



# Новые методы выявления антифосфолипидных антител

О.Ю. Ткаченко<sup>1</sup>, С.В. Лапин<sup>1</sup>, А.В. Мазинг<sup>1</sup>, Т.В. Блинова<sup>1</sup>, С.Е. Бутина<sup>2</sup>, В.Л. Эмануэль<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-методический центр по молекулярной медицине; Россия, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Санкт-Петербург

**Цель обзора:** освещение представлений о современных методах выявления антифосфолипидных антител (АФА) в крови.

**Основные положения.** В настоящее время в большинстве клинических лабораторий уровень АФА измеряют методом иммуноферментного анализа с помощью специальных тест-систем, которые имеют ряд серьезных недостатков. Преимущества новых методов выявления АФА — улучшение параметров сорбции антигенов, автоматизация, мультиплексный подход. Хемилюминесцентные анализаторы позволяют добиться очень высокой точности при измерении высоких титров АФА и в диагностике антифосфолипидного синдрома демонстрируют чувствительность, достигающую 100%, при специфичности 72,3%. Мультиплексный лайн-дот быстрее и эффективнее выявляет женщин с наличием сразу трех видов АФА и дает возможность выделить среди них группу наибольшего риска осложнений беременности. Этот тест также обнаруживает антитела к домену 1  $\beta_2$ -гликопротеина I.

**Заключение.** Новые методы обнаружения АФА могут повысить точность диагностики аутоиммунных заболеваний.

**Ключевые слова:** антифосфолипидные антитела, антифосфолипидный синдром, системная красная волчанка, иммуноферментный анализ, мультиплексный лайн-дот, хемилюминесцентный анализ.

**Вклад авторов:** Ткаченко О.Ю. — обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, сбор клинического материала, обработка, анализ и интерпретация данных, статистическая обработка данных; Лапин С.В. — обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, выполнение работ по контролю качества исследований; Мазинг А.В. — обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, выполнение лабораторных исследований, анализ и интерпретация данных, оформление результатов рукописи для печати; Блинова Т.В. — обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, выполнение лабораторных исследований, анализ и интерпретация данных, оформление результатов рукописи для печати; Бутина С.Е. — обзор публикаций по теме статьи, сбор клинического материала, обработка, анализ и интерпретация данных; Эмануэль В.Л. — разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи для публикации.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

**Для цитирования:** Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Мазинг А.В., Блинова Т.В., Бутина С.Е., Эмануэль В.Л. Новые методы выявления антифосфолипидных антител. Доктор.Ру. 2019; 10(165): 57–62. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-165-10-57-62

## New Methods for Detecting Antiphospholipid Antibodies

O.Yu. Tkachenko<sup>1</sup>, S.V. Lapin<sup>1</sup>, A.V. Mazing<sup>1</sup>, T.V. Blinova<sup>1</sup>, S.E. Butina<sup>2</sup>, V.L. Emanuel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Guidance Center for Molecular Medicine; 6-8 Lev Tolstoy St., Bldg. 28, St. Petersburg, Russian Federation 197022

<sup>2</sup> Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University (a Federal Government-funded Educational Institution of Higher Education), Russian Ministry of Health; 6-8 Lev Tolstoy St. Bldg. 28, St. Petersburg, Russian Federation 197022

**Objective of the Review:** To describe the understanding of current methods for detecting antiphospholipid antibodies (aPL) in the blood.

**Key Points:** At present, in most clinical laboratories the aPL level is measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using special test systems, which have serious drawbacks. The advantages of new methods for detecting aPL include improved antigen sorption, automation of the procedure, and multiplexing. A chemiluminescent assay is a highly precise technology for measuring high aPL titers, achieving up to 100% sensitivity and 72.3% specificity in diagnosing antiphospholipid syndrome. Multiplex line/dot blots permit faster and more effective identification of women with all three types of aPL, and make it possible to single out those at highest risk for complications of pregnancy. They also detect antibodies to domain 1 of  $\beta_2$ -glycoprotein I.

**Conclusion:** New methods for detecting aPL may improve the accuracy of diagnostics for autoimmune disorders.

**Keywords:** antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus, enzyme-linked immunosorbent assay, multiplex line/dot, chemiluminescent assay.

**Contribution:** Tkachenko O.Yu. — thematic publications reviewing, study design, a set of clinical material, data review, analysis and interpretation, statistical data processing; Lapin S.V. — thematic publications reviewing, study design, research quality control; Mazing A.V. — thematic publications reviewing, study design, laboratory tests, data analysis and interpretation, manuscript preparation; Blinova T.V. — thematic publications reviewing, study design, laboratory tests, data analysis and interpretation, manuscript preparation; Butina S.E. — thematic publications reviewing, a set of clinical material, data review, analysis and interpretation; Emanuel V.L. — study design, data analysis and interpretation, article reviewing.

**Conflict of interest:** The authors declare that they do not have any conflict of interests.

**For citation:** Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Blinova T.V., Butina S.E., Emanuel V.L. New Methods for Detecting Antiphospholipid Antibodies. Doctor.Ru. 2019; 10(165): 57–62. (in Russian) DOI: 10.31550/1727-2378-2019-165-10-57-62

Блинова Татьяна Владимировна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине. 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 28. eLIBRARY.RU SPIN: 1637-4357. E-mail: vblinova@list.ru  
Бутина София Евгеньевна — студентка 6-го курса, член студенческого научного общества ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 28. E-mail: ejvcons@mail.ru  
(Окончание на с. 58.)



Данный обзор имеет своей целью освещение представлений о современных методах выявления антифосфолипидных антител (АФА) в крови. АФА — семейство антител, которые взаимодействуют с фосфолипидами, фосфолипидно-белковыми комплексами и фосфолипидсвязывающими, или кофакторными, белками. Патогенетически значимые АФА связываются со скрытым эпитопом кофакторных белков, т. е. связывание аутоантител и белков является конформационно-зависимым. Естественный антикоагулянт иммунорегулирующий белок  $\beta_2$ -гликопротеин I — наиболее полно изученный кофактор АФА, который при взаимодействии с фосфолипидами изменяет конформацию и экспонирует неоэпитоп в домене 1 [1]. Реже выявляются антитела к другим плазменным белкам, способным менять конформацию при взаимодействии с фосфолипидным бислоем, в том числе к протромбину и аннексину V.

Отдельно рассматривают АФА к отрицательно заряженным и нейтральным фосфолипидам, в том числе к кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилэтаноламину, аннексину, протромбину, фосфатидилглицеролу, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте, фосфатидилхолину и др. Однако АФА часто встречаются при инфекционных процессах, поэтому их обнаружение является низкоспецифичным.

Обычно АФА выявляют с помощью иммунометрических тестов, а также функционального коагуляционного теста, известного как тест на наличие волчаночного антикоагулянта (ВАК) [2]. Это целый комплекс коагуляционных тестов, выявляющий подавление фосфолипидзависимых коагуляционных реакций под действием антител при отсутствии дефицита факторов свертывания крови [3].

Имеются сведения о высокой частоте развития тромбозов и привычного невынашивания беременности у лиц с положительным результатом анализа на наличие АФА в сыворотке крови [4]. Основными тромбогенными механизмами считают взаимодействие АФА с системой плазменного гемостаза и системой антикоагулянтов, однако установлено также воздействие аутоантител на тромбоциты и эндотелиоциты.

Исследовано *in vitro* и *in vivo* множество моделей действия аутоантител, которые могут нарушить процесс коагуляции как напрямую, так и опосредованно — влияя на иммунные, стромальные, эндотелиальные, плацентарные клетки, что вызывает широкий спектр патогенных реакций. Отмечена способность АФА реагировать с фосфолипидсвязывающими белками на мембранах разных типов клеток, что приводит в конечном счете к их активации [4]. При ассоциированном с АФА невынашивании беременности они взаимодействуют с человеческим трофобластом, что обуславливает повреждение клеток и усиливает апоптоз, ингибирует пролиферацию, формирование синцития, снижает выработку хорионического гонадотропина, нарушает секрецию факторов роста и ослабляет естественные инвазивные свойства.

Определение уровня АФА входит в критерии диагностики системной красной волчанки (СКВ), разработанные

Международной коллаборацией клиник по проблеме СКВ (англ. Systemic Lupus International Collaborating Clinics, SLICC) и пересмотренные в 2012 г. [5], а также в критерии диагностики антифосфолипидного синдрома (АФС) [2]. Серологический маркер СКВ в рекомендациях SLICC — уровень антител к кардиолипину. Для диагностики АФС выявляют антител к кардиолипину (IgG и IgM) к кардиолипину, а также антитела (IgG и IgM) к  $\beta_2$ -гликопротеину I. Диагноз АФС ставят при обнаружении антител (IgG/IgM) к кардиолипину и ВАК при повторном исследовании спустя 12 недель, причем в среднем или высоком титре ( $\geq 40$  U или выше 99-го перцентиля), что позволяет исключить наличие транзиторных АФА.

Большинство исследователей отмечает высокую частоту выявления АФА при многих заболеваниях: аутоиммунных (первичном билиарном циррозе, аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, ревматоидном артрите, синдроме Шегрена, системной склеродермии, целиакии и саркоидозе), инфекционных (гепатите С, ВИЧ-инфекции, парвовирусной, микоплазменной, стрептококковой инфекции, туберкулезе), лимфопролиферативных и онкологических. Однако АФА также иногда обнаруживаются у здоровых людей (у 10–12% пожилых и 1–2% молодых), у которых их наличие не приводит к развитию тромбозов и невынашиванию беременности [6–10]. В связи с этим предполагается, что для запуска патогенетических механизмов недостаточно наличия АФА — необходимо дополнительное воздействие, которое усугубляет тромбогенный эффект аутоантител [11]. Такое воздействие оказывают факторы сердечно-сосудистого риска (например, артериальная гипертензия, СД и ожирение), приобретенного тромботического риска (например, курение, оральная контрацепция и беременность), генетические факторы гиперкоагуляции (например, мутация в гене фактора V Лейдена или в гене фактора II, а также в генах протеинов C и S) и острые инфекции. Кроме того, действие АФА может быть обусловлено их эпитопной специфичностью. Недавно было показано, что антитела к  $\beta_2$ -гликопротеину I подразделяются на антитела к домену 1, которые связаны с клиническими проявлениями АФС, и антитела к домену 4/5, которые чаще выявляются при инфекционных заболеваниях и ассоциированы с развернутой картиной АФС [12, 13]. В настоящий момент метод выявления патогенетически значимых АФА так и не разработан.

Таким образом, при определении риска развития тромбоза большое значение имеет спектр АФА. В нескольких исследованиях продемонстрирована тесная связь между спектром выявляемых АФА (ВАК, антитела к кардиолипину и  $\beta_2$ -гликопротеину I) и клиническими проявлениями АФС. Так, V. Pengo и соавт. показали, что одновременное обнаружение нескольких АФА позволяет точнее определить риск развития тромбоземболии или выкидыша [14]. Пациенты, у которых выявлены одновременно антитела к кардиолипину и  $\beta_2$ -гликопротеину I в среднем или высоком титре и ВАК,

Лапин Сергей Владимирович — к. м. н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине. 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 28. eLIBRARY.RU SPIN: 9852-7501. E-mail: svlapin@mail.ru

Мазинг Александра Васильевна — к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики НМЦ по молекулярной медицине. 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 28. eLIBRARY.RU SPIN: 4458-4633. E-mail: alex\_mazing@mail.ru

Ткаченко Ольга Юрьевна — врач клинко-диагностической лаборатории НМЦ по молекулярной медицине. 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 28. eLIBRARY.RU SPIN: 6593-8770. E-mail: kachenie@mail.ru

Эмануэль Владимир Леонидович — д. м. н., профессор, академик Академии метрологии, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России; директор НМЦ по молекулярной медицине. 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 28. eLIBRARY.RU SPIN: 1177-4802. E-mail: vladimirem1@gmail.com (Окончание. Начало см. на с. 57.)

относятся к группе крайне высокого риска развития клинических проявлений.

В попытках количественно оценить вероятность развития тромбозов К. Отомо и соавт. в 2012 г. разработали диагностический комплекс, включающий 5 коагуляционных тестов для выявления ВАК и 6 ИФА-тестов для выявления антител (IgG/IgM) к кардиолипину,  $\beta_2$ -гликопротеину I, фосфатидилсерин-протромбиновому комплексу [15]. Для количественной оценки риска тромбоза S. Sciascia и соавт. в 2013 г. предложили шкалу GAPSS (англ. Global Anti-Phospholipid Syndrome Score) [16]. Она включает анализ нескольких комбинаций независимых факторов риска тромбоза, уточнение сердечно-сосудистых факторов риска, определение спектра АФА, а также других аутоантител (табл. 1). Шкала GAPSS позволяет рассматривать АФА не только как диагностический маркер АФС и СКВ, но и как предиктор развития тромбозов и патологии беременности.

### ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

В большинстве клинических лабораторий АФА выявляют методом ИФА с помощью специальных тест-систем [17]. В 2014 г. опубликованы рекомендации по определению уровня АФА методом количественного ИФА (табл. 2).

Они содержат информацию о типе анализируемой пробы, особенностях тестов, расчета референтного интервала и интерпретации результатов, но некоторые вопросы их практического использования остаются без ответа [18].

Таблица 1

### Шкала оценки риска тромбоза при антифосфолипидном синдроме (Global Anti-Phospholipid Syndrome Score) [16]

Показатель	Оценка, баллы
Антитела к кардиолипину (IgG/IgM)	5
Антитела к $\beta_2$ -гликопротеину I (IgG/IgM)	4
Волчаночный антикоагулянт	4
Антитела к фосфатидилсерин-протромбиновому комплексу	3
Гиперлипидемия	3
Артериальная гипертензия	1

Таблица 2

### Рекомендации Научного комитета по стандартизации Научного комитета по стандартизации (Международного общества тромбозов и гемостаза) (Scientific Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis) по выявлению антифосфолипидных антител с помощью твердофазных тест-систем [18]

Этап	Комментарий
<b>1. Отбор пациентов</b>	Не рекомендуется назначать исследование уровня антифосфолипидных антител пациентам без соответствующей клинической картины. Следует назначать тесты пациентам моложе 50 лет с венозной/артериальной тромбоземболией, тромбозами нетипичных локализаций и тромбозами/осложнениями беременности, ассоциированными с аутоиммунными заболеваниями
<b>2. Забор крови</b>	Сыворотка или бедная тромбоцитами плазма с цитратом натрия в концентрации 0,109 моль/л (3,2%). В случае использования биоматериала, не указанного производителем, тест должен быть валидирован. Образцы могут храниться при температуре +2...+8 °C в течение 2–3 дней; более длительное хранение должно осуществляться при температуре –20 °C и ниже. Следует избегать циклов замораживания-оттаивания биоматериала.
<b>3. Выбор теста</b>	Рекомендуются тесты для выявления антител к $\beta_2$ -гликопротеину I и зависимых антител к кардиолипину. В качестве антигена должен быть использован человеческий $\beta_2$ -гликопротеин I
<b>4. Технические характеристики</b>	Расхождения между результатами двух проведенных иммуноферментного анализа не должно превышать 20%, для автоматизированных систем — 10%. Контрольный образец из набора реагентов, как отрицательный, так и на верхней границе референтного материала, должен быть включен в каждое проведение теста. Хотя бы один положительный и отрицательный контрольный образец не из набора реагентов (коммерческий или биоматериал пациента) должен быть включен в каждое проведение теста. Результат теста считается ложным, если хотя бы один контрольный образец выходит за пределы допустимого диапазона. 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 верхней границы аналитического диапазона должны быть разбавлены и повторно исследованы, или результат их исследования квалифицируется как «выше верхнего значения диапазона измерения». Аналогично поступают при значениях ниже нижней границы («ниже нижнего предела обнаружения») Следует интерпретировать пограничные результаты как сомнительные. Результаты тестов следует оценивать только при наличии тромбоза или осложнений беременности

Этап	Комментарий
<b>5. Интерференции</b>	Наличие ревматоидного фактора может приводить к ложноположительным результатам теста на антитела (IgM) к $\beta_2$ -гликопротеину I и кардиолипину. Рекомендуется избегать иктеричных, гемолитических, липемических образцов. Наличие гетерофильных антител, человеческих антител к клеткам животных и высокие уровни моноклональных иммуноглобулинов могут приводить к ложноположительным результатам
<b>6. Двойной или однократный анализ образца</b>	Ручной иммуноферментный анализ: повторное тестирование калибраторов, контрольных образцов и образцов пациентов. Автоматизированные платформы: оценить неточность; если она составляет менее 10%, может быть рассмотрено однократное тестирование образцов пациентов и контрольных образцов; следует дублировать анализ калибраторов
<b>7. Стандарты и калибровка</b>	Всегда необходимо определять соответствие первичному стандарту. Вторичные калибраторы могут использоваться в повседневной практике. В каждое проведение иммуноферментного анализа должна быть включена многоточечная калибровочная кривая ( $\geq 6$ точек), охватывающая весь диапазон
<b>8. Подсчет результатов</b>	Нет доступных международных единиц. Результаты подсчитываются в соответствии с калибровочной шкалой теста. Низкие и высокие результаты представлены как «ниже предела обнаружения» или «выше верхнего значения диапазона измерения»
<b>9. Референтный интервал</b>	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 ( $\geq 20$ ). Референтный интервал производителя может быть использован, если статистический метод указан, а популяция доноров сопоставима с местным населением. Если это возможно, клинические лаборатории должны сопоставить референтные интервалы с клиническими проявлениями, связанными с тромбозом/осложнениями беременности, у местного населения
<b>10. Интерпретация результатов и подготовка отчета</b>	Результаты определения АФА следует интерпретировать с учетом клинической картины. Необходимо выяснить, являются ли результаты положительными или отрицательными, в соответствии с методом и референтным интервалом. Рассмотреть технические характеристики тест-системы. Подтвердить положительный результат через 12 недель и рассмотреть только устойчивые положительные результаты как клинически значимые. Выполнить все 3 анализа (на волчаночный антикоагулянт, антитела к $\beta_2$ -гликопротеину I и кардиолипину) для увеличения диагностической значимости. Интерпретировать комплексно. Подготовить отчет, включающий результаты анализа и интерпретацию результатов

Очевидно, что особенности сбора, хранения и обработки образцов биоматериала для ИФА менее критичны, чем для коагуляционных тестов. Однако результаты определения антител к  $\beta_2$ -гликопротеину I и кардиолипину, полученные с помощью разных тест-систем в разных лабораториях, варьируют, несмотря на попытки стандартизации процесса тестирования. Различия в результатах возникают из-за методологических проблем при выполнении анализов, особенностей калибровки и отсутствия консенсуса в интерпретации положительных и отрицательных результатов. В своем недавнем исследовании мы проанализировали степень совпадения результатов применения двух тест-систем зарубежного производства для измерения уровней антител к  $\beta_2$ -гликопротеину I и кардиолипину методом ИФА. В исследовании участвовали пациенты с ранним (развившимся в возрасте до 50 лет) острым некардиоэмболическим инсультом, с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, а также с привычным невынашиванием беременности ( $n = 127$ ). Результаты применения тест-систем для выявления антител к  $\beta_2$ -гликопротеину I совпали в 70% случаев, антител (IgG и IgM) к кардиолипину — соответственно в 88% и 70%. При сопоставлении количественных результатов применения тест-систем разных производителей для выявления АФА методом ИФА каппа Козна составила 0,045 для результатов выявления антител

к  $\beta_2$ -гликопротеину I, 0,061 и 0,068 — соответственно для антител (IgM и IgG) к кардиолипину. Таким образом, степень совпадения результатов применения тест-систем разных производителей, популярных в российских лабораториях, оказалась низкой [19]. Так как высокая вариабельность результатов и низкая специфичность теста обуславливают спорную клиническую значимость АФА, целесообразно оценить преимущества новых методов, лишенных этих недостатков.

В течение последних лет были разработаны новые методы выявления АФА — методы твердофазного ИФА. Они основаны на новом подходе к сорбции антигена, обеспечивающем большую плотность антигена на твердофазном носителе. Связывание молекул  $\beta_2$ -гликопротеина I в твердой фазе имеет решающее значение, поскольку определяет конформационное изменение белка, необходимое для связывания аутоантител.

### ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Автоматизированный хемилюминесцентный анализ считается альтернативой методу ИФА, но имеет ряд важных преимуществ [20]. Антитела, присутствующие в образце, связываются с твердой фазой, представленной магнитными частицами, которые покрыты антигеном. При добавлении реагентов, которые вызывают хемилюминесцентную реакцию, испускаемый свет измеряется оптической



системой прибора. Этот сигнал прямо пропорционален концентрации АФА в образце. Результаты сравнения диагностических характеристик хемилюминесцентного анализа и планшетного ИФА при выявлении АФА позволили сделать ряд заключений [21, 22]. Во-первых, полностью автоматизированные и компьютеризированные анализаторы значительно сокращают время работы. Во-вторых, хотя хемилюминесцентный анализ и менее чувствителен по сравнению с ИФА, он более эффективен для диагностики АФС. Это можно объяснить особенностями твердой фазы для сорбции антигена, поскольку, в отличие от полистероловых ИФА-планшетов, магнитные частицы обеспечивают большую площадь поверхности и плотность сорбции антигена. Кроме того, широкий диапазон концентраций АФА, определяемых с помощью автоматических анализаторов, обусловлен особенностями хемилюминесцентной реакции анализа, которая позволяет добиться очень высокой точности при измерении высоких титров АФА. Таким образом, в диагностике АФС хемилюминесцентные анализаторы демонстрируют чувствительность, достигающую 100%, при специфичности 72,3% [22].

### МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ЛАЙН-ДОТ

Мультиплексный лайн-дот (МЛД), а также мультиплексные методы с применением магнитных частиц способны обеспечить одновременное выявление нескольких АФА [23]. Особенность МЛД — использование гидрофобной мембраны из поливинилидендифторида. В отличие от твердой фазы, обычно имеющей слабый отрицательный заряд, пористая структура мембраны обладает высоким сродством к гидрофобной части фосфолипидов, что приводит к более плотному их распределению 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*.

В нашем недавнем исследовании мы проанализировали диагностическую ценность МЛД в постановке серологического диагноза АФС. Мы собрали биоматериал пациентов с тромбозами и невынашиванием беременности ( $n = 127$ ) [24] и использовали тест-системы для выявления антител к кардиолипину и  $\beta_2$ -гликопротеину I методом ИФА, МЛД — для выявления антител к кардиолипину,  $\beta_2$ -гликопротеину I, аннексину V, протромбину, фосфатидной кислоте, фосфатидилглицеролу, фосфатидилинозитолу, фосфатидилхолину, фосфатидилсерину, фосфатидилэтаноламину. При анализе частоты выявления средних и высоких титров антител к кардиолипину и  $\beta_2$ -гликопротеину I метод МЛД оказался вдвое чувствительнее ИФА. В общей когорте пациентов чаще всего обнаруживались антитела к  $\beta_2$ -гликопротеину I, фосфатидилсерину, кардиолипину, аннексину V, фосфатидной кислоте; у пациентов с тромбозом глубоких вен нижних конечностей — антитела к фосфатидной кислоте (40%), фосфатидилсерину (33%), аннексину V (22,1%), протромбину (7,4%); у пациентов с острым инсультом — антитела к фосфатидной

кислоте (46,2%), фосфатидилсерину (37,2%), аннексину V (13,3%), фосфатидилинозитолу (8,9%), протромбину (8,9%), фосфатидилглицеролу (6,7%); у пациенток с акушерской патологией — антитела к аннексину V (26%), фосфатидилхолину (15,9%), фосфатидилглицеролу (13,6%), фосфатидной кислоте (13,5%), протромбину (9,4%), фосфатидилинозитолу (6,8%), фосфатидилэтаноламину (4,5%). У пациентов с тромбозом глубоких вен нижних конечностей и острым инсультом значительно чаще обнаруживались антитела (IgG и IgM) к фосфатидной кислоте и фосфатидилсерину (точный критерий Фишера,  $p = 0,0093$ ,  $OD = 0,2355$ ;  $p = 0,0044$ ,  $OD = 0,2308$ ).

Мы использовали МЛД для выявления АФА в группе пациенток с акушерской патологией и проанализировали спектр обнаруженных антител. Для этого мы разделили пациенток с первичным АФС на группы:

- 1) с положительным результатом анализа на ВАК, антитела к кардиолипину и  $\beta_2$ -гликопротеину I;
- 2) с положительным результатом анализа на ВАК и антитела к  $\beta_2$ -гликопротеину I и отрицательным результатом анализа на антитела к кардиолипину;
- 3) с положительным результатом анализа на один из видов антител (ВАК, антитела к кардиолипину или  $\beta_2$ -гликопротеину I).

Метод МЛД выявляет больше пациентов с положительным результатом анализа на все 3 вида антител, позволяя более эффективно оценить риск развития патологии беременности и выделить группу наибольшего риска осложнений.

Еще одно преимущество этого теста для выявления АФА — возможность обнаружения антител к домену 1  $\beta_2$ -гликопротеина I. После связывания  $\beta_2$ -гликопротеина I с отрицательно заряженными иммобилизованными анионными фосфолипидами посредством домена 5 домен 1 образует «верхнюю» часть открытой формы  $\beta_2$ -гликопротеина I, которая взаимодействует с АФА. Благодаря высокой плотности гидрофильных участков фосфолипидов на мембране МЛД домены 4 и 5 участвуют в связывании иммобилизованных фосфолипидов и более не доступны для взаимодействия с АФА [25, 26].

Наши данные указывают на то, что МЛД для выявления АФА можно рекомендовать как эффективную мультипараметрическую тест-систему для одновременного полуколичественного обнаружения спектра АФА в одном образце. Уникальные свойства МЛД позволяют рассматривать его как инструмент для оценки риска развития клинических проявлений АФС.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Информативность тест-систем для обнаружения антител к кардиолипину и  $\beta_2$ -гликопротеину I методом иммуноферментного анализа в диагностике антифосфолипидного синдрома остается спорной ввиду сложности их стандартизации. В настоящем обзоре мы оценили возможности новых методов выявления антифосфолипидных антител, преимущества которых заключаются в улучшении параметров сорбции антигенов, автоматизации, мультиплексном подходе. Новые методы могут способствовать повышению точности диагностики аутоиммунных заболеваний.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. De Laat B., Derksen R.H., van Lummel M., Pennings M.T., de Groot P.G. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood*. 2006; 107(5): 1916–24. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1943
2. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R. et al. International consensus statement on an

update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4(2): 295–306. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x

3. Hoxha A., Ruffatti A., Mattia E., Meneghel L., Tonello M., Salvan E. et al. Relationship between antiphosphatidylserine/prothrombin and conventional antiphospholipid antibodies in primary antiphospholipid syndrome. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53(8): 1265–70. DOI:10.1515/cclm-2014-1129

4. Meroni P.L., Borghi M.O., Raschi E., Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011; 7(6): 330–9. DOI: 10.1038/nrrheum.2011.52
5. Inês L., Silva C., Galindo M., López-Longo F.J., Terroso G., Romão V.C. et al. Classification of systemic lupus erythematosus: Systemic Lupus International Collaborating Clinics versus American College of Rheumatology criteria. A comparative study of 2,055 patients from a real-life, international systemic lupus erythematosus cohort. *Arthritis Care Res.* 2015; 67(8): 1180–5. DOI: 10.1002/acr.22539
6. Mankai A., Manoubi W., Ghozzi M., Melayah S., Sakly W., Ghedira I. High frequency of antiphospholipid antibodies in primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2015; 29(1): 32–6. DOI: 10.1002/jcla.21723
7. Versini M. Thyroid autoimmunity and antiphospholipid syndrome: not such a trivial association. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2017; 8: 175. DOI: 10.3389/fendo.2017.00175
8. Abdel-Wahab N., Talathi S., Lopez-Olivo M.A., Suarez-Almazor M.E. Risk of developing antiphospholipid syndrome following viral infection: a systematic review and meta-analysis. *Lupus.* 2018; 27(4): 572–83. DOI: 10.1177/0961203317731532
9. Tincani A., Taraborelli M., Cattaneo R. Antiphospholipid antibodies and malignancies. *Autoimmun. Rev.* 2010; 9(4): 200–2. DOI: 10.1016/j.autrev.2009.04.001
10. Quémeñeur T., Lambert M., Hachulla E., Dubucquoi S., Caron C., Fauchais A.L. et al. Significance of persistent antiphospholipid antibodies in the elderly. *J. Rheumatol.* 2006; 33(8): 1559–62.
11. Meroni P.L., Chighizola C. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome (APS). *Rev. Med. Interne.* 2012; 33 (suppl. 2): A2–4. DOI: 10.1016/j.revmed.2012.09.010
12. Mahler M., Norman G.L., Meroni P.L., Khamashta M. Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein 1: a promising candidate biomarker for risk management in antiphospholipid syndrome. *Autoimmun. Rev.* 2012; 12(2): 313–7. DOI: 10.1016/j.autrev.2012.05.006
13. Chighizola C.B., Pregolato F., Andreoli L., Bodio C., Cesana L., Comerio C. et al. Beyond thrombosis: anti-β2GPI domain 1 antibodies identify late pregnancy morbidity in anti-phospholipid syndrome. *J. Autoimmun.* 2018; 90: 76–83. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.02.002
14. Pengo V., Ruffatti A., Legnani C., Gresele P., Barcellona D., Erba N. et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8(2): 237–42. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03674.x
15. Otomo K., Atsumi T., Amengual O., Fujieda Y., Kato M., Oku K. et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(2): 504–12. DOI: 10.1002/art.33340
16. Sciascia S., Sanna G., Murru V., Roccatello D., Khamashta M.A., Bertolaccini M.L. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology (Oxford).* 2013; 52(8): 1397–403. DOI: 10.1093/rheumatology/kes388
17. Devreese K.M. Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int. J. Lab. Hematol.* 2014; 36(3): 352–63. DOI: 10.1111/ijlh.12234
18. Devreese K.M., Pierangeli S.S., de Laat B., Tripodi A., Atsumi T., Ortel T.L. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12(5): 792–5. DOI: 10.1111/jth.12537
19. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А. и др. Сравнительный анализ информативности тест-систем разных производителей для определения антифосфолипидных антител для диагностики антифосфолипидного синдрома Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(1): 40–4. [Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solov'eva L.N., Bondareva E.A. et al. Sravnitel'nyi analiz informativnosti test-sistem raznykh proizvoditel'ey dlya opredeleniya antifosfolipidnykh antitel dlya diagnostiki antifosfolipidnogo sindroma. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2017; 62(1): 40–4. (in Russian)]
20. Van Hoesche F., Persijn L., Decavele A.S., Devreese K. Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int. J. Lab. Hematol.* 2012; 34(6): 630–40. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2012.01448.x
21. Capozzi A., Lococo E., Grasso M., Longo A., Garofalo T., Misasi R. et al. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay. *J. Immunol. Methods.* 2012; 379(1–2): 48–52. DOI: 10.1016/j.jim.2012.02.020
22. Noubouossie D., Valsamis J., Corazza F., Rozen L., Debaugnies F., Demulder A. An automated chemiluminescence immunoassay may detect mostly relevant IgG anticardiolipin antibodies according to revised Sydney criteria. *Acta Clin. Belg.* 2012; 67(3): 184–9. DOI: 10.2143/ACB.67.0.2062000
23. Egerer K., Roggenbuck D., Büttner T., Lehmann B., Kohn A., von Landenberg P. et al. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay. *Arthritis Res. Ther.* 2011; 13(4): R118. DOI: 10.1186/ar3421
24. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А. и др. Анализ спектра антифосфолипидных антител у пациентов с тромбозами и привычным невынашиванием беременности Медицинская иммунология. 2018; 20(5): 753–62. [Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Shmonin A.A., Solov'eva L.N., Bondareva E.A., Sel'kov S.A. i dr. Analiz spektra antifosfolipidnykh antitel u patsientov s trombozami i privychnym nevyvashivaniem beremennosti Meditsinskaya immunologiya. 2018; 20(5): 753–62. (in Russian)]
25. Roggenbuck D., Borghi M.O., Somma V., Büttner T., Schierack P., Hanack K. et al. Antiphospholipid antibodies detected by line immunoassay differentiate among patients with antiphospholipid syndrome, with infections and asymptomatic carriers. *Arthritis Res. Ther.* 2016; 18(1):111. DOI: 10.1186/s13075-016-1018-x
26. Nalli C., Somma V., Andreoli L., Büttner T., Schierack P., Mahler M. et al. Anti-phospholipid IgG antibodies detected by line immunoassay differentiate patients with anti-phospholipid syndrome and other autoimmune diseases. *Auto Immun. Highlights.* 2018; 9(1): 6. DOI: 10.1007/s13317-018-0106-0 