

Практические подходы к лабораторной оценке риска рецидивирующих тромбозов при антифосфолипидном синдроме

О. Ю. Ткаченко, врач клинической лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории НМЦ молекулярной медицины Минздрава России

С. В. Лапин, к.м.н., зав. лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ молекулярной медицины Минздрава России

А. В. Мазинг, к.м.н., в.н.с. лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, НМЦ молекулярной медицины Минздрава России

В. Л. Эмануэль, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова», Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Practical approaches to laboratory assessment of risk of recurrent thrombosis in antiphospholipid syndrome

O. Yu. Tkachenko, S. V. Lapin, A. V. Mazing, V. L. Emanuel

First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Антифосфолипидные антитела (АФА) представляют собой группу антител, которые взаимодействуют с фосфолипидами (ФЛ), фосфолипидно-белковыми комплексами и фосфолипид-связывающими белками. Важной характеристикой АФА является то, что они, в особенности $\beta 2$ ГП1-зависимые АФА, являются патогенными аутоантителами и ассоциированы с развитием тромбозов и привычного невынашивания беременности. Выявление АФА в качестве диагностического показателя включено в критерии антифосфолипидного синдрома (АФС) и системной красной волчанки (СКВ) SLICC 2012. Также АФА обнаруживаются у пациентов с другими аутоиммунными, инфекционными, онкологическими заболеваниями, у 10–12% пожилых и 1–5% здоровых молодых людей, но при этом не приводят к развитию тромбозов и невынашиванию беременности. В настоящее время в большинстве клинических лабораторий для измерения АФА используют иммуноферментные (ИФА) тест-системы, которые имеют ряд серьезных недостатков. Преимуществом мультиплексного лайн-дота для детекции АФА являются улучшение параметров сорбции антигенов, мультиплексный подход. Таким образом, новые методики могут служить инструментом для детекции АФА и способствовать улучшению качества диагностики аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: антифосфолипидные антитела, антифосфолипидный синдром, иммуноферментный анализ, мультиплексный лайн-дот, обзор.

Summary

Antiphospholipid antibodies (aPLs) are a heterogenous group of autoantibodies that interact with phospholipids (PL), phospholipid-protein complexes and phospholipid-binding proteins. aPLs are pathogenic and associated with the development of thrombosis and pregnancy pathology. The detection of aPLs as a diagnostic indicator is included in the criteria for antiphospholipid syndrome (APS) and systemic lupus erythematosus (SLE) SLICC 2012. Also, aPLs is found in patients with other autoimmune, infectious diseases and cancer, in 10–12% of elderly and 1–5% healthy young people, but do not lead to the development of thrombosis and/or miscarriage. Simultaneous detection of aPLs with different tests indicate bad prognosis and a higher risk of clinical manifestation of APS. Triple positivity for classical markers of disease is found in patients with oncoming thrombosis. Another concept is the Global APS Score (GAPSS) that also takes into account the aPL profile as well as conventional cardiovascular risk factor and also some autoantibodies found in systemic disease. Currently, enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA) are most widely used test for detection of aPLs. The advantage of new methods for detecting aPLs is to improve the parameters of sorption of antigens, automation, multiplex approach. Thus, new techniques can serve as a tool for the detection of aPLs and contribute to improving the quality of diagnosis of autoimmune diseases.

Key words: antiphospholipid antibodies, antiphospholipid antibodies syndrome, line immunoassay, ELISA, review.

Введение

Антифосфолипидный синдром (АФС) является аутоиммунным заболеванием, которое резко увеличивает риск развития артериального (венозного) тромбозов и (или) патологии беременности и характеризуется наличием антифосфолипидных антител (АФА) [1]. В 1999 году международные эксперты разработали клинические и лабораторные критерии для диагностики АФС, которые стали известны как критерии Сап-

поро [2]. Впоследствии эти критерии были пересмотрены в 2006 году в Сиднее [3]. Клинические критерии включают объективно подтвержденный венозный, артериальный или тромбоз мелких сосудов или патологию беременности, ассоциированную с плацентарной недостаточностью, включая невынашивание беременности или преждевременные роды. Лабораторные критерии требуют, чтобы положительный лабораторный

тест на антифосфолипидные антитела (АФА) был обнаружен в двух или более случаях с интервалом не менее 12 недель. В критерии включены антикардиолипиновые антитела (аКЛ) класса IgG или IgM в средних или высоких титрах, антитела против $\beta 2$ -гликопротеина I ($\beta 2$ -ГП1) классов IgG или IgM и волчаночный антикоагулянт (ВАК) [3].

Помимо классических АФА, были изучены другие многочислен-

ные АФА, такие как антитела против фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, аннексина V, которые могут определяться у пациентов с клиническими проявлениями АФС как вместе с аКЛ, $\alpha\beta$ 2-ГП1, ВАК, так и изолированно. Их изолированная детекция лежит в основе выявления пациентов с так называемым серонегативным АФС, то есть рецидивирующими тромбозами и невынашиванием беременности с отрицательными аКЛ, $\alpha\beta$ 2ГП1, ВАК. Их вклад в лабораторную диагностику для оценки риска клинических проявлений АФС на данный момент уточняется.

АФС сопровождается высоким риском повторных тромбозов, которые могут быть эффективно предотвращены посредством своевременного назначения профилактической антикоагулянтной терапии. Таким образом, одной из важных задач тактики лечения АФС является идентификация пациентов с высоким риском рецидивирующих клинических проявлений АФС. Среди классических АФА ВАК наиболее значимо ассоциирован с тромбозами и акушерскими осложнениями. Титр АФА (аКЛ и анти- β 2ГП1) также рассматривается в рамках оценки риска развития тромбозов и привычных невынашиваний беременности. Согласно международным рекомендациям, АФА представленные классом IgG в среднем и высоком титре считаются более важным фактором риска для клинических проявлений АФС по сравнению с низким титром и IgM изотипом. При определении риска развития тромбоза большое значение придают спектру выявляемых АФА. В нескольких исследованиях была продемонстрирована тесная связь между профилем выявляемых АФА (ВАК, аКЛ, $\alpha\beta$ 2ГП1) и клиническими проявлениями АФС. Так, Pengo и др. к 2010 году обнаружили, что при анализе спектра АФА одновременное выявление нескольких аутоантител позволяет определить риск развития тромбоэмболического события или выкидыша [4, 5]. В рекомендациях Европейской лиги против ревматических заболеваний (EULAR) по лечению АФС 2019 года выявление ВАК

(в двух или более случаях в течение 12 недель), двойная (любая комбинация ВАК, антитела к аСЛ или анти-бета-2-гликопротеин I антитела) или тройная (все три подтипа) АФА-позитивности, наличие постоянно высоких титров АФА классифицируются как спектр АФА высокого риска [6].

Совсем недавно были предложены шкала антифосфолипидных антител (aPL-S) и глобальная шкала АФС (GAPSS) [7, 8]. Авторы aPL-s предлагают комплексно оценивать профиль АФА. В GAPSS оцениваются клинические проявления, традиционные факторы сердечно-сосудистого риска и профиль АФА.

Таким образом, в диагностике АФС намечается общая тенденция, в которой важно не только установить диагноз АФС, но и выделить группы пациентов с высоким риском тромбозов, обусловленных антифосфолипидными антителами. Оценка риска осложнения особенно актуальна в акушерской практике, где нет возможности длительно наблюдать беременную с высокой вероятностью акушерской патологии для подтверждения диагноза АФС. Исследование традиционных АФА с помощью новых методов, определение уровней позитивности антител, оценка спектра редких АФА, присутствующих в сыворотке пациента, с помощью мультиплексных технологий, анализ сопутствующих факторов риска тромбозов представляют собой практические подходы в оценке рисков рецидивирующих тромбозов и акушерской патологии при АФС.

Классические и новые антифосфолипидные антитела

Антифосфолипидные антитела (АФА) представляют собой семейство антител, которые взаимодействуют с фосфолипидами (ФЛ), фосфолипидно-белковыми комплексами и фосфолипид-связывающими или кофакторными белками [9, 10]. Патогенетически значимые АФА реагируют со скрытым эпитопом белков кофакторов, то есть связывание аутоантител и белка является конформационно-зависимым [11, 12]. Естественный антикоагулянт и иммунорегулирующий

белок β 2-гликопротеин-1 (β 2ГП1) является наиболее подробно изученным кофактором АФА, который при взаимодействии с фосфолипидами изменяет конформацию и экспонирует неопэпитоп в домене 1. Особые иммуногенные структуры домена 1 становятся мишенями патогенных АФА в отличие от низкопатогенных АФА, которые могут реагировать с другими структурными доменами молекулы [13, 14]. К основным протромбогенным механизмам относится взаимодействие АФА с плазменным звеном гемостаза, а также системой антикоагулянтов, однако также показано воздействие аутоантител на тромбоциты и эндотелиоциты [15–19]. Описано множество моделей действия аутоантител *in vitro* и *in vivo* как связанных с нарушениями в системе коагуляции, так и опосредованных воздействием на иммунные, стромальные, эндотелиальные, плацентарные клетки, которые приводят к широкому спектру патогенных реакций. Отмечается способность АФА реагировать с фосфолипид-связывающими белками на мембранах разных типов клеток, что приводит в конечном итоге к их активации [20]. При АФА-ассоциированном невынашивании беременности АФА взаимодействуют с человеческим трофобластом, что ведет к апоптозу, ингибированию пролиферации, формирования синцития, снижению выработки хорионического гонадотропина, нарушению секреции факторов роста и нарушению естественных инвазивных свойств [21–23].

Реже выявляются антитела к другим плазменным белкам, способным менять конформацию при взаимодействии с фосфолипидным бислоем, в том числе протромбину и аннексину V [23–24]. Отдельно выделяют антитела к отрицательно заряженным и нейтральным фосфолипидам, в том числе аКЛ, фосфатидилсерину, фосфатидилэтаноламину и ряд других (рис. 1) [14, 26]. Была оценена диагностическая и прогностическая роль некоторых аутоантител, нацеленных на другие отрицательно заряженные фосфолипиды [26, 27]. В частности, антитела

Таблица 1

Шкала aPL-S — оценки риска развития клинических проявлений АФС

Тест	Баллы
АЧТВ-тест смешения	5
Подтверждающий тест, соотношение > 1,3	2
Подтверждающий тест, соотношение > 1,1	1
Каолиновое время свертывания	8
Тест с разведенным ядом гадюки Рассела (ВАК)	4
Подтверждающий тест, соотношение > 1,3	2
Подтверждающий тест, соотношение > 1,1	1
aКЛ IgG, высокие титры	20
aКЛ IgG, низкие титры	4
aКЛ IgM	2
aβ2ГП1 IgG, высокие титры	20
aβ2ГП1 IgG, низкие титры	6
aβ2ГП1 IgM	1
Антитела к Ps/Pt IgG, высокие титры	20
Антитела к Ps/Pt IgG, низкие титры	13
Антитела к Ps/Pt IgM	8



Рисунок 1. Мультиплексный лайн-дот для детекции антифосфолипидных антител.

Примечание: АЧТВ — активированное частичное тромбиновое время, aβ2ГП1 — антитела к β2-гликопротеину 1, aКЛ — антитела к кардиолипину, aPS-PT — антитела к комплексу «фосфатидилсерин — протромбин», ВАК — волчаночный антикоагулянт.

к трем анионным фосфолипидам, таким как фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидная кислота часто выявляются при АФС. Хотя выявление данных антител

не улучшает диагностику АФС по сравнению с классическими лабораторными критериями, однако спектр аутоантител может быть информативен при оценке риска

рецидива невынашивания беременности [28–30]. *In vitro* было показано, что антитела, направленные против ФС, ингибируют развитие и инвазию трофобласта. Кроме того, аФС может замедлять образование синцитиотрофобластов и снижать синтез ХГЧ [31].

Антитела, направленные против фосфатидилэтаноламина (аФЭ), выявлялись у пациентов с клиническими проявлениями АФС изолированно, и по этой причине они заслуживают особого внимания [32–34]. Данные антитела могут связываться с высокомолекулярным кининогеном, что приводит к образованию тримолекулярного комплекса с кининогеном, который усиливает индуцированную тромбином агрегацию тромбоцитов. Так антитела к фосфатидилэтаноламину значительно чаще встречается у женщин с необъяснимой ранней потерей плода, более того, в нескольких исследованиях сообщалось об их взаимосвязи с необъяснимыми венозными тромбозами [34].

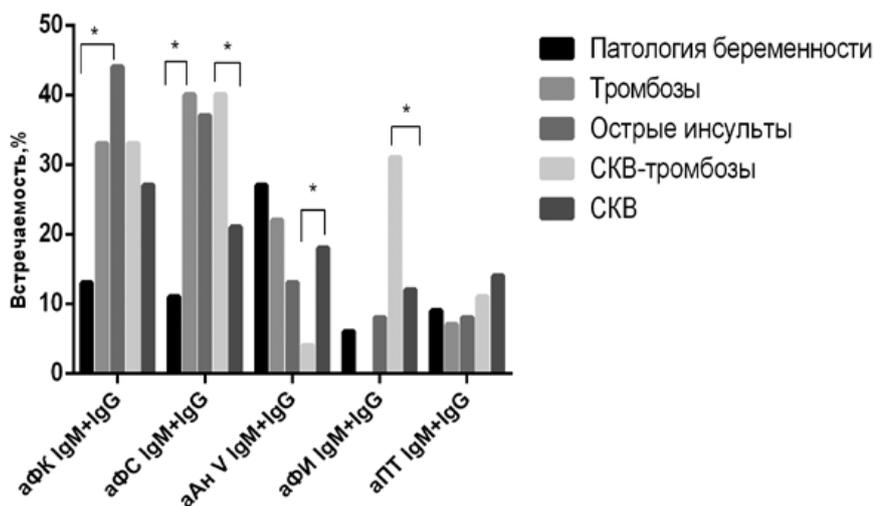


Рисунок 2. Встречаемость новых антифосфолипидных антител в группах пациентов с патологией беременности, тромбозами глубоких вен, инсультами, системной красной волчанкой с тромбозами, системной красной волчанкой без тромбозов в анамнезе.

Примечание: аФК — антитела к фосфатидной кислоте, аФС — антитела к фосфатидилсерину, аАнV — антитела к аннексину, аФИ — антитела к фосфатидилинозитолу, аПТ — антитела к протромбину, аФГ — антитела к фосфатидилглицеролу, аФХ — антитела к фосфатидилхолину.

Шкалы для оценки риска при антифосфолипидном синдроме

В попытке количественно оценить вероятность развития тромбозов Otomo и др. в 2012 году разработали диагностический комплекс тестов АФА (aPL-s), включающий пять коагуляционных тестов для детекции ВАК и шесть ИФА-тестов (aКл класса IgG/IgM, aβ2ГП1 класса IgG/IgM, фосфатидилсерин-зависимые антитела к протромбину класса IgG/IgM) [7]. В данном исследовании АФА профиль каждого пациента был индексирован, определен в формате антифосфолипидной шкалы (aPL-S) и ретроспективно проанализирован относительно риска тромботических событий у пациентов с аутоиммунными заболеваниями (табл. 1). Индекс aPL-S значимо коррелировал с риском тромботических событий, и в группе наиболее высокого риска состояли пациенты с индексом aPL-s > 30.

Для количественной оценки риска тромбоза и патологии беременности Sciascia и др. в 2013 году была разработана шкала GAPSS, представляющая собой глобальную оценку АФС [8]. Для этого был проведен анализ нескольких комбинаций независимых факторов риска тромбоза, определения профиля АФА, уточнения сердечно-сосудистых факторов риска, а также спектра других аутоантител (табл. 2). Концепция GAPSS позволяет рассматривать АФА не только как диагностический биомаркер для АФС и СКВ, но и как предиктор развития тромбозов и патологии беременности. Индекс GAPSS рассчитывается для каждого пациента путем сложения баллов, соответствующих факторам риска. Более высокий индекс отмечается у пациентов с тромбозами, тромбозами и патологией беременности, с рецидивирующими тромбозами. Индекс GAPSS > 11 продемонстрировал самую высокую чувствительность и специфичность.

Новые методы выявления антифосфолипидных антител

В большинстве клинических лабораторий для измерения АФА используют ИФА-тест-системы. В по-

Фактор	Баллы
aКл IgG/IgM	5
aβ2ГП1 IgG/IgM	4
ВАК	4
aPS-Pt антитела	3
Гиперлипидемия	3
Артериальная гипертензия	1

Примечание: aβ2ГП1 — антитела к β2-гликопротеину 1, aКл — антитела к кардиолипину, aPS-PT — антитела к комплексу «фосфатидилсерин — протромбин», ВАК — волчаночный антикоагулянт.

следние годы были опубликованы рекомендации по измерению АФА с использованием количественного ИФА. Они содержат информацию о типе анализируемой пробы, особенностях тестов, расчету референтного интервала и интерпретации результатов, но некоторые вопросы их практического использования остаются без ответа. Очевидно, что сбор, хранение и обработка проб для ИФА менее критичны по сравнению с коагуляционными тестами. Однако, сохраняются высокая вариация результатов aКЛ и aβ2ГП1 при межлабораторных сличениях, несмотря на попытки стандартизации тестирования. Различия в результатах теста возникают из-за методологических проблем при выполнении анализов, особенностей калибровки и отсутствия консенсуса в интерпретации как положительных, так и отрицательных результатов. В нашем недавнем исследовании мы проанализировали сходимость двух ИФА-тест-систем зарубежного производства для измерения aβ2ГП1 [36]. Мы исследовали пациентов с ранним (до 50 лет) острым некардиоэмболическим инсультом, лиц с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, а также пациенток с привычным невынашиванием беременности (всего n = 127). Сходимость двух тест-систем ИФА для определения aβ2ГП1 составила 70 %, для aКЛ IgG — 88 %, для aКЛ IgM — 70 %. При сопоставлении количественных результатов ИФА-тест-систем разных производителей для детекции АФА значения каппа (коэффициента

Коэна) составили: 0,045 для aβ2ГП1, 0,061 — для aКЛ IgM, 0,068 — для aКЛ Ig G. Таким образом, сходимость количественных результатов тест-систем разных производителей, популярных в лабораториях России, оказалась крайне низкой. Так как высокая вариабельность и низкая специфичность приводят к спорной клинической значимости АФА, целесообразно оценить преимущества новых методов детекции антител, способных 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. Связывание молекул β2ГП1 на твердой фазе имеет решающее значение, поскольку определяет конформационное изменение белка, необходимое для связывания аутоантител. Мультиплексный лайн-дот (МЛД), а также хемилюминисцентный анализ (ХА) характеризуются единовременным выявлением нескольких АФА. Автоматизированный ХА является альтернативой методу ИФА, но имеет ряд существенных преимуществ [13, 37, 38]. Измеряемые антитела, присутствующие в образце, связываются с твердой фазой, представленной магнитными частицами, покрытыми антигеном. При добавлении реагентов, которые вызывают хемилюминисцентную реакцию, испускаемый свет измеряется оптической системой прибора.

Этот сигнал прямо пропорционален концентрации антител АФА в образце. Особенностью МЛД является использование гидрофобной мембраны из поливинилидендифторида (PVDF), которая обладает уникальными свойствами [39]. 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*.

Использование мультиплексного лайн-дота для оценки риска тромбозов

В нашем недавнем исследовании мы проанализировали диагностическую ценность МЛД при постановке серологического диагноза АФС. Для измерения АФА мы использовали ИФА-тест-системы для детекции аКЛ и аβ2ГП1, мультиплексный лайн-дот для детекции аКЛ, аβ2ГП1, антител к аннексину V (аАн V), протромбину (аПТ), фосфатидной кислоте (аФК), фосфатидилинозитолу (аФИ), фосфатидсерину (аФС), фосфатидилхолину (аФХ), фосфатидилсерину (аФС), фосфатидилинозитолу (аФИ), фосфатидилэтаноламину (аФЭ) (рис. 1). Так как преимуществом метода МЛД является одновременная детекция спектра АФА, мы также оценили его использование для оценки риска клинических проявлений АФС [39, 40]. Для оценки роли МЛД в диагностике первичного АФС мы исследовали три группы пациентов: 44 пациента с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, 45 пациентов с двумя и более выкидышами. В качестве группы с вторичным АФС мы проанализировали 100 пациентов

с системной красной волчанкой (СКВ). В качестве группы сравнения использовались сыворотки крови 50 здоровых доноров. Мы провели сравнительный анализ встречаемости аβ2GP и аКЛ между методом МЛД и ИФА-тест-системами двух разных производителей, именуемых в дальнейшем ПР1 и ПР2 [36].

Большинство АФА при использовании ИФА-тест-систем и метода МЛД в группах с первичным АФС были обнаружены в низком титре. При оценке встречаемости АФА мы не выявили преимуществ метода МЛД по сравнению с ИФА. Но при анализе частоты средних и высоких титров новый метод показал достоверно более высокую чувствительность для детекции главных маркеров АФС — аКЛ. Это позволяет избавиться от значительного числа низкоположительных неспецифических реакций АФА, которые могут быть обусловлены транзиторными непатогенными антителами. Значимость выявления АФА в средних и высоких титрах и более выраженная связь с клиническими проявлениями была описана рядом авторов и включена в международные критерии АФС [41].

Так как одним из преимуществ МЛД является возможность обнаружения 10 видов АФА, была оценена частота выявления как аβ2ГП1, аКЛ, так и других АФА — аФК, аФХ, аФЭ, аФГ, аФИ, аФС, аАн V и аПТ (рис. 2). В общей когорте пациентов чаще всего обнаруживались аβ2GP1, аФС, аКЛ, аАн V, аФК. В группе пациентов с тромбозами глубоких вен нижних конечностей среди АФА чаще детектировались антитела к ФК (40%), к ФС (33%), к Анн V (22,1%), аПТ (7,4%). У пациентов с острыми инсультами были обнаружены антитела к ФК (46,2%), к ФС (37,2%), к Анн V (13,3%), к ФИ (8,9%), к ПТ (8,9%), к ФГ (6,7%). У пациенток с акушерской патологией встречались антитела к Анн V (26%), к ФХ (15,9%), к ФГ (13,6%), к ФК (13,5%), к ПТ (9,4%), к ФИ (6,8%), к ФЭ (4,5%). У пациентов с тромботическими проявлениями (тромбозы глубоких вен нижних конечностей и острые инсульты)

значительно чаще детектировались аФК IgG и IgM ($p = 0,0093$) и аФС IgG и IgM ($p = 0,0044$). Мы использовали новый метод МЛД для выявления АФА в группе пациентов с акушерской патологией и проанализировали спектр АФА антител. Для этого 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(+)]. Метод МЛД выявил больше пациентов с тройной позитивностью АФА, тем самым позволяя более эффективно оценить риск развития патологии беременности и выделить группу наибольшего риска осложнений.

В когорте пациентов с СКВ ($n = 100$) мы также исследовали распространенность АФА, измерив как ВАК, аКЛ IgG и IgM, аβ2ГП1 IgG и IgM, так и другие АФА — аФХ, аФЭ, аФГ, аФЭ, аФС, аФК, аАн V и аПТ классов IgG и IgM с помощью МЛД. Для этого мы разделили пациентов с СКВ на две группы: 55 пациентов с СКВ и тромбозами в анамнезе (СКВ-тромбозы) и 45 пациентов без тромбозов в анамнезе (СКВ без тромбозов). У пациентов с СКВ и тромбозами в анамнезе ($n = 45$) чаще выявлялись аКЛ IgG (38%; $p = 0,0266$) и аβ2ГП1 IgG (47%; $p = 0,0018$), определяемые с помощью ИФА, и аКЛ IgG (38%; $p = 0,0402$) и аβ2ГП1 IgG (38%; $p = 0,0127$), измеренные с помощью МЛД, по сравнению с пациентами с СКВ без тромбозов (12/9% аКЛ IgG, 16/9% аβ2ГП1 IgG методами ИФА / МЛД), а также ВАК (56% / 31%; $p = 0,0074$).

Недавно было высказано предположение, что МЛД может быть полезным инструментом для того, чтобы отличить пациентов с АФС от бессимптомных носителей [42]. Реактивность аКЛ и аβГП1 IgG/IgM, оцененная с помощью МЛД, была значительно выше у пациентов с АФС, в то время как связывание иммуноглобулинов класса IgG с КЛ и β2ГП1 было значительно ниже

у носителей АФА. Это можно объяснить, тем что ФЛ на новой подложке имитируют их естественную конформацию, необходимую для связывания белковых кофакторов.

Мы проанализировали встречаемость аКЛ, а β 2ГП1 в группах СКВ-тромбозы 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 ЕД ОП). В группе СКВ без тромбозов чувствительность обоих методов к различным титрам АФА не показала существенных различий. Но в группе СКВ-тромбозы МЛД показал ту же чувствительность, что и ИФА для аКЛ IgG и IgM, но оказался в три раза более чувствительным при обнаружении а β 2ГП1 классов IgM и IgG.

В нашем исследовании мы оценили и другие АФА, обнаруженные методом МЛД в группах СКВ-тромбозы и СКВ без тромбозов в анамнезе. Нами было обнаружено, что аФС и аФИ класса IgG в 3,6 раза чаще встречались у пациентов с тромбозами в анамнезе, и, таким образом, эти антитела могут быть использованы в качестве маркеров риска развития тромбозов у пациентов с СКВ. В группах СКВ-тромбозы и СКВ без тромбозов мы также оценили АФА. Мы проанализировали обнаружение 1–3 и более 4 различных АФА IgM и IgG отдельно с помощью МЛД. В группе СКВ более 4 маркеров IgM и особенно IgG выявлялись значительно чаще у пациентов с СКВ и тромбозами в анамнезе по сравнению с СКВ без клинических проявлений АФС.

Таким образом, метод мультиплексного лайн-блоттинга показывает более высокую чувствительность при детекции средних и высоких титров АФА, а также позволяет выявить пациентов с множественной серологической позитивностью (табл. 3). Наши данные указывают на то, что МЛД для выявления АФА является эффективной мультипараметрической тест-системой для одновременного полуколичественного обнаружения спектра аутоантител

Преимущества мультиплексного лайн-дота для детекции антифосфолипидных антител

- Выявление максимально широкого спектра антифосфолипидных антител одновременно
- Преимущественная детекция высокого уровня антифосфолипидных аутоантител
- Оценка риска тромбозов и невынашивания беременности при антифосфолипидном синдроме
- Оценка риска тромбозов при системной красной волчанке

в одном образце. Уникальные свойства этого метода позволяют рассматривать его как важный инструмент для оценки риска развития клинических проявлений АФС.

Заключение

Можно сделать вывод, что лабораторная диагностика АФС все еще находится в процессе развития. Стандартизация ИФА-тест-систем для детекции аКЛ и а β 2ГП1 в диагностике АФС остаются спорным вопросом. В нашем обзоре мы оценили возможности новых методологических подходов для выявления антифосфолипидных антител. Преимуществами новых методов детекции АФА являются улучшение параметров сорбции антигенов, автоматизация, мультиплексный подход. Использование новых методов позволяет выявлять патогенетически-значимые АФА. Новые технологии могут представлять собой полезные инструменты для диагностики иммунологических нарушений, способствуя повышению эффективности и точности диагностики аутоиммунных заболеваний.

Список литературы

1. Hughes G. R. V. Hughes Syndrome (the antiphospholipid syndrome) / Hughes G. R. V. // *Autoimmunity Reviews* — 2008. — V. 7 — N3 — P. 262–266.
2. Wilson W. A. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: Report of an International workshop / Wilson W. A., Gharavi A. E., Koike T., Lockshin M. D., Branch D. W., Piette J.-C., Brey R., Derksen R., Harris E. N., Hughes G. R. V., Triplett D. A., Khamashta M. A. // *Arthritis & Rheumatism* — 1999. — V. 42 — N7 — P. 1309–1311.
3. Miyakis S. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / Miyakis S., Lockshin M. D., Atsumi T., Branch D. W., Brey R. L., Cervera R., Derkesen R. H. W. M., Groot P. G. De, Koike T., Meroni P. L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyianopoulos P. G., Krilis S. A. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2006. — V. 4 — N2 — P. 295–306.
4. Pengo V. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome / Pengo V., Biasiolo A., Pegoraro C., Cucchini U., Noventa F., Illiceto S. // *Thrombosis and Haemostasis* — 2005. — V. 93 — N06 — P. 1147–1152.
5. Pengo V. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome / Pengo V., Ruffatti A., Legnani C., Gresele P., Barcellona D., Erba N., Testa S., Marongiu F., Bison E., Denas G., Banzato A., Padayattil Jose S., Illiceto S. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* — 2010. — V. 8 — N2 — P. 237–242.
6. Tektonidou M. G. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults / Tektonidou M. G., Andreoli L., Limper M., Amoura Z., Cervera R., Costedoat-Chalumeau N., Cuadrado M. J., Dörner T., Ferrer-Oliveras R., Hambly K., Khamashta M. A., King J., Marchiori F., Meroni P. L., Mosca M., Pengo V., Raio L., Ruiz-Irastorza G., Shoenfeld Y., Stojanovich L., Svenungsson E., Wahl D., Tincani A., Ward M. M. // *Annals of the Rheumatic Diseases* — 2019. — C. *annrheumdis-2019-215213*.
7. Otomo K. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events / Otomo K., Atsumi T., Amengual O., Fujieda Y., Kato M., Oku K., Horita T., Yasuda S., Koike T. // *Arthritis and Rheumatism* — 2012. — V. 64 — N2 — P. 504–512.
8. Sciascia S. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. / Sciascia S., Sanna G., Murru V., Roccatello D., Khamashta M. A., Bertolaccini M. L. // *Rheumatology (Oxford, England)* — 2013. — V. 52 — N8 — P. 1397–403.
9. Meroni P. L. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: An additional example of the mosaic of autoimmunity / Meroni P. L. // *Journal of Autoimmunity* — 2008. — V. 30 — N1–2 — P. 99–103.
10. Meroni P.-L. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome (APS). / Meroni P.-L., Chighizola C. // *La Revue de medecine interne* — 2012. — T. 33 Suppl 2 — P. A2–4.
11. Laaf B. de Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change / Laaf B. de // *Blood* — 2006. — V. 107 — N5 — P. 1916–1924.
12. Ağar Ç. β 2-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: Implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome / Ağar Ç., Os G. M. A., Van, Mörgelin M., Sprenger R. R., Marquart J. A., Urbanus R. T., Derksen R. H. W. M., Meijers J. C. M., Groot P. G. De // *Blood* — 2010. — V. 116 — N8 — P. 1336–1343.

13. Misasi R. "New" Antigenic Targets and Methodological Approaches for Refining Laboratory Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome / Misasi R., Capozzi A., Longo A., Recalchi S., Lococo E., Alessandri C., Conti F., Valesini G., Sorice M. // *Journal of Immunology Research* — 2015. — V. 2015 — P. 1–13.
14. Mahler M. Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein 1: A promising candidate biomarker for risk management in antiphospholipid syndrome / Mahler M., Norman G. L., Meroni P. L., Khamashta M. // *Autoimmunity Reviews* — 2012. — V. 12 — N2 — P. 313–317.
15. Cugno M. Patients with antiphospholipid syndrome display endothelial perturbation. / Cugno M., Borghi M. O., Lonati L. M., Ghiadoni L., Gerosa M., Grossi C., Angelis V. De, Magnaghi G., Tincani A., Mari D., Riboldi P., Meroni P. L. // *Journal of Autoimmunity* — 2010. — V. 34 — N2 — P. 105–110.
16. Boles J. Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. / Boles J., Mackman N. // *Lupus* — 2010. — V. 19 — N4 — P. 370–8.
17. Agostinis C. A non-complement-fixing antibody to 2 glycoprotein 1 as a novel therapy for antiphospholipid syndrome / Agostinis C., Durigutto P., Sblattero D., Borghi M. O., Grossi C., Guida F., Bulla R., Macor P., Pregolato F., Meroni P. L., Tedesco F. // *Blood* — 2014. — V. 123 — N22 — P. 3478–3487.
18. Pennings M. T. T. Interaction of β 2-glycoprotein I with members of the low density lipoprotein receptor family / Pennings M. T. T., Lummel M. Van, Derksen R. H. W. M., Urbanus R. T., Romijn R. A., Lenting P. J., Groot P. G. De // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* — 2006. — V. 4 — N8 — P. 1680–1690.
19. Meroni P. L. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies / Meroni P. L., Borghi M. O., Raschi E., Tedesco F. // *Nature Reviews Rheumatology* — 2011. — V. 7 — N6 — P. 330–339.
20. Simone N. Di Antiphospholipid Antibodies Affect Human Endometrial Angiogenesis / Simone N. Di, Nicuolo F. Di, D'ippolito S., Castellani R., Tersigni C., Caruso A., Meroni P., Marana R. // *Biology of Reproduction* — 2010. — V. 83 — N2 — P. 212–219.
21. Rand J. H. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: Role in pregnancy losses and thrombosis // *Lupus*. — 2010. — V. 19. — N4. — P. 460–469.
22. Viall C. A. Antiphospholipid antibodies internalised by human syncytiotrophoblast cause aberrant cell death and the release of necrotic trophoblast debris / Viall C. A., Chen Q., Liu B., Hickey A., Snowise S., Salmon J. E., Stone P. R., Chamley L. W. // *Journal of Autoimmunity* — 2013. — V. 47 — P. 45–57.
23. 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 / Bertolaccini M., Amengual O., Atsumi T., Binder W., Laaf B. de, Forastiero R., Kuffeh W., Lambert M., Matsubayashi H., Murthy V., Petri M., Rand J., Sanmarco M., Tebo A., Pierangeli S. // *Lupus* — 2011. — V. 20 — N2 — P. 191–205.
24. Sater M. S. Anti-annexin V IgM and IgG autoantibodies and the risk of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage / Sater M. S., Finan R. R., Mustafa F. E., Al-Khateeb G. M., Al-mawi W. Y. // *Journal of Reproductive Immunology* — 2011. — V. 89 — N1 — P. 78–83.
25. Sciascia S. New Tests to Detect Antiphospholipid Antibodies: Antiprothrombin (aPT) and Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin (aPS/PT) Antibodies / Sciascia S., Khamashta M. A., Bertolaccini M. L. // *Current Rheumatology Reports* — 2014. — V. 16 — N5 — P. 415.
26. Favalaro E. J. Antiphospholipid antibody testing for the antiphospholipid syndrome: a comprehensive practical review including a synopsis of challenges and recent guidelines / Favalaro E. J., Wong R. C. W. // *Pathology* — 2014. — V. 46 — N6 — P. 481–495.
27. Erkan D. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Treatment Trends / Erkan D., Aguiar C. L., Andrade D., Cohen H., Cuadrado M. J., Danowski A., Levy R. A., Ortel T. L., Rahman A., Salmon J. E., Tektonidou M. G., Willis R., Lockshin M. D. // *Autoimmunity Reviews* — 2014. — V. 13 — N6 — P. 685–696.
28. Branch D. W. Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome / Branch D. W., Silver R., Pierangeli S., Leeuwen I. Van, Harris E. N. // *Obstetrics and Gynecology* — 1997.
29. Bertolaccini M. L. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome / Bertolaccini M. L., Roch B., Amengual O., Atsumi T., Khamashta M. A., Hughes G. R. V. // *British Journal of Rheumatology* — 1998.
30. Fialová L. Prevalence of various antiphospholipid antibodies in pregnant women / Fialová L., Mikulíková L., Matouš-Malbohan I., Benešová O., Zwinger A. // *Physiological Research* — 2000.
31. Katsuragawa H. Monoclonal Antibody against Phosphatidylserine Inhibits *In Vitro* Human Trophoblastic Hormone Production and Invasion / Katsuragawa H., Kanzaki H., Inoue T., Hirano T., Mori T., Rote N. S. // *Biology of Reproduction* — 1997. — V. 56 — N1 — P. 50–58.
32. Gris J. C. Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nimes Obstetricians and Haematologists Study — NOHA. / Gris J. C., Quéré I., Sanmarco M., Boutiere B., Mercier E., Amirat J., Hubert A. M., Ripart-Neveu S., Hoffet R., Tailland M. L., Rousseau O., Monpeyroux F., Dauzat M., Sampol J., Daures J. P., Berlan J., Marès P. // *Thrombosis and haemostasis* — 2000. — V. 84 — N2 — P. 228–36.
33. Sugi T. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss* / Sugi T., Matsubayashi H., Inomo A., Dan L., Makino T. // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* — 2004. — V. 30 — N4 — P. 326–332.
34. Sanmarco M. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis / Sanmarco M., Gayet S., Alessi M.-C., Audrain M., Maistre E. de, Gris J.-C., Groot P. de, Hachulla E., Harlé J.-R., Sié P., Boffa M.-C. // *Thrombosis and Haemostasis* — 2007. — V. 97 — N06 — P. 949–954.
35. Sanmarco M. ELISA for antiphosphatidylethanolamine antibody detection: High impact of assay buffer on results / Sanmarco M. // *Journal of Immunological Methods* — 2010. — V. 358 — V. 1–2 — P. 9–16.
36. Ткаченко О. Ю. Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител / Ткаченко О. Ю., Лапин С. В., М. М. А. В. Л. Н., Шмонин А. А., Соловьева Л. Н., Бондарева Е. А., Сельков С. А., Чепанов С. В., Тотолян А. А., Анализ С., Методов И. — 2017. — Т. 62 — № 1 — С. 40–44.
37. Capozzi A. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay / Capozzi A., Lococo E., Grasso M., Longo A., Garofalo T., Misasi R., Sorice M. // *Journal of Immunological Methods* — 2012. — V. 379 — V. 1–2 — P. 48–52.
38. Noubououssie D. An automated chemiluminescence immunoassay may detect mostly relevant IgG anticardiolipin antibodies according to revised Sydney criteria. / Noubououssie D., Valsamis J., Corazza F., Rozen L., Debaugnies F., Demulder A. // *Acta clinica Belgica* — 2012.
39. Egerer K. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay / Egerer K., Roggenbuck D., Büttner T., Lehmann B., Kohn A., Landenberg P. von, Hiemann R., Feist E., Burmester G.-R., Dörner T. // *Arthritis Research & Therapy* — 2011. — V. 13 — N4 — P. R118.
40. Nalli C. Anti-phospholipid IgG antibodies detected by line immunoassay differentiate patients with anti-phospholipid syndrome and other autoimmune diseases / Nalli C., Somma V., Andreoli L., Büttner T., Schierack P., Mahler M., Roggenbuck D., Tincani A. // *Autoimmunity Highlights* — 2018. — V. 9 — N1 — P. 6.
41. Ткаченко О. Ю., Лапин С. В., Шмонин А. А., Соловьева Л. Н., Бондарева Е. А., Сельков С. А., Чепанов С. В. Т. А. А. Анализ спектра антифосфолипидных антител у пациентов с тромбозами и привычным невынашиванием беременности / Ткаченко О. Ю., Лапин С. В., Шмонин А. А., Соловьева Л. Н., Бондарева Е. А., Сельков С. А., Чепанов С. В. Т. А. А., Дирк П. // *Medical Immunology (Russia)* — 2018. — Т. 20 — № 5 — С. 753–762.
42. Roggenbuck D. Differentiation between APS patients and antiphospholipid antibody-positive carriers-impossible or matter of technique? / Roggenbuck D., Schierack P., Mahler M., P. Marcor, M. O. Borghi, Meroni P. L. // *Clinical and Experimental Rheumatology* — 2016.

Для цитирования. Ткаченко О. Ю., Лапин С. В., Мазинг А. В., Эмануэль В. Л. Практические подходы к лабораторной оценке риска рецидивирующих тромбозов при антифосфолипидном синдроме // *Медицинский алфавит*. Серия «Обзорение». — 2019. — Т. 4. — 35 (410). — С. 16–22.

