подтверждены с помощью повторного тестирования не ранее чем через 6 недель для исключения транзиторных АФА.

Диагностические критерии АФС были пересмотрены в 2006 году [112]. Клинические критерии остались неизменными, но некоторые пояснения были добавлены. Временной интервал повторного тестирования АФА был расширен с 6 (критерии Саппоро) до 12 недель, чтобы уменьшить риск детекции транзиторных АФА. Рекомендации по детекции ВАК стали более жесткими, а именно было рекомендовано использование двух или более тестов для измерения ВАК с разными аналитическими принципами, поскольку ни один тест не обладает 100% чувствительностью к ВАК. Был рассмотрен вопрос тестирования ВАК у пациентов, получающих терапию антагонистами витамина К. Не рекомендуется выполнять исследование ВАК при значении международного нормированного отношения

(МНО) > 3,5. При меньшем значении МНО образцы должны быть разбавлены нормальной плазмой.

Были выявлены сложности в измерении аКЛ, а именно низкая межлабораторная сходимость результатов, отсутствие международных стандартов для определения низких, средних и высоких уровней аКЛ, а также установления интервала тех уровней антител, которые лучше всего соответствуют клиническим проявлениям. В результате были введены новые уровни пограничного значения для аКл > 40 GPL или MPL – Ед/мл или > 99-й перцентиль. Наиболее важным изменением в пересмотренных лабораторных критериях было включение аβ2ГП1 классов IgG и IgM, так как данные антитела являются независимым фактором риска развития тромбозов и осложнений беременности.

При определении риска развития тромбоза большое значение придают спектру выявляемых АФА. В нескольких исследованиях была продемонстрирована тесная связь между профилем выявляемых АФА (ВАК, аКЛ, аβ2ГП1) и клиническими проявлениями АФС. Было обнаружено, что при анализе АФА одновременное выявление нескольких аутоантител позволяет определить риск развития тромбоэмболического события или выкидыша [134]. Пациенты, у которых одновременно выявляются средние или высокие уровни аКл, аβ2ГП1 и ВАК, состоят в группе наиболее высокого риска развития клинических проявлений. Поэтому рекомендовано классифицировать пациентов с АФС в исследованиях согласно их серологическому профилю следующим образом: (I) присутствует более одного лабораторного критерия (любая комбинация), (IIa) изолированное выявление ВАК, (IIb) изолированное выявление аКЛ, и изолированное выявление аβ2ГП1(IIc).

Для того, чтобы количественно оценить вероятность развития клинических проявлений АФС, были разработаны расчетные клинико-лабораторные индексы тромботического риска, а именно антифосфолипидная шкала (aPL-s) и шкала глобальной оценки АФС (GAPSS)[125, 153]. Концепция aPL-s и GAPSS позволяет рассматривать АФА не только как диагностический маркер АФС и СКВ, но и как

предиктор развития тромбозов и патологии беременности. Индексы рассчитываются для каждого пациента путем сложения баллов, соответствующих факторам риска. Антифосфолипидная шкала (aPL-s) представляет собой диагностический комплекс тестов АФА, включающий 5 коагуляционных тестов для детекции ВАК и 6 ИФА тестов (аКл, а β_2 ГП1, антитела к Фс-Пт классов IgG/IgM [125]. Индекс aPL-S значимо коррелирует с риском тромботических событий, и в группе наиболее высокого риска состояли пациенты с индексом aPL-s >30. Шкала глобальной оценки АФС (GAPSS) включает аКЛ IgG/IgM, а β_2 ГП1 IgG/IgM, ВАК, антитела к Фс-Пт, гиперлипидемию и артериальную гипертензию [153]. Более высокий индекс выявляется у пациентов с тромбозами и их рецидивами, патологией беременности, при этом индекс GASSP >11 обладает самой высокой чувствительностью и специфичностью.

Согласно рекомендациям Европейской антиревматической лиги (Eular) 2019 года, идентификация факторов риска тромботических проявлений АФС имеет решающее значение в ведении пациентов [164]. Профиль АФА высокого риска включает ВАК, наличие двойной или тройной позитивности АФА и/или персистирующие высокие уровни АФА. Дополнительными факторами риска являются наличие других системных аутоиммунных заболеваний, особенно СКВ, тромботические или акушерские проявления АФС в анамнезе, а также традиционные сердечно-сосудистые факторы риска.

Помимо тромбоза и патологии беременности, ряд других клинических проявлений был описан у АФА-положительных пациентов [14, 48]. Нетромботические неврологические заболевания (эпилепсия, РС-подобное заболевание, мигрень, деменция), тромбоцитопения, патология клапанов сердца, микроангиопатическая нефропатия, ретикулярное ливедо и язвы на коже, когнитивные нарушения – лишь некоторые из возможных проявлений, которые не являются классификационными критериями из-за их низкой специфичности (Таблица 1).

Таблица 1- Некритериальные клинические проявления АФС

Клинические манифестации	Отличительные особенности	Встречаемость
Ретикулярное ливедо	Исходная ассоциация с артериальным тромбозом не подтверждена в проспективных исследованиях	20-25%
Язвы	Часто наблюдается при катастрофическом АФС	около 33%
Патология клапанов сердца	Дополнительный риск вторичной тромбоэмболии	12-33%
Стеноз почечной артерии	Является причиной тяжелой артериальной гипертензии, почечных инфарктов	26%
АФС нефропатия	Ассоциация с осложнениями беременности, внепочечный сосудистый тромбоз и повышенный риск хронической почечной недостаточности среди пациентов с СКВ	35%
Тромбоцитопения	Обычно мягкая, обладает защитным эффектом от тромботического риска	20-25%
Мигрень/головная боль	Спорная ассоциация с АФА из-за высокой распространенности в популяции	20%
Эпилепсия	Во многих, но не во всех случаях, связана с ишемическими событиями; Конфликтные данные о связи между АФА и судорогами при СКВ	6-7%
РС-подобное заболевание	Отсутствие данных о распространенности из-за трудности при дифференциальном диагнозе	-
Когнитивные нарушения	Нарушение внимания и вербальной речи	38%
Деменция	Результат хроническими или рецидивирующими ишемическими событиями	-
Поперечный миелит	Сильная корреляция с АФА у пациентов с СКВ	около 1%

В нескольких исследованиях оценивалось наличие АФА в общей популяции, и диапазон распространенности составил от 1 до 5% для антител аКЛ и ВАК [134]. Распространенность а β 2ГП1 и аКЛ (как IgM, так и IgG) в большой когорте 510 женщин без патологии беременности на 15-18 неделе беременности составила 3,9 и 1,6% соответственно, и чаще детектировались низкие уровни антител. Распространенность а β 2ГП1, аКЛ и ВАК увеличивается с возрастом, в особенности у пожилых людей с хроническими заболеваниями. Однако в большинстве случаев у этих лиц не развиваются клинические проявления АФС [108]. Недавно группа

исследователей АФС «APS ACTION» опубликовала метаанализ литературы, касающийся распространенности АФА у населения в целом с патологией беременности, инсультом, инфарктом миокарда (ИМ) и тромбозами глубоких вен (ТГВ). Согласно результатам данного обзора, АФА выявляются примерно у 13% пациентов с инсультом, 11% с ИМ, 9,5% с ТГВ и 6% пациентов с патологией беременности [26]. Часто патогенетическая взаимосвязь между АФА и конкретной нозологической формой остается неуточненной.

Принято выделять несколько классификационных форм АФС. Пациенты с первичным АФС (ПАФС) не имеют других аутоиммунных состояний, тогда как вторичный АФС (ВАФС) диагностируется, когда критерии АФС выполняются в присутствии другого заболевания - чаще всего СКВ [93]. Так, СКВ является хроническим системным аутоиммунным заболеванием с неизвестным этиопатогенезом. На фоне генетической, гормональной и иммунологической предрасположенности внешние факторы могут играть роль триггера, ведущего к развитию СКВ [3, 60]. Классификационные критерии Американского колледжа ревматологии (ACR)/SLICC 2019 года в качестве иммунологических маркеров включают, помимо белков системы комплемента и СКВ-специфических антител, такие АФА, как ВАК, ложноположительную реакцию Вассермана, аКЛ классов IgA, IgG, IgM и аβ2ГП1 классов IgA, IgG, IgM [27]. Около 40% пациентов с СКВ являются АФА-положительными, однако тромбоз развивается менее чем у 40% больных СКВ [113]. Было показано, что АФС может развиваться у 50-70% пациентов с СКВ после 20 лет наблюдения [124]. Напротив, лишь у немногих пациентов с ПАФС возникает развернутая клиническая картина СКВ и, как правило, это происходит только после длительного периода времени. В течение 10-летнего наблюдения в проекте «Euro-Phospholipid» у 8 пациентов, диагностированных как первичный АФС, синтезировались антитела к дсДНК, и они были реклассифицированы как волчано-подобный синдром, в то время как только три пациента были реклассифицированы как СКВ-ассоциированный АФС [49].

Распространенность АФА среди пациентов с СКВ составляет от 12 до 44% для аКЛ, от 15 до 34% для ВАК и от 10 до 19% для а β 2ГП1 [12, 36]. Возможно, что реальная частота АФА у пациентов с СКВ недооценивается, особенно если у пациентов эти антитела вырабатываются с перерывами или синтез антител снижен под воздействием иммуносупрессивной терапии. Alarcon-Segovia и др. показали, что до 30% пациентов с СКВ и аКЛ не имели признаков АФС во время 7 летнего наблюдения [24]. Напротив, в когорте СКВ Университета Джона Хопкинса риск развития тромбоза у пациентов с положительным ВАК был около 50% через 20 лет наблюдения [25]. Недавно Freire PV и др. ретроспективно проанализировали когорту из 80 пациентов с первичным АФС. У 17,5 % пациентов в течение 5 лет развилась СКВ [62]. В ретроспективном исследовании, проведенном Тарром и его коллегами, было выяснено, что в 26 случаях (7,2%) СКВ манифестировала в форме ПАФС [162]. В течение 5-летнего проспективного наблюдения из 531 пациентов с ПАФС, включенных в исследовании Europhospholipid [48], только у 6 пациентов был поставлен диагноз СКВ. Интересно, что у детей в два раза чаще, чем у взрослых на фоне первичного АФС развивается СКВ [68].

Также АФА обнаруживаются у пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями, инфекциями, онкологическими заболеваниями и при приеме некоторых лекарственных препаратов. Существует тесная связь между синтезом а β 2ГП1 и аКЛ классов IgG/IgM и системной склеродермией: АФА-положительные пациенты чаще страдают от легочной гипертензии, болезни почек, тромбозов и дигитальной ишемии [102]. Первичный билиарный цирроз, аутоиммунный гепатит и первичный склерозирующий холангит в значительной степени ассоциированы с положительными АФА [117]. Связь с тромботическими осложнениями, связанными с АФА на фоне аутоиммунных заболеваний печени, требует дальнейшего изучения. Кроме того, АФА часто выявляются на фоне аутоиммунных заболеваний щитовидной железы [174]. В большинстве случаев этот феномен не имеет клинических последствий и, вероятно, является результатом гиперстимуляции самореактивных В-клонов. Однако редко комбинация неконтролируемой болезни

Грейвса, которая приводит к гиперкоагуляции, и наличие АФА могут способствовать развитию тромбозов. Также АФА, но в еще большей степени аутоиммунное поражения щитовидной железы, являются основными и независимыми факторами снижения фертильности и неблагоприятного исхода беременности.

Было обнаружено важное различие в антигенсвязывающих свойствах между АФА, синтезирующимися на фоне инфекционных процессов, и АФА, характерными для АФС. Так, аКЛ, обнаруженные при АФС, являются « β 2ГП1-зависимыми», т. е. связывание с кардиолипином зависит от присутствия в реакционном буфере сывороточных кофакторов, главным образом β 2ГП1. Напротив, аКЛ пациентов с инфекциями, прежде всего сифилисом, связывают кардиолипин без взаимодействия с сывороточными кофакторами, поэтому такие аКЛ являются « β 2ГП1-независимыми» аутоантителами чаще класса IgM, чем IgG [127]. Таким образом, АФА, возникающие при инфекциях, являются транзиторными и исчезают в течение 2 или 3 месяцев [169]. Эти β 2ГП1-независимые АФА класса IgM редко связаны с клиническими проявлениями АФС. Однако некоторые инфекции иногда ассоциированы с $\alpha\beta$ 2ГП1 или β 2ГП1-зависимыми аКЛ, которые являются причиной тромботических осложнений [26]. Cervera и др. в 2004 году описали клинические и серологические характеристики 100 пациентов с АФС, который был диагностирован на фоне инфекционных процессов [46]. К основным инфекциям, выявленными на фоне АФС, были отнесены кожная инфекция (18%), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (17%), пневмония (14%), гепатит С (13%) и инфекции мочевыводящих путей (10%) [47]. Клиническими проявлениями АФС были легочная патология (39%), поражение кожи (36%) и почек (35%). Особо следует отметить, что катастрофический АФС развивался на фоне инфекций в 40% случаев, тогда как КАФС составляет менее 2% всех случаев АФС. Abdel-Wahab и др. провели масштабный мета-анализ клинических случаев с целью оценить риск синтеза АФА и связанных с ними тромбоэмболических событий и/или патологии беременности после вирусных

инфекций [21]. Вирусная инфекция была ассоциирована с АФС в 55,6%, а именно ВИЧ инфекция и вирус гепатита С чаще всего приводили к тромбозам. Парвовирус В19 чаще выявлялся у бессимптомных АФА-носителей. Таким образом, литературные данные подтверждают высокую встречаемость аКЛ и а β 2ГП1 на фоне различных инфекционных патологий. Однако АФА при инфекционных заболеваниях – это не всегда транзитное явление, и они могут приводить к развернутой клинической картине АФС.

Отдельные клинические случаи и некоторые ретроспективные исследования показали, что частота детекции аКЛ на фоне тромбозов у пациентов с различными злокачественными опухолями, включая солидные опухоли и лимфопролиферативные заболевания, сравнима с общей популяцией. Поскольку онкология является состоянием, предрасполагающим к гиперкоагуляции, не совсем ясно, играют ли АФА роль в развитии тромбоза или являются просто эпифеноменом у больных раком [61]. Существует большое количество противоречивых данных о роли АФА, возникающих на фоне онкологических заболеваний. Показатели распространенности АФА варьируются в широких пределах в зависимости от исследования [110, 126, 136, 152, 177]. Вероятно, это связано с большим разбросом клинических характеристик исследуемых популяций и различными методами, использованными для детекции АФА.

Некоторые лекарственные препараты могут индуцировать синтез АФА, однако не ясно, как часто они приводят к развернутой клинической картине АФС. Группа препаратов, которые могут быть ассоциированы с АФА, включает фенотиазины (хлорпромазин), фенитоин, гидралазин, прокаинамид, хинидин, хинин, этосуксимид, интерферон-альфа, амоксициллин, хлоротиазид, оральные контрацептивы и пропранолол. Биологические препараты и, в частности, ингибиторы фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) (адалимумаб, этанерцепт, налсимаб) также индуцируют синтез аутоантител, включая аКЛ. Одно из возможных объяснений индукции аутоантител у пациентов, получавших анти-TNF- α терапию, заключается в том, что подавление TNF- α приводит к повышению

регуляции интерлейкина-10 (IL-10), который, в свою очередь, активирует аутореактивные В-клетки, которые стимулируют синтез аутоантител [29].

Таким образом, выявление АФА необходимо для диагностики АФС и оценки риска развития клинических проявлений данной патологии в клинической практике. Однако синтез АФА на фоне других аутоиммунных, инфекционных, онкологических заболеваний, а также у здоровых доноров и пожилых людей значительно затрудняет интерпретацию лабораторного исследования.

1.2 Патогенетическое воздействие антифосфолипидных антител

Важно отметить, что АФА являются как диагностическими маркерами, так и патогенетическими факторами АФС. Патогенетическая значимость АФА проявляется высокой частотой развития тромбозов и привычного невынашивания беременности у серопозитивных лиц [5, 113]. Естественный антикоагулянт и иммунорегулирующий белок β 2ГП1 является наиболее подробно изученным ко-фактором АФА, который при взаимодействии с фосфолипидами изменяет конформацию и экспонирует неозпитоп в домене 1 [97]. С учетом экспериментальных данных, полученных *in vitro* и *in vivo*, именно β 2ГП1-зависимые АФА ответственны за тромботические проявления АФС.

Помимо β 2ГП1, АФА реагируют с другими фосфолипидсвязывающими белками, в частности с Пт [1]. Антитела к Пт могут нарушать функцию эндотелиальных клеток в результате взаимодействия с молекулами, экспрессируемыми на клеточной поверхности. Наиболее убедительная связь между данными антителами и тромбозом была обнаружена для антител, направленных против фосфатидилсерин-протромбинового комплекса (Фс-Пт) [37,90,122]. Антитела к Фс-Пт лучше взаимодействуют с конформационными эпитопами протромбина в комплексе с анионными фосфолипидами в присутствии ионов кальция.

К основным АФА-опосредованным протромбогенным механизмам относятся влияние на плазменный гемостаз и на систему естественных антикоагулянтов [13]. Так, АФА также могут увеличить ферментативную активность прокоагулянтов. АФА могут активировать прокоагулянтные факторы, такие как тромбин, протромбин, FVIIa, FIXa и FXa, природные антикоагулянты, такие как протеин С и белки, участвующие в фибринолизе (плазмин и активатор тканевого плазминогена) [72]. АФА взаимодействует с тромбином и фактором Ха, препятствуя образованию тромбин-антитромбинового и фактор Ха-антитромбинового комплекса, таким образом влияя на инактивацию тромбина и фактора Ха. Кроме того, сообщается, что АФА снижает активность активированного протеина С (APC). У пациентов с АФА также обнаруживается снижение уровней протеинов С и протеина S. Кроме того, было показано, что некоторые АФА ингибируют опосредованный плазмином фибринолиз, что в конечном итоге приводит к нарушению растворения фибрина плазмином. Было обнаружено, что некоторые субпопуляции АФА связывают тканевой активатор плазминогена, ингибируя опосредованное им превращение плазминогена в плазмин.

Эффекты АФА также обусловлены их способностью активировать или подавлять функции разных типов клеток, взаимодействуя с фосфолипид-связывающими белками на их мембранах [4, 107]. Воздействие АФА на тромбоциты опосредовано такими механизмами, как активация и разрушение тромбоцитов, снижение их выработки в костном мозге, увеличение пула тромбоцитов и псевдотромбоцитопения [28]. Важным результатом воздействия АФА на тромбоциты является усиление экспрессии гликопротеинов на мембране тромбоцитов (GPIIb/IIIa и IIIa), что приводит к их активации и высвобождению различных прокоагулянтных медиаторов [3, 159]. АФА усиливают экспрессию тканевого фактора на моноцитах периферической крови. У пациентов с АФС экспрессия тканевого фактора повышена и коррелирует с экспрессией β 2ГП1 на моноцитах [41]. Другой мишенью действия АФА являются эндотелиальные клетки. Было показано, что АФА могут реагировать с эндотелиальными клетками, в

основном распознавая $\beta 2$ ГП1, присутствующий на клеточной мембране [128]. $\beta 2$ ГП1-зависимые АФА могут вызывать активацию эндотелиальных клеток с индукцией провоспалительного и прокоагулянтного клеточного фенотипа [52].

Наличие АФА представляет собой фактор риска привычного невынашивания и осложнений беременности (ранняя и тяжелая преэклампсия). Такая причинно-следственная связь была выявлена в нескольких эпидемиологических исследованиях и воссоздается в ряде экспериментальных моделей, где пассивная инъекция АФА класса IgG вызывает потерю плода и замедление роста у беременных мышей [101, 105, 115].

Возможным объяснением такого воздействия АФА является тот факт, что АФА могут индуцировать прокоагулянтное состояние плаценты, приводя к ее тромбозу. Однако морфологические исследования не выявили внутрисосудистых или ворсинчатых тромбов. Одним из основных механизмов повреждения плаценты является способность антител (в частности, $\alpha\beta 2$ ГП1) нарушать антикоагулянтный слой аннексина V в трофобласте и монослой эндотелиальных клеток. Аннексин V высоко экспрессируется на апикальных мембранах плацентарных ворсинчатых синцитиотрофобластов на границе между плодом и плацентой и выполняет роль тромбомодулятора, экранируя слой фосфолипидов. Данный белок требуется для поддержания целостности плаценты [168]. Было обнаружено, что распределение аннексина V, охватывающее межворсинчатые поверхности, оказались значительно более разреженными в плацентах АФА-позитивных женщин, по сравнению с АФА-негативными пациентками. Снижение плацентарной экспрессии аннексина V связано с повышенным риском развития невынашивания беременности [39, 167].

Выявлены также другие патогенетические механизмы, обусловленные воздействием АФА, которые препятствуют нормальной плацентации. Так АФА оказывают прямое воздействие на материнскую децидуальную оболочку и трофобласт. АФА связываются с человеческими трофобластом, индуцируя повреждение клеток и апоптоз, ингибирование пролиферации и образования синцития, снижение продукции хорионического гонадотропина человека,

дефектной секреции факторов роста и нарушения инвазии. Все эти АФА-опосредованные эффекты приводят к нарушению формирования полноценной плаценты и реализации ее функции [109].

Ряд исследований подтверждают участие системы комплемента в индукции АФА-опосредованного невынашивания беременности [19, 70, 109, 138]. Обращают особое внимание на продукт расщепления C5a компонента комплемента C5, который является ключевым эффектором, действие которого опосредовано увеличением экспрессии тканевого фактора нейтрофилами и моноцитами, проникающих в плацентарные ткани [81]. Гепарин, эффективно используемый в терапии пациенток с АФА-опосредованным невынашиванием беременности, обладает в первую очередь ингибирующей активностью в отношении системы комплемента, а уже во вторую очередь препятствует гиперкоагуляции [84].

При биопсии эндометрия у пациентов с АФС были обнаружены нарушенная дифференцировка эндометрия и снижение экспрессии фактора распада комплемента (также известного как CD55). Эти изменения до зачатия могут нарушить имплантацию и привести к последующему выкидышу [34]. Кроме того, β 2ГП1-зависимые АФА способны реагировать с человеческими стромальными децидуальными клетками *in vitro*, вызывая провоспалительный фенотип.

Предполагается, что для реализации данных механизмов действия АФА недостаточно только носительства аутоантител. Для инициации патофизиологических процессов необходимо дополнительное воздействие, которое усугубляет прокоагулянтное действие аутоантител [103]. Чтобы объяснить патогенез тромбозов, принимая во внимание то, что тромботические события происходят относительно редко, несмотря на постоянное присутствие АФА, была предложена «гипотеза двух ударов». Согласно этому принципу аутоантитело («первый удар») индуцирует тромбофилию, но тромбообразование происходит только при наличии инициирующего фактора («второй удар») [104]. Такие факторы, как сердечно-сосудистые риски (гипертензия, диабет и ожирение), приобретенные тромботические риски (например, курение, оральная контрацепция

и беременность), генетические факторы гиперкоагуляции (мутация фактора V Лейдена или II, а также протеинов C и S), и острые инфекции необходимы для запуска патогенетического каскада, приводящего к клинической симптоматике АФС [17].

С другой стороны, патогенетические свойства АФА могут быть обусловлены их эпитопной специфичностью. Недавно было показано, что антитела против β 2ГП1 подразделяются на антитела против домена 1 β 2ГП1, которые связаны с клиническими проявлениями АФС, и антитела к домену 4/5, которые чаще выявляются при инфекционных заболеваниях и не приводят к развернутой картине АФС [50, 99]. В настоящий момент общепризнанного метода выявления патогенетически значимых АФА не существует.

Таким образом, тромботические осложнения при АФС обусловлены механизмами, которые лишь частично объясняют патогенез акушерской патологии. Хотя АФА представляют собой гетерогенное семейство аутоантител, есть доказательства того, что они взаимодействуют с разными конформационными эпитопами β 2ГП1. В последнее время внимание было уделено эпитопной специфичности β 2ГП1-зависимых АФА, однако требуется больше исследований, посвященных влиянию некритериальных антител на течение и прогноз заболевания, а также иммуногенетические исследования могут послужить ключом для лучшего понимания патогенеза АФС.

1.3. Методы измерения антифосфолипидных антител

В большинстве клинических лабораторий для измерения АФА используют ИФА тест-системы [4, 55]. В последние годы были опубликованы рекомендации по измерению АФА с использованием количественного ИФА (Таблица 2) [56].

Таблица 2 - Рекомендации Научного и стандартизационного комитета Международного общества Тромбоза и Гемостаза для измерения антифосфолипидных антител твердофазными тест-системам

<p>1. Отбор пациентов Не рекомендуется назначать исследование на АФА пациентам без соответствующей клинической картины. Следует выполнять тесты пациентам младше 50 лет с венозным/артериальным тромбозом, тромбозами нетипичных локализаций и тромбозами/осложнениями беременности, ассоциированными с аутоиммунными заболеваниями.</p>
<p>2. Забор крови Сыворотка или бедная тромбоцитами плазма с 0.109 М цитратом натрия. В случае использования биоматериала, не указанного производителем, тест должен быть валидирован. Образцы могут храниться при температуре + 2-8 ° С в течение 2-3 дней или при температуре - 20 ° С или ниже для более длительного хранения. Избегать циклов замораживания-оттаивания биоматериала.</p>
<p>3. Выбор теста Рекомендуется выполнять анализы, детектирующие β2ГП1-зависимые аКЛ и аβ2ГП1. В качестве антигена должен быть использован человеческий β2ГП1.</p>
<p>4. Технические характеристики Расхождения между постановками должно быть <20% при ручном методе ИФА и <10% для автоматизированных систем. Контроль качества из набора реагентов, как отрицательный, так и на верхней границе референтного значения, должен быть включен в каждую постановку. Хотя бы один положительный и отрицательный контроль, не включенный в набор реагентов (коммерческий или биоматериал пациента), должен быть включен в каждую постановку. Постановка не прошла, если хотя бы один контрольный образец выходит за допустимый диапазон. Настоятельно рекомендуется участие во внешней системе контроля качества. Пределы обнаружения должны определяться в отрицательном образце с тем же референтным интервалом, что и образцы пациентов. Образцы со значениями выше аналитического диапазона измерения теста должны быть разбавлены и повторно протестированы или указаны как «выше верхнего значения диапазона измерения». Значения ниже пределов обнаружения следует сообщать как «ниже нижнего предела обнаружения». Следует интерпретировать пограничные результаты как сомнительные. Результаты тестов следует оценивать только при наличии тромбоза / осложнений беременности.</p>
<p>5. Интерференции Наличие положительного ревматоидного фактора может приводить к ложноположительным результатам при измерении аβ2ГП1 и аКл класса IgM. Рекомендуется избегать иктеричных, гемолитических, липемических образцов. Гетерофильные антитела и высокие уровни моноклональных иммуноглобулинов могут приводить к ложноположительным результатам.</p>
<p>6. Постановки в дублях или однократный анализ образца Ручной ИФА: повторное тестирование калибраторов, контролей и образцов пациентов. Автоматизированные платформы: оценить неточность; допустимое значение <10%; калибровочная кривая - постановка в дублях.</p>
<p>7. Стандарты и калибровка Всегда необходимо определять соответствие первичному стандарту. Вторичные калибраторы могут использоваться в повседневной практике. В каждой постановке ИФА должна быть включена многоточечная калибровочная кривая (не менее шести точек и охватывающая весь измеряемый диапазон).</p>

Продолжение таблицы 2

<p>8. Подсчет результатов Нет доступных международных единиц. Результаты подсчитываются в соответствии с калибровкой теста. Низкие и высокие результаты представлены как «ниже предела обнаружения» или «выше верхнего значения диапазона измерения».</p>
<p>9. Значения референтного интервала Использовать референтный интервал, рассчитанный для реагентов/приборов, используемых в лаборатории. Необходимо протестировать по меньшей мере 120 плазм или сывороток и рассчитать 99-й процентиль или подтвердить референтный интервал производителя на ограниченном количестве здоровых доноров (не менее 20). Референтный интервал производителя может быть использован, если указан статистический метод, а популяция доноров сопоставима с местным населением. Если это возможно, клинические лаборатории должны проверять референтные интервалы в соответствии с клиническими проявлениями (тромбозами / осложнения беременности) у местного населения.</p>
<p>10. Интерпретация результатов и подготовка отчета Результаты детекции АФА следует интерпретировать с учетом клинической картины. Необходимо выяснить, являются ли результаты положительными или отрицательными в соответствии с методом и референтным интервалом. Следует оценить технические характеристики тест-системы. Нужно подтвердить положительный результат через 12 недель и считать только стойко положительные результаты как клинически значимые и выполнить все три анализа (ВАК, аКЛ и аβ2ГП1) для увеличения диагностической значимости. Интерпретировать комплексно ВАК, аКЛ и аβ2ГП1. Подготовить отчет, включающий результаты анализа и интерпретацию результатов.</p>

Примечание: АФА – антифосфолипидные антитела, аКл – антикардиолипиновые антитела, аβ2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину 1, ВАК – волчаночный антикоагулянт

Они содержат информацию о типе анализируемой пробы, особенностях тестов, расчете референтного интервала и интерпретации результатов, но некоторые вопросы их практического использования остаются без ответа [41]. Несмотря на попытки стандартизации, сохраняются значительные межлабораторные и внутрилабораторные вариации в результатах аКЛ и аβ2ГП1 разных ИФА тест-систем. Различия в результатах измерений возникают из-за методологических проблем при выполнении анализов, различий в калибровке и отсутствия консенсуса в интерпретации как положительных, или отрицательных результатов [20].

Так как высокая вариабельность и низкая специфичность приводят к спорной клинической значимости АФА, целесообразно оценить преимущества новых методов детекции антител, способные преодолеть эти недостатки. В течение

последних нескольких лет были разработаны новые твердофазные методы иммунохимического выявления АФА. Данные методы характеризуются новыми подходами к сорбции антигена, обеспечивая большую плотность антигена на твердофазном носителе [7].

Автоматизированный хемиллюминисцентный анализ (ХА) является альтернативой методу ИФА и имеет ряд существенных преимуществ [83]. Измеряемые антитела, присутствующие в образце, связываются с твердой фазой, представленной магнитными частицами, покрытыми антигеном. При добавлении реагентов, которые вызывают хемиллюминесцентную реакцию, испускаемый свет измеряется оптической системой прибора. Этот сигнал прямо пропорционален концентрации антител АФА в образце. Результаты сравнения диагностических характеристик хемиллюминесцентной технологии и планшетного ИФА для выявления АФА позволили сделать ряд заключений [23]. Во-первых, полностью автоматизированные и компьютеризированные анализаторы значительно сокращают время работы по сравнению классическим методом ИФА. Во-вторых, было установлено, что ХА более эффективен для идентификации пациентов с АФС. Это различие можно объяснить особенностями твердой фазы для сорбции антигена, поскольку в отличие от полистероловых ИФА планшетов магнитные частицы ХА отличаются высокой площадью поверхности и плотностью сорбированного антигена. Кроме того, широкий диапазон измерений, детектируемые с помощью автоматических анализаторов, позволяют добиться очень высокой точности при определении высоких уровней АФА. Таким образом, в диагностике АФС хемиллюминесцентные анализаторы демонстрируют чувствительность, достигающую 100% при специфичности, составляющей 72,3% [120].

Еще одним методом для детекции АФА является МЛД [58]. Особенностью метода МЛД является использование гидрофобной ПВДФ мембраны, которая обладает уникальными свойствами. В отличие от твердой фазы ИФА метода, обычно обладающей слабым отрицательным зарядом, пористая структура мембраны обладает высоким сродством к гидрофобной части фосфолипидов, что

приводит к более плотному распределению фосфолипидов на поверхности мембраны, которая взаимодействует с кофакторами и специфическими аутоантителами. Это позволяет приблизить реакцию *in vitro* к физиологическим условиям связывания аутоантител и антигена, которые происходят *in vivo*. Еще одним преимуществом этого теста для детекции АФА является возможность обнаружения антител против домена 1 β 2ГП1. После связывания β 2ГП1 с отрицательно заряженными иммобилизованными анионными фосфолипидами посредством домена 5, домен 1 образует «верхнюю» часть открытой формы β 2ГП1, которая взаимодействует с АФА. Учитывая высокую плотность гидрофильных участков фосфолипидов на мембране МЛД, домен 4 и домен 5 β 2ГП1 участвуют в связывании иммобилизованных фосфолипидов и больше не доступны для взаимодействия с АФА [118, 142]. для выявления АФА МЛД является эффективной мультипараметрической тест-системой для одновременного полуколичественного обнаружения спектра аутоантител в одном образце. Уникальные свойства этого метода позволяют рассматривать его как инструмент для оценки риска развития клинических проявлений АФС.

1.4 Роль HLA-DRB1 в формировании иммунного ответа при системной красной волчанке и антифосфолипидного синдрома

Основным генетическим фактором, определяющим предрасположенность к развитию аутоиммунных заболеваний, является носительство некоторых аллелей генов человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA). Комплекс генов HLA локализуется на 6 хромосоме и разделен на 3 класса. Высокополиморфные гены HLA классов I и II (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP) кодируют белки, которые участвуют в представлении антигена и формируют главный комплекс гистосовместимости, HLA III класса - множество важных генов иммунной системы (C2, C4A, C4B, TNF- α , лимфотоксин- α , белки теплового шока и CFB) [69]. Эта взаимосвязь была показана на биологических моделях и подтверждена в

популяционных исследованиях, а также методом полногеномного поиска ассоциации (GWAS). Гены HLA класса II играют важную роль в синтезе аутоантител. Например, при целиакии образование антител к трансглутаминазе 2 строго зависит от того, является ли человек носителем HLA-DQ2 или HLA-DQ8 аллелей [5, 38]. Некоторые аллели HLA-DRB1 у пациентов с ревматоидным артритом ассоциированы с синтезом антител к циклическому цитруллинированному пептиду [6, 78]. Аутоантитела при системных васкулитах ассоциированы с полиморфизмом HLA-DQ или с полиморфизмом HLA-DP в зависимости от антигенной специфичности [15]. Анализ взаимосвязи аутоантител к островковым клеткам поджелудочной железы при диабете 1 типа с полиморфизмами генов HLA показал, что антитела к GAD65 ассоциированы с HLA-DQB1, тогда как антитела к IA-2A - с HLA-DRB1 [78]. Эти данные свидетельствуют о том, что разные специфичности Т-клеток объясняют связь различных аллелей HLA с конкретными аутоантителами.

Ряд исследований указывают на взаимосвязь между носительством некоторых аллелей генов HLA и СКВ. На данный момент вклад HLA-DRB1 в развитие СКВ был широко изучен в разных популяциях. В европейской популяции с СКВ ассоциированы в большей степени аллели HLA-DRB1*03:01 и HLA-DRB1*15:01. Гаплотипы, содержащие аллели HLA-DRB1*03, соответствуют серотипу DR3, а гаплотипы, содержащие аллели HLA-DRB1*15 или HLA-DRB1*16, - серотипу DR2. Аллели HLA-DRB1 значительно связаны с предрасположенностью к СКВ и в других этнических группах: * 15:03 - у афроамериканцев [160], *08:02 - у латиноамериканцев [139], *15:01 и *15:02, *08:02 и *04:01 - у азиатов [81, 157].

Помимо увеличения общего риска развития СКВ, некоторые аллели генов HLA связаны с повышенным риском синтеза антинуклеарных аутоантител [74]. Согласно гипотезе молекулярной мимикрии, микробные пептиды, содержащие гомологичные последовательности с аутоантигенами, стимулируют аутореактивные Т-клетки. В норме количество этих аутореактивных Т-клеток снижается посредством влияния Т-регуляторных клеток. У пациентов с СКВ этот процесс

нарушен, что приводит к значительному накоплению кросс-реактивных Т-клеток и интенсивному синтезу аутоантител у носителей СКВ-ассоциированных аллелей HLA-DRB1. Это может быть объяснено тем, что Т-регуляторные клетки могут быть подвержены неэффективной позитивной селекции в отношении некоторых аллелей генов HLA II класса [130]. Механизмы, опосредованные аутореактивными Т-клетками в течение ряда лет, приводят к разнообразию и сложной специфике аутоантител. Благодаря этому процессу образуются пулы органоспецифичных аутореактивных эффекторных Т-клеток, поражающие органы-мишени при СКВ. Гаплотипы HLA, включающие DRB1*1501/DQB1*0602 (DR2), ассоциированы с антителами против Sm, тогда как гаплотипы HLA DRB1*0301/DQB1*0201 (DR3) связаны с антителами к Ro и La антигенам. У носителей гаплотипов DR2 / DR3 преимущественно детектируются антитела против Ro, La и Sm антигенов [74].

В настоящее время также ясно, что наличие генетической предрасположенности необходимо для последующего развития АФС. Связь с HLA-гаплотипами описывалась в семейных клинических случаях АФС. Были обнаружены гаплотипы A30, Cw3, B60, DR4, DRw53 и DQw3 в сочетании с аКЛ у всех членов английских канадских семей с СКВ, АФС и аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы [98, 146]. Большинство исследований генетической предрасположенности ВАФС были посвящены СКВ и аКЛ. Galeazzi и др. провели масштабное исследование, включающее около 600 пациентов с СКВ европейского происхождения, и проанализировали ассоциацию аКЛ и $\alpha\beta 2$ ГП1 с аллелями HLA II класса [65, 154]. В этой работе впервые было показано, что аКЛ и $\alpha\beta 2$ ГП1 связаны с аллелями HLA-DRB1*0402 и DRB1*0403 локуса DRB1*04 [65, 154]. Также были обнаружены ассоциации аКЛ IgA и синдрома Рейно с DRB1*07 и DQA1*0301, гемолитической анемии и аКЛ IgM с DQA1 * 0301, тромбоцитопении и аКЛ IgG с DRB3*0301.

Совсем недавно клинические и аллельные ассоциации HLA II класса были обнаружены и для других АФА, таких как антитела к ПТ, аАн V, к протеину С и протеину S в однородной группе из 136 европейских пациентов с СКВ [155]. Были

обнаружены ассоциации между антителами к ПТ и HLA-DQB1*0301, DQA1*03, DRB1*04, что совпадает с ранее полученными данными относительно β 2ГП1. Также было обнаружено, что уровень антител к АнV положительно коррелирует с HLA-DRB1*08 и отрицательно - с HLA-DQA1*0102 [154]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что выработка АФА находится под генетическим контролем.

Помимо индукции выработки АФА, некоторые аллели HLA класса II влияют на уровень патогенетического воздействия АФА. E. Papalardo и др. исследовали выработку АФА у иммунизированных человеческим β 2ГП1 мышей, в том числе у MHC II $-/-$ нокаутированных мышей [129]. Недостаток аллелей MHC класса II приводил к снижению продукции АФА. Исследователи также пришли к выводу, что как уровень антител, так и уровень патогенетического воздействия АФА, продуцируемых во время прогрессирования АФС, по-видимому, зависят от экспрессии соответствующих аллелей MHC класса II. Таким образом, восприимчивость к АФС может быть связана с эффективностью, с которой аллели HLA класса II представляют антигены, которые сходны с β 2ГП1. Учитывая тот факт, что HLA класса II является одной из наиболее полиморфных групп генов, необходимы дополнительные исследования для уточнения роли этих аллелей в представлении специфических β 2ГП1-эпитопов, а также их влияния на уровень патогенетического воздействия АФА.

Проведенные исследования продемонстрировали высокую частоту выявления новых HLA-аллелей в российских популяциях [9]. Были опубликованы данные относительно взаимосвязи HLA-DRB1 и рассеянного склероза, болезни Крона, сахарного диабета 1 типа, целиакии в российской популяции [2, 10, 18, 40, 100], но нет исследований об ассоциации HLA-DRB1 с СКВ. Несмотря на то, что большинство исследователей выявили связь между аллелями HLA и СКВ, только в некоторых исследованиях пытались взглянуть на отношения между данными генетическими маркерами и активностью СКВ, а также спектром клинических проявлений и аутоантител.

Поэтому представляется целесообразным охарактеризовать иммунологические и иммуногенетические факторы риска клинических проявлений АФС, а именно спектр АФА, исследованный как методом классического ИФА, так и новым методом МЛД. Также следует оценить клиническое значение некритериальных АФА, а также роль генов локуса HLA-DRB1 в диагностике и оценке риска развития клинических проявлений АФС. Полученные результаты клинико-диагностической и прогностической значимости исследованных маркеров позволят повысить клиническую информативность лабораторной диагностики АФС, прогнозирования риска развития тромбозов и невынашивания беременности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Группы обследуемых лиц

2.1.1. На базе кафедры неврологии ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова и Городской больницы № 26 были обследованы 44 пациента с диагнозом «острое нарушение мозгового кровообращения» (ОНМК). Из них 25 пациентов (12 мужчин, 13 женщин) в возрасте от 34 до 50 лет перенесли ОНМК в вертебро-базилярном бассейне, 19 пациентов (12 мужчин, 7 женщин) в возрасте от 35 до 50 лет перенесли ОНМК в каротидном бассейне. У 36 пациентов ОНМК был первичный, у 8 пациентов – повторный. Среднее значение по шкале NIHSS составило $4,3 \pm 4,8$ баллов.

Критериями включения в исследование были возраст <50 лет, наличие диагноза «Острое нарушение мозгового кровообращения» на момент госпитализации, подтвержденного клиническими, инструментальными и лабораторными методами диагностики.

Критериями исключения из группы были наличие кардиальной патологии, артериальной гипертензии, сахарного диабета 1 и 2 типа, атеросклероза сосудов, значение индекса массы тела более 30, врожденные тромбофилии, болезни почек, онкологических заболеваний, лимфопролиферативных заболеваний, туберкулеза, острых инфекций, хронических вирусных инфекций, приема пероральных контрацептивов.

2.1.2. На базе ФГБНУ «НИИ акушерства гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» были обследованы 45 беременных женщин в возрасте от 24 до 40 лет с 2 и более невынашиваниями беременности на ранних сроках в анамнезе. Из них у 10 женщин было 3 и более невынашивания на ранних сроках беременности в анамнезе.

Критериями включения в исследование были наличие беременности, >2 выкидышей в анамнезе.

Критериями исключения из группы были анатомические, гормональные, генетические причины невынашивания, онкологические заболевания, туберкулез, инфекционные заболевания, наследственные тромбофилии.

2.1.3. На базе Центра Флебологии были обследованы 27 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей (14 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 26 до 76 лет. У 15 пациентов было 2 и более тромбоза глубоких вен в анамнезе. Все тромбозы были подтверждены инструментальными методами ультразвуковой доплерографии, флебографии, компьютерной томографии, магнитно-резонансная томографии.

Критериями включения в исследование были наличие тромбоза глубоких вен нижних конечностей в анамнезе, подтвержденное клиническими, инструментальными и лабораторными методами диагностики.

Критериями исключения из группы были наличие кардиальной патологии, артериальной гипертензии, сахарного диабета 1 и 2 типа, атеросклероза сосудов, индекса массы тела более 30, врожденные тромбофилии, болезни почек, гиперхолестеринемии, дислипидемии, наследственности относительно раннего начала сердечно-сосудистых заболеваний в семье, онкологических заболеваний, лимфопролиферативных заболеваний, туберкулеза, острых инфекций, хронических вирусных инфекций, прием пероральных контрацептивов.

2.1.4. На базе ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» и СПб ГБУ "Клиническая ревматологическая больница №25" были обследованы 100 пациентов с диагнозом «системная красная волчанка». Возраст, пол, длительность течения, клинические проявления АФС, а также наличие фотодерматоза, высыпаний, алопеции, язвы, синдрома Рейно, артрита, поражения почек, иммунологические показатели, наличие анемии, тромбоцитопении, лимфоцитопении и другие проявления СКВ регистрировались для каждого пациента. Диагноз СКВ основывался на стандартных клинических, лабораторных, радиологических и гистопатологических методах в соответствии с классификационными критериями SLICC 2012[134].

Критерии включения в исследование: диагноз «системная красная волчанка», подтвержденная клиническими, инструментальными и лабораторными методами диагностики, возраст > 18 лет.

Критериями исключения из группы были онкологические заболевания, инфекционные заболевания, лимфопролиферативные заболевания, прием оральных контрацептивов.

2.1.5. В контрольную группу вошли 30 практически здоровых лиц без клинических проявлений системных аутоиммунных заболеваний (5 мужчин, 25 женщин) в возрасте от 36 до 52 лет.

От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на предоставление крови и генетического материала для исследования, а также на обработку, систематизацию, хранение и использование персональных данных.

2.2 Лабораторные методы исследования

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 [6], произведен расчет внутрилабораторного референтного интервала (РИ) непараметрическим методом 99 перцентиль для каждой из ИФА 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. Для исследования ВАК венозную кровь забирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,2 % цитрата натрия. Во всех случаях антикоагулянт в пробирках был комнатной температуры, соотношение крови и антикоагулянта составляло 9:1. Было выполнено двойное центрифугирование каждого из образцов: первое центрифугирование на скорости 2000 g, 15 мин, при комнатной температуре, затем повторное центрифугирование супернатанта в течение 10 мин при более высокой (3000 g) скорости.

Всем пациентам был проведен скрининг системы гемостаза: протробин, активированное парциальное тромбопластиновое время, тромбиновое время. ВАК был измерен в соответствии с рекомендациями Международного общества по тромбозу и гемостазу 2012 года. Для измерения ВАК мы использовали автоматический коагулометр (Sysmex CS-5100, Япония) и 2 набора коммерчески доступных реагентов - LA1 (скрининговый) и LA2 (подтверждающий) реагенты и реагенты для определения активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) Dade Actin FSL (скрининговый) и Dade Actin FS (подтверждающий) реагенты (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Германия). Скрининговый реагент LA1 и подтверждающий реагент LA2 - тесты для измерения времени свертывания плазмы, активированного разбавленным ядом гадюки Рассела (dilute Russell viper venom time - dRVVT). Скрининговый реагент LA1 - бедный фосфолипидами реагент DRVV для скрининга на наличие ВАК, подтверждающий реагент LA2 - богатый фосфолипидом реагент DRVV для нейтрализации ингибирующего эффекта ВАК. Dade Actin FSL и Dade Actin FS

реагенты – бедный фосфолипидами и богатый фосфолипидами реагенты для измерения АПТВ.

Если время свертывания плазмы пациента в 2-х скрининговых тестах (с LA1 Dade Actin FSL реагентами) укладывалось в нормальный диапазон, то результаты теста оценивались как отрицательные. В случае удлинения времени свертывания плазмы выполнялся тест с подтверждающими реагентами (LA2 или Dade Actin FS).

Результаты скрининговых тестов были выражены в виде скринингового отношения (СО)

$$CO = \frac{T_6}{T_H} \quad (1)$$

, где T_6 – время скринингового теста (например, время разбавленного яда гадюки Рассела) плазмы больного;

T_H – время скринингового теста нормального пула бедной тромбоцитами донорской плазмы;

Результаты подтверждающего теста (с избыточной концентрацией фосфолипидов) также представлялись в виде подтверждающего отношения (ПО)

$$PO = \frac{T_6}{T_H} \quad (2)$$

, где T_6 – время подтверждающего теста плазмы больного;

T_H – время того же подтверждающего теста нормального пула бедной тромбоцитами донорской плазмы;

Окончательное решение о наличии в плазме больного ВАК принимали после вычисления Нормализованного Отношения (НО) по формуле

$$HO = \frac{CO}{PO} \quad (3)$$

Тест смешивания, а именно смешивание исследуемой плазмы с плазмой здоровых доноров ($n=20$), мы использовали в случае удлинения времени свертывания как скринингового, так и подтверждающего тестов. Это было необходимо для исключения дефицита факторов II, V и X. Смешивание исследуемой плазмы с пулом плазмы здоровых доноров восполняет недостаток

любых факторов в плазме пациента. Если тест смешивания также прологирован, это указывает на то, что в плазме пациента присутствует ингибитор ВАК. Результат выражался в виде индекса циркулирующего антикоагулянта (ИЦА) и рассчитывался по формуле

$$\text{ИЦА}=(b-c)/a \times 100, \quad (4)$$

где a = АПТВ плазмы пациента;

b = АПТВ смешанной плазмы пациента с плазмой здоровых доноров ($n=20$) в соотношении 1:1;

c = АПТВ плазмы здоровых доноров;

Все тесты, а также нормализованное отношение ВАК и индекс циркулирующего антикоагулянта были валидированы на плазме 20 здоровых доноров ($n=20$).

В группе СКВ были измерены также титр и тип свечения антинуклеарного фактора, уровень антител к двуспиральной ДНК, наличие аутоантител против ядерных антигенов (Sm, нуклеосомы, гистоны, PCNA, SS-A 60 кДа, SS-A 52 кДа, SS-B, CENP-B, Scl-70, Sm, nRNP-Sm, Jo-1, PM/Scl), концентрации компонентов системы комплемента C3 и C4.

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).

2.3 Статистический анализ

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 процентиль).

Так как результаты измерений АФА показали ненормальное распределение, референтный интервал был рассчитан с помощью метода 25 и 99-й процентиль. Для оценки сходимости тест-систем разных производителей был использован коэффициент Каппа Коэна. Коэффициент Карра <0 расценивался как «нет сходимости», между 0,00 и 0,20 - «слабая сходимость», между 0,21 и 0,40 - «низкая сходимость», между 0,41 и 0,60 - «удовлетворительная сходимость», между 0,61 и 0,80 - «хорошая сходимость», между 0,81 и 1,00 - «почти идеальная сходимость».

Данные были описаны как числа и проценты для номинативных переменных и медианы с межквартильными диапазонами для количественных переменных. У-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, а β 2ГП3, 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Расчет референтных интервалов тест-систем разных производителей для детекции антифосфолипидных антител и волчаночного антикоагулянта

Для детекции аβ2ГП1, аКл IgM, аКл IgG были использованы ИФА тест-системы ПР1 и ПР2. Для каждой из тест-систем была рассчитана верхняя граница референтного интервала (ВГРИ) методом 99-й перцентиль. Для этой цели АФА были измерены в группе, включающей 30 здоровых доноров без клинических проявлений аутоиммунных заболеваний. Полученные референтные интервалы не отличались от референтных интервалов производителей (Таблица 3).

Таблица 3 - Сравнение верхней границы референтного интервала производителя и верхней границы референтного интервала, полученные в группе 30 здоровых доноров

Тест-система	ВГРИ производителя (УЕ/мл)	Внутрилабораторная ВГРИ 99-й перцентиль (УЕ/мл)
аβ2ГП1 ПР1	>20	19,1
аβ2ГП1 ПР2	>10	7,5
аКл IgG ПР1	>10	3,8
аКл IgG ПР2	>12	9,6
аКл IgM ПР1	>10	7,2
аКл IgM ПР2	>12	7,1

Примечание: ПР1 - Euroimmun (Германия), ПР2 - Orgentec Diagnostica (Германия), ПР3 - Medipan (Германия); ВГРИ – верхняя граница референтного интервала: рассчитана непараметрическим методом 99 перцентиль при детекции АФА в группе 30 здоровых доноров

В группе, включающей 30 здоровых доноров без клинических проявлений аутоиммунных заболеваний, АФА были измерены также с помощью МЛД. Для каждого из АФА был рассчитана ВГРИ методом 99-й перцентиль (Таблица 4).

Таблица 4 - Верхние границы референтного интервала для антител, измеренных с помощью мультиплексного лайн-дота, полученные в группе 30 здоровых доноров

Антифосфолипидные антитела класса IgM	Внутрилабораторная ВГРИ 99-й процентиль (ОП)	Антифосфолипидные антитела класса IgG	Внутрилабораторная ВГРИ 99-й процентиль (ОП)
аКЛ	30	аКЛ	30
аФК	30	аФК	30
аФС	30	аФС	30
аФХ	30	аФХ	30
аФИ	30	аФИ	30
аФГ	30	аФГ	30
аФЭ	30	аФЭ	30
аПР	30	аПР	30
а β 2ГП1	30	а β 2ГП1	30
аАн V	30	аАн V	30

Примечание: аКЛ – антитела к кардиолипину, аФК – антитела к фосфатидной кислоте, аФС – антитела к фосфатидилсерину, аФХ- антитела к фосфатидилхолину, аФИ – антитела к фосфатидилинозитолу, аФГ – антитела к фосфатидилглицеролу, аФЭ – антитела к фосфатидилэтаноламину, аПР – антитела к протромбину, а β 2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину, аАн V – антитела к аннексину V

Расчет референтных интервалов коагуляционных тестов для определения ВАК был произведен при использовании LA1 (скрининговый) и LA2 (подтверждающий) реагентов и реагентов для определения АПТВ Dade Actin FSL (скрининговый) и Dade Actin FS (подтверждающий) (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Германия). Была произведена оценка времени свертываемости крови в плазме 30 здоровых доноров без клинических проявлений аутоиммунных заболеваний. Для каждого из тестов был рассчитан внутрилабораторный референтный интервал (Таблица 5).

Таблица 5 - Референтные интервалы коагуляционных тестов для определения волчаночного антикоагулянта, полученные в результате валидации на 30 здоровых доноров

Реагенты	Нормальные диапазоны, сек.
LA1	31,0 - 44,0
LA2	30,0 - 38,0
Dade Actin FSL	26,5 - 37,0
Dade Actin FS	25,2 - 36,0
Нормализованное отношение	0,8 - 1,2
ИЦА	< 18

Примечание: LA1 - скрининговый реагент теста с ядом гадюки Рассела, LA2 – подтверждающий реагент теста с ядом гадюки Рассела, Dade Actin FSL - бедный фосфолипидами АПТВ тест, Dade Actin FS - богатый фосфолипидами АПТВ тест, ИЦА – индекс циркулирующего антикоагулянта

3.2 Встречаемость АФА в группах пациентов с тромбозами и невынашиванием беременности, системной красной волчанкой

Для определения встречаемости в биообразцах пациентов с ранними ишемическими инсультами, тромбозами глубоких вен, патологией беременности аβ2ГП1, аКл IgG, аКл IgM были измерены на ИФА тест-системах ПР1 и ПР2, а также с помощью МЛД (Таблица 6). 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 6 - Встречаемость АФА (а β 2ГП1, 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%)
	а β 2ГП1	8 (18%)	1 (3,7%)	3 (6,8%)
ПР2	аКЛ	11 (24%)	2 (7,4%)	14 (31,8%)
	а β 2ГП1	16 (35%)	2 (7,4%)	10 (22,7%)
МЛД	аКЛ	11(24%)	6 (22,2%)	2 (4,5%)
	а β 2ГП1	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, а β 2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину

Был проведен корреляционный анализ в группе пациентов с ранними ишемическими инсультами, тромбозами глубоких вен, патологией беременности, в результате которого ни для одного из производителей не было обнаружено связи между ВАК и АФА (Таблица 7).

Таблица 7 - Корреляционный анализ между волчаночным антикоагулянтом и антифосфолипидными антителами у пациентов с ранним ишемическим инсультом, тромбозами глубоких вен, патологией беременности

АФА	Коэффициент Спирмана	P значение
аКЛ IgG, ПР1	0,01	0,96
аКЛ IgG, ПР2	-0,16	0,15
аКЛ IgG, МЛД	-0,01	0,94
аКЛ IgM, ПР1	-0,03	0,76

Таблица 7 - Продолжение

АФА	Коэффициент Спирмана	P значение
аКЛ IgM, ПР2	-0,15	0,20
аКЛ IgG, МЛД	0,08	0,48
аКЛ IgM, МЛД	0,07	0,52
аβ2ГП1, ПР1	-0,11	0,33
аβ2ГП1, ПР2	-0,09	0,42
аβ2ГП1, МЛД	0,01	0,69

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.

Для определения встречаемости АФА у пациентов с СКВ аβ2ГП1, аКл IgG, аКл IgM были измерены на ИФА тест-системах ПР2, а также методом МЛД (Таблица 8).

Таблица 8 - Встречаемость АФА в группе пациентов с системной красной волчанкой

Тест-система	АФА	Пациенты с системной красной волчанкой (n=100)
ПР2	аКл IgG	26 (26%)
	аКл IgM	16 (16%)
	аβ2ГП1IgG	28 (28%)
	β2ГП1IgM	23 (23%)
МЛД	аКл IgG	15 (15%)
	аКл IgM	10 (10%)
	аβ2ГП1IgG	27 (27%)
	β2ГП1IgM	27 (27%)
ВАК		41 (41%)

Примечание: АФА – антифосфолипидные антитела, 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, ПР2 – производитель 2, МЛД – мультиплексный лайн-дот

В результате корреляционного анализа была обнаружена взаимосвязь между ВАК и АФА. В результате исследования была обнаружена прямая корреляция между ВАК и повышением уровня аКЛ IgM, аКЛ IgG, аβ2ГП1 IgG, аβ2ГП1 IgM, измеренных как методом МЛД, так и ИФА (Таблица 9).

Таблица 9 - Корреляционный анализ между волчаночным антикоагулянтом и антифосфолипидными антителами у пациентов с системной красной волчанкой

АФА	Коэффициент Спирмана	P значение
аКЛ IgM, ИФА	0,41	< 0,0001
аКЛ IgG, ИФА	0,55	< 0,0001
аβ2ГП1 IgG, ИФА	0,48	< 0,0001
аβ2ГП1 IgM, ИФА	0,32	< 0,001
аКЛ IgM, МЛД	0,27	< 0,001
аКЛ IgG, МЛД	0,27	< 0,001
аβ2ГП1 IgG, МЛД	0,30	< 0,001
аβ2ГП1 IgM, МЛД	0,38	< 0,001

Примечание: АФА – антифосфолипидные антитела, 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, ИФА – иммуноферментный анализ, МЛД – мультиплексный лайн-дот

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

Антитела аКл IgG и аКл IgM, аβ2ГП1 IgGAM были измерены у пациентов с ранним ишемическим инсультом, рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и невынашиванием беременности. При сопоставлении результатов ИФА тест-систем разных производителей для детекции АФА значения каппа/коэффициента Коэна составили 0,045 для аβ2ГП1, 0,061 - для аКл IgM, 0,068 – для аКл IgG, и сходимость тест-систем ПР1 и ПР2 оказалась крайне низкой (Таблица 10). При сравнении результатов детекции АФА ИФА тест-системами ПР1 и МЛД ПР3 сходимость для аβ2ГП1, аКлIgM, аКл IgG составила 0,045, 0,061, 0,068,

ИФА тест-систем ПР2 - 0,200, 0,246 и 0,084 соответственно. Низкую сходимость для всех тестов продемонстрировали тест-системы ПР1 и ПР2. При сопоставлении ПР2 и ПР3 удовлетворительная сходимость была обнаружена при измерении аКЛ IgM. Сходимость всех тестов оказалась удовлетворительной при сопоставлении ИФА тест-систем ПР2 и МЛД (Таблица 11, Таблица 12)

Таблица 10 - Сходимость ИФА тест-систем разных производителей (ПР1 и ПР2)

АФА	Карра	Сходимость
аβ2ГП1	0,17	Низкая
аКл IgM	0,11	Низкая
аКл IgG	0,15	Низкая

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

Таблица 11 - Сходимость нового метода МЛД ПР3 и ИФА тест-систем ПР1

АФА	Карра	Сходимость
аβ2ГП1	0,18	Низкая
аКл IgM	0,24	Удовлетворительная
аКл IgG	0,08	Низкая

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

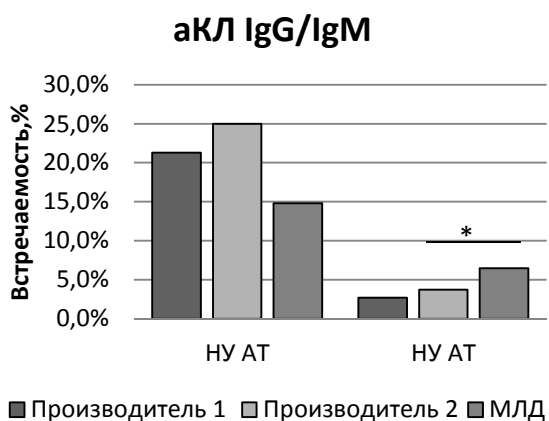
Таблица 12 - Сходимость нового метода МЛД ПР3 и ИФА тест-систем ПР2

АФА	Карра	Сходимость
аβ2ГП1	0,32	Удовлетворительная
аКл IgM	0,23	Удовлетворительная
аКл IgG	0,21	Удовлетворительная

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

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). 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.

А)



Б)

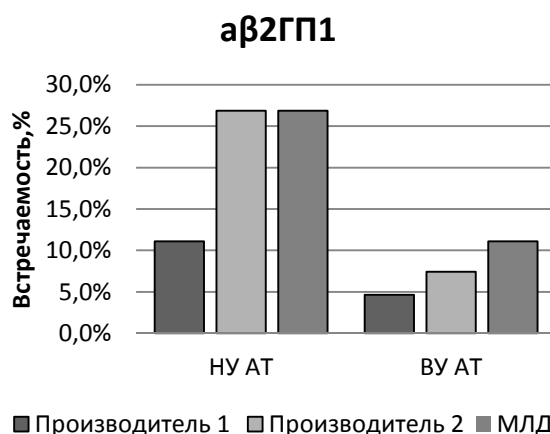


Рисунок 1 – А) Встречаемость антител к кардиолипину IgG/IgM, измеренного ИФА тест-системами производителя 1, производителя 2 и МЛД;

Рисунок 1 - 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

Так как одним из преимуществ МЛД является возможность обнаружения 10 видов АФА, была оценена частота выявления как аβ2ГП1, аКл, так и других АФА – антител к Фк, Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Ан V и аПр (Рисунок 2).

В общей когорте пациентов чаще всего обнаруживались, а β 2ГП1, 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%).

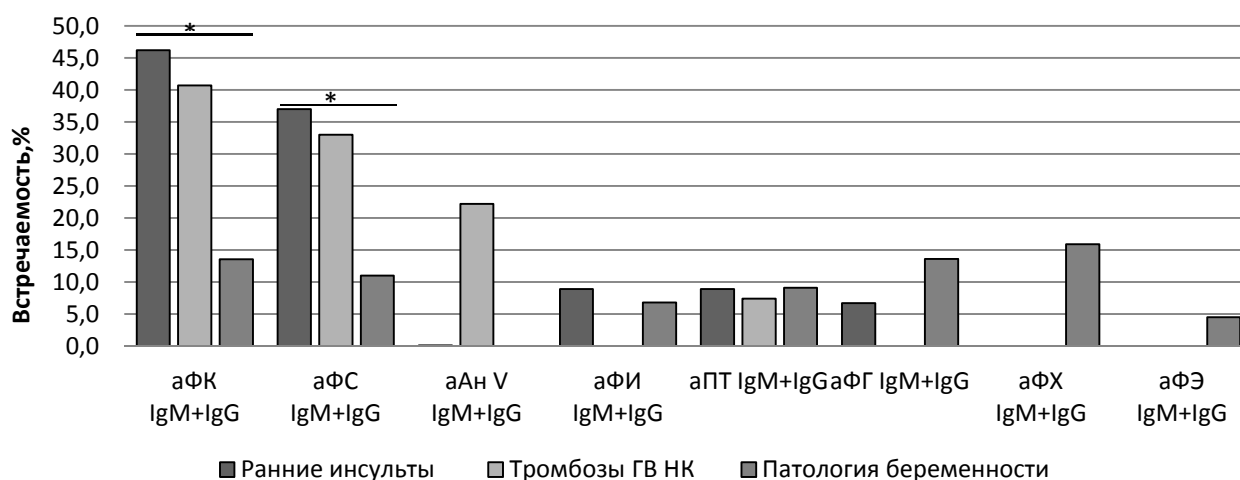


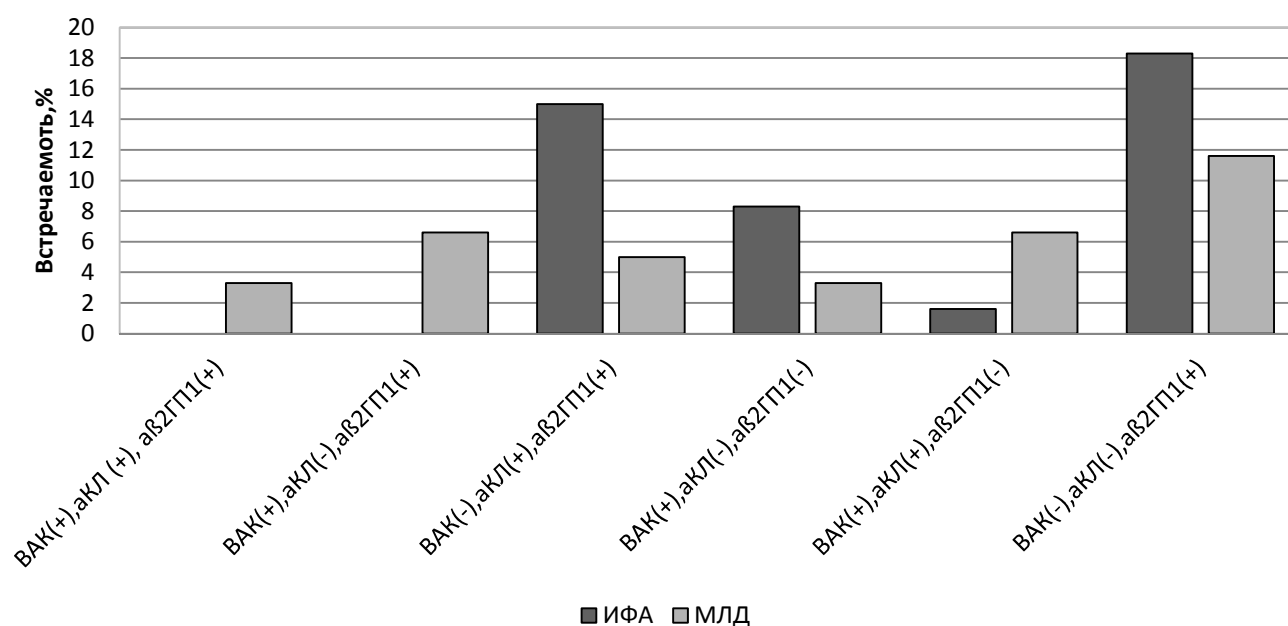
Рисунок 2 - Встречаемость аФК, аФс, аАн V, аФи и других АФА в группах пациентов с патологией беременности, тромбозами глубоких вен, ранними инсультами

Рисунок 2 - 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

Спектр АФА, выявленный с помощью метода МЛД, был проанализирован. Для этого пациентки с патологией беременности были разделены на группы с тройной позитивностью АФА (ВАК(+), аКЛ(+), а β 2ГП1(+)), с двойной

позитивностью АФА (ВАК(+),аКЛ(-),аβ2ГП1(+)), и монопозитивностью АФА ((ВАК(+),аКЛ(-),аβ2ГП1(-)/ ВАК(-),аКЛ(+),аβ2ГП1(-)/ ВАК(-),аКЛ(-),аβ2ГП1(+)).

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)

Рисунок 3 - Примечание: ВАК – волчаночный антикоагулянт, аКЛ – антитела к кардиолипинам, аβ2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину 1, ИФА - иммуноферментный анализ, МЛД - мультиплексный лайн-дот

Аналитические характеристики ИФА тест-систем ПР1 и ПР2 приведены в Таблице 13. Специфичность АФА тест-систем колебалась в диапазоне от 97 % до 100 %. Тест для измерения аβ2ГП1 при использовании тест-систем ПР2 оказался наиболее чувствительным.

Таблица 13 - Аналитические характеристики тест-систем иммуноферментного анализа

ИФА	ЧВ,%	95%ДИ	СП,%	95%ДИ	ОППР	95%ДИ	ОПОР	95%ДИ
аКЛ IgG ПР1	12,04	6,57 - 19,70	100,00	96,38 - 100,00	-	-	0,88	0,82 - 0,94
аКЛ IgM ПР1	9,26	4,53 - 16,37	100,00	96,38 - 100,00	-	-	0,91	0,85 - 0,96
аβ2ГП1 ПР1	11,11	5,87 - 18,60	95,34	88,72 - 98,36	2,22	0,81 - 6,08	0,94	0,86 - 1,01
аКЛ IgG ПР2	2,78	0,58 - 7,90	100,00	96,38 - 100,00	-	-	0,97	0,94 - 1,00
аКЛ IgM ПР2	22,22	14,79 - 31,24	98,45	92,96 - 99,76	11,11	2,69 - 45,81	0,79	0,71 - 0,88
аβ2ГП1 ПР2	24,07	16,37 - 33,25	97,67	91,48 - 99,38	8,02	2,51 - 25,69	0,78	0,70 - 0,88

Примечание: ПР1 – производитель 1, ПР2 – производитель 2, аКЛ IgG – антитела к кардиолипину класса IgG, аКЛ IgM – антитела к кардиолипину класса IgM, аβ2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину, ЧВ – чувствительность, СП – специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОППР – отношение правдоподобности положительного результата исследования, ОПОР – отношение правдоподобности отрицательного результата исследования

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.

Таблица 14 - Аналитические характеристики мультиплексного лайн-дота

МЛД АФА	ЧВ, %	95%ДИ	СП, %	95%ДИ	ОП ПР	95% ДИ	ОП ОР	95% ДИ
аКЛ IgM	6,48	2,65 - 12,90	100	96,38 – 100,00	6,48	0,81- 51,76	0,94	0,90-1,00
аФК IgM	3,7	1,02 - 9,21	99	94,5 - 99,97	-	-	0,96	0,93-1,00
аФХ IgM	0	0,00 - 3,36	100	96,38 - 100,00	-	-	1	1,00 -1,00
аФЭ IgM	0	0,00 - 3,36	100	96,38 - 100,00	-	-	1	1,00 -1,00
аФГ IgM	0	0,00 - 3,36	100	96,38 - 100,00	-	-	1	1,00 -1,00
аФИ IgM	0	0,00 - 3,36	100	96,38 - 100,00	-	-	1	1,00 -1,00
аФС IgM	0,93	0,02 - 5,05	99	94,50 - 99,91	0,93	0,06-14,61	1	0,97-1,03
аАн V IgM	4,63	1,52 - 10,47	100	96,38 - 100,00	-	-	0,95	0,91-0,99
аβ2ГП1 IgM	1,85	0,23 - 6,53	99	94,55 - 99,97	1,85	0,17 – 20,11	0,99	0,96-1,02
аПР IgM	5,56	2,07 - 11,70	100	96,38 - 100,00	-	-	0,94	0,90-0,99
аКЛ IgG	8,33	3,88 - 15,23	100	96,38 – 100,00	-	-	0,96	0,93 -1,00
аФК IgG	12,9	7,27 - 20,79	100	96,38 – 100,00	-	-	0,87	0,81-0,94
аФХ IgG	2,78	0,58 - 7,90	100	96,38 - 100,00	-	-	0,97	0,94-1,00
аФЭ IgG	0,93	0,02 - 5,05	100	96,38 – 100,00			0,99	0,97-1,01
аФГ IgG	0,89	0,58 - 7,90	100	96,38 - 100,00	-	-	0,97	0,94-1,00
аФИ IgG	0,93	0,02 - 5,05	100	96,38 - 100,00			0,99	0,97-1,01
аФС IgG	16,6	10,19 - 25,06	100	96,38 – 100,00	-	-	0,83	0,77 -0,91
аАн V IgG	18,5	11,69 - 27,14	100	96,38 - 100,00	-	-	0,81	0,74-0,89
аβ2ГП1 IgG	20,3	13,23 - 29,20	100	96,38 – 100,00	-	-	0,8	0,72 -0,88
аПР IgG	5,56	2,07 - 11,70	100	96,38 - 100,00	-	-	0,94	0,90 -0,99

Примечание: ПР1 – производитель 1, ПР2 – производитель 2, аКЛ IgG – антитела к кардиолипину класса IgG, аКЛ IgM– антитела к кардиолипину класса IgM, аβ2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину, ЧВ – чувствительность, СП – специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОППР- отношение правдоподобности положительного результата исследования, ОПОР - отношение правдоподобности отрицательного результата исследования.

3.4 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. Демографические, клинические и лабораторные данные представлены в Таблице 15.

Таблица 15 - Демографические, клинические и лабораторные данные пациентов с системной красной волчанкой (СКВ)

Характеристика	СКВ (n=100)	СКВ-ТГВ/АТ (n =45)	СКВ без тромбозов (n =55)
Возраст, лет	41 (32-52)	45 (36-54)	37 (32-53,7)
Женщины, n (%)	97 (97%)	43 (95,4%)	54 (98%)
Продолжительность, лет	6 (2-16)	8 (2,5-17,5)	5 (2-15)
<i>Livedo reticularis</i> , n (%)	18 (18,0 %)	6 (13,3%)	12 (21%)
Сыпь на скулах, n (%)	43 (43,0%)	18 (32,7%)	25 (45%)
Артрит, n (%)	72 (67,2%)	31 (68%)	41 (74%)
Плеврит, n (%)	11 (11,0%)	7 (15,5%)	4 (7%)
Поражение почек, n (%)	52 (52,0 %)	22 (48%)	30 (54,5%)
Тромбоцитопения, n (%)	26 (26,0 %)	12 (25%)	14 (25,4%)
Патология беременности, n (%)	16 (16,0 %)	15 (33%)	1 (1,8%)
Ожирение, n (%)	21 (21,0 %)	11 (24%)	10 (18%)
Антинуклерный фактор, n (%)	79 (79,0 %)	32 (71%)	47 (85,4%)
Антитела к дсДНК, n (%)	45 (45,0 %)	17 (42%)	28 (50,9%)
C4, g/L (25–75th percentile)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)
SLEDAI	6 (4-12)	8 (4-14)	6 (4-12)

В этой когорте больных 45% пациентов имели ТГВ и/или АТ, которые были классифицированы как СКВ-ТГВ/АТ. Вторая группа включала пациентов без каких-либо тромботических проявлений (СКВ без тромбозов, n=55). В группе СКВ-ТГВ/АТ у 9 (20%) пациентов был артериальный тромбоз, у 26 (57%) венозный тромбоз и у 10 (22%) как артериальный, так и венозный тромбоз. Кроме того, 15 пациенток этой группы (33,3%) имели патологию беременности, включая ранние выкидыши, поздние выкидыши и преждевременные роды.

Для измерения аКл IgG и аКл IgM, аβ2ГП1 IgG и IgM у пациентов с СКВ были использованы ИФА тест-системы ПР2 и МЛД. Сравнение методов ИФА (ПР2) и МЛД показало хорошую сопоставимость результатов для аβ2ГП1 IgG и IgM, умеренную сходимость для аКл IgG, низкую сходимость для аКл IgM (Таблица 16).

Таблица 16 - Сходимость ИФА и МЛД методов в группе системной красной волчанки

АФА	Карра	Сходимость
аКл IgM	0,36	Низкая
аКл IgG	0,55	Удовлетворительная
аβ2ГП1 IgM	0,73	Хорошая
аβ2ГП1 IgG	0,67	Хорошая

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

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 17). 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 без тромбозов.

Таблица 17 - Встречаемость аКЛ, аβ2ГП1, ВАК в группах СКВ-ТГВ/АТ и СКВ без тромбозов

	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 тромбозов 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, * – $p < 0,05$, при сравнении показателя с группой СКВ без тромбозов

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). 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 (Рисунок 4).

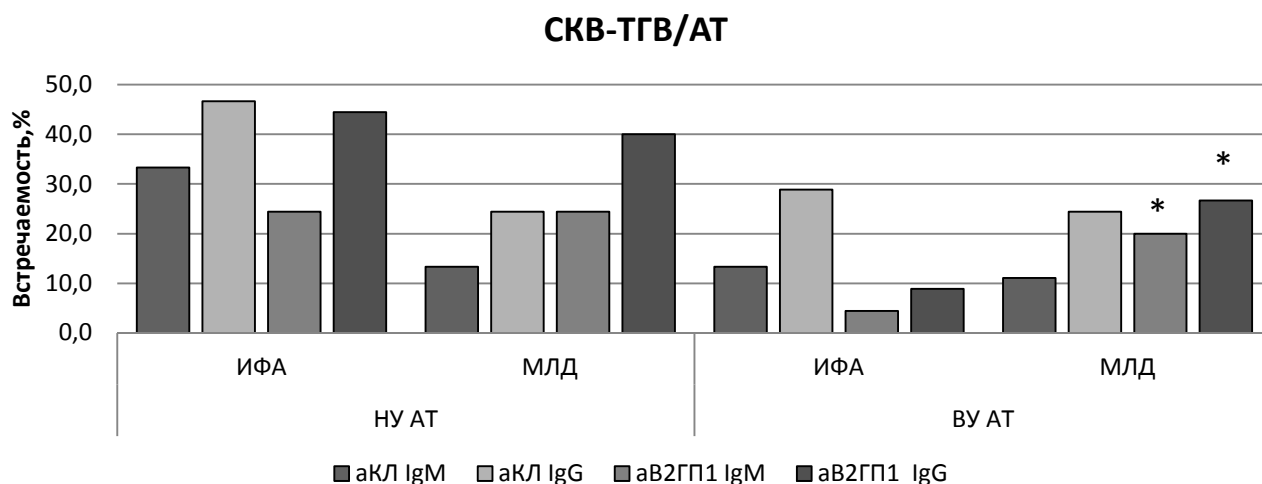


Рисунок 4 - Встречаемость низких (НУ АТ) и высоких уровней (ВУ АТ) АФА (аКЛ, аβ2ГП1) в группе СКВ-ТГВ/АТ, * $p < 0,05$ при сравнении показателя с встречаемостью ВУ АТ, измеренных методом ИФА

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

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).

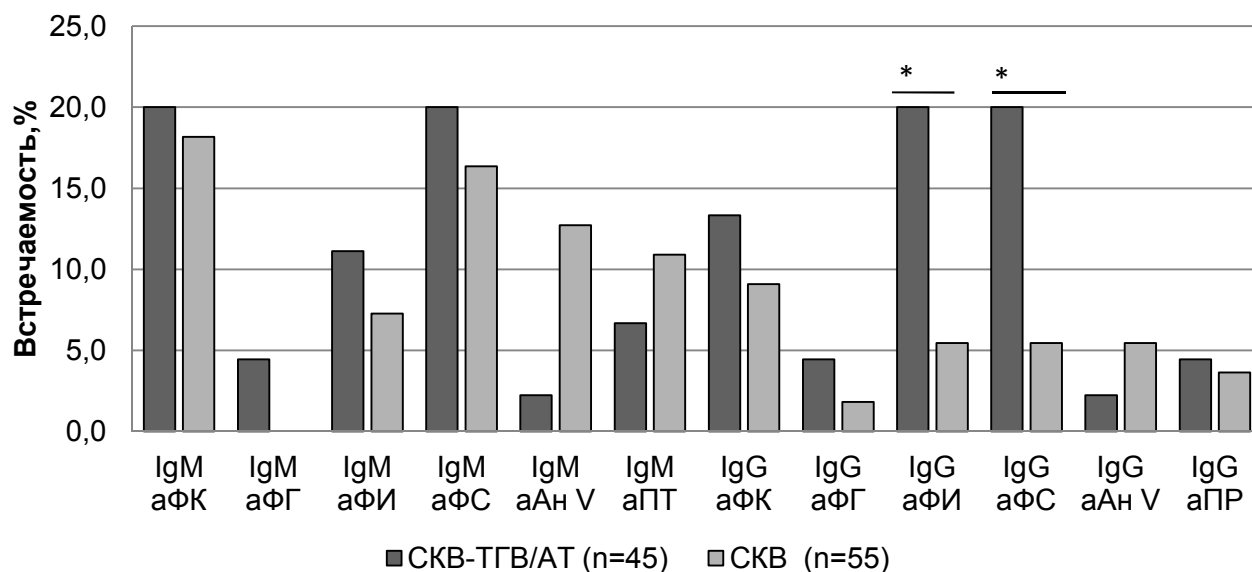


Рисунок 5 - Встречаемость других АФА, измеренных методом МЛД в группах СКВ-ТГВ/АТ и СКВ

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

Аналитические характеристики для АФА, установленные с помощью ИФА, приведены в таблице 18.

Таблица 18 - Аналитические характеристики тест-систем иммуноферментного анализа в группе системной красной волчанки

ИФА	ЧВ,%	95%ДИ	СП,%	95% ДИ	ОППР	95%ДИ	ОПОР	95%ДИ
аКЛ IgG	27,00	18,61 - 36,80	100	96,4 – 100	-	-	0,73	0,65 – 0,82
аКЛ IgM	21,00	13,49 - 30,29	100	96,4 - 100	-	-	0,79	0,71 – 0,87
аβ2ГП1 IgG	33,00	23,92- 43,12	98	92,9 - 99,7	16,50	4,07 – 66,9	0,68	0,59 -0,79
аβ2ГП1 IgM	20,00	12,67- 29,18	98	92,96 - 99,7	10,00	2,40 – 41,66	0,82	0,74- 0,90

Примечание: ИФА - иммуноферментный анализ, ЧВ – чувствительность, СП – специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОППР - отношение правдоподобности положительного результата, отношение правдоподобия для отрицательного результата, аКЛ – антитела к кардиолипинам, аβ2ГП1 – антитела к бета-2 гликопротеину 1

Специфичность АФА тест-систем была в диапазоне от 98% до 100 %. Самым чувствительным АФА, определенным методом ИФА, является аβ2ГП1 IgG с чувствительностью 33%.

Были определены аналитические характеристики нового метода МЛД в группе СКВ (Таблица 19). 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.

Таблица 19 - Аналитические характеристики тест-системы мультиплексного лайн-дота в группе системной красной волчанки

МЛД АФА	ЧВ, %	95%ДИ	СП, %	95%	ОП ПР	95% ДИ	ОП ОР	95% ДИ
аКЛ IgM	10,00	4,90 - 17,62	100,00	96,00 - 100,00	-	-	0,90	0,84 - 0,96
аФК IgM	18,00	11,03 - 26,95	99,00	94,5 - 99,97	18	2,45-132,28	0,83	0,75 - 0,91
аФХ IgM	0,00	0,00 - 3,36	100,00	96,30 - 100,00	-	-	1,00	1,00 - 1,00
аФЭ IgM	0,00	0,00 - 3,36	100,00	96,30 - 100,00	-	-	1,00	1,00 - 1,00
аФГ IgM	2,00	0,24 - 7,04	100,00	96,30 - 100,00	-	-	0,98	0,95 - 1,01
аФИ IgM	10,00	4,90 - 17,62	100,00	96,3 - 100,00	-	-	0,98	0,84 - 0,96
аФС IgM	18,00	11,03 - 26,95	99,00	94,50 - 99,90	18	2,45-132,28	0,83	0,75 - 0,91
аАн V IgM	8,00	3,52 - 15,16	100,00	96,38 - 100,00	-	-	0,92	0,87 - 0,97
аβ2ГП1 IgM	30,00	21,24 - 39,98	99,00	94,55 - 99,97	30	4,17-215,77	0,71	0,62 - 0,81
аПП IgM	13,00	7,11 - 21,20	100,00	96,38 - 100,00	-	-	0,87	0,81 - 0,94

Таблица 19 - Продолжение

Аналитические характеристики тест-системы мультиплексного лайн-дота в группе системной красной волчанки

МЛД АФА	ЧВ, %	95%ДИ	СП, %	95%	ОП ПР	95% ДИ	ОП ОР	95% ДИ
аКЛ IgG	15,00	8,65 -23,53	100,00	96,38 - 100,00	-	-	0,85	0,78 - 0,92
аФК IgG	4,00	1,10 - 9,93	100,00	96,38 - 100,00	-	-	0,96	0,92 - 1,00
аФХ IgG	0,00	0,00 - 3,36	100,00	96,38 - 100,00	-	-	1,00	1,00 - 1,00
аФЭ IgG	0,00	0,00 - 3,36	100,00	96,38 – 100,00	-	-	1,00	1,00 - 1,00
аФГ IgG	3,00	0,62 - 8,52	100,00	96,38 – 100,00	-	-	0,97	0,94 - 1,00
аФИ IgG	12,00	6,36 - 20,02	100,00	96,38-100,00	-	-	0,88	0,82 - 0,95
аФС IgG	15,00	8,65 - 23,53	100,00	96,30 -100,00	-	-	0,85	0,78 - 0,92
аАн V IgG	4,00	1,10 - 9,93	100,00	96,38-100,00	-	-	0,96	0,92 - 1,00
аβ2ГП1 IgG	27,00	18,61 - 36,80	100,00	96,38- 100,00	-	-	0,73	0,65 - 0,82
аПР IgG	4,00	1,10 - 9,93	100,00	96,30- 100,00	-	-	0,96	0,92 - 1,00

Примечание: ПР1 – тест-системы Euroimmun (Германия), ПР2 – тест-Orngentec Diagnostica (Германия), 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, ЧВ – чувствительность, СП – специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОППР – отношение правдоподобности положительного результата исследования, ОПОР – отношение правдоподобности отрицательного результата исследования

3.5 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 20). 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.

Таблица 20 - Логистический регрессионный анализ антифосфолипидных антител (АФА), измеренный методом МЛД у пациентов с СКВ с тромбозом и без него

		Коэффициент	СО	ОШ	95% ДИ	Р значение
(А)		Т				
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
(В)						
Тромбоз						
	>4 АФА	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	2,68	0,91	14,57	2,46, 86,27	0,00
	Возраст	0,07	0,02	1,06	1,02, 1,12	0,00
ТГВ						
	>4 аАФА	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	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

У пациентов с СКВ-АТ или СКВ-АТ/ТГВ чаще наблюдались не соответствующие критериям АФА, чем у пациентов с СКВ-ТГВ (12/20, 60% vs 10/32, 31,2%, $p = 0,05$).

3.6 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 21).

Таблица 21 - Встречаемость аллелей HLA-DRB1 у пациентов с системной красной волчанкой

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 проанализировали различия в профиле аутоантител у пациентов с СКВ и различными аллельными вариантами (Таблица 22). Аллельные варианты DRB1*03/*03 или *03/*X и DRB1*15/*15 или *15/*X связаны с наличием антител к Ro52 и SСа60. 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 (αβ2ГП1 IgG, аКЛ IgG и IgM) чаще обнаруживались HLA-DRB1*04, и HLA-DRB1*13 был связан с αβ2ГП1 IgG и IgM.

Таблица 22 - Ассоциации антинуклеарных и антифосфолипидных антител и HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*15

HLA-DRB1 АТ	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
АТ к дсДНК	18(47)	0,20	5 (20)	0,33	17(54)*	0,0027	12(54)	0,09	16(40)	0,12
АТ к гист	5(13)	1,00	2(8)	0,75	8(25)*	0,01	6(27)*	0,02	4(10)	1,00
АТ к нукл.	9(23)	0,072	3(12,5)	0,77	10(32)*	0,005	5(22)	0,54	9(22)	0,14
АТ к Ro52	18(47)*	0,02	3 (12,5)	0,39	9(29)	0,82	7(31)	0,61	16(40)*	0,01
АТ к SSa60	18(47)* *	<0,0001	2(8)	0,27	7(22)	1,00	7(31)	0,43	16(40)* *	0,0045
АТ кRNP/Sm	6(15)	1,00	3 (12,5)	0,91	5(16)	0,78	7(31)*	0,025	7(17,5)	0,31
αβ2ГП1 IgG	9 (23,6)	0,84	11(45)*	0,03	10(32)	0,15	12(54)* *	0,003	6(15)	0,06
αβ2ГП1 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: АТ – антитела, АТ к дсДНК- антитела к двуспиральной ДНК, АТ к гист. - антитела к гистонам, АТ к нукл. - антитела к нуклеосомам, АТ к Ro52 - антитела к Ro-52, АТ к SSa60 - антитела к SSa60, АТ к RNP / Sm - антитела к RNP/Sm, αβ2ГП1 - антитела к бета-2 гликопротеину 1, аКЛ - антитела к кардиолипинам, ВАК - волчаночный антикоагулянт

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно международным критериям АФС, лабораторная диагностика играет решающую роль в постановке диагноза и дальнейшей тактике ведения больных. Однако несовершенство традиционных методов выявления АФА ведет к необходимости повторного обследования пациентов, что затрудняет своевременную постановку диагноза. Действующие критерии рекомендуют учитывать в диагностике АФС только высокие уровни АФА, в то время как на практике низкие уровни антител встречаются в разы чаще, но их клиническое значение установить обычно не удается [112].

Один из первых сравнительных анализов тест-систем ИФА проведен в 1987 г. [170]. Авторы сравнивали чувствительность первых коммерческих и «домашних» тест-систем и пришли к выводу, что чувствительность «домашних» тест-систем превышает чувствительность коммерческих, а также что ИФА тест-системы для детекции АФА нуждаются в стандартизации. В 2009 г. вышла обзорная статья, название которой «Технические аспекты лабораторного тестирования антифосфолипидных антител. Стандартизация - несбыточная мечта?» очень хорошо характеризует возникшую 20 лет назад проблему, до сих пор не имеющую решения [137]. В редких исследованиях о сравнении коммерческих тест-систем между собой делают вывод, что анализ воспроизводимости показывает определенные различия между ИФА тест-систем разных производителей [54, 87]. Источник кардиолипина и техники, используемые для покрытия лунок, как известно, влияют на результаты. Некоторые производители используют фетальную телячью сыворотку в качестве блокирующего агента, тогда как другие используют кардиолипин, насыщенный человеческим β 1ГП1 в качестве антигена. Известно, что различные способы очистки β 2ГП1 приводят к изменению референтного интервала теста [94]. Следует отметить, что когда к тест-системе для измерения аКЛ добавляется человеческий β 2ГП1, сходимость аКЛ и а β 2ГП1 существенно повышается, и это привело к предположению о том, что а β 2ГП1 не должны детектироваться у пациентов,

которые отрицательны в отношении аКЛ. Напротив, некоторые утверждают, что аКЛ тесты обнаруживают клинически значимые антитела, которые не обнаруживаются с помощью тестов аβ2ГП1 [35, 119]

Для определения встречаемости АФА с помощью 2х ИФА тест-систем разных производителей были исследованы 3 группы пациентов с клиническими проявлениями АФС. В первую вошли 44 пациента с ранним ишемическим инсультом, во вторую – 27 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, третья состояла из 45 пациентов с двумя и более выкидышами. В качестве группы сравнения использовались сыворотки крови 30 здоровых доноров. Был проведен сравнительный анализ встречаемости аβ2ГП1 и аКл между ИФА тест-системами ПР1 и ПР2.

В проведенном исследовании сравнение тест-систем показало низкую сходимость между тест-системами разных производителей. Наборы ПР1 и ПР2 для детекции аКЛ IgG показали показали наилучшую сходимость (85%). Наихудшую сходимость продемонстрировали тест-системы для детекции аβ2ГП1 – 69%. Для наборов, измеряющих аКл IgM, сходимость составила 77%. Однако было ясно, что уровни позитивности и интерпретации уровней антител различны. В когорте больных с вероятным АФС превалировали низкие уровни АФА, и наибольшие расхождения наблюдались именно в этом диапазоне измерений. Лучшая сходимость была отмечена при обнаружении высоких уровней АФА, что подчеркивает тот факт, что выбор коммерческого набора определяет результат при обследовании сывороток, которые заведомо содержат низкую концентрацию измеряемого аналита. Было обнаружено, что сходимость между ИФА тест-системами двух производителей была лучше в случае детекции аКЛ IgG и IgM по сравнению с аβ2ГП1.

В целом, единичные низкие уровни АФА с большой осторожностью следует использовать при определении показаний для назначения профилактической терапии АФС, поскольку ИФА методы не всегда обнаруживают патогенетически значимые антитела. В 2006 году Американская кардиологическая

ассоциация выпустила рекомендации по оценке потенциальных новых биомаркеров для сердечно-сосудистых заболеваний. Тесты должны коррелировать с клинической картиной и иметь прогнозируемое значение риска развития тромбозов и патологии беременности, а также суммироваться с уже установленным маркерам риска [171]. На сегодняшний день доступные ИФА тест-системы не полностью соответствуют вышеупомянутым рекомендациям, поэтому необходимо улучшение методов детекции АФА, а также оптимизация практики клинического использования этих маркеров.

В связи с этим в аутоиммунной диагностике активно развиваются новые методы детекции аутоантел. Для выявления АФА используются ХА и МЛД [89, 111]. Их отличием от ИФА является более широкий аналитический диапазон теста, использование новых подходов к сорбции антигена и детекции сигнала, более высокая плотность антигена на носителе, широкий спектр измеряемых показателей, новые возможности стандартизации. Особенностью МЛД являются характеристики сорбции фосфолипидов на PVDF-мембране, которая взаимодействует с липидной частью фосфолипидов, что позволяет ориентировать гидрофильные участки молекул, обеспечивая тем самым более плотное их распределение, а также взаимодействие с белковыми ко-факторами [58]. Интересно, что человеческие моноклональные АФА IgG продемонстрировали лучшую реактивность с МЛД по сравнению с ИФА.

В данном диссертационном исследовании был проведен сравнительный анализ между МЛД и ИФА тест-системами ПР1 и ПР2. При оценке встречаемости АФА преимущества метода МЛД по сравнению с ИФА не были обнаружены. Но при анализе частоты высоких уровней антител новый метод оказался более эффективным при детекции АФА. Это позволяет избавиться от значительного числа низкоположительных неспецифических реакций АФА, которые могут быть обусловлены транзиторными антителами. Значимость выявления высоких уровней аутоантител и их выраженная связь с клиническими проявлениями заболевания

была описана большинством исследователей и используется в международных критериях АФС [112].

Распространенность АФА у пациентов с ранними ишемическими инсультами, а именно аКЛ, аβ2ГП1 и ВАК составляет до 13,5% пациентов с без какого-либо известного предрасполагающего коагуляционного расстройства [26]. По данным исследовательской группы проекта Euro-Phospholipid, совокупная распространенность инсульта и транзиторной ишемической атаки пациентов с АФС составляет 19,8 и 11,1% соответственно [47]. Исследование АФА и ишемического инсульта (APASS) показали, что наличие АФА является независимым фактором риска развития инсульта [92]. Врей и др. опубликовали аналогичные результаты, что при 20-летнем наблюдении риск рецидива сердечно-сосудистой катастрофы среди пациентов с АФА в 1,5 раза выше, чем у АФА-негативных пациентов [42, 43]. Несколько исследований изучали ассоциации других АФА с инсультом. Антитела к комплексу протромбин/серин IgG независимо связаны с инсультом или смертью у пациентов с транзиторной ишемической атакой [116]. Okuma и др. (2010) обнаружили антитела к Фи и Фс у 13,6 % пациентов с ишемическим инсультом и продемонстрировали значимую корреляцию с антинуклеарными антителами [122]. Частота антитела к Фи и Фи, аКЛ, а также комбинация трех или более IgM АФА, обнаруженных с помощью МЛД, была значительно выше у пациентов с АФС и транзиторной ишемической атакой [58]. Исследователями была выдвинута гипотеза, что АФА может быть использован в качестве маркера атеросклеротической нестабильности бляшек. Частая экспозиция внутренних цитозольных белков из-за нестабильной бляшки может объяснить низкий уровень АФА.

В выполненном исследовании были проанализированы распространенность аКЛ, аβ2ГП1 и других АФА в когорте пациентов с ранним ишемическим инсультом. Такие антитела, как аКЛ, аβ2ГП1 и другие АФА, были измерены с помощью ИФА и МЛД. Встречаемость АФА в когорте пациентов с ранним инсультом (n=44) варьировала от 4% до 31,8%. Наименьшее количество АФА-

положительных пациентов было выявлено ИФА тест-системами ПР1 - аКЛ в 2,2% и аβ2ГП1 в 6,6% случаев. ИФА тест-системами ПР2 было выявлено максимальное количество положительных результатов - 31,8% аКЛ, 22,7% - аβ2ГП1. Результаты в когорте пациентов с ранними ишемическими инсультами моложе 50 лет продемонстрировали очень низкие уровни аКЛ и аβ2ГП1. С помощью МЛД аКЛ детектировались в 4,5% случаев, аβ2ГП1 – в 22,7%, а также были обнаружены антитела к Фк (46,2%), Фс (37,2%), Ан V (13,3%), Фи (8,9%), Пт (8,9%), Фг (6,7%). В целом, встречаемость других АФА в группе ранних ишемических инсультов почти в два раза превышала встречаемость аКЛ и аβ2ГП1. В группе пациентов с тромбозами глубоких вен нижних конечностей среди некритериальных АФА чаще детектировались антитела к Фк (40%), Фс (33%), Ан V (22,1%), Пт (7,4%). Таким образом, использование нового метода МЛД по сравнению с ИФА позволило увеличить выявляемость АФА (как аКЛ и аβ2ГП1, так и антитела к Фк, Фс, Фи, Фг, Фэ, Ан V, Пт) с 4%-31,8 % до 59 %. Это позволяет сделать заключение, что метод МЛД для детекции АФА может быть использован не только для диагностики АФС, но и для стратификации риска сердечно-сосудистых заболеваний.

У пациенток с патологией беременности были описаны ассоциации с АФА, таких как антитела к Фэ и аАн V, но результаты литературных данных противоречивы [76]. Высокий уровень антител к Ан V был обнаружен в нескольких ретроспективных исследованиях [151]. Однако в большом проспективном когортном исследовании обнаружение данных антител на начало беременности не было связано с риском потери беременности [37]. В когорте пациенток с акушерской патологией (n=45) встречались антитела к Ан V (26%), Фх (15,9%), Фг (13,6%), Фк (13,5%), Пт (9,4%), Фи (6,8%), Фэ (4,5%), но не к Фс, как в группах с венозными тромбозами и острыми инсультами. Изолированно другие АФА встречались в 17%, т. е. метод МЛД позволяет увеличить выявляемость АФА у пациенток с привычным невынашиванием беременности с 33% до 50 %.

Определение факторов риска развития патологии беременности может быть клинически полезным для консультирования и планирования лечения пациенток с

АФС [11]. Логично, что выбор терапии у беременных с АФС следует проводить на основе степени акушерского риска. Для стратификации риска тромбозов пациентов с АФС подразделяют на две категории: (I) с положительностью более одного АФА и (II) с одним АФА, и наибольшему риску подвержены именно пациенты с тройной АФА позитивностью [112]. В отношении патологии беременности Rufatti и др. также сделали заключение, что неблагоприятные исходы беременности чаще встречаются у пациентов из категории I, чем из категории II [148]. Гораздо более эффективно разделять пациентов I категории также на двойную и тройную позитивность, так как именно пациенты с тройной позитивностью имеют наихудший прогноз как относительно рисков развития тромбозов, так и неблагоприятных исходов беременности [132, 149]

Для оценки такого подхода мы разделили пациенток с первичным АФС на группы с тройной позитивностью АФА (ВАК(+),аКЛ(+),аβ₂ГП1(+)), с двойной позитивностью АФА (ВАК(+),аКЛ(-),аβ₂ГП1(+)), и монопозитивностью АФА ((ВАК(+),аКЛ(-),аβ₂ГП1(-)/ ВАК(-),аКЛ(+),аβ₂ГП1(-)/ ВАК(-),аКЛ(-),аβ₂ГП1(+)). Согласно полученным данным, метод МЛД выявил больше пациентов с тройной позитивностью АФА, чем ИФА. Таким образом, метод МЛД может быть эффективным инструментом для оценки риска развития патологии беременности и выявления пациентов наибольшего риска осложнений.

Преимуществом метода МЛД является единовременная детекция аКл, аβ₂ГП1, антител к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр классов IgG и IgM. Был проведен анализ встречаемости одного, двух, трех и более АФА в общей когорте пациентов, обследованных с помощью метода МЛД. В диссертационном исследовании у 19% пациентов обнаружен только один маркер АФС, а два и более маркера - в 21 % случаев. Таким образом, можно выделить значительное количество случаев, при котором АФС подтверждается несколькими серологическими признаками. К сожалению, не удалось выявить клинических особенностей у обследованных нами пациентов, что может быть обусловлено небольшим размером группы и коротким временем наблюдения.

АФА были впервые описаны как предикторы тромбоза у пациентов с СКВ [16, 80, 88]. С тех пор клинические и лабораторные особенности как ПАФС, так и ВАФС были подробно изучены в когортах СКВ и АФС, а также в различных метаанализах [48, 80, 140, 161]. Помимо тромбоза и патологии беременности, которые являются основными клиническими характеристиками АФС, АФА при СКВ были ассоциированы с поражением клапанов, livedo reticularis, тромбоцитопенией, гемолитической анемией, неврологическими и психиатрическими заболеваниями, поражением почек [22, 53, 94, 150, 165, 179]. Однако ассоциации АФА и нетромботических проявления СКВ остаются недостаточно изученными.

В когорте пациентов с СКВ (n=100) были исследованы распространенность АФА, а именно были измерены как ВАК, аКЛ IgG и IgM, α 2ГП1 IgG и IgM, так и другие АФА – антитела к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр классов IgG и IgM. Для детекции АФА мы использовали два метода - ИФА и МЛД. Сходимость результатов измерения АФА между тест-системами ИФА и МЛД была хорошей для α 2ГП1 IgG и IgM, средней для аКЛ IgG и удовлетворительной для аКЛ IgM. Это соответствует ранее опубликованным данным для α 2ГП1 классов IgG и IgM [58]. Средняя и удовлетворительная сходимость для аКЛ IgG и IgM не упоминалась в предыдущих исследованиях. Единственное существенное различие было обнаружено для аКЛ IgG, выявленного с помощью МЛД, по сравнению с ИФА у бессимптомных носителей АФА. Как отмечалось в большинстве исследований, ВАК, аКЛ и α 2ГП1 класса IgG, а не класса IgM, были основными маркерами при СКВ с тромбозом. Двойная и тройная позитивность АФА были также ассоциированы с СКВ и венозными и артериальными тромбозами [91, 131, 140].

Недавно было высказано предположение, что МЛД может быть полезным инструментом для того, чтобы отличить пациентов с АФС от бессимптомных носителей АФА [144]. Реактивность аКЛ и α 2ГП1 IgG/IgM, оцененная с помощью МЛД, была значительно выше у пациентов с АФС, в то время как связывание иммуноглобулинов класса IgG с КЛ и β 2ГП1 было значительно ниже у носителей

АФА. Это можно объяснить, тем что фосфолипиды на новой подложке имитируют их естественную конформацию, необходимую для связывания белковых кофакторов [57].

Была проанализирована встречаемость аКЛ, аβ2ГП1 в группах СКВ- ТГВ/АТ и СКВ без тромбозов в анамнезе, учитывая только высокие уровни антител, выявленные с помощью ИФА тест-систем (>40 Ед/мл), а также только высокоположительные результаты МЛД (> ++ 60 ОП). В группе СКВ без тромбозов чувствительность обоих методов к различным уровнями АФА не показала существенных различий. Но в группе СКВ-ТГВ/АТ МЛД показал ту же чувствительность, что и ИФА для аКЛ IgG и IgM, но оказался в три раза более чувствительным при обнаружении аβ2ГП1 классов IgM и IgG.

Некритериальные АФА, таких как антитела к Фк, Фи, Фс, были предложены для диагностики и оценки риска АФС [86]. Было показано, что антитела к Фс и Фи ассоциированы с осложнениями во время беременности [145, 169, 178].

В данном исследовании при СКВ Ю >4 маркеров класса IgG выявлялись значительно чаще у пациентов с СКВ-ТГВ/АТ по сравнению с СКВ без тромбозов. Кроме того, анализ некритериальных АФА был информативным при диагностике АТ, то позволило дифференцировать пациентов с СКВ-АТ и СКВ-АТ/ТГВ от пациентов с СКВ-ТГВ. Выявление по меньшей мере двух некритериальных АФА ассоциировано в значительной степени с АТ, чем ТГВ нижних конечностей.

Кроме того, аФс и аФи были определены как независимые факторы риска тромбоза и его рецидива, а также тромбозов артерий и вен, соответственно. Выявление >4 АФА класса IgG, обнаруженных методом МЛД, было также независимым фактором риска тромбоза (с ВАК в качестве кофактора), артериального (с возрастом в качестве кофактора) и венозного (с ожирением в качестве кофактора) тромбоза, а также рецидива тромбоза (с возрастом в качестве кофактора) с высоким ОШ. Важно отметить, ОШ такого показателя, как >4 АФА, достигло значения 36,9 (95% ДИ 3,76, 342,78) для рецидива тромбоза. Интересно, что ВАК является независимым фактором риском тромбоза с ОШ 2,2 (95% ДИ 0,94,

5,21). Продолжительность и активность заболевания, а также пол и АФА класса IgM не показали связи с тромботическими событиями и их рецидивом при СКВ. Это еще раз подтверждает предположение, что АФА IgG играют определяющую роль при тромботических явлениях при СКВ, а рецидив тромбоза связан с множественной положительностью АФА. Следует отметить, что в этом исследовании мы не обнаружили никакой связи АФА с акушерскими осложнениями.

Иммуногенетика представляет собой важное направление изучения аутоиммунных заболеваний, поскольку позволяет установить врожденную генетическую предрасположенность к индукции иммунных реакций, что может проявляться как развитием аутоиммунных заболеваний, так и особенностями спектра аутоантител как у заболевших, так и у состоящих в группах риска. На данный момент вклад HLA-DRB1 в развитие СКВ был широко изучен в разных популяциях. У европейцев с риском заболевания СКВ связаны HLA-DRB1*03:01 и DRB1*15:01 [32, 51, 141]. Аллели HLA-DRB1 значимо ассоциированы с предрасположенностью к СКВ и в других этнических группах: *15:03 - у афроамериканцев [160], *08:02 - у латиноамериканцев и *15:01 и *15:02, *08:02 и *04:01 – у азиатов [82, 95, 158]. Была проведена оценка распространенности полиморфизмов HLA-DRB1 у пациентов с СКВ в популяции жителей Санкт-Петербурга и Северо-Западного федерального округа Российской Федерации и их клинической значимости. В данном исследовании только у носителей DRB1*03, но не DRB1*15, была показана статистически значимая связь с СКВ по сравнению с контрольной группой. Аллельный вариант HLA-DRB1*03 также ассоциирован с СКВ в тайваньских, латиноамериканских и британских исследованиях [45, 127].

Josef Smolen и др. в 1987 году опубликовал одну из первых работ, посвященных ассоциации антинуклеарных антител и HLA-DR антигенов [159]. Они показали, что HLA-DR3 связан с наличием антител против антигенов Ro/SSA или анти-La/SSB, а антитела против Sm или анти-RNP были ассоциированы с HLA-DR4. В ряде других исследований была обнаружена ассоциация анти-Ro антител

и/или анти-La антител с HLA-DR3 и/или HLA-DR2 [73, 77, 175]. В нашем исследовании мы также нашли связь между аллельными вариантами DRB1*03 (*03/*03 или *03/*X) и DRB1*15 (*15/*15 или *15/*X) с антителами к Ro52 и Ssa 60.

Podrebarac и др. в 1998 году описали взаимосвязь между синтезом анти-дсДНК антител и HLA-DRB1*1501 (DR2) [135]. В последнее время связь между HLA-DR2 и DR3 с синтезом анти-дсДНК антител была установлена и другими исследователями [163, 172]. В данном исследовании мы обнаружили, что генотип DRB1*07 (*07/*07 или *07/X) показал повышенный риск синтеза антител к дсДНК, антител к гистонам, антител к нуклеосомам. Аллельный вариант DRB1*07 был ассоциирован с СКВ в некоторых исследованиях южноиндийской, мексиканской, венгерской, египетской и корейской популяциях [30, 31, 75, 160]. Но ни одно из исследований не описывало ассоциацию с антителами к дсДНК, нуклеосомам и гистонам. В венгерском и египетском исследованиях DRB1*07 обнаруживалась чаще у пациентов с одним или несколькими тяжелыми почечными проявлениями. У корейцев HLA-DRB1*07:01 были связаны с синтезом антител к Sm антигену.

Опубликованы данные, которые свидетельствуют о том, что HLA-DRB1*04 и HLA-DRB1*13 являются протективными аллелями СКВ [63, 64]. Тем не менее, эти аллельные варианты связаны с сосудистыми событиями и синтезом АФА среди больных СКВ в большинстве исследований [59]. HLA-DRB1*04 ассоциировано с тромбозами как при ревматоидном артрите, так и при СКВ [72]. Положительные ассоциации между HLA-DRB1*04/*13 и АФА предполагают, что АФА является одним из основных механизмов, который способствует развитию тромбозов среди носителей этих генотипов [96]. В нашем исследовании мы подтверждаем связь между HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*13 и АФА, особенно для $\alpha 2$ ГП1 IgG. Также мы проанализировали отдельно пациентов с СКВ и вторичным АФС и пациентов с СКВ, положительных на АФА.

Таким образом, HLA-DRB1*03 показал статистически значимую связь с заболеваемостью СКВ в популяции жителей Санкт-Петербурга и Северо-Западного

федерального округа Российской Федерации. Также были обнаружены ассоциации между аллельными вариантами DRB1*03 (*03/*03 или *03/*X) и DRB1*15 (*15/*15 или *15/*X) с антителами к Ro52 и SSa60, DRB1*07 - с антителами против дсДНК, нуклеосомам и гистонами. Наличие аллелей риска, HLA-DRB1*04 и HLA-DRB1*13 ассоциировано с повышенным риском синтеза АФА и развитием тромботических осложнений у пациентов с СКВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Измерение АФА играет важную роль в оценке тромботического риска при определении тактики ведения пациентов с персистирующими АФА и с тромботическими осложнениями и/или патологией беременности. Современная концепция оценки риска развития клинических проявлений АФС включает анализ профиля АФА, при этом риск тромбозов и невынашивания беременности увеличивается в зависимости от количества выявленных аутоантител [131]. Тем не менее, данные подходы не всегда могут корректно идентифицировать пациентов группы высокого риска вследствие недостатков лабораторных методов.

В данном диссертационном исследовании было показано, что в группах пациентов с вероятным первичным АФС преобладали низкие уровни аКЛ и аβГП1, которые не коррелировали с ВАК. При сопоставлении ИФА тест-систем разных производителей была обнаружена их низкая сходимость, что подтверждает данные о недостаточной стандартизации ИФА. Полученные данные свидетельствуют о спорной клинической значимости выявленных АФА. Одним из новых методов для измерения АФА является МЛД, который характеризуется улучшенными параметрами сорбции антигенов, а также способностью выявлять до 20 серологических показателей [62]. Наши данные свидетельствуют о том, что использование МЛД для детекции АФА обладает рядом преимуществ по сравнению с ИФА. Данный метод лучше выявляет высокие уровни АФА, что позволило выделить группу повышенного риска развития тромботических осложнений и патологии беременности.

Другой важной характеристикой МЛД является измерение широкого спектра АФА, включающего аКЛ и аβГП1 и антитела к Фх, Фэ, Фг, Фи, Фс, Фк, Ан V и Пр классов IgG и IgM. Нами было показано, что антитела к Фс и Фк были ассоциированы с развитием как ТГВ, так и АТ, а выявление в основном некритериальных АФА было характерно для пациентов с инсультами в анамнезе. Результаты диссертационного исследования указывают на важную роль феномена множественной серологической позитивности в оценке риска развития клинических

проявлений у пациентов СКВ. Выявление данного феномена с помощью метода МЛД у пациентов с СКВ и АФА позволило выделить группу высокого риска развития осложнений. Так, детекция более 4 некритериальных АФА класса IgG ассоциирована с развитием тромботических осложнений. Было установлено, что аФс и аФи, измеренные с помощью МЛД, являются независимыми факторами риска развития тромбозов при СКВ. У пациентов с АТ или АТ/ТГВ чаще обнаруживались некритериальные антитела, чем у пациентов с только с ТГВ.

В ходе исследования было проведено типирование локуса DRB1 гена HLA, и была исследована связь между аллелями HLA-DRB1, АФА и тромбозами у больных СКВ. Аллельные варианты DRB1*04 и DRB1*13 ассоциированы с аКЛ IgG и аβ2ГП1 и, таким образом, являются прогностически неблагоприятным фактором развития тромбозов и невынашиваний беременности в этой группе пациентов.

Таким образом, анализ литературных данных и собственных результатов исследования позволяет заключить, что использование нового метода МЛД является информативным дополнением к лабораторной диагностике АФС, так как позволяет увеличить количество подтвержденного АФС и вносит существенный вклад в оценку риска развития клинических проявлений. Комплексная оценка спектра АФА и иммуногенетических факторов риска при использовании современных технологий является наиболее перспективным подходом к выявлению пациентов с высоким риском развития тромботических и акушерских проявлений.

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;

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а β 2ГП1 – 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 – фосфатидилсерин в комплексе с протромбином
- Фх – фосфатидилхолин
- Фэ – фосфатидилэтаноламин
- β 2ГП1 - бета-2 гликопротеин 1
- ВАК - волчаночный антикоагулянт
- ВАФС – вторичный антифосфолипидный синдром
- ВГРИ – верхняя граница референтного интервала
- ВИЧ - вирус иммунодефицита человека
- ВТЭ – венозная тромбоземболия
- ВУ АТ – высокие уровни антител
- ДИ – доверительный интервал

ДИ – доверительный интервал
ИМ – инфаркт миокарда
ИФА – иммуноферментный анализ
ИЦА – индекс циркулирующего антикоагулянта
КАФС – катастрофический антифосфолипидный синдром
МЛД – мультиплексный лайн-дот
МНО – международное номинированное отношение
НУ АТ – низкие уровни антител
ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
ОП – оптическая плотность
ОПОР – отношение правдоподобности отрицательного результата
ОППР – отношение правдоподобности положительного результата
ОШ – отношение шансов
ПАФС – первичный антифосфолипидный синдром
ПО – подтверждающее отношение ВАК
ПР1 – производитель 1
ПР2 – производитель 2
ПР3 – производитель 3
ПТ – протромбин
СКВ – системная красная волчанка
СО – скрининговое отношение ВАК
СП – специфичность
ТГВ – тромбозы глубоких вен
ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии
ФЛ – фосфолипиды
ХА – хемиллюминисцентный анализ
ЧВ – чувствительность

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Е. Н. Диагностическое и прогностическое значение антител к кардиолипину, β 2-гликопротеину 1 и протромбину при антифосфолипидном синдроме / Е. Н. Александрова, А. А. Новиков, Т. М. Решетняк, Т. В. Попкова, М. В. Черкасова, М. А. Диатроптова, Э. С. Мач, Л. Н. Денисов, Е. Л. Насонов // «Клинико-лабораторный консилиум». – 2009. – № 2(27). – С. 47–58.
2. Алексеев, Л. П. Иммуногенетика сахарного диабета 1 типа — от фундаментальных исследований к клинике / Л. П. Алексеев, И. И. Дедов, Р. М. Хаитов, М. Н. Болдырева, Д. Ю. Трофимов, В. А. Петеркова, Т. Л. Кураева, Д. Д. Абрамов // Научные сообщения. – 2012. – Т. 1. – С. 75–80.
3. Богданов, А. Н. Тромбоцитопения при системной красной волчанке / А.Н.Богданов, С.Г. Щербак // Клиническая больница. – 2013. – Т. 4. - №1. – С. 30–31.
4. Волкова, М. В. Антифосфолипидные Антитела: Современные Представления О Патогенетическом Действии / Р. Д. Волкова М.В., Куднер Е.В., Генералов И.И // Вестник Вгму. – 2015. – Т. 14. – № 3. – С.6–15.
5. Вохмянина, Н. В. Клиническое значение выявления депозитов тканевых трансглутаминазных антител (IgA TTg) в слизистой тонкого кишечника для диагностики и эффективности лечения больных целиакией / Н. В. Вохмянина, А. В. Козлов, Л.С. Орешко // Профилактическая и клиническая медицина. – 2011. – Т. 39. – №2 – С. 18–21.
6. Гордеева, Л. А. Аллели Hla-Drb1 У Пациентов С Ревматоидным Артритом / Л. А. Гордеева, А. В. Шабалдин, А. Н. Глушков, Т. М. Решетняк // Научно-Практическая Ревматология. – 2004. – Т. 4 – № 58 – С. 29–34.
7. Ивашкина, С. Г. Некоторые аспекты лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома / С. Г. Ивашкина // Справочник заведующего КДЛ. – 2015. – № 3 – С. 25–32.

8. Кондратьева, Л. В. Антифосфолипидный синдром: диагностика и профилактика тромбозов / Л. В. Кондратьева, Т. М. Решетняк // Доктор.ру. – 2010. – Т. 3. – № 54. – С. 52–55.
9. Логинова, М. А. Новые HLA-аллели в Российских популяциях / М. А. Логинова, И. В. Парамонов // Трансфузиология. – 2016. – Т. 17. – № 3. – С. 12–15.
10. Малкова, А. М. Значение антител к дезаминированному глиадину при лабораторной диагностике целиакии / А. М. Малкова, А. И. Будкова, А. В. Мазинг, Т. В. Блинова, С. В. Лапин, К. А. Малышкин // Лабораторная и инструментальная диагностика в клинической практике. – 2017. – Т. 8. – С. 49–53.
11. Менжинская, И. В. Спектр антифосфолипидных антител у женщин с привычным невынашиванием беременности и их диагностическое значение / И. В. Менжинская, М. М. Кашенцева, Т. Б. Ионанидзе, Л. В. Ванько, Г. Т. Сухих // Иммунология. – 2016. – Т. 37 – № 1. – С. 4–9.
12. Насонов, Е. Л. Антифосфолипидный Синдром / Е. Л. Насонов. - Москва: Литтера, 2006. – 440 с.
13. Острякова, Е. В. Антифосфолипидный синдром и система фибринолиза / Е. В. Острякова, Л. И. Патрушев, Т. М. Решетняк // Научно-Практическая Ревматология. – 2011. – № 6 – С. 57–64.
14. Папаян, Л. П. Антифосфолипидный синдром как приобретенная аутоиммунная тромбофилия в педиатрической нефрологической практике / Л. П. Папаян, К. А. Папаян // Нефрология. – 2016. – Т. 20 – № 3. – С. 9–16.
15. Первакова, М. Ю. Диагностическая и клиническая значимость определения фенотипа α -1-антитрипсина при системных васкулитах / М. Ю. Первакова, А. Л. Чудинов, С. В. Лапин, И. Б. Беляева, В. И. Мазуров, Т. В. Блинова, Е. А. Суркова, В. Л. Эмануэль, О. В. Инамова // Научно-Практическая Ревматология. – 2017. – Т. 55 – № 2 – С. 164–168.
16. Решетняк, Т. М. Разновидности антифосфолипидных антител у больных

системной красной волчанкой и первичным антифосфолипидным синдромом / Т.М.Решетняк, Я. Забек, Александрова З.С., В.С. Войцеховская // Научно-Практическая Ревматология. – 2005. – № 5 – С.11–18.

17. Решетняк, Т.М. Антифосфолипидный синдром : современное состояние и задачи на будущее / Т. М. Решетняк // Научно-Практическая Ревматология. – 2013. – Т. 51. – № 1 – С. 11–14.

18. Ставцев, Д.С. Значение иммуногенетических факторов в развитии болезни Крона / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, О.В. Князев, Т.В. Пухликова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2015. – Т. 25. – № 3. – С. 70–77.

19. Трофимов, Е.А. Антифосфолипидный синдром: особенности течения у беременных и варианты терапии / Е.А. Трофимов, А.С. Трофимова // Акушерство/Гинекология. – 2016. – Т. 47 – № 15. – С. 1032–1036.

20. Эмануэль, В. Л. Нетипичные ошибки в иммунном анализе / В. Л. Эмануэль, В.С. Берестовская // Медицинский алфавит. – 2018. – Т. 1 – №5. – С.1–5.

21. Abdel-Wahab, N. Systematic review of case reports of antiphospholipid syndrome following infection / N. Abdel-Wahab, M. A. Lopez-Olivo, G. P. Pinto-Patarroyo, M. E. Suarez-Almazor // *Lupus*. – 2016. – V. 25 – № 14. – P. 1520–1531.

22. Afeltra, A. Neuropsychiatric lupus syndromes: relationship with antiphospholipid antibodies. / A. Afeltra, P. Garzia, A. P. Mitterhofer, M. Vadacca, S. Galluzzo, F. Del Porto, L. Finamore, S. Pascucci, M. Gasparini, B. Laganà, D. Caccavo, G. M. Ferri, A. Amoroso, A. Francia // *Neurology*. – 2003. – V. 61. – № 1 – P.108–110.

23. Ağar Ç. β 2-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: Implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome / Ç. Ağar, G. M. A. Van Os, M. Mörgelin, R. R. Sprenger, J. A. Marquart, R. T. Urbanus, R. H. W. M. Derksen, J. C. M. Meijers, P. G. De Groot // *Blood* – 2010. – V.116. – № 8. – P.1336–1343.

24. Alarcon-Segovia, D. Antiphospholipid Syndrome Within Systemic Lupus

Erythematosus / D. Alarcon-Segovia // *Lupus*. – 1994. – V. 3 – № 4. – P.289–291

25. Alarcon-Segovia, D. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus / D. Alarcon-Segovia, M. E. Perez-Vazquez, A. R. Villa, C. Drenkard, J. Cabiedes // *Semin. Arthritis Rheum.* – 1992. – V. 21. – № 5. – P.275–286.

26. Andreoli, L. Estimated Frequency of Antiphospholipid Antibodies in Patients With Pregnancy Morbidity, Stroke, Myocardial Infarction, and Deep Vein Thrombosis: A Critical Review of the Literature / L. Andreoli, C. B. Chighizola, A. Banzato, G. J. Pons-Estel, G. R. de Jesus, D. Erkan // *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. – 2013. – V. 65. – № 11. – P.1869–1873.

27. Aringer, M. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus / M. Aringer, K. Costenbader, D. Daikh, S. R. Johnson // *Ann. Rheum. Dis.* – 2019. – V. 78. – № 9. – P.1151–1159.

28. Artim-Esen, B. The Significance and Management of Thrombocytopenia in Antiphospholipid Syndrome / B. Artim-Esen, R. Diz-Küçükkaya, M. İnanç // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2015. – V. 17 – № 3 – P. 14.

29. Atzeni, F. Autoimmunity and Anti-TNF- α Agents / F. Atzeni, M. Turiel, F. Capsoni, A. Doria, P. Meroni, P. Sarzi-Puttini // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – V. 1051. – № 1. – P. 559–569.

30. Bagiński, C. On generation of the symmetric or the alternating group by two cycles / C. Bagiński, G. Gromadzki // *Colloq. Math.* – 2017. – V. 150. – № 2. – P.161–174.

31. Bang, S.Y. Brief Report: Influence of HLA-DRB1 Susceptibility Alleles on the Clinical Subphenotypes of Systemic Lupus Erythematosus in Koreans / S. Y. Bang, J. Y. Choi, S. Park, J. Choi, S. J. Hong, H. S. Lee, C. B. Choi, S. C. Bae // *Arthritis Rheumatol.* – 2016. – V. 68 – № 5. – P.1190–1196.

32. Barcellos, L.F. High-Density SNP Screening of the Major Histocompatibility Complex in Systemic Lupus Erythematosus Demonstrates Strong Evidence for Independent Susceptibility Regions / L. F. Barcellos, S. L. May, P. P. Ramsay, H. L. Quach, J. A. Lane, J. Nititham, J. A. Noble, K. E. Taylor, D. L. Quach, S. A. Chung, J. A. Kelly, K. L. Moser, T. W. Behrens, M. F. Seldin, G. Thomson, J. B. Harley, P. M. Gaffney, L. A. Criswell // *PLoS Genet.* – 2009. – V. 5 – № 10. – e1000696c.
33. Bertolaccini, M. ‘Non-criteria’ aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010 / M. Bertolaccini, O. Amengual, T. Atsumi, W. Binder, B. de Laat, R. Forastiero, W. Kutteh, M. Lambert, H. Matsubayashi, V. Murthy, M. Petri, J. Rand, M. Sanmarco, A. Tebo, S. Pierangeli // *Lupus.* – 2011. – V. 20. – № 2. – P.191–205.
34. Bertolaccini, M. Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems / M. Bertolaccini, T. Atsumi, T. Koike, G. Hughes, M. Khamashta // *Thromb. Haemost.* – 2005. – V. 93. – № 2. – P.289–297.
35. Bertolaccini, M.L. Antiphospholipid antibody tests: spreading the net / M. L. Bertolaccini // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – V. 64 – № 11. – P.1639–1643.
36. Biggioggero, M. The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome / M. Biggioggero, P. L. Meroni // *Autoimmun. Rev.* – 2010. – V. 9 – № 5. – P.A299–A304.
37. Bizzaro, N. A Prospective Study of 1038 Pregnancies on the Predictive Value of Anti-Annexin V Antibodies for Fetal Loss / N. Bizzaro, A. Antico, M. Musso, S. Platzgummer, L. Camogliano, R. Tozzoli, D. Villalta // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – V. 1050.– № 1. – P.348–356.
38. Björck, S. Screening Detects a High Proportion of Celiac Disease in Young HLA-genotyped Children / S. Björck, C. Brundin, E. Lörinc, K. F. Lynch, D. Agardh // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2010. – V. 50. – № 1. – P.49–53.
39. Bogdanova, N. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene

promoter is associated with recurrent pregnancy loss / N. Bogdanova, J. Horst, M. Chlystun, P. J. P. Croucher, A. Nebel, A. Bohring, A. Todorova, S. Schreiber, V. Gerke, M. Krawczak, A. Markoff // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. – V. 16. – № 5. – P.573–578.

40. Boiko, A.N. Association and linkage of juvenile MS with HLA-DR2(15) in Russians / A. N. Boiko, E. I. Gusev, M. A. Sudomoina, A. D. Alekseenkov, O. G. Kulakova, O. V. Bikova, O. I. Maslova, M. R. Guseva, S. Y. Boiko, M. E. Guseva, O. O. Favorova // *Neurology.* – 2002. – V. 58. – № 4. – P.658–660.

41. Boles, J. Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. / J. Boles, N. Mackman // *Lupus.* – 2010. – V. 19. – № 4 – P.370–378.

42. Brey, R. Antiphospholipid antibodies and the brain: A consensus report / R. Brey, E. Muscal, J. Chapman // *Lupus.* – 2011. – V. 20 – № 2 – P.153–157.

43. Brey, R.L. Management of the neurological manifestations of APS-what do the trials tell us? / R. L. Brey // *Thromb. Res.* – 2004. – V. 114. – № 5–6. – P.489–499.

44. Capozzi, A. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay / A. Capozzi, E. Lococo, M. Grasso, A. Longo, T. Garofalo, R. Misasi, M. Sorice // *J. Immunol. Methods.* – 2012. – V. 379. – № 1–2. – P.48–52.

45. Castano-Rodriguez, N. Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus / N. Castano-Rodriguez, L. M. Diaz-Gallo, R. Pineda-Tamayo, A. Rojas-Villarraga, J. M. Anaya // *Autoimmun Rev.* – 2008. – V. 7. – № 4. – P.322–330.

46. Cervera, R. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics of 100 patients / R. Cervera // *Ann. Rheum. Dis.* – 2004. – V. 63. – № 10. – P.1312–1317.

47. Cervera, R. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe / R. Cervera, M.-C. Boffa, M. Khamashta, G. Hughes // *Lupus.* – 2009. – V. 18. – № 10. – P.889–893.

48. Cervera, R. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic

manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. / R. Cervera, J.-C. Piette, J. Font, M. a Khamashta, Y. Shoenfeld, M. T. Camps, S. Jacobsen, G. Lakos, A. Tincani, I. Kontopoulou-Griva, M. Galeazzi, P. L. Meroni, R. H. W. M. Derksen, P. G. de Groot, E. Gromnica-Ihle, M. Baleva, M. Mosca, S. Bombardieri, F. Houssiau, J.-C. Gris, I. Quéré, E. Hachulla, C. Vasconcelos, B. Roch, A. Fernández-Nebro, M.-C. Boffa, G. R. V Hughes, M. Ingelmo // *Arthritis Rheum.* – 2002. – V. 46 – № 4 – P.1019–1027.

49. Cervera, R. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: A multicentre prospective study of 1000 patients / R. Cervera, R. Serrano, G. J. Pons-Estel, L. Ceberio-Hualde, Y. Shoenfeld, E. De Ramón, V. Buonaiuto, S. Jacobsen, M. M. Zeher, T. Tarr, A. Tincani, M. Taglietti, G. Theodossiades, E. Nomikou, M. Galeazzi, F. Bellisai, P. L. Meroni, R. H. W. M. Derksen, P. G. D. De Groot, M. Baleva, S. Mosca, M. Bombardieri, F. Houssiau, J. C. Gris, I. Quéré, E. Hachulla, C. Vasconcelos, A. Fernández-Nebro, M. Haro, Z. Amoura, M. Miyara, M. Tektonidou, G. Espinosa, M. L. Bertolaccini, M. A. Khamashta // *Ann. Rheum. Dis.* – 2015. – V. 74 – № 6 – P.1011–1018.

50. Chighizola, C.B. Beyond thrombosis: Anti-β2GPI domain 1 antibodies identify late pregnancy morbidity in anti-phospholipid syndrome / C. B. Chighizola, F. Pregnolato, L. Andreoli, C. Bodio, L. Cesana, C. Comerio, M. Gerosa, C. Grossi, R. Kumar, M. G. Lazzaroni, M. Mahler, E. Mattia, C. Nalli, G. L. Norman, M. G. Raimondo, A. Ruffatti, M. Tonello, L. Trespidi, A. Tincani, M. O. Borghi, P. L. Meroni // *J. Autoimmun.* – 2018. – V. 90 – P.76–83.

51. Chung, S.A. Differential Genetic Associations for Systemic Lupus Erythematosus Based on Anti-dsDNA Autoantibody Production / S. A. Chung, K. E. Taylor, R. R. Graham, J. Nititham, A. T. Lee, W. A. Ortmann, C. O. Jacob, M. E. Alarcón-Riquelme, B. P. Tsao, J. B. Harley, P. M. Gaffney, K. L. Moser, M. Petri, F. Y. Demirci, M. I. Kamboh, S. Manzi, P. K. Gregersen, C. D. Langefeld, T. W. Behrens, L. A. Criswell // *PLoS Genet.* – 2011. – V. 7 – № 3 – e1001323c.

52. Cugno, M. Patients with antiphospholipid syndrome display endothelial perturbation. / M. Cugno, M. O. Borghi, L. M. Lonati, L. Ghiadoni, M. Gerosa, C. Grossi, V. De Angelis, G. Magnaghi, A. Tincani, D. Mari, P. Riboldi, P. L. Meroni // *J. Autoimmun.* – 2010. – V. 34 – № 2 – P.105–110.

53. Deák, M. Non-thromboembolic risk in systemic lupus erythematosus associated with antiphospholipid syndrome / M. Deák, M. Bocskai, S. Burcsár, O. Dányi, Z. Fekete, L. Kovács // *Lupus.* – 2014. – V. 23. – № 9 – P.913–918.

54. Decavele, A.S. Evaluation of three commercial ELISA kits for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome / A. S. Decavele, S. Schouwers, K. M. J. Devreese // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2011. – V. 33 – № 1. – P.97–108.

55. Devreese, K.M.J. Antiphospholipid antibody testing and standardization // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2014. – V. 36. – № 3. – P.352–363.

56. Devreese, K.M.J. Testing for Antiphospholipid antibodies with Solid Phase Assays: guidance from the SSC of the ISTH / K. M. J. Devreese, S. S. Pierangeli, B. de Laat, A. Tripodi, T. Atsumi, T. L. Ortel // *J. Thromb. Haemost.* – 2014. – V. 12 – № 5 – P.792–795.

57. Egerer, K. Profiling of antiphospholipid antibodies - Association with cerebrovascular events in antiphospholipid syndrome / K. Egerer, D. Roggenbuck, T. Büttner, B. Lehmann, A. Kohn, P. Von Landenberg, E. Feist, G.-R. Burmester, T. Dörner // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2011. – V.13. - №13. – P.R118.

58. Egerer, K. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay / K. Egerer, D. Roggenbuck, T. Büttner, B. Lehmann, A. Kohn, P. von Landenberg, R. Hiemann, E. Feist, G.-R. Burmester, T. Dörner // *Arthritis Res. Ther.* – 2011. – V. 13. – № 4. – P. R118.

59. Farragher, T.M. Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis / T. M. Farragher, N. J. Goodson, H. Naseem, A. J. Silman, W.

Thomson, D. Symmons, A. Barton // *Arthritis Rheum.* – 2008. – V. 58.– № 2. – P.359–369.

60. Feldt, J.M. Von Systemic lupus erythematosus. Recognizing its various presentations / J. M. Von Feldt // *Postgrad. Med.* – 1995. – V. 97 – № 4 – P.79-86.

61. Font, C. Solid cancer, antiphospholipid antibodies, and venous thromboembolism / C. Font, L. Vidal, G. Espinosa, D. Tàssies, J. Monteagudo, B. Farrús, L. Visa, R. Cervera, P. Gascon, J. C. Reverter // *Autoimmun. Rev.* – 2011. – V. 10. – № 4. – P.222–227.

62. Freire, P.V. Distinct antibody profile: A clue to primary antiphospholipid syndrome evolving into systemic lupus erythematosus? / P. V. Freire, E. Watanabe, N. R. Dos Santos, C. Bueno, E. Bonfá, J. F. De Carvalho // *Clin. Rheumatol.* – 2014. – V. 33. – № 3. – P.349–353.

63. Furukawa, H. The role of common protective alleles HLA-DRB1*13 among systemic autoimmune diseases / H. Furukawa, S. Oka, N. Tsuchiya, K. Shimada, A. Hashimoto, S. Tohma, A. Kawasaki // *Genes Immun.* – 2017. – V. 18. – № 1. – P.1–7.

64. Galeazzi, M. HLA Class II DNA Typing in a Large Series of European Patients with Systemic Lupus Erythematosus / M. Galeazzi, G. D. Sebastiani, G. Morozzi, C. Carcassi, G. B. Ferrara, R. Scorza, R. Cervera, E. De Ramon Garrido, A. Fernandez-Nebro, F. Houssiau, A. Jedryka-Goral, G. Passiu, C. Papasteriades, J.-C. Piette, J. Smolen, G. Porciello, R. Marcolongo // *Medicine (Baltimore).* – 2002. – V. 81. – № 3. – P.169–178.

65. Galeazzi, M. HLA class II alleles associations of anticardiolipin and anti b2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus / M. Galeazzi, G. D. Sebastiani, A. Tincani, J.-C. Piette, F. Allegri, G. Morozzi, F. Bellisai, R. Scorza, G. B. Ferrara, C. Carcassi, J. Font, G. Passiu, J. Smolen, C. Papasteriades, F. Houssiau, A. F. Nebro, E. De Ramon Garrido, A. Jedryka-Goral, R. Marcolongo // *Lupus.* – 2000. – V. 9. – № 1. – P.47–55.

66. Galli, M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis: Do test patterns identify

the patients' risk?// *Thrombosis Research*. – 2004. – V.114. – №5–6. – P.597-601.

67. Galli, M. Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome / M. Galli, G. Reber, P. De Moerloose, P. G. De Groot // *J. Thromb. Haemost.* – 2008. – V.6. – №2. – P. 399-401.

68. Gattorno, M. Outcome of primary antiphospholipid syndrome in childhood / M. Gattorno, F. Falcini, A. Ravelli, F. Zulian, A. Buoncompagni, G. Martini, M. Resti, P. Picco, A. Martini // *Lupus*. – 2003. – V. 12. – № 6. – P.449–453.

69. Ghodke-Puranik, Y. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review / Y. Ghodke-Puranik, T. B. Niewold // *J. Autoimmun.* – 2015. – V. 64 – P.125–136.

70. Girardi, G. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction / G. Girardi, D. Yarilin, J. M. Thurman, V. M. Holers, J. E. Salmon // *J. Exp. Med.* – 2006. – V. 203. – № 9. – P.2165–2175.

71. Goldman-Mazur, S. High detection rates of antithrombin deficiency and antiphospholipid syndrome in outpatients aged over 50 years using the standardized protocol for thrombophilia screening / S. Goldman-Mazur, E. Wypasek, M. Karpiński, A. Stanisiz, A. Undas // *Thromb. Res.* – 2019. – V. 176 – P.67–73.

72. Gonzalez-Gay, M.A. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis / M. A. Gonzalez-Gay, C. Gonzalez-Juanatey, M. J. Lopez-Diaz, A. Piñeiro, C. Garcia-Porrúa, J. A. Miranda-Filloo, W. E. R. Ollier, J. Martin, J. Llorca // *Arthritis Rheum.* – 2007. – V. 57. – № 1. – P.125–132.

73. Gottenberg, J.-E. In primary Sjögren's syndrome, HLA class II is associated exclusively with autoantibody production and spreading of the autoimmune response. / J.-E. Gottenberg, M. Busson, P. Loiseau, J. Cohen-Solal, V. Lepage, D. Charron, J. Sibilia, X. Mariette // *Arthritis Rheum.* – 2003. – V. 48. – № 8. – P.2240–2245.

74. Graham, R.R. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes

contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE / R. R. Graham, W. Ortmann, P. Rodine, K. Espe, C. Langefeld, E. Lange, A. Williams, S. Beck, C. Kyogoku, K. Moser, P. Gaffney, P. K. Gregersen, L. A. Criswell, J. B. Harley, T. W. Behrens // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2007. – V. 15 – № 8 – P.823–830.

75. Granados, J. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans / J. Granados, G. Vargas-Alarcón, F. Andrade, H. Melin-Aldana, J. Alcocer-Varela, D. Alarcón-Segovia // *Lupus.* – 1996. – V. 5 – № 3 – P.184–189.

76. Gris, J.C. Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nîmes Obstetricians and Haematologists Study-NOHA. / J. C. Gris, I. Quéré, M. Sanmarco, B. Boutiere, E. Mercier, J. Amiral, A. M. Hubert, S. Ripart-Neveu, M. Hoffet, M. L. Tailland, O. Rousseau, F. Monpeyroux, M. Dauzat, J. Sampol, J. P. Daures, J. Berlan, P. Marès // *Thromb. Haemost.* – 2000. – V. 84 – № 2 – P.228–36.

77. Hamilton, R.G. Two Ro (SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro (SS-A) autoantibody. / R. G. Hamilton, J. B. Harley, W. B. Bias, M. Roebber, M. Reichlin, M. C. Hochberg, F. C. Arnett // *Arthritis Rheum.* – 1988. – V. 31 – № 4 – P.496–505.

78. Han, B. Fine Mapping Seronegative and Seropositive Rheumatoid Arthritis to Shared and Distinct HLA Alleles by Adjusting for the Effects of Heterogeneity / B. Han, D. Diogo, S. Eyre, H. Kallberg, A. Zhernakova, J. Bowes, L. Padyukov, Y. Okada, M. A. González-Gay, S. Rantapää-Dahlqvist, J. Martin, T. W. J. Huizinga, R. M. Plenge, J. Worthington, P. K. Gregersen, L. Klareskog, P. I. W. de Bakker, S. Raychaudhuri // *Am. J. Hum. Genet.* – 2014. – V. 94 – № 4 – P.522–532.

79. Harris, E.N. Syndrome of the black swan / E. N. Harris // *Rheumatology* – 1987. – V. 26 – № 5 – P.324–326.

80. Harris, E.N. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and

association with thrombosis in systemic lupus erythematosus / E. N. Harris, M. L. Boey, C. G. Mackworth-Young, A. E. Gharavi, B. M. Patel, S. Loizou, G. R. V. Hughes // *Lancet*. – 1983. – V. 322 – № 8361 – P.1211–1214.

81. Hashimoto, H. HLA Antigens in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus / H. Hashimoto, Y. Nishimura, R. P. Dong, A. Kimura, T. Sasazuki, K. Yamanaka, Y. Tokano, A. Murashima, K. Kabasawa, S. Hirose // *Scand. J. Rheumatol.* – 1994. – V. 23 – № 4. – P.191–196.

82. Hashimoto, H. HLA Antigens in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus / H. Hashimoto, Y. Nishimura, R. P. Dong, A. Kimura, T. Sasazuki, K. Yamanaka, Y. Tokano, A. Murashima, K. Kabasawa, S. Hirose // *Scand. J. Rheumatol.* – 1994. – V. 23. – № 4. – P.191–196.

83. Hoecke, F. Van Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome / F. Van Hoecke, L. Persijn, A.-S. Decavele, K. Devreese // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2012. – V. 34. – № 6. – P.630–640.

84. Hoppe, B. Heparin or aspirin or both in the treatment of recurrent abortions in women with antiphospholipid antibody (syndrome) / B. Hoppe, G.-R. Burmester, T. Dörner // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2011. – V. 23. – № 3. – P.299–304.

85. Howson, J.M.M. Evidence That HLA Class I and II Associations With Type 1 Diabetes, Autoantibodies to GAD and Autoantibodies to IA-2, Are Distinct / J. M. M. Howson, H. Stevens, D. J. Smyth, N. M. Walker, K. A. Chandler, P. J. Bingley, J. A. Todd // *Diabetes.* – 2011. – V. 60 – № 10 – P.2635–2644.

86. Hoxha, A. Relationship between antiphosphatidylserine/prothrombin and conventional antiphospholipid antibodies in primary antiphospholipid syndrome / A. Hoxha, A. Ruffatti, E. Mattia, L. Meneghel, M. Tonello, E. Salvan, V. Pengo, L. Punzi // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2015. – V. 53 – № 8. – P.1265–1270.

87. Iker, B.C. Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples / B. C. Iker, K. R. Bright, I. L.

Pepper, C. P. Gerba, M. Kitajima // *J. Virol. Methods.* – 2013. – V. 191 – № 1 – P.24–30.

88. İlgen, U. Antiphospholipid antibodies and non-thrombotic manifestations of systemic lupus erythematosus / U. İlgen, M. E. Yayla, A. Ateş, İ. Okatan, E. U. Yurteri, M. Torgutalp, A. B. D. Keleşoğlu, T. M. Turgay, G. Kınıklı // *Lupus* – 2018. – V. 27. – № 4. – P.665–669.

89. Ioannou, Y. Novel assays of thrombogenic pathogenicity in the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen β 2-glycoprotein I / Y. Ioannou, J.-Y. Zhang, M. Qi, L. Gao, J. C. Qi, D.-M. Yu, H. Lau, A. D. Sturgess, P. G. Vlachoyiannopoulos, H. M. Moutsopoulos, A. Rahman, C. Pericleous, T. Atsumi, T. Koike, S. Heritier, B. Giannakopoulos, S. A. Krilis // *Arthritis Rheum.* – 2011. – V. 63. – № 9. – P.2774–2782.

90. Iuliano, A. Antiphospholipid syndrome's genetic and epigenetic aspects // *Autoimmun. Rev.* – 2019. – V. 18.– № 9.– P.102352.

91. Kelchtermans, H. IgG/IgM antiphospholipid antibodies present in the classification criteria for the antiphospholipid syndrome: a critical review of their association with thrombosis / H. Kelchtermans, L. Pelkmans, B. de Laat, K. M. Devreese // *J. Thromb. Haemost.* – 2016. – V. 14. – № 8. – P.1530–1548.

92. Levine, S.R. Antiphospholipid Antibodies and Subsequent Thrombo-occlusive Events in Patients With Ischemic Stroke / S. R. Levine // *JAMA.* – 2004. – V. 291. – № 5. – P.576.

93. Levy, R.A. History, Classification, and Subsets of the Antiphospholipid Syndrome/ Levy Roger A., Gómez-Puerta, Cervera J.A. / Ricard Handbook of systemic Autoimmune Diseases. – 2017. – V.12. – P.1–16.

94. Love, P.E. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance / P. E. Love, S. A. Santoro // *Ann. Intern. Med.* – 1990. – V. 112. – № 9. – P.682–698.

95. Lu, L.Y. Molecular analysis of major histocompatibility complex allelic associations with systemic lupus erythematosus in Taiwan. / L. Y. Lu, W. Z. Ding, D. Fici, R. Deulofeut, H. H. Cheng, C. C. Cheu, P. K. Sung, P. H. Schur, P. A. Fraser // *Arthritis Rheum.* – 1997. – V. 40 – № 6 – C.1138–45.

96. Lundström, E. HLA-DRB1*04/*13 alleles are associated with vascular disease and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus / E. Lundström, J. T. Gustafsson, A. Jönsen, D. Leonard, A. Zickert, K. Elvin, G. Sturfelt, G. Nordmark, A. A. Bengtsson, U. Sundin, H. Källberg, J. K. Sandling, A. C. Syvänen, L. Klareskog, I. Gunnarsson, L. Rönnblom, L. Padyukov, E. Svenungsson // *Ann. Rheum. Dis.* – 2013. – V. 72. – № 6. – P.1018–1025.

97. Lyons, P.A. Genetically Distinct Subsets within ANCA-Associated Vasculitis / P. A. Lyons, T. F. Rayner, S. Trivedi, J. U. Holle, R. A. Watts, D. R. W. Jayne, B. Baslund, P. Brenchley, A. Bruchfeld, A. N. Chaudhry, J. W. Cohen Tervaert, P. Deloukas, C. Feighery, W. L. Gross, L. Guillevin, I. Gunnarsson, L. Harper, Z. Hrušková, M. A. Little, D. Martorana, T. Neumann, S. Ohlsson, S. Padmanabhan, C. D. Pusey, A. D. Salama, J.-S. F. Sanders, C. O. Savage, M. Segelmark, C. A. Stegeman, V. Tesař, A. Vaglio, S. Wiczorek, B. Wilde, J. Zwerina, A. J. Rees, D. G. Clayton, K. G. C. Smith // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – V. 367. – № 3. – P.214–223.

98. Mackie, I.J. Familial lupus anticoagulants / I. J. Mackie, C. B. Colaco, S. J. Machin // *Br. J. Haematol.* – 1987. – V. 67. – № 3. – P.359–363.

99. Mahler, M. Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein 1: A promising candidate biomarker for risk management in antiphospholipid syndrome / M. Mahler, G. L. Norman, P. L. Meroni, M. Khamashta // *Autoimmun. Rev.* – 2012. – V. 12. – № 2. – P.313–317.

100. Makarycheva, O.Y. Family Analysis of Linkage and Association of HLA-DRB1, CTLA4, TGFB1, IL4, CCR5, RANTES, MMP9 and TIMP1 Gene Polymorphisms with Multiple Sclerosis. / O. Y. Makarycheva, E. Y. Tsareva, M. A. Sudomoina, O. G. Kulakova, B. V Titov, O. V Bykova, N. V Gol'tsova, L. M. Kuzenkova, A. N. Boiko, O.

O. Favorova // *Acta Naturae*. – 2011. – V. 3. – № 1. – P.85–92.

101. Martinez de la Torre, Y. Protection against inflammation- and autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6. / Y. Martinez de la Torre, C. Buracchi, E. M. Borroni, J. Dupor, R. Bonecchi, M. Nebuloni, F. Pasqualini, A. Doni, E. Lauri, C. Agostinis, R. Bulla, D. N. Cook, B. Haribabu, P. Meroni, D. Rukavina, L. Vago, F. Tedesco, A. Vecchi, S. A. Lira, M. Locati, A. Mantovani // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – V. 104. – № 7. – P.2319–2324.

102. Merashli, M. Clinical relevance of antiphospholipid antibodies in systemic sclerosis: A systematic review and meta-analysis / M. Merashli, J. Alves, P. R. J. Ames // *Semin. Arthritis Rheum.* – 2017. – V. 46. – № 5. – P.615–624.

103. Meroni, P. L. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome (APS). / P.-L. Meroni, C. Chighizola // *La Rev. Med. interne.* – 2012. – V. 33 – P.A2-4.

104. Meroni, P.L. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: An additional example of the mosaic of autoimmunity / P. L. Meroni // *J. Autoimmun.* – 2008. – V. 30 – № 1–2 – P.99–103.

105. Meroni, P.L. Antiphospholipid Antibody Syndrome / P. L. Meroni. – Cham: Springer International Publishing:2015 –267p.

106. Meroni, P.L. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases / P. L. Meroni, M. Biggioggero, S. S. Pierangeli, J. Sheldon, I. Zegers, M. O. Borghi // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2013. – V. 10. – № 1. – P.35–43.

107. Meroni, P.L. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies / P. L. Meroni, M. O. Borghi, E. Raschi, F. Tedesco // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2011. – T. 7. – № 6. – P.330–339.

108. Meroni, P.L. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in centenarians / P. L. Meroni, D. Mari, D. Monti, R. Coppola, M. Capri, S. Salvioli, A. Tincani, R. Gerli, C. Franceschi // *Exp. Gerontol.* – 2004. – V. 39. – № 10. – P.1459–1465.

109. Meroni, P.L. Anti-phospholipid antibody mediated fetal loss: Still an open

question from a pathogenic point of view // *Lupus*. – 2010. – V. 19. – № 4. – P.453–456

110. Miesbach, W. Thrombotic manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with malignancies / W. Miesbach, I. Scharrer, R. Asherson // *Clin. Rheumatol.* – 2006. – V. 25. – № 6. – C.840–844.

111. Misasi, R. “New” Antigenic Targets and Methodological Approaches for Refining Laboratory Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome / R. Misasi, A. Capozzi, A. Longo, S. Recalchi, E. Lococo, C. Alessandri, F. Conti, G. Valesini, M. Sorice // *J. Immunol. Res.* – 2015. – V. 2015. – P.1–13.

112. Miyakis, S. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / S. Miyakis, M. D. Lockshin, T. Atsumi, D. W. Branch, R. L. Brey, R. Cervera, R. H. W. M. Derkesen, P. G. De Groot, T. Koike, P. L. Meroni, G. Reber, Y. Shoenfeld, A. Tincani, P. G. Vlachoyiannopoulos, S. A. Krilis // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – V. 4. – № 2. – P. 295–306.

113. Mok, C.C. Incidence and risk factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: A comparison of three ethnic groups / C. C. Mok, S. S. K. Tang, C. H. To, M. Petri // *Arthritis Rheum.* – 2005. – V. 52. – № 9. – P.2774–2782.

114. Moore, G. Recent Guidelines and Recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants / G. Moore // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2014. – V. 40 – № 2. – P.163–171.

115. Mulla, M.J. A Role for Uric Acid and the Nalp3 Inflammasome in Antiphospholipid Antibody-Induced IL-1 β Production by Human First Trimester Trophoblast / M. J. Mulla, J. E. Salmon, L. W. Chamley, J. J. Brosens, C. M. Boeras, P. B. Kavathas, V. M. Abrahams // *PLoS One*. – 2013. – V. 8 – № 6 – P.e65237.

116. Mullen, M.T. Anti-Phosphatidylserine-Prothrombin Antibodies are Associated with Outcome in a TIA Cohort / M. T. Mullen, S. R. Messé, S. E. Kasner, L. Sansing, M. R. Husain, G. L. Norman, Z. Shums, B. L. Cucchiara // *Front. Neurol.* – 2012. – V. 3 – P.137.

117. Nakamura, M. Clinical Significance of Autoantibodies in Primary Biliary Cirrhosis / M. Nakamura // *Semin. Liver Dis.* – 2014. – V. 34 – № 03 – P.334–340.

118. Nalli, C. Anti-phospholipid IgG antibodies detected by line immunoassay differentiate patients with anti-phospholipid syndrome and other autoimmune diseases / C. Nalli, V. Somma, L. Andreoli, T. Büttner, P. Schierack, M. Mahler, D. Roggenbuck, A. Tincani // *Autoimmun. Highlights* – 2018. – V. 9 – № 1 – P.6.

119. Nash, M.J. The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for antiphospholipid antibodies / M. J. Nash, R. S. Camilleri, S. Kunka, I. J. Mackie, S. J. Machin, H. Cohen // *J. Thromb. Haemost.* – 2004. – T. 2 – № 7 – 1077–1081c.

120. Noubouossie, D. An automated chemiluminescence immunoassay may detect mostly relevant IgG anticardiolipin antibodies according to revised Sydney criteria. / D. Noubouossie, J. Valsamis, F. Corazza, L. Rozen, F. Debaugnies, A. Demulder // *Acta Clin. Belg.* – 2012. – V. 67 – № 3 – P.184–189.

121. Okada, Y. Risk for ACPA-positive rheumatoid arthritis is driven by shared HLA amino acid polymorphisms in Asian and European populations / Y. Okada, K. Kim, B. Han, N. E. Pillai, R. T. H. Ong, W. Y. Saw, M. Luo, L. Jiang, J. Yin, S. Y. Bang, H. S. Lee, M. A. Brown, S. C. Bae, H. Xu, Y. Y. Teo, P. I. W. de Bakker, S. Raychaudhuri // *Hum. Mol. Genet.* – 2014. – V. 23 – № 25 – P.6916–6926.

122. Okuma, H. Investigation of Antiphosphatidyl-Serine Antibody and Antiphosphatidyl-Inositol Antibody in Ischemic Stroke Patients / H. Okuma, Y. Kitagawa, S. Takagi // *Clin. Dev. Immunol.* – 2010. – T. 2010 – P.1–4.

123. Olsen, N.J. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases / N. J. Olsen, M. Y. Choi, M. J. Fritzler // *Arthritis Res. Ther.* – 2017. – V. 19. – № 1. – P.172.

124. Opatrny, L. Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: A metaanalysis / L. Opatrny, M. David, S. R. Kahn, I. Shrier, E. Rey // *J. Rheumatol.* – 2006. – V. 33 – № 11.

125. Otomo, K. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events / K. Otomo, T. Atsumi, O. Amengual, Y. Fujieda, M. Kato, K. Oku, T. Horita, S. Yasuda, T. Koike // *Arthritis Rheum.* – 2012. – V. 64. – № 2. – P.504–512.

126. Özgüroğlu, M. Serum cardiolipin antibodies in cancer patients with thromboembolic events / M. Özgüroğlu, B. Arun, Y. Erzin, G. Demir, F. Demirelli, N. M. Mandel, E. Büyükkunal, S. Serdengeçti, B. Berkarda // *Clin. Appl. Thromb.* – 1999. – V. 5 – № 3 – P.181–184.

127. Pan, C. Molecular analysis of HLA-DRB1 allelic associations with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Taiwan / C. Pan, C. Wu, H. Chen, C. Dang, F. Chang, H. Liu, C. Chu, M. Lin, Y. Lee // *Lupus.* – 2009. – V. 18 – № 8 – P.698–704.

128. Papa, N. Del Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III: beta 2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. / N. Del Papa, L. Guidali, L. Spatola, P. Bonara, M. O. Borghi, A. Tincani, G. Balestrieri, P. L. Meroni // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 1995. – V. 13 – № 2 – P.179–185.

129. Papalardo, E. Major Histocompatibility Complex Class II Alleles Influence Induction of Pathogenic Antiphospholipid Antibodies in a Mouse Model of Thrombosis / E. Papalardo, Z. Romay-Penabad, R. Willis, P. Christadoss, A. L. Carrera-Marin, E. Reyes-Maldonado, R. Rudrangi, S. Alfieri-Papalardo, E. Garcia-Latorre, M. Blank, S. Pierangeli, A. R. Brasier, E. B. Gonzalez // *Arthritis Rheumatol.* – 2017. – V. 69 – № 10 – P.2052–2061.

130. Paust, S. Regulatory T cells and autoimmune disease/ S. Paust, H. Cantor // *Immunol. Rev.* – 2005. – №205. – P.195-207.

131. Pengo, V. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome / V. Pengo, A. Ruffatti, C. Legnani, P. Gresele, D. Barcellona, N. Erba, S. Testa, F. Marongiu, E. Bison, G. Denas, A. Banzato, S. Padayattil Jose, S. Iliceto // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – V. 8 – № 2. – P.237–242.

132. Pengo, V. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. / V. Pengo, A. Ruffatti, C. Legnani, S. Testa, T. Fierro, F. Marongiu, V. De Micheli, P. Gresele, M. Tonello, A. Ghirarduzzi, E. Bison, G. Denas, A. Banzato, S. Padayattil Jose, S. Iliceto // *Blood*. – 2011. – V. 118. – № 17. – P.4714–4718.

133. Petri, M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. / M. Petri // *J. Autoimmun.* – 2000. – V. 15 – № 2 – P.145–151.

134. Petri, M. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus / M. Petri, A.-M. Orbai, G. S. Alarcón, L. S. Magder // *Arthritis Rheum.* – 2012. – V. 64. – № 8. – P.2677–2686.

135. Podrebarac, T.A. Clinical correlates, serum autoantibodies and the role of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with SLE / T. A. Podrebarac, D. M. Boisert, R. Goldstein // *Lupus*. – 1998. – V. 7 – № 3 – P.183–191.

136. Pusterla, S. Antiphospholipid antibodies in lymphoma: prevalence and clinical significance. / S. Pusterla, S. Previtali, S. Marziali, S. Cortelazzo, A. Rossi, T. Barbui, M. Galli // *Hematol. J.* – 2004. – V. 5. – № 4. – P.341–346.

137. Reber, G. Technical Aspects in Laboratory Testing for Antiphospholipid Antibodies: Is Standardization an Impossible Dream? / G. Reber, F. Boehlen, P. de Moerloose // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2008. – V. 34. – № 4. – P.340–346.

138. Redecha, P. Tissue factor: A link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody-induced fetal injury / P. Redecha, R. Tilley, M. Tencati, J. E. Salmon, D. Kirchhofer, N. Mackman, G. Girardi // *Blood*. – 2007. – V. 110. – № 7. – P.2423–2431.

139. Reveille, J.D. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: I. The effects of HLA class II, C4, and CR1 alleles, socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset / J. D. Reveille, J. M. Moulds, C. Ahn, A. W. Friedman, B. Baethge, J.

Roseman, K. V. Straaton, G. S. Alarcon // *Arthritis Rheum.* – 1998. – V. 41 – № 7 – P.1161–1172.

140. Reynaud, Q. Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis / Q. Reynaud, J.-C. Lega, P. Mismetti, C. Chapelle, D. Wahl, P. Cathébras, S. Laporte // *Autoimmun. Rev.* – 2014. – V. 13 – № 6 – P.595–608.

141. Rioux, J.D. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases / J. D. Rioux, P. Goyette, T. J. Vyse, L. Hammarstrom, M. M. A. Fernando, T. Green, P. L. De Jager, S. Foisy, J. Wang, P. I. W. de Bakker, S. Leslie, G. McVean, L. Padyukov, L. Alfredsson, V. Annese, D. A. Hafler, Q. Pan-Hammarstrom, R. Matell, S. J. Sawcer, A. D. Compston, B. A. C. Cree, D. B. Mirel, M. J. Daly, T. W. Behrens, L. Klareskog, P. K. Gregersen, J. R. Oksenberg, S. L. Hauser // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – V. 106 – № 44 – P.18680–18685.

142. Roggenbuck, D. Antiphospholipid antibodies detected by line immunoassay differentiate among patients with antiphospholipid syndrome, with infections and asymptomatic carriers. / D. Roggenbuck, M. O. Borghi, V. Somma, T. Büttner, P. Schierack, K. Hanack, C. Grossi, C. Bodio, P. Macor, P. von Landenberg, F. Boccellato, M. Mahler, P. L. Meroni // *Arthritis Res. Ther.* – 2016. – V. 18 – № 1. - P.111.

143. Roggenbuck, D. Antiphospholipid antibody profiling — Time for a new technical approach? / D. Roggenbuck, K. Egerer, P. von Landenberg, R. Hiemann, E. Feist, G.-R. Burmester, T. Dörner // *Autoimmun. Rev.* – 2012. – V. 11 – № 11 – P.821–826.

144. Roggenbuck, D. Differentiation between APS patients and antiphospholipid antibody-positive carriers-impossible or matter of technique? / Roggenbuck D., P. Schierack, M. Mahler, P. Marcor, M.O. Borghi, P. L. Meroni // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2016. – V.18 – №1 – P.111.

145. Rote, N.S. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss: Correlation between the activated partial thromboplastin time and antibodies against

phosphatidylserine and cardiolipin / N. S. Rote, D. D. Johnson, D. Ware Branch // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1990. – V. 163 – № 2 – P.575–584.

146. Rouget, J.P. Lupus anticoagulant: a familial observation / J. P. Rouget, J. Goudemand, G. Montreuil, A. Cosson, J. Jaillard // *Lancet* – 1982. – V. 320 – № 8289 – P.105.

147. Ruffatti, A. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: A prospective multicentre follow-up study / A. Ruffatti, T. Del Ross, M. Ciprian, M. T. Bertero, S. Sciascia, S. Scarpato, C. Montecucco, S. Rossi, P. Caramaschi, D. Biasi, A. Doria, M. Rampudda, M. Nuzzo, F. Fischetti, U. Picillo, A. Brucato, E. Salvan, V. Pengo, P. Meroni, Angela Tincani // *Ann. Rheum. Dis.* – 2011. – V.70. – №6. – P.1083-1086.

148. Ruffatti, A. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. / A. Ruffatti, M. Tonello, T. Del Ross, A. Cavazzana, C. Grava, F. Noventa, F. Tona, S. Iliceto, V. Pengo // *Thromb. Haemost.* – 2006. – V. 96 – № 3 – P.337–341.

149. Saccone, G. Antiphospholipid antibody profile based obstetric outcomes of primary antiphospholipid syndrome: the PREGNANTS study / G. Saccone, V. Berghella, G. M. Maruotti, T. Ghi, G. Rizzo, G. Simonazzi, N. Rizzo, F. Facchinetti, A. Dall'Asta, S. Visentin, L. Sarno, S. Xodo, D. Bernabini, F. Monari, A. Roman, A. C. Eke, A. Hoxha, A. Ruffatti, E. Schuit, P. Martinelli // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2017. – V. 216. – № 5. – P.525.e1-525.e12.

150. Sahin, M. Clinical manifestations and antiphosphatidylserine antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: is there an association? / M. Sahin, N. Duzgun, S. E. Tunc, H. Tutkak // *Clin. Rheumatol.* – 2006. – V. 26. – № 2. – P.154–160.

151. Sater, M.S. Anti-annexin V IgM and IgG autoantibodies and the risk of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage / M. S. Sater, R. R. Finan, F. E. Mustafa, G. M. Al-Khateeb, W. Y. Almawi // *J. Reprod. Immunol.* – 2011. – V. 89 – № 1 – P.78–83.

152. Schved, J.F. A Prospective Epidemiological Study on the Occurrence of

Antiphospholipid Antibody: The Montpellier Antiphospholipid (MAP) Study / J. F. Schved, C. Dupuy-Fons, C. Biron, I. Quéré, C. Janbon // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* – 1994. – V. 24. – № 3. – P.175–182.

153. Sciascia, S. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score / S. Sciascia, G. Sanna, V. Murru, D. Roccatello, M. A. Khamashta, M. L. Bertolaccini // *Rheumatology (Oxford)*. – 2013. – V. 52. – № 8. – P.1397–1403.

154. Sebastiani, G. Immunogenetic studies on systemic lupus erythematosus / G. Sebastiani, M. Galeazzi // *Lupus*. – 2009. – V. 18 – № 10. – P.878–883.

155. Sebastiani, G.D. HLA-DPB1 alleles association of anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus / Sebastiani, G.D.Galeazzi, M.Tincani, A.Scorza, R.Mathieu, A.Passiu, G.Morozzi, G.Piette, J.C. Cervera, R.Houssiau, F.Smolen, J.Nebro, A Fernandez, De Ramon, E.Goral, A Jedryka, Papasteriades, C.Ferrara, G. B.Carcassi, C.Bellisai, F., Marcolongo, R. // *Lupus*. – 2003. – V.2. – №7. – P.560–563.

156. Shi, W. Prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a healthy population / W. Shi, S. A. Krilis, B. H. Chong, S. Gordon, C. N. Chesterman // *Aust. N. Z. J. Med.* – 1990. –V.20. – №3. – P.231-236.

157. Shimane, K. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes / K. Shimane, Y. Kochi, A. Suzuki, Y. Okada, T. Ishii, T. Horita, K. Saito, A. Okamoto, N. Nishimoto, K. Myouzen, M. Kubo, M. Hirakata, T. Sumida, Y. Takasaki, R. Yamada, Y. Nakamura, N. Kamatani, K. Yamamoto // *Rheumatology*. – 2013. – V. 52 – № 7 – P.1172–1182.

158. Siriboonrit, U. Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais / U. Siriboonrit, N. Tsuchiya, M. Sirikong, C. Kyogoku, S. Bejrachandra, P. Suthipinittharm, K. Luangtrakool, D. Srinak, R. Thongpradit, K. Fujiwara, D. Chandanayingyong, K. Tokunaga // *Tissue Antigens* – 2003. – V. 61 – № 5 – P.374–383.

159. Smolen, J.S. HLA-DR antigens in systemic lupus erythematosus: Association with specificity of autoantibody responses to nuclear antigens / J. S. Smolen, J. H. Klippel, E. Penner, M. Reichlin, A. D. Steinberg, T. M. Chused, O. Scherak, W. Graninger, E. Hartter, C. C. Zielinski // *Ann. Rheum. Dis.* – 1987. – V. 46 – № 6 – P.457–462.

160. Suggs, M.J.L. HLA DRB1*1503 allelic haplotype predominance and associated immunodysregulation in systemic lupus erythematosus / M. J. L. Suggs, V. Majithia, R. E. Lewis, J. M. Cruse // *Exp. Mol. Pathol.* – 2011. – V. 91 – № 2 – P.548–562.

161. Taraborelli, M. The contribution of antiphospholipid antibodies to organ damage in systemic lupus erythematosus / M. Taraborelli, L. Leuenberger, M. G. Lazzaroni, N. Martinazzi, W. Zhang, F. Franceschini, J. Salmon, A. Tincani, D. Erkan // *Lupus.* – 2016. – V. 25 – № 12 – P.1365–1368.

162. Tarr, T. Primary antiphospholipid syndrome as the forerunner of systemic lupus erythematosus / T. Tarr, G. Lakos, H. P. Bhattoa, G. Szegedi, Y. Shoenfeld, E. Kiss // *Lupus.* – 2007. – V. 16. – № 5. – P.324–328.

163. Taylor, K.E. Risk Alleles for Systemic Lupus Erythematosus in a Large Case-Control Collection and Associations with Clinical Subphenotypes / K. E. Taylor, S. A. Chung, R. R. Graham, W. A. Ortmann, A. T. Lee, C. D. Langefeld, C. O. Jacob, M. I. Kamboh, M. E. Alarcón-Riquelme, B. P. Tsao, K. L. Moser, P. M. Gaffney, J. B. Harley, M. Petri, S. Manzi, P. K. Gregersen, T. W. Behrens, L. A. Criswell // *PLoS Genet.* – 2011. – V. 7 – № 2 – P.e1001311.

164. Tektonidou M.G. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults / M. G. Tektonidou, L. Andreoli, M. Limper, Z. Amoura, R. Cervera, N. Costedoat-Chalumeau, M. J. Cuadrado, T. Dörner, R. Ferrer-Oliveras, K. Hambly, M. A. Khamashta, J. King, F. Marchiori, P. L. Meroni, M. Mosca, V. Pengo, L. Raio, G. Ruiz-Irastorza, Y. Shoenfeld, L. Stojanovich, E. Svenungsson, D. Wahl, A. Tincani, M. M. Ward // *Ann. Rheum. Dis.* – 2019. – V.78. – № 10 – P.1296–

1304.

165. Tektonidou, M.G. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: Prevalence, clinical associations, and long-term outcome / M. G. Tektonidou, F. Sotsiou, L. Nakopoulou, P. G. Vlachoyiannopoulos, H. M. Moutsopoulos // *Arthritis Rheum.* – 2004. – V. 50 – № 8 – P.2569–2579.

166. Tincani, A. Antiphospholipid antibodies and malignancies / A. Tincani, M. Taraborelli, R. Cattaneo // *Autoimmun. Rev.* – 2010. – V. 9. – № 4. – P. 200–202.

167. Tiscia, G. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications / G. Tiscia, D. Colaizzo, E. Chinni, D. Pisanelli, N. Sciannamè, G. Favuzzi, M. Margaglione, E. Grandone // *Thromb. Haemost.* – 2009. – V. 102. – № 08. – P.309–313.

168. Tüttelmann, F. Further insights into the role of the annexin A5 M2 haplotype as recurrent pregnancy loss factor, assessing timing of miscarriage and partner risk / F. Tüttelmann, P. Ivanov, C. Dietzel, A. Sofroniou, T. M. Tsvyatkovska, R. S. Komsa-Penkova, A. Markoff, P. Wieacker, N. Bogdanova // *Fertil. Steril.* – 2013. – V. 100 – № 5 – P.1321–1325.

169. Ulcova-Gallova, Z. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only / Z. Ulcova-Gallova, V. Krauz, P. Novakova, L. Milichovska, Z. Micanova, K. Bibkova, R. Sucha, J. Turek, M. Balvin, Z. Rokyta // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2005. – V.54. – №2. – P.112-117.

170. Urbanus, R.T. Antiphospholipid antibodies-we are not quite there yet. / R. T. Urbanus, P. G. de Groot // *Blood Rev.* – 2011. – V.25 – № 2 – P.97–106.

171. Vasan, R.S. Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular basis and practical considerations // *Circulation.* – 2006. – V. 113. – № 19. – P.2335–2362.

172. Vasconcelos, C. HLA in Portuguese systemic lupus erythematosus patients and

their relation to clinical features // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – V. 1173. – P.575–580.

173. Verro, P. Cerebrovascular ischemic events with high positive anticardiolipin antibodies / P. Verro, S. R. Levine, G. E. Tietjen // *Stroke* – 1998. – V.29. – №11. – P.2245 –2253.

174. Versini, M. Thyroid Autoimmunity and Antiphospholipid Syndrome: Not Such a Trivial Association. / M. Versini // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2017. – V. 8 –P. 175.

175. Wilson, R.W. Sjögren's syndrome. Influence of multiple HLA-D region alloantigens on clinical and serologic expression. / R. W. Wilson, T. T. Provost, W. B. Bias, E. L. Alexander, D. W. Edlow, M. C. Hochberg, M. B. Stevens, F. C. Arnett // *Arthritis Rheum.* – 1984. – V. 27. – № 11. – P.1245–1253.

176. Wilson, W.A. International Consensus Statement On Preliminary Classification Criteria For the Definite Antiphospholipis Syndrome / W. A. Wilson, A. E. Gharavi, T. Koike, M. D. Lockshin, D. W. Branch, J.-C. Piette, R. Brey, R. Derksen, E. N. Harris, G. R. Hughes, D. A. and Triplett, M. A. Khamashta // *Arthritis Rheum.* – 1999. – V. 42 – № 7 – P.1309–1311.

177. Yoon, K.H. High prevalence of antiphospholipid antibodies in Asian cancer patients with thrombosis / K. H. Yoon, A. Wong, T. Shakespeare, P. Sivalingam // *Lupus.* – 2003. – T. 12. – № 2. – P.112–116

178. Ziporen, L. Animal models for antiphospholipid syndrome in pregnancy / L. Ziporen, M. Blank, Y. Shoenfeld // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* – 1997. – V. 23. – № 1. – P.99–117.

179. Zuily, S. Increased risk for heart valve disease associated with antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: meta-analysis of echocardiographic studies. / S. Zuily, V. Regnault, C. Selton-Suty, V. Eschwège, J.-F. Bruntz, E. Bode-Dotto, E. De Maistre, P. Dotto, C. Perret-Guillaume, T. Lecompte, D. Wahl // *Circulation.* – 2011. – V. 124. – № 2. – P.215–224.