

На правах рукописи

Менжинская Ирина Владимировна

**АНТИТЕЛА К ГОРМОНАМ, ФОСФОЛИПИДАМ И
ФОСФОЛИПИД-СВЯЗЫВАЮЩИМ ПРОТЕИНАМ У ЖЕНЩИН
С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Ванько Людмила Викторовна

Официальные оппоненты:

Свитич Оксана Анатольевна, доктор медицинских наук, член-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», директор института

Сельков Сергей Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий, руководитель отдела.

Левкович Марина Аркадьевна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел медико-биологических проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии научно-исследовательского института акушерства и педиатрии, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Новикова Лидия Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Согласно современным представлениям, при нарушении механизмов аутоотолерантности в организме человека могут вырабатываться антитела к собственным антигенам органов и тканей, гормонам, фосфолипидам и другим молекулам, при этом аутоиммунный процесс развивается с соблюдением общих закономерностей гуморального иммунного ответа. Аутоантитела могут участвовать в патогенезе органоспецифических и системных аутоиммунных заболеваний, служить предвестниками болезни и иметь важное диагностическое и прогностическое значение (Notkins A.L., 2007; Shoenfeld Y. et al., 2008).

Аутоиммунные заболевания наиболее широко распространены среди женщин репродуктивного возраста, что обусловлено иммуностимулирующим действием женских половых гормонов, влиянием генов X хромосом на иммунный ответ, преобладанием у женщин Th2 иммунного ответа (Shoenfeld Y. et al., 2008; Pennell L.M. et al., 2012). Аутоиммунитет может оказывать влияние на все стадии репродуктивного процесса, включая оогенез, имплантацию и беременность (Carp H.J.A. et al., 2012), однако механизмы этого влияния остаются недостаточно выясненными.

Аутоиммунные нарушения наблюдаются у 20% женщин с привычным невынашиванием беременности, которым страдают 2-5% женщин репродуктивного возраста (Ford NB et al., 2009; Kwak-Kim J. et al., 2013). Антифосфолипидные антитела являются одним из наиболее частых аутоиммунных этиологических факторов данной патологии (Сидельникова В.М., 2005; Макацария А.Д. и соавт., 2007). С этими антителами ассоциируются от 7 до 25% случаев необъяснимого привычного выкидыша (D'Ippolito S. et al., 2014). Наличие волчаночного антикоагулянта, антител (IgM, IgG) к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I относят к лабораторным классификационным критериям антифосфолипидного синдрома (Pierangeli S.S. et al., 2011). Однако определение спектра антител к фосфолипидам, фосфолипид-связывающим протеинам и их комплексам повышает эффективность диагностики данного синдрома у серонегативных пациентов

(Cervera R. et al., 2012). Поэтому в настоящее время продолжается поиск новых высокоэффективных серологических маркеров антифосфолипидного синдрома (Bertolaccini M.L. et al., 2014; Misasi R. et al., 2015; Rodrigues-Garsia V. et al., 2015).

В научной литературе сообщается о повышенном образовании антител к гонадотропным и половым стероидным гормонам у женщин с нарушениями репродуктивной функции. Имеются единичные противоречивые сообщения о выявлении антител к хорионическому гонадотропину человека при невынашивании беременности (Pala A. et al., 1988; Tulppala M. et al., 1992), бесплодии и неудачах в программах экстракорпорального оплодотворения (Amato F. et al., 2002). Гиперчувствительность к прогестерону и эстрадиолу выявлена с помощью кожных тестов у женщин с предменструальным синдромом и привычным невынашиванием беременности (Itsekson A. M. et al., 2007, 2011; Ellaithy M.I. et al., 2013). Принимая во внимание важность биологических функций хорионического гонадотропина и прогестерона для наступления и сохранения беременности, большое научное и практическое значение имеет исследование роли антител к этим гормонам в развитии осложнений и потери беременности у женщин с привычным невынашиванием.

Степень разработанности темы исследования

Аутоантитела разной специфичности часто обнаруживаются у женщин с привычным невынашиванием беременности. Однако только антифосфолипидные антитела четко ассоциируются с привычным невынашиванием как у пациенток с аутоиммунными заболеваниями, так и в генеральной популяции. Мишенями антифосфолипидных антител могут быть анионные и нейтральные фосфолипиды, фосфолипид-связывающие протеины плазмы и их комплексы с фосфолипидами, компоненты комплемента, факторы свертывания крови. В качестве диагностических маркеров антифосфолипидного синдрома рассматриваются IgA-антитела к β 2-гликопротеину-I и кардиолипину, антитела к домену I β 2-гликопротеина-I, фосфатидилэтаноламину, фосфатидилсерину, протромбину, комплексу фосфатидилсерин/протромбин и аннексину A5. Однако из-за противоречивых данных научной литературы необходимы дальнейшие исследования для

подтверждения клинико-диагностического значения этих антител при акушерской патологии. Нет единого мнения о значении данных антител для диагностики акушерского антифосфолипидного синдрома. Для практического применения тестов требуется проведение их стандартизации.

Описаны отдельные случаи повышенного образования антител к хорионическому гонадотропину, индуцированного введением гомо- или гетерологичных препаратов гормона, иммунизацией контрацептивной вакциной, созданной на основе его β -субъединицы (Talwar G.P. et al., 1997), а также случай спонтанной продукции антител к гормону у женщины с невынашиванием беременности (Pala A. et al., 1988). Показана способность антител к хорионическому гонадотропину у женщины с бесплодием и невынашиванием беременности нейтрализовать биологическую активность гормона в исследованиях *in vitro* и *in vivo* (Amato F. et al., 2002). В связи с этим антитела к данному гормону рассматриваются как возможная причина самопроизвольной потери беременности и неудач в программах экстракорпорального оплодотворения. Образование поликлональных аутоантител к стероидным гормонам, включая прогестерон, продемонстрировано с помощью ИФА у женщин с предменструальным синдромом (Roby R.R. et al., 2006). Однако из-за отсутствия объективных методов определения антител к гормонам остаются неисследованными распространенность, иммунохимические свойства, клинико-диагностическое и патогенетическое значение данных антител при нарушениях репродуктивной функции и патологии беременности.

Для формирования современных научных представлений о влиянии аутоиммунных процессов на репродуктивную функцию и беременность необходимо создание новых объективных методов определения антител к гормонам и фосфолипидам, изучение взаимосвязи антител с нарушениями репродуктивной функции и патологией беременности. Особую клиническую важность имеет исследование диагностической значимости этих антител для привычного невынашивания беременности и их прогностического значения для течения и исхода беременности. Все вышеизложенное явилось основанием для проведения данного исследования, связанного с решением актуальной научной

и практической задачи, направленного на совершенствование диагностики и расширение знаний об иммунных механизмах, участвующих в патогенезе привычного невынашивания беременности у женщин.

Цель исследования

Определить диагностическое, прогностическое и патогенетическое значение антител к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам при привычном невынашивании беременности у женщин на основе совершенствования методов выявления антител, изучения их физико-химических, иммунохимических свойств и ассоциации с акушерской патологией.

Задачи исследования

1. Разработать модификации ИФА для определения антител к хорионическому гонадотропину человека, пептидными последовательностям его β -субъединицы, прогестерону, принадлежащих к разным изотипам, в сыворотке (плазме) крови человека.

2. Определить распространенность и уровень антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону, спектр антифосфолипидных антител и диагностическую значимость антител при привычном невынашивании беременности и угрожающем выкидыше в I триместре беременности.

3. Охарактеризовать антитела к гормонам и антифосфолипидные антитела по принадлежности к классам иммуноглобулинов M, G, A, E, подклассам IgG, avidности и эпитопной специфичности.

4. Оценить состояние системы комплемента и распространенность антител к компоненту комплемента C1q у женщин, серопозитивных на антитела к гормонам и антифосфолипидные антитела.

5. Охарактеризовать основные показатели клеточного и гуморального иммунитета при повышенном образовании антител к гормонам.

6. Определить прогностическое значение антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону для течения и исхода беременности у женщин с привычным невынашиванием.

7. Оценить патогенетическое значение антител к гормонам на основе анализа физико-химических и иммунохимических свойств антител, активности системы комплемента и ассоциации антител с акушерской патологией.

8. Определить наиболее значимые диагностические маркеры привычного невынашивания беременности.

Научная новизна

Впервые с использованием новых модификаций ИФА показано повышенное образование антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону классов G, A и M у женщин с привычным невынашиванием беременности. Установлена ассоциация данной патологии с высокоавидными антителами к гормонам функционально активных подклассов G1 и G2, с антителами, направленными к эпитопам β -субъединицы хорионического гонадотропина, определяющим специфичность и биологическую активность гормона.

Впервые установлено, что антитела к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону являются независимыми факторами риска привычного невынашивания беременности на ранних сроках и угрожающего выкидыша в I триместре беременности. Во время беременности антитела к хорионическому гонадотропину ассоциируются с высоким риском угрозы ее прерывания в I триместре, плацентарной недостаточности и хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, антитела к прогестерону – с высоким риском гипоплазии хориона в I триместре беременности.

Впервые у женщин с привычным невынашиванием беременности охарактеризован широкий спектр антифосфолипидных антител, включающий кроме антител к кардиолипину, β 2-гликопротеину-I и ВА антитела к аннексину A5, комплексу фосфатидилсерин/протромбин и фосфатидилэтаноламину, по авидности, подклассам IgG и эпитопной специфичности. Выявлена ассоциация привычного невынашивания беременности с IgG-антителами к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I подкласса G2 с высоким и средним уровнем авидности и высокоавидными IgG-антителами к аннексину A5, повышенная вероятность наличия антител к домену I при средних и высоких уровнях IgG-антител к β 2-гликопротеину-I. Установлено, что IgG-антитела к β 2-гликопротеину-I и

аннексину А5 являются независимыми факторами риска привычного невынашивания беременности на ранних сроках.

Впервые показана ассоциация повышенного уровня антител к хорионическому гонадотропину человека и антифосфолипидных антител с активацией системы комплемента по классическому пути и высоким риском образования анти-C1q антител, способствующих повышению активности комплемента.

Теоретическая и практическая значимость

На основании результатов исследования сформулирована научная концепция формирования иммунопатологического процесса, опосредованного антителами к хорионическому гонадотропину человека, прогестерону, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам, у женщин с осложненным течением и потерей беременности, что способствует более полному пониманию патогенеза привычного невынашивания беременности.

Разработаны новые модификации ИФА для определения антител к хорионическому гонадотропину человека, пептидными последовательностями β -субъединицы гормона и прогестерону, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов (M, G, A, E) и подклассам IgG в сыворотке (плазме) крови человека. Показана высокая диагностическая значимость антител к этим гормонам для привычного невынашивания беременности на ранних сроках и угрожающего выкидыша в I триместре беременности, прогностическое значение выявления антител к хорионическому гонадотропину человека для угрозы прерывания беременности в I триместре, плацентарной недостаточности и хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, антител к прогестерону для гипоплазии хориона в I триместре беременности.

При исследовании спектра антифосфолипидных антител установлено, что наиболее высокую диагностическую значимость для привычного невынашивания беременности на ранних сроках имеют IgG-антитела к β 2-гликопротеину-I и аннексину А5. Определение антител к аннексину А5, фосфатидилэтаноламину и комплексу фосфатидилсерин/протромбин повышает

эффективность диагностики антифосфолипидного синдрома у женщин с привычным невынашиванием, серонегативных на антитела, отнесенные к критериям антифосфолипидного синдрома. Оценка avidности антител, подклассов IgG и специфичности к домену I β 2-гликопротеина-I способствует стратификации женщин по риску развития тромбоза и осложнений беременности.

Комплексная диагностика привычного невынашивания беременности, предусматривающая определение профиля антител к гормонам (хорионическому гонадотропину человека, прогестерону), антифосфолипидных антител и оценку состояния системы комплемента, позволяет уточнить патогенез привычного невынашивания, прогнозировать течение и исход беременности.

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования направлена на определение наиболее значимых серологических маркеров привычного невынашивания беременности. Объектом исследования были женщины с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и угрожающим выкидышем в I триместре беременности. Предметом исследования служили антитела к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам, их физико-химические и иммунохимические свойства, показатели иммунного статуса и системы комплемента, характеризующие иммунные механизмы, способствующие развитию осложнений и потере беременности.

Чтобы охарактеризовать распространенность, физико-химические и иммунохимические свойства, диагностическое значение антител к гормонам и антифосфолипидных антител (аФЛ), состояние системы комплемента и иммунный статус у женщин с ПНБ, выполняли одномоментные исследования случай-контроль. Для определения прогностического значения данных антител для течения и исхода беременности у женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к гормонам, проводили проспективные когортные исследования.

В соответствии с поставленными задачами в исследование были включены 452 женщины в возрасте от 20 до 40 лет, обратившиеся в научно-

поликлиническое отделение центра по поводу привычного невынашивания беременности (с 3 и более случаями самопроизвольного прерывания беременности), из них 210 женщин с привычным невынашиванием на ранних сроках (до 12 недель гестации), 275 женщин вне беременности, 177 беременных в I триместре беременности, наступившей в естественном цикле, и 47 женщин с угрожающим выкидышем на раннем сроке неясного генеза. Диагноз ПНБ и угрожающего выкидыша был поставлен в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Группу сравнения составили 272 относительно здоровые женщины в возрасте от 20 до 40 лет, 194 вне беременности с одной или двумя физиологическими беременностями в течение последних 5 лет и 88 беременных в I и II триместрах с одноплодной физиологической беременностью, наступившей в естественном цикле. Материалом для исследования служила сыворотка (плазма) периферической венозной крови и цельная венозная периферическая кровь.

Общими критериями исключения служили: пороки развития половых органов, носительство хромосомных перестроек, беременности после экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона, многоплодные беременности, наличие инфекций, передаваемых половым путем, выраженные эндокринные нарушения, тяжелые экстрагенитальные и аутоиммунные заболевания.

От каждой женщины было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Проведение исследования было одобрено Комиссией по этике центра (протокол № 33 от 14.12. 2012 г.).

Женщины были обследованы в соответствии со схемой и клиническим протоколом, разработанными во 2-ом отделении акушерском патологии беременности (отделении терапии и профилактики невынашивания беременности) центра (Сидельникова В.М., 2010).

В работе использовались физико-химические, биохимические и иммунологические методы исследования и методы статистического анализа.

Определение антифосфолипидных антител проводили с использованием методов ИФА, иммуноблоттинга и хемилюминесцентного иммуноанализа

(ХЛИА). Для качественного определения профиля аФЛ (IgM, IgG) к четырем антигенам (β 2-гликопротеину-I (β 2-ГП-I), кардиолипину (КЛ), фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилинозитолу (ФИ)) в сыворотке крови применяли метод иммуноблоттинга с использованием наборов «Anti-phospholipid Dot» (MEDIPAN, Германия). Содержание аФЛ в сыворотке (плазме) крови определяли методом непрямого твердофазного ИФА с использованием наборов для количественного определения антител (IgM, IgG) к фосфолипидам (КЛ, ФС, фосфатидилэтаноламину (ФЭ)), фосфолипид-связывающим протеинам (β 2-ГП-I, аннексину А5 (Ан А5), протромбину (ПТ)) и комплексу фосфатидилсерин/протромбин (ФС/ПТ) (ORGENTEC Diagnostika и AESKU. DIAGNOSTICS, Германия). Для определения антител (IgM, IgG) к β 2-ГП-I и IgG-антител к домену I β 2-ГП-I применяли полуколичественный метод ХЛИА с использованием автоматического хемилюминесцентного анализатора ACL Acustar™ (Instrumentation Laboratory Co., США), наборов HemosIL Acustar (Instrumentation Laboratory Co.) и QUANTA Flash (Inova Diagnostics, США).

Определение антител к хорионическому гонадотропину человека (аХГЧ), свободным α - и β -субъединицам гормона и эпитопам β -субъединицы проводили с помощью разработанных модификаций непрямого твердофазного ИФА. Иммунизацию ХГЧ (ООО «Биалекса», Россия) на полистирольные микропланшеты Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Дания) проводили путем пассивной адсорбции или посредством мышиных моноклональных антител (МКАТ) к α -субъединице ХГЧ (ООО «Биалекса»). Свободные α - или β -субъединицы ХГЧ (ООО «Биалекса») иммобилизовали на полистирол путем пассивной адсорбции. Иммунизацию синтетических пептидов β -ХГЧ С109-119 и С109-145 (Bachem AG, Швейцария) проводили на микропланшеты NUNC IMMOBILIZER AMINO (Thermo Fisher Scientific Nunc A/S) в соответствии с прилагаемым протоколом фирмы-производителя. ИФА выполняли с использованием конъюгатов антител к IgM, IgG, IgA или IgE человека с пероксидазой хрена (АО «Вектор-Бест», Россия) в рабочих разведениях, как описано в статье (Менжинская И.В. и соавт., 2015).

Метод аффинной хроматографии на сорбенте, приготовленном путем иммобилизации ХГЧ (ООО «Биалекса») на CNBr-активированной сефарозе 4В

(Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), использовали для выделения очищенных антител к ХГЧ из пулированной сыворотки крови пациенток с ПНБ, позитивной на данные антитела.

Автоматизированный оптический биосенсор ProteOn™ XPR36 применяли для исследования взаимодействия сывороточных антител с ХГЧ в режиме реального времени с использованием многоканального микрофлюидного сенсорного чипа GLC (6x6), буферных растворов и реагентов ProteOn (Bio-Rad, США).

Определение антител к прогестерону (аПГ), принадлежащих к разным классам, проводили с использованием модифицированных вариантов непрямого твердофазного ИФА. На микропланшеты Nunc MaxiSorp иммобилизовали конъюгаты ПГ с бычьим сывороточным альбумином (БСА), ПГ-3-БСА и ПГ-11-БСА (Sigma-Aldrich, США), или конъюгаты гидроксипрогестерона с гемоцианином (Гем), ПГ-3-Гем и ПГ-11-Гем (Michigan Diagnostics, США). ИФА выполняли с использованием мышиных МКАТ к IgM, IgG или IgA человека, меченных пероксидазой хрена (АО «Вектор-Бест») в рабочих разведениях, как описано в статье (Менжинская И.В. и соавт., 2017).

Для определения подклассов IgG-антител к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам в ИФА использовали МКАТ к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека, конъюгированные с биотином, и стрептавидин, меченный пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich), в рабочих разведениях, как описано в статье (Менжинская И.В. и соавт., 2015).

Определение avidности аФЛ и антител к гормонам класса G проводили двумя способами. Для определения avidности аФЛ ИФА выполняли в соответствии с инструкцией по применению набора за исключением того, что исследуемый образец сыворотки крови разводили в буферном растворе с повышенным содержанием NaCl (0,5 М), как описано в статье (Менжинская И.В. и соавт., 2016). Avidность антител к ХГЧ и ПГ определяли аналогичным способом, а также с применением после образования комплекса антиген-антитело белок-диссоциирующего агента (АО «Вектор-Бест»), удаляющего низкоавидные антитела с поверхности твердой фазы (Менжинская И.В. и соавт., 2015). Уровень avidности антител оценивали по рассчитанному индексу

авидности (ИА): авидность считали высокой при ИА более 70%, средней – при 30% < ИА < 70% и низкой – при ИА менее 30%.

Состояние системы комплемента оценивали с использованием иммуноферментных наборов для определения концентрации компонентов комплемента C3 и C4 (AssayPro, США), циркулирующих иммунных комплексов, связывающихся с C1q (ЦИК-C1q) (BUHLMANN Laboratories AG, Швейцария) и C3d (ЦИК-C3d) (IBL International GmbH, Германия), и IgG-антител к компоненту комплемента C1q (ORGENTEC Diagnostika, Германия).

Метод проточной цитофлуориметрии применяли для фенотипической характеристики лимфоцитов периферической крови с помощью меченных флуоресцеина изотиоцианатом и фикоэритрином моноклональных антител к поверхностным рецепторам лимфоцитов CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD56 (Becton Dickinson и eBioscience, США), с использованием проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson) и программы Cell Quest.

Определение общего содержания иммуноглобулинов классов G, M и A в периферической крови женщин проводили турбидиметрическим методом на анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом АБхФк-02 «НПП-ТМ» (ООО НПП «Техномедика», Россия) с применением наборов фирмы Human (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Office Excel 2010, Statistica for Windows (версия 10) и MedCalc (версия 12). Рассчитывали параметрические (t-критерий Стьюдента) и непараметрические критерии (Колмогорова-Смирнова, W-критерий Шапиро-Уилка, U-критерий Манна-Уитни, критерий χ^2 Пирсона). Данные представляли при нормальном распределении средней арифметической (M) и стандартным отклонением (SD), при отклонении от нормального распределения – медианой (Me), 25-ым и 75-ым процентилями. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционную связь между переменными оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона или Спирмена. Диагностическое и прогностическое значение серологических маркеров определяли с помощью ROC-анализа (Receiver Operating Characteristics) и путем расчета показателя отношения шансов (OR).

Положения, выносимые на защиту

1. Привычное невынашивание беременности у женщин ассоциируется с повышенным образованием поликлональных антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону классов М, G и А, высокоавидными IgG-антителами с преобладанием подклассов G1 и G2. Антитела к гормонам являются независимыми факторами риска привычного невынашивания беременности на ранних сроках и угрожающего выкидыша в I триместре беременности и имеют высокую диагностическую значимость для данной патологии. Антитела к хорионическому гонадотропину человека представляют собой гетерогенную группу антител, взаимодействующих с цельной молекулой гормона, свободными α - и β -субъединицами, эпитопами β -субъединицы, определяющими специфичность и биологическую активность гормона.

2. Женщины с привычным невынашиванием беременности характеризуются широким спектром антифосфолипидных антител, включающим кроме антител к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I антитела к аннексину А5, фосфатидилэтаноламину и комплексу фосфатидилсерин/протромбин, определение которых повышает эффективность диагностики антифосфолипидного синдрома. IgG-антитела к β 2-гликопротеину-I и аннексину А5 являются независимыми факторами риска привычного невынашивания беременности на ранних сроках и имеют высокую диагностическую значимость для данной патологии. При высоком и среднем уровне IgG-антител к β 2-гликопротеину-I имеется повышенная вероятность наличия антител к домену I. Привычное невынашивание ассоциируется с антителами к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I подкласса IgG2 со средним и высоким уровнем авидности и высокоавидными IgG-антителами к аннексину А5.

3. У женщин с привычным невынашиванием беременности при повышенном образовании антифосфолипидных антител и антител к хорионическому гонадотропину часто определяется гипокомplementемия, проявляющаяся снижением содержания компонентов комплемента С3 и С4, повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов и аутоантител к

компоненту комплемента C1q, что отражает активацию системы комплемента по классическому пути.

4. Выявление антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону имеет прогностическое значение для течения и исхода беременности. Наличие антител к хорионическому гонадотропину человека во время беременности ассоциируется с высоким риском развития угрожающего выкидыша на раннем сроке, плацентарной недостаточности и хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тогда как антитела к прогестерону представляют фактор риска гипоплазии хориона в I триместре беременности. Взаимосвязь повышенного образования антител к гормонам с активацией системы комплемента, осложнениями и потерей беременности предполагает патогенетическое значение данных антител при привычном невынашивании беременности.

Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности результатов исследования свидетельствует достаточный объем исследований, применение современных, объективных, высокочувствительных и специфических методов исследования, использование автоматических анализаторов с полной автоматизацией процесса проведения анализа, учета и оценки результатов, обеспечивающих высокую точность определения, и адекватных методов статистического анализа данных.

Диссертационная работа обсуждена на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 4 июня 2018 года (протокол № 6).

Материалы диссертационной работы были представлены на 4-ой Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» (Пермь, 2010), Межрегиональном форуме «Актуальные вопросы аллергологии и иммунологии - междисциплинарные проблемы» (Санкт-Петербург, 2010), XI, XIV, XVI, XVII, XVIII Всероссийских научно-образовательных форумах «Мать и Дитя» (Москва, 2010, 2013, 2015, 2016, 2017), V Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2011), 13th, 14th, 15th International Symposium for Immunology of Reproduction (Варна, 2012, 2015, 2018), XXVI Международном конгрессе «Новые технологии в диагностике и лечении

гинекологических заболеваний» (Москва, 2013), 9th International Congress on Autoimmunity (Ницца, 2014), VII Всероссийской научной конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты (Ростов-на-Дону, 2015), I междисциплинарной конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016), II Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2016), XXII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Теория и практика клинической лабораторной диагностики» (Москва, 2017), Всероссийской конференции «Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению» (Москва, 2018), III Всероссийском конгрессе «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2018).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 43 печатные работы, в том числе 27 статей в 7 научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций, одна в зарубежном издании, 13 публикаций в материалах отечественных и международных конференций, симпозиумов и конгрессов, 2 патента.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе направления диссертационного исследования и выполнении всех его этапов. Сбор и обобщение данных литературы, ведение индивидуальных регистрационных карт пациентов и их отбор, научные эксперименты, апробация результатов научных исследований, формирование электронных баз данных, статистическая обработка, интерпретация и анализ результатов экспериментов, подготовка основных публикаций по материалам исследования выполнены автором лично.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Диссертация изложена на 376 страницах, содержит 46 таблиц и 46 рисунков. Библиография включает 606 источников (26 на русском, 580 на английском языках).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Модификации ИФА для определения антител к гормонам в сыворотке (плазме) крови человека. В соответствии с поставленной целью и задачами исследования были разработаны модификации непрямого твердофазного ИФА для определения антител к ХГЧ и ПГ, относящихся к разным классам иммуноглобулинов (М, G, A, E) и подклассам IgG (1-4), в сыворотке (плазме) крови человека. При иммобилизации ХГЧ посредством МКАТ к α -ХГЧ достигалось ориентированное расположение молекул гормона на поверхности твердой фазы с экспонированием β -субъединицы, определяющей специфичность и биологическую активность гормона.

Специфичность взаимодействия сывороточных антител с ХГЧ была подтверждена в ИФА конкурентным ингибированием связывания антител с гормоном на твердой фазе в присутствии избытка ХГЧ (0,5 мг/мл) в растворе. Кроме того, специфичность подтверждалась взаимодействием сывороточных антител с ХГЧ, иммобилизованным на поверхности микрофлюидного сенсорного чипа, в системе ProteOn™ XPR36 в режиме реального времени, а также выделением аффинно очищенных антител к ХГЧ из пулированной сыворотки крови пациенток с ПНБ, позитивной на α ХГЧ по результатам ИФА.

Для обеспечения надежной иммобилизации молекул ПГ на поверхности твердой фазы использовали конъюгаты ПГ с БСА, содержащие 12-16 молекул ПГ на молекулу БСА. Сывороточные антитела (IgM, IgG) связывались с адсорбированными конъюгатами ПГ-3-БСА и ПГ-11-БСА независимо от расположения ковалентной связи в молекуле ПГ. При использовании в ИФА конъюгатов гидроксипрогестерона с гемоцианином, содержащих 120-150 молекул производной ПГ на молекулу Гем, чувствительность определения антител повышалась в 1,3-2 раза.

Для оценки результатов определения антител к гормонам в ИФА был установлен порог отсечения, равный сумме среднего значения оптической плотности (ОП), полученного при исследовании сывороток здоровых женщин (n=30), и двух стандартных отклонений. Содержание антител в исследуемых образцах определяли по среднему значению ОП с помощью калибровочной кривой, построенной в линейных координатах с простой линейной

интерполяцией от точки к точке, и выражали в условных единицах в миллилитре (Ед/мл).

Модифицированные варианты ИФА характеризовались высокой чувствительностью определения антител к ХГЧ и ПГ классов М и G (5-6 Ед/мл), точностью определения (КВ <7%) и воспроизводимостью результатов (КВ <8%), широким диапазоном концентраций с линейной зависимостью сигнала от содержания антител в сыворотке (плазме) крови (5-6 – 120 Ед/мл).

Распространенность антител к ХГЧ, принадлежащих к разным изотипам, их авидность и диагностическое значение при ПНБ. Вне беременности у пациенток с ПНБ на ранних сроках наблюдалось повышенное образование антител к ХГЧ, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов (М, G, А, Е), по сравнению со здоровыми женщинами без потерь беременности (таблица 1). Повышенные уровни IgG- и IgA-антител определялись в сыворотке крови у пациенток с ПНБ чаще по сравнению с IgE ($p < 0,01$), в 14,9 раза и 8,9 раза чаще, чем у здоровых женщин ($p < 0,0001$). Следует отметить, что в большинстве случаев IgA- и IgE-антитела выявлялись в комбинации с IgG или IgM (в 94,2% и 93,1% случаев).

Таблица 1 – Частота выявления антител к ХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин вне беременности.

Класс антител	Частота выявления, абс. число (%)		p*- значение	OR, 95% CI	p- значение
	Исследуемая группа, n=94	Группа сравнения, n=82			
IgM	41 (43,6)	12 (14,6)	0,0001	4,5[2,16-9,42]	0,0001
IgG	61 (64,9)**	9 (11)	<0,0001	14,9[6,66-33,8]	<0,0001
IgA	52 (55,3)**	10 (12,2)	<0,0001	8,9[4,1-19,38]	<0,0001
IgE	29 (30,9)	11 (13,4)	0,0098	2,9[1,33-6,23]	0,0072

Примечание. * – значение p при сравнении двух групп; ** $p < 0,01$ при сравнении с IgE

Медианные значения уровня аХГЧ разных классов в исследуемой группе были значимо выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$) (рисунок 1А). Между уровнями IgM и IgG аХГЧ наблюдалась обратная корреляционная связь

средней силы ($r=-0,3258$; $p=0,0014$), а между уровнями IgG и IgA определялась слабая прямая корреляционная связь ($r=0,2839$; $p=0,0055$).

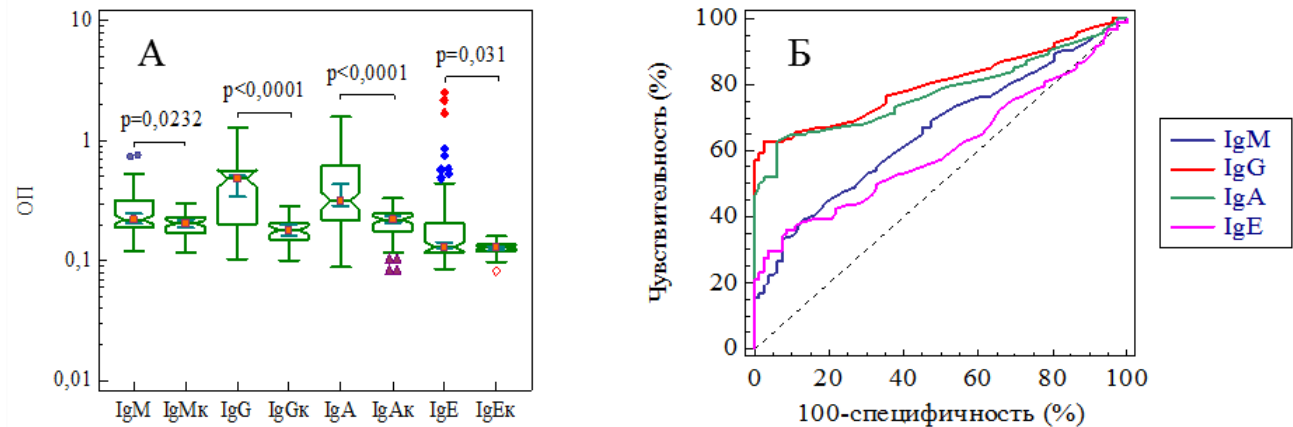


Рисунок 1 – А. Уровни антител разных классов к ХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ и здоровых женщин (контроль) вне беременности. Б. ROC-кривые вероятности ПНБ у женщин в зависимости от уровня антител классов М, G, А, Е к ХГЧ в сыворотке крови (значения АUC, соответственно, 0,665; 0,801; 0,774; 0,608; $p<0,05$).

Сывороточные антитела пациенток с ПНБ взаимодействовали в ИФА как с цельной молекулой ХГЧ, так и со свободными α - и β -субъединицами гормона, иммобилизованными на твердой фазе путем пассивной адсорбции. Уровень IgG-антител к цельной молекуле ХГЧ коррелировал с уровнем антител к α -ХГЧ ($r=0,97$) и β -ХГЧ ($r=0,82$) ($p<0,01$). Следует отметить гетерогенный состав антител к ХГЧ, включающий антитела к α -субъединице, общей для гликопротеиновых гормонов, и к β -субъединице, специфической для ХГЧ.

Сывороточные IgG-антитела у женщин, позитивных на аХГЧ ($n=44$), взаимодействовали с синтетическими пептидами, соответствующими пептидным последовательностям β -ХГЧ С109-119 и С109-145, ответственным за специфичность и биологическую активность гормона. При этом с пептидом С109-119 реагировали 50% сывороток, с пептидом С109-145 – 29,5% сывороток. Установлено, что при уровне IgG аХГЧ выше 48 Ед/мл вероятность наличия антител к обеим пептидным последовательностям повышается в 10,1 раза (OR 10,1; 95% CI [2,22-45,71]; $p=0,0027$). Эти данные имеют важное значение, так как недавно получено подтверждение, что антитела к пептидным

последовательностям β -ХГЧ 116-125, 126-135 и 131-140 нейтрализуют биологическую активность гормона (Caldeira J. и соавт., 2015).

В сыворотке крови у пациенток с ПНБ, позитивных на аХГЧ (n=48), выявлялись IgG-антитела четырех подклассов. При этом наиболее часто находили повышенные уровни антител, принадлежащих к функционально активным подклассам IgG1 (56,3%) и IgG2 (60,4%). IgG1- и IgG2-антитела определялись чаще, чем IgG3 (33,3%) ($p=0,0393$ и $p=0,014$). Комбинация IgG1 с IgG2 и IgG4 была наиболее частой (в 20,8% случаев). Важно подчеркнуть, что IgG1-антитела могут нейтрализовать биологическую активность ХГЧ и активировать систему комплемента через связывание компонента C1q, тогда как взаимодействие IgG2-антител с клеточными Fc γ -рецепторами может привести к активации или нарушению функции тромбоцитов, моноцитов, нейтрофилов и клеток трофобласта, повышению риска развития тромботических и воспалительных осложнений.

Показана возможность определения avidности аХГЧ класса G двумя способами: с использованием реакционного буфера с повышенным содержанием NaCl (0,5 M) на этапе взаимодействия антител с антигеном или белок-диссоциирующего агента после образования комплекса антиген-антитело на твердой фазе. При этом средние показатели ИА IgG-антител составляли $63,2\pm 9,3\%$ и $62,1\pm 10,8\%$ и не различались ($p=0,63$), а между значениями ИА наблюдалась сильная прямая корреляционная связь ($r=0,86$; $p<0,0001$).

С ПНБ на ранних сроках ассоциировались высокоавидные IgG-антитела к ХГЧ, высокая avidность IgG-антител с ИА более 70% определялась в 56,3% случаев. Средний ИА IgG2-антител ($68,1\pm 18\%$) был выше среднего ИА IgG1- ($46,3\pm 16,9\%$; $p=0,0001$) и IgG4-антител ($41,5\pm 8,3\%$; $p<0,0001$). Важно отметить, что высокая avidность IgG-антител способствует реализации их эффекторных функций. В случае АФС именно высокоавидные аФЛ класса G ассоциируются с тромботическими и акушерскими осложнениями (Šučnik S. и соавт., 2012).

Определение аХГЧ характеризовалось высокой чувствительностью, специфичностью и диагностической значимостью для ПНБ на ранних сроках (таблица 2). Диагностическая значимость IgG- и IgA-антител для ПНБ была выше, чем IgM и IgE ($p<0,05$). Выявление высокого уровня IgE-антител

ассоциировалось с тяжелыми случаями ПНБ с числом потерь беременности более трех. При определении комбинации аХГЧ классов G, M и A диагностическая значимость возрастала (AUC 0,937; $p < 0,05$).

Таблица 2 – Диагностическая значимость антител к ХГЧ для привычного невынашивания беременности на ранних сроках.

Класс антител	CV, ед. ОП	Se, %	Sp, %	PPV, %	NPV, %	AUC, 95% CI	p-значение
IgM	>0,230	45,2	80,5	72,6	56,2	0,665[0,590-0,734]	0,0001
IgG	>0,238	65,6	89,0	87,2	69,3	0,801[0,737-0,857]	<0,0001
IgA	>0,267	64,5	90,2	88,3	68,9	0,774[0,705-0,834]	<0,0001
IgE	>0,149	39,8	84,2	74,3	54,9	0,608[0,531-0,680]	0,0120

Примечание. CV – критерийное значение, Se – чувствительность, Sp – специфичность, PPV – положительная прогностическая значимость, NPV – отрицательная прогностическая значимость, AUC – площадь под ROC-кривой

С использованием оптимальных порогов отсечения для оценки результатов ИФА показано, что шансы развития ПНБ на ранних сроках у женщин возрастали при наличии IgG аХГЧ в 15,7 раза (95% CI [6,97-35,44]), IgA в 12,1 раза (95% CI [5,64-25,94]), IgM в 3,9 раза (95% CI [1,94-7,94]) и IgE в 2,6 раза (95% CI [1,36-5,12]) ($p < 0,01$). Построенные ROC-кривые позволяли эффективно классифицировать пациенток с ПНБ и здоровых женщин без потерь беременности по уровням аХГЧ классов G и A (рисунок 1Б) и соответствовали хорошему качеству модели. Однако, по-видимому, IgA-антитела не имели самостоятельного диагностического значения, так как часто выявлялись в комбинации с IgG и коррелировали с уровнем IgG.

Таким образом, антитела к ХГЧ являются независимым фактором риска ПНБ на ранних сроках и представляют собой гетерогенную группу антител, реагирующих с цельной молекулой ХГЧ, свободными α - и β -субъединицами гормона, эпитопами β -ХГЧ, специфическими для ХГЧ и ответственными за биологическую активность гормона. IgG-антитела к ХГЧ характеризуются высокой авидностью, преобладанием функционально активных подклассов G1 и G2. Антитела к ХГЧ, особенно классов G и A, имеют высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках.

Характеристика антител к ПГ и их диагностическое значение при ПНБ. С

помощью разработанных модификаций ИФА продемонстрировано повышенное образование поликлональных антител к ПГ у женщин с ПНБ на ранних сроках. У данных пациенток антитела к ПГ выявлялись с высокой частотой, при этом IgG-антитела определялись в 7,6 раза, IgA – в 5,2 раза, IgM – в 3,6 раза чаще, чем у здоровых женщин без потери беременности (таблица 3). Наиболее часто выявлялись антитела одного класса G (22,5%) или M (20%) и комбинации антител IgG+IgA (25%) и IgM+IgG+IgA (17,5%). Предполагается, что ПГ, являясь гаптеном вследствие низкой молекулярной массы, после связывания с тканевыми белками или белками плазмы крови может действовать как полноценный антиген, вызывая развитие Th2-лимфоцитов, регулирующих образование антител и аллергические реакции.

Таблица 3 – Частота выявления антител к прогестерону в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин вне беременности.

Класс антител	Частота выявления, абс. число (%)		p*	OR, 95% CI	p
	Исследуемая группа, n=90	Группа сравнения, n=90			
IgM	36 (40)	14 (15,5)	0,0005	3,6[1,78-7,35]	0,0004
IgG	44 (48,9)	10 (11,1)	<0,0001	7,6[3,52-16,64]	<0,0001
IgA	40 (44,4)	12 (13,3)	<0,0001	5,2[2,49-10,86]	<0,0001

Примечание. * – значение p при сравнении двух групп

Медианные значения уровня антител к ПГ классов G, M и A в исследуемой группе были значимо выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$) (рисунок 2А). Между уровнями IgG- и IgA-антител в сыворотке крови у женщин с ПНБ была выявлена прямая корреляционная связь средней силы ($r = 0,3901$; $p = 0,0081$).

У пациенток с ПНБ, положительных на аПГ, было обнаружено повышение уровня IgG-антител четырех подклассов. IgG1-антитела превосходили IgG-антитела других подклассов по частоте выявления и уровню. Антитела подклассов G1 и G2 выявлялись чаще (в 90% и 54% случаев), чем

подклассов G3 и G4 (в 20% и 32% случаях; $p < 0,05$), а IgG1 – чаще, чем IgG2 ($p = 0,0002$). По частоте выявления у женщин с ПНБ преобладали одиночные IgG1-антитела и комбинация IgG1 с IgG2 (в 36% и 28% случаев).

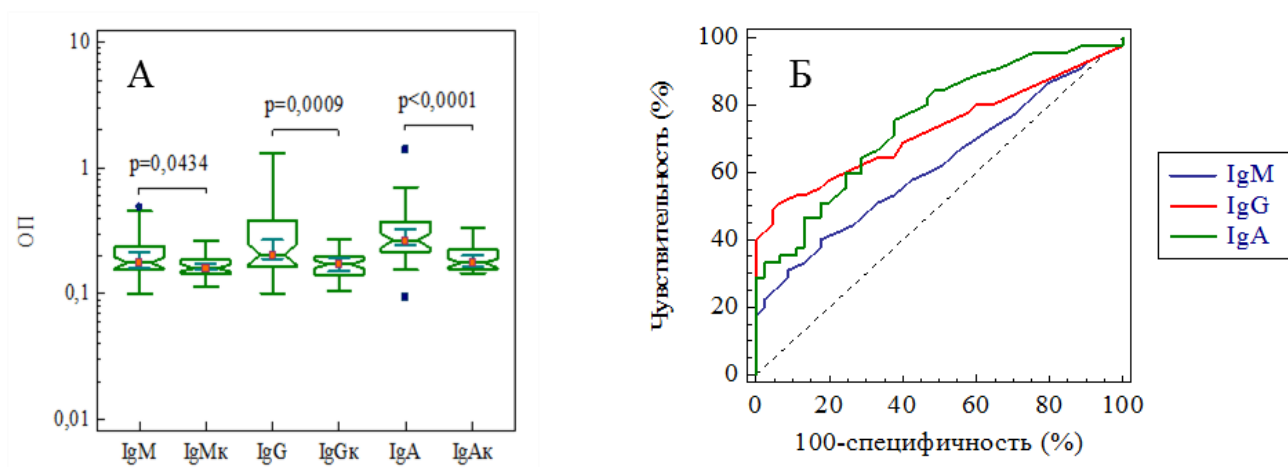


Рисунок 2 – А. Уровни антител разных классов к ПГ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на раннем сроке и здоровых женщин (контроль) вне беременности. Б. ROC-кривые вероятности ПНБ на ранних сроках у женщин в зависимости от уровня антител классов М, G и А к ПГ в сыворотке крови (значения AUC 0,621, 0,726 и 0,751; $p < 0,05$).

Авидность IgG-антител к ПГ определяли с применением белок-диссоциирующего агента, при этом среднее значение ИА антител составляло $50,8 \pm 13,7\%$. Однако высокоавидные аПГ класса G выявлялись у пациенток с ПНБ значительно реже (в 24% случаях), чем высокоавидные аХГЧ (в 53,6% случаев) ($p = 0,0022$), что может быть обусловлено разной иммуногенностью гормонов. Антитела к ПГ подкласса IgG2 имели более высокую авидность (ИА $63,5 \pm 14,1\%$), чем антитела подкласса IgG1 (ИА $46,7 \pm 18,2\%$) ($p < 0,05$).

Определение аПГ характеризовалось высокой чувствительностью, специфичностью и диагностической значимостью для ПНБ на ранних сроках (таблица 4). При этом IgG- и IgA-антитела имели более высокую диагностическую значимость, чем IgM. При определении комбинации IgM+IgG+IgA диагностическая значимость аПГ для ПНБ значительно повышалась (AUC 0,859, $p < 0,0001$) по сравнению с таковой IgG ($p = 0,0494$). Построенные ROC-кривые позволяли эффективно дифференцировать пациенток с ПНБ и здоровых женщин без потери беременности по уровню аПГ классов G и A

(рисунок 2Б). Предсказательная способность модели оценивалась как хорошая в случае IgG- и IgA-антител и как средняя в случае IgM.

С использованием оптимальных порогов отсечения для оценки результатов ИФА показано, что шансы развития ПНБ на ранних сроках у женщин при наличии IgG-антител к ПГ возрастали в 9,1 раза (95% CI [3,3-25,3]), IgA – в 4,8 раза (95% CI [2,5-9,6]), IgM – в 3,1 раза (95% CI [1,3-7,4]) ($p < 0,05$).

Таблица 4 – Диагностическая значимость антител к прогестерону для привычного невынашивания беременности на ранних сроках.

Класс антител	CV, ед. ОП	Se, %	Sp, %	PPV, %	NPV, %	AUC, 95% CI	p-значение
IgM	>0,190	40	82,2	69,2	57,8	0,621[0,512-0,721]	0,0429
IgG	>0,221	53,3	88,9	82,8	65,6	0,726[0,597-0,794]	<0,0001
IgA	>0,246	51,1	82,2	74,2	62,7	0,751[0,648-0,836]	<0,0001

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Таким образом, антитела к ПГ являются независимым фактором риска ПНБ на ранних сроках. Высокоавидные аПГ класса G выявляются при данной патологии реже, чем высокоавидные аХГЧ. Среди IgG-антител разных подклассов по частоте выявления преобладают функционально активные IgG1 и IgG2. Определение антител к ПГ классов G и A характеризуется высокой диагностической значимостью для ПНБ на ранних сроках.

Профиль антифосфолипидных антител и их диагностическое значение при ПНБ на ранних сроках. При исследовании спектра аФЛ у пациенток с ПНБ на ранних сроках ($n=91$) были обнаружены повышенные уровни антител к КЛ, β 2-ГП-I, ФС, ФЭ, Ан А5, ПТ и комплексу ФС/ПТ (у 56 (61,5%)) (рисунок 3). Антитела (IgM, IgG) к β 2-ГП-I выявлялись суммарно чаще (у 31,9% пациенток), чем антитела к ФС (у 15,4%; $p=0,0145$). Важно отметить, что, хотя ФС экспонируется на поверхности клеток во время дифференцировки трофобласта и образования синцития, именно антитела к β 2-ГП-I ассоциируются с ПВ и рассматриваются как фактор риска потери беременности.

Часто выявлялись одиночные аФЛ (в 41,1% случаев) с преобладанием антител к Ан А5 (в 52,2%) и β 2-ГП-I (39,1%), одновременно антитела к КЛ и

β 2-ГП-I определялись у 12 (21,4%) женщин, комбинации разных аФЛ – у 18 (32,1%) женщин, тройная позитивность на антитела к КЛ, β 2-ГП-I и ВА отмечалась только у 3 (5,4%) пациенток с венозным тромбозом в анамнезе.

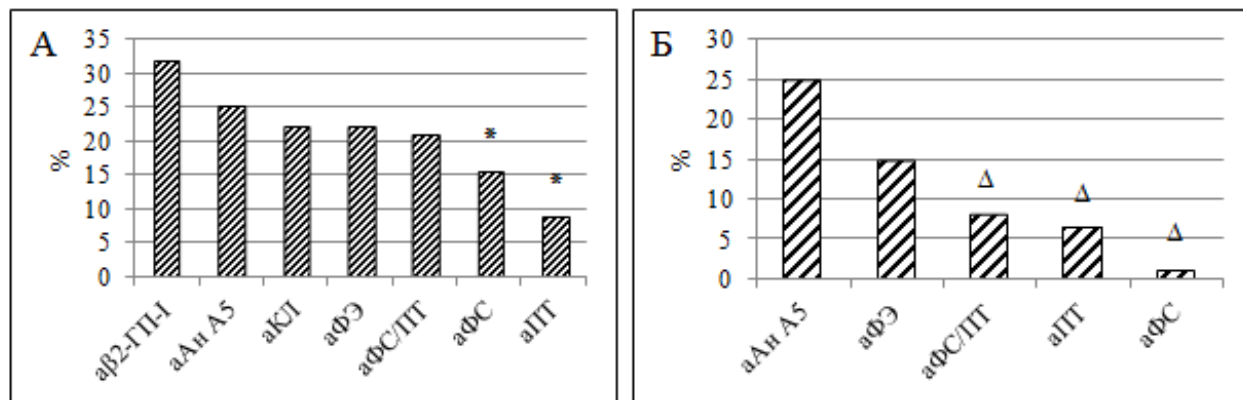


Рисунок 3 – Частота выявления аФЛ (IgM, IgG) в сыворотке крови у женщин с ПНБ (А) и в подгруппе пациенток, серонегативных на антитела к КЛ, β 2-ГП-I и ВА (Б). * – $p < 0,05$ при сравнении с a β 2-ГП-I; Δ – $p < 0,05$ при сравнении с aAn A5

Антитела (IgM, IgG) к β 2-ГП-I и Ан А5, а также IgG-антитела к КЛ, ФЭ и ФС/ПТ определялись у пациенток с ПНБ в 4,6-9,5 раза чаще, чем у здоровых женщин без потери беременности ($p < 0,01$), наиболее часто при ПНБ выявлялись IgG-антитела к β 2-ГП-I и Ан А5 (таблица 5).

У 41,7% пациенток, серонегативных на лабораторные критерии АФС, определялись аФЛ другой специфичности: aAn А5 – у 25%, aФЭ – у 15%, aФС/ПТ – у 8,3%, aПТ – у 6,7%, aФС – у 1,3% (рисунок 3Б). При этом антитела к Ан А5 были найдены чаще, чем антитела к ФС/ПТ, ПТ и ФС ($p < 0,05$). Антитела к Ан А5 были единственными выявленными аФЛ в 13,2% случаев.

Предполагается, что определение антител к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ может способствовать более полной идентификации пациенток с АФС. Полученные результаты подтверждаются данными Mekinian A. и соавт. (2016), которые обнаружили антитела к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ у серонегативных женщин с клиническими признаками акушерского АФС.

При сравнении результатов определения антител (IgM, IgG) к КЛ, ФС и β 2-ГП-I, полученных с помощью ИФА и иммуноблоттинга, отмечалось хорошее совпадение результатов и сильная прямая корреляционная связь между данными двух методов ($r \geq 0,7$; $p < 0,05$), что подтверждает

перспективность использования иммуноблоттинга для исследования профиля аФЛ.

Таблица 5 – Частота выявления аФЛ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин вне беременности.

Вид антител	Частота выявления, абс.ч. (%)		p*	OR, 95% CI	p	
	Исследуемая группа, n=91	Группа сравнения, n=104				
аКЛ	IgM	11 (12,1)	4 (3,8)	0,0571	3,4 [1,05-11,2]	0,0405
	IgG	11 (12,1)	2 (1,9)	0,0104	7,1 [1,51-32,54]	0,0129
аβ2-ГП-I	IgM	16 (17,6)	3 (2,9)	0,0117	7,2 [2,02-25,54]	0,0023
	IgG	20 (22)	3 (2,9)	0,0001	9,5 [2,71-33,13]	0,0004
аФС	IgM	7 (7,7)	2 (1,9)	0,1129	4,3 [0,86-21,0]	0,0759
	IgG	7 (7,7)	2 (1,9)	0,1129	4,3 [0,86-21,0]	0,0759
аАн А5	IgM	14 (15,4)	3 (2,9)	0,0047	6,1 [1,7-22,05]	0,0056
	IgG	13 (14,3)	2 (1,9)	0,0029	8,5 [1,86-38,77]	0,0057
аПТ	IgM	5 (5,5)	2 (1,9)	0,3353	2,9 [0,56-15,67]	0,2007
	IgG	4 (4,4)	1 (1)	0,2983	4,7 [0,52-43,16]	0,1678
аФС/ПТ	IgM	11 (12,1)	4 (3,8)	0,0571	3,4 [1,05-11,20]	0,0405
	IgG	14 (15,4)	3 (2,9)	0,0047	6,1 [1,7-22,05]	0,0056
аФЭ	IgM	12 (13,2)	5 (4,8)	0,0688	2,5 [0,89-6,91]	0,0819
	IgG	14 (15,4)	4 (3,8)	0,0109	4,6 [1,44-14,36]	0,0099

Примечание.* – значение p при сравнении показателей в двух группах

Медианные значения уровня аФЛ у пациенток с ПНБ были значимо выше, чем у здоровых женщин ($p < 0,05$) (таблица 6). У большинства пациенток преобладали низкие (до 20 Ед/мл) и средние (от 20 до 60 Ед/мл) уровни аФЛ. Только у трех пациенток с венозным тромбозом в анамнезе и тройной позитивностью на лабораторные критерии АФС уровень IgG-антител к КЛ и β2-ГП-I был значимо выше ($106 \pm 71,8$ GPL-Ед/мл; $120,3 \pm 85,7$ Ед/мл), чем у пациенток без тромботических осложнений ($18,6 \pm 7,4$ GPL-Ед/мл; $28,5 \pm 19,1$ Ед/мл) ($p < 0,01$).

Между уровнями антител к КЛ, ФС и β2-ГП-I классов М и G наблюдалась сильная прямая корреляционная связь (r от 0,89 до 0,97; $p < 0,0001$). Корреляционная связь средней силы была найдена между уровнями IgG-

антител к ФЭ, ФС/ПТ и аФЛ другой специфичности, включая IgG-антитела к КЛ и ФС. Корреляционная связь между уровнями аАн А5 и других аФЛ не наблюдалась. Не найдена значимая корреляционная связь между уровнями антител к ПТ и комплексу ФС/ПТ, которые, по-видимому, принадлежат к разным группам антител.

Таблица 6 – Уровни аФЛ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин вне беременности (Me, x_{\min} - x_{\max}).

Вид антител	Уровень аФЛ *		р-значение	
	Исследуемая группа, n=91	Группа сравнения, n=104		
аКЛ	IgM	1,8 [0,5-66,5]	1,25 [0,5-15,6]	0,0338
	IgG	2,4 [1,0-185]	1,9 [1,0-12,5]	0,0181
а β 2-ГП-I	IgM	2,4 [0,5-68,7]	2,1 [0,5-8,3]	0,0037
	IgG	2,9 [0,5-217,1]	1,85 [0,5-8,4]	0,0012
аФС	IgM	2,0 [0,5-69,8]	1,8 [0,5-12,1]	0,0405
	IgG	2,4 [0,7-177]	2,1 [0,5-13,6]	0,0381
аАн А5	IgM	2,8 [1,0-8,7]	2,55 [1,0-8,5]	0,0127
	IgG	3,4 [1,5-69,8]	2,85 [1,0-8,1]	0,0009
аПТ	IgM	2,4 [1,0-25,0]	2,25 [1,0-12,3]	0,0148
	IgG	4,6 [1,0-172]	3,2 [1,0-15,2]	0,0023
аФС/ПТ	IgM	3,9 [1,0-92,1]	3,3 [1,0-24,1]	0,0232
	IgG	7,7 [2,1-130,6]	6,1 [1,9-22,3]	0,004
аФЭ	IgM	8,5 [2,7-195,3]	6,8 [2,5-27,9]	0,0103
	IgG	7,6 [2,8-215,4]	6,2 [2,2-20,9]	0,0099

Примечание. * – единицы измерения аКЛ – MPL-Ед/мл и GPL-Ед/мл, других аФЛ – Ед/мл

У пациенток с ПНБ средние значения индекса avidности антител к КЛ, β 2-ГП-I и Ан А5 класса G значимо не различались и составляли, соответственно, $57,11 \pm 21,22\%$, $64,82 \pm 19,65\%$ и $68,22 \pm 12,98\%$ ($p > 0,05$). IgG-антитела к КЛ и β 2-ГП-I имели высокую avidность в 33,3% и 30% случаев, тогда как высокая avidность IgG-антител к Ан А5 наблюдалась в 61,5% случаев. У пациенток с тромботическими осложнениями в анамнезе наблюдался не только высокий уровень, но и высокая avidность IgG-антител к КЛ и β 2-ГП-I с ИА > 90%. Полученные результаты об ассоциации

высокоавидных антител к КЛ и β 2-ГП-I класса G с патологией беременности и тромбозом согласуются с данными Šušnik S. и соавт. (2012).

У пациенток с ПНБ выявлялись повышенные уровни антител к КЛ, β 2-ГП-I и Ан А5 четырех подклассов IgG. Среди IgG-антител к КЛ и β 2-ГП-I по частоте выявления преобладали IgG2. При этом повышение уровня IgG2-антител наблюдалось чаще (в 83,3% и 65% случаев), чем IgG1 (в 32% и 15%), IgG3 (в 32% и 25%) и IgG4 (в 17 % и 25%) ($p < 0,05$). Частота выявления антител к Ан А5, принадлежащих к разным подклассам IgG, значимо не различалась, повышенные уровни IgG1, IgG2 и IgG3 выявлялись в 30,8-38,5% случаев, IgG4 – в 53,8% случаев.

IgG-антитела к β 2-ГП-I и Ан А5 являлись независимыми факторами риска развития ПНБ на ранних сроках и имели высокую диагностическую значимость для данной патологии (таблица 7). Включение антител к Ан А5 в комбинацию антител к КЛ и β 2-ГП-I повышало ее диагностическую значимость для ПНБ (AUC 0,806 (95% CI [0,744-0,859]; $p < 0,0001$). Полученные данные об ассоциации антител к Ан А5 с ПНБ подтверждаются результатами исследования Vešegović M. и соавт. (2016).

Таблица 7 – Диагностическая значимость IgG-антител к β 2-ГП-I и Ан А5 для привычного невынашивания беременности на ранних сроках

Вид антител	CV, Ед/мл	Se, %	Sp, %	PPV, %	NPV, %	AUC, 95% CI	p- значение
$\alpha\beta$ 2-ГП-I IgG	>2,4	59,3	72,1	65,1	66,9	0,705[0,636-0,768]	<0,0001
α Ан А5 IgG	>3,0	60,4	73,1	66,3	67,8	0,743[0,675-0,802]	<0,0001

Примечание. См. примечание к таблице 2.

На рисунке 4 приведены построенные ROC-кривые, которые позволяли эффективно дифференцировать пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин без потери беременности по уровню IgG-антител к β 2-ГП-I и Ан А5 и соответствовали хорошему качеству модели.

Сравнение результатов ИФА и ХЛИА при исследовании сывороток крови женщин с ПНБ, позитивных на антитела (IgM, IgG) к β 2-ГП-I ($n=30$), показало хорошее совпадение результатов (в 92% случаев) в среднем и высоком

диапазоне концентраций антител. При этом между уровнями антител к $\beta 2$ -ГП-I класса М наблюдалась сильная прямая корреляционная связь ($r=0,737$; $p<0,0001$), а между уровнями антител класса G – прямая корреляционная связь средней силы ($r=0,66$; $p<0,0001$).

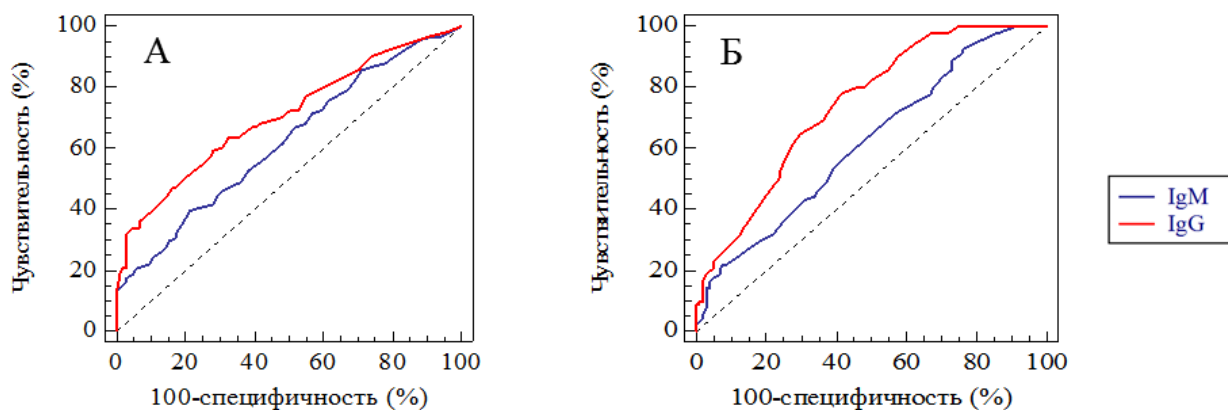


Рисунок 4 – ROC-кривые вероятности ПНБ на ранних сроках у женщин в зависимости от уровня антител (IgM, IgG) к $\beta 2$ -ГП-I (А) и Ан А5 (Б) в сыворотке крови (значения AUC 0,621 и 0,705; 0,623 и 0,743; $p<0,01$)

При исследовании эпитопной специфичности антител к $\beta 2$ -ГП-I с помощью ХЛИА у 13 (43,3%) серопозитивных женщин с ПНБ ($n=30$) были выявлены IgG-антитела к домену I $\beta 2$ -ГП-I. Медианный уровень этих антител составлял 9,85 [3,7-7664,3] хемилюминесцентных единиц (СУ). Между уровнями IgG-антител к $\beta 2$ -ГП-I (по результатам ИФА) и к домену I наблюдалась прямая корреляционная связь средней силы ($r=0,646$; $p=0,0001$). По данным ROC-анализа, при уровне IgG-антител к $\beta 2$ -ГП-I выше 17,6 Ед/мл имеется высокая вероятность наличия антител к домену I (OR 41,3; 95% CI [5,01-339,82]; $p=0,0005$). Эти данные имеют важное клиническое значение для стратификации пациенток с ПНБ по риску тромбоза и акушерских осложнений.

Таким образом, ПНБ на ранних сроках ассоциируется с широким спектром аФЛ, включающим антитела к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ, определение которых может повысить эффективность диагностики АФС. IgG-антитела к $\beta 2$ -ГП-I и Ан А5 являются независимыми факторами риска ПНБ на ранних сроках. При среднем и высоком уровне антител к $\beta 2$ -ГП-I отмечается высокая вероятность образования антител к домену I. Антитела к Ан А5 представляются перспективным диагностическим маркером акушерского АФС.

Спектр и диагностическое значение антител к гормонам и аФЛ при угрожающем выкидыше на раннем сроке беременности. У пациенток с угрожающим выкидышем в I триместре в сроке $8,5 \pm 2,3$ недель с помощью ИФА была обнаружена повышенная продукция антител к ХГЧ и ПГ по сравнению с женщинами с физиологическим течением беременности. При угрожающем выкидыше антитела классов М и G к ХГЧ выявлялись в 8,8 и 8,6 раза чаще, а к ПГ – в 3,2 и 4,7 раза чаще, чем при физиологическом течении беременности ($p < 0,05$) (таблица 8).

Таблица 8 – Частота выявления антител к ХГЧ и ПГ у женщин с угрожающим выкидышем на раннем сроке и физиологическим течением беременности.

Вид антител	Частота выявления, абс. ч. (%)		p*	OR, 95% CI	p
	Исследуемая группа, n=47	Группа сравнения, n=30			
аХГЧ IgM	27 (57,4)	4 (13,3)	0,0003	8,8[2,64-29,16]	0,0004
IgG	23 (48,9)	3 (10)	0,0011	8,6[2,29-32,38]	0,0014
аПГ IgM	27 (57,4)	9 (30)	0,0344	3,2[1,19 – 8,32]	0,0206
IgG	16 (34)	3 (10)	0,0347	4,7[1,22 – 17,68]	0,0243

Примечание. * - значение p при сравнении двух групп

Антитела к гормонам выявлялись у пациенток с угрожающим выкидышем значимо чаще, чем аФЛ. Высокие уровни антител к ХГЧ, превышающие в 2 раза средний уровень в контрольных сыворотках, были обнаружены у 61,7% пациенток, а к ПГ – у 55,3% пациенток. Тогда как аФЛ с аналогичным уровнем выявлялись реже, только у 21,3% пациенток: аКЛ – у 6,4%, аβ2-ГП-I – у 6,4%, аАн А5 – у 12,8%, аПТ – у 4,3% пациенток ($p < 0,0001$). Между уровнями антител класса М или G к ХГЧ и ПГ наблюдалась прямая корреляционная связь средней силы (r 0,48 и 0,37; $p < 0,001$).

Антитела к ХГЧ и ПГ классов М и G имели высокую диагностическую значимость для угрожающего выкидыша на раннем сроке беременности (таблица 9), при этом показатели AUC антител классов М и G значимо не различались ($p = 0,4365$; $p = 0,6402$). Определение комбинации антител классов М и G к ХГЧ или ПГ характеризовалось более высокой диагностической

значимостью (AUC 0,882 (95% CI [0,788-0,944]) и 0,801 (95% CI [0,694-0,883]; $p < 0,0001$). При применении оптимальных порогов отсечения для оценки результатов ИФА шансы развития угрожающего выкидыша в I триместре беременности при наличии аХГЧ класса М или G повышались в 14,6 раза (95% CI [4,56-46,65]) и 3,4 раза (95% CI [1,26-9,19]) ($p < 0,0001$), а при наличии аПГ класса М или G в 5,3 раза в обоих случаях (95% CI [1,89-14,83]) ($p = 0,0015$).

Таблица 9 – Диагностическая значимость антител к ХГЧ и ПГ для угрожающего выкидыша на раннем сроке беременности.

Вид антител	CV, ед. ОП	Se, %	Sp, %	PPV, %	NPV, %	AUC, 95% CI	p-значение
аХГЧ IgM	>0,232	74,5	83,3	87,5	67,6	0,793[0,686-0,877]	<0,0001
аХГЧ IgG	>0,237	55,3	73,3	76,4	51,2	0,734[0,621-0,828]	<0,0001
аПГ IgM	>0,327	59,6	76,7	80	54,8	0,741[0,628-0,834]	<0,0001
аПГ IgG	>0,216	61,7	76,7	80,6	56,1	0,703[0,588-0,802]	0,0006

Примечание: см. примечание к таблице 2.

Построенные ROC-кривые позволяли эффективно классифицировать пациенток с угрожающим выкидышем на раннем сроке и женщин с физиологическим течением беременности по уровню антител к ХГЧ и ПГ (рисунок 5), при этом отмечалось хорошее качество модели.

Таким образом, у пациенток с угрожающим выкидышем в I триместре беременности часто обнаруживаются повышенные уровни антител к ХГЧ и ПГ классов М и G по сравнению с женщинами с физиологическим течением беременности, значимо чаще, чем аФЛ. Антитела к ХГЧ и ПГ являются независимыми факторами риска развития угрожающего выкидыша на раннем сроке и имеют высокую диагностическую значимость для данной патологии.

Состояние системы комплемента у женщин с антителами к гормонам и аФЛ. Так как система комплемента играет важную роль в патогенезе акушерского АФС, у женщин с повышенным образованием аФЛ и антител к гормонам оценивали состояние системы комплемента по уровню компонентов комплемента С3 и С4, циркулирующих иммунных комплексов, способных активировать систему комплемента, и IgG-антител к компоненту С1q.

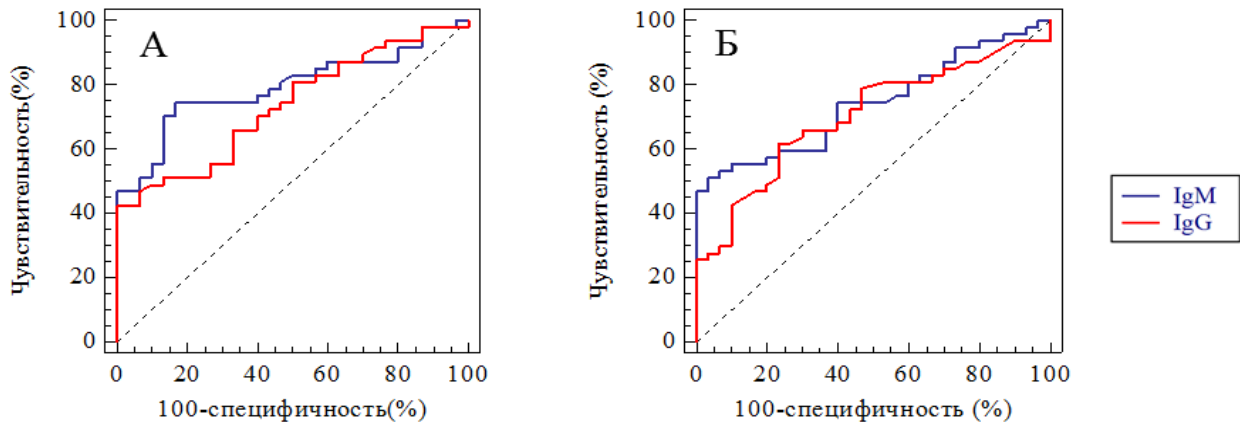


Рисунок 5 – ROC-кривые вероятности угрожающего выкидыша в I триместре беременности у женщин в зависимости от уровня антител (IgM, IgG) к ХГЧ (А) и ПГ (Б) в сыворотке крови (AUC 0,793 и 0,734; 0,741 и 0,703; $p < 0,001$).

Положительная реакция на ЦИК наблюдалась у большей части (у 43,1%) женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к ХГЧ ($n=51$): на ЦИК-С1q – у 27,5%, на ЦИК-С3d – у 21,6%, на оба вида ЦИК – у 5,9%. Медианный уровень ЦИК-С1q составлял 3,4 [1,5-27,5] мкг-экв/мл, ЦИК-С3d – 13,5 [8-33,0] мкг-экв/мл. При этом у женщин с повышенным уровнем ЦИК преобладали IgG-антитела к ХГЧ подкласса IgG1 (у 77%) с более высоким уровнем авидности (ИА $53,7 \pm 15,3\%$), чем при нормальном уровне ЦИК (ИА $43,5 \pm 12,7\%$) ($p=0,0249$). Повышенное содержание ЦИК предполагает активацию системы комплемента по классическому пути.

Содержание компонентов системы комплемента С3 и С4 определяли у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аФЛ ($n=45$) или аХГЧ ($n=72$), в сравнении с показателями здоровых женщин ($n=38$). Исследованные сыворотки крови содержали повышенные уровни антител (IgM, IgG) к КЛ, ФС и $\beta 2$ -ГП-I (в 60%, 60% и 75,6% случаев), к Ан А5 и ПТ (в 17,8% и 11,1%), или антитела к ХГЧ класса G (в 91,7%) и M (в 16,7% случаев).

У женщин с ПНБ, позитивных на аФЛ и аХГЧ, часто отмечалась гипокомплементемия, проявляющаяся снижением уровня компонентов комплемента С3 и С4. Снижение содержания компонента С3 наблюдалось не только у пациенток с повышенным образованием аФЛ (в 73,3% случаев), но и аХГЧ (в 65,4% случаев), при этом средние уровни С3 в обоих случаях были

ниже, чем у здоровых женщин ($p < 0,05$) (рисунок 6А). Снижение уровня компонента С4 определялось у 10 (8,1%) пациенток, а именно, у 6 (13,3%) с аФЛ и у 4 (5,1%) с аХГЧ, среднее содержание С4 у пациенток с ПНБ было также ниже, чем у здоровых женщин ($p < 0,05$). Следует отметить, что гипокомплементемия отражает активацию системы комплемента и потребление данных компонентов. Полученные результаты согласуются с данными Alijotas-Reig J. и соавт. (2015) о частой гипокомплементемии и активации системы комплемента по классическому пути у женщин с акушерским АФС.

Повышение сывороточного уровня анти-С1q антител класса G (>10 Ед/мл) наблюдалось у 18,8% пациенток с ПНБ: у 20% с аФЛ и у 18,1% с аХГЧ. Анти-С1q антитела выявлялись чаще у пациенток с ПНБ, чем у здоровых женщин (у 2,6%) ($p < 0,05$). При наличии аФЛ вероятность образования анти-С1q антител была выше в 9,3 раза (OR 9,3; 95% CI [1,114-76,783]), а при наличии аХГЧ – в 8,2 раза (OR 8,2; 95% CI [1,02-64,94]) ($p < 0,05$).

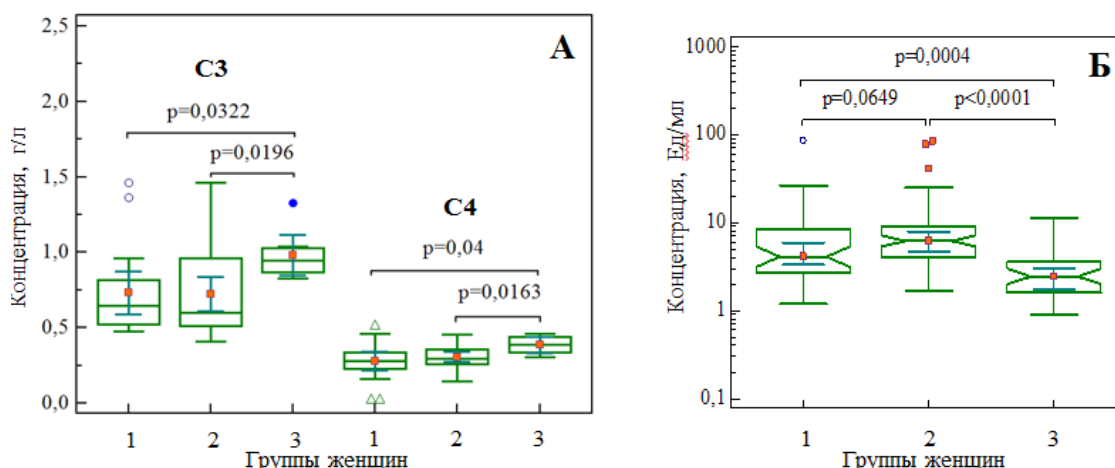


Рисунок 6 – Уровни (М, 95% CI) компонентов комплемента С3 и С4 (А) и содержание (Ме, 95% CI) анти-С1q антител (Б) в сыворотке крови у пациенток, серопозитивных на аФЛ (1) и аХГЧ (2), и у здоровых женщин (3).

Медианные значения уровня анти-С1q антител у женщин с ПНБ были значимо выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$) (рисунок 6Б). Эти результаты согласуются с данными Оку К. и соавт. (2016) о высокой распространенности анти-С1q антител у пациентов с первичным АФС и имеют важное значение в связи с тем, что анти-С1q антитела способны усиливать активацию системы комплемента с участием иммунных комплексов, а также

путем прямого взаимодействия C1q с фосфолипидами и фосфолипид-связывающими протеинами.

Таким образом, у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аФЛ и аХГЧ, наблюдается снижение содержания компонентов комплемента C3 и C4, повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов и анти-C1q антител, что отражает активацию системы комплемента по классическому пути.

Особенности иммунного статуса у женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к ХГЧ. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов и содержания общих иммуноглобулинов в периферической крови у женщин с ПНБ, серопозитивных (подгруппа I, n=30) и серонегативных на аХГЧ (подгруппа II, n=32), проводилось в середине менструального цикла. Установлено, что средние значения абсолютного и относительного содержания клеток с фенотипом CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD56+ и соотношения CD3+CD4+/CD3+CD8+ у данных пациенток значимо не различались и соответствовали референсному диапазону за исключением показателя относительного содержания клеток CD56+ у серонегативных женщин ($18,1 \pm 3,9\%$), который превышал верхнюю границу референсного интервала. При этом в двух подгруппах часто отмечалось повышенное относительное содержание клеток CD56+ (соответственно, у 30% и у 43,8% пациенток), что является характерным для женщин с ПНБ и подтверждается данными мета-анализа Seshadri S. и Sunkara S.K. (2014).

Среднее абсолютное и относительное содержание клеток CD19+ в периферической крови в двух подгруппах соответствовало нормальному диапазону, однако у серопозитивных пациенток данные показатели были выше, чем у серонегативных ($p=0,0005$). Следует отметить, что среднее относительное содержание клеток кластера CD19+CD5+ в подгруппе I ($3,1 \pm 1,4\%$) было выше верхней границы референсного диапазона. Кроме того, среднее абсолютное и относительное содержание клеток CD19+CD5+ в подгруппе I было выше, чем в подгруппе II ($p<0,001$). Вероятность повышения относительного содержания клеток CD19+CD5+ у серопозитивных пациенток была в 14 раз выше, чем у серонегативных (OR 14 [3,84-51,05]; $p=0,0001$).

У серопозитивных на аХГЧ пациенток часто выявлялось повышенное содержание общих IgM (у 60%), IgG (у 43,3%) по сравнению с серонегативными пациентками ($p < 0,05$). При высоком уровне аХГЧ шансы повышения содержания общих IgG возрастали в 50 раз (OR 50; 95% CI[2,8-894,98]; $p = 0,0078$), IgM – в 22,5 раза (OR 22,5; 95% CI[4,51-112,22]; $p = 0,0001$). Между уровнями IgM-антител к ХГЧ и общих IgM наблюдалась сильная прямая корреляционная связь ($r = 0,73$; $p < 0,0001$).

Таким образом, у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, иммунный статус характеризовался более высокими средними показателями абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов CD19+ и кластера CD19+CD5+, чем у серонегативных пациенток, повышенным показателем относительного содержания клеток кластера CD19+CD5+, повышением уровня общих сывороточных IgM и IgG.

Ассоциация антител к хорионическому гонадотропину и прогестерону с акушерской и гинекологической патологией. Анализ клинико-анамнестических данных у женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к ХГЧ ($n = 105$) и ПГ ($n = 89$), показал, что у большинства женщин потери беременности наблюдались в I триместре беременности ($> 80\%$) в сроке от 5 до 8 недель, реже отмечались потери плода во II триместре или преждевременные роды, часто невынашиванию предшествовали медицинские аборт (в 17,1% и 40,4% случаев), в структуре гинекологической заболеваемости отмечались частые воспалительные заболевания органов малого таза (в 38,1% и 52% случаев). Важно подчеркнуть, что значительная часть женщин ранее применяли гормональные контрацептивы (34,3%) или получали препараты прогестеронового ряда (76,9%). Кроме того, у женщин отмечалась высокая частота перенесенных инфекционных заболеваний, носительства возбудителей вирусных инфекций, таких как ВПГ (67,3%) и ЦМВ (92,3%), и токсоплазма (13,5%), часто диагностировались аллергические (у 25,7%) и аутоиммунные заболевания (у 21,2%).

Вне беременности у женщин с аХГЧ в 25,7% случаев диагностировалась недостаточность лютеиновой фазы. В то же время у женщин с высоким уровнем аПГ (более 30 Ед/мл) более часто наблюдались дисменорея (у 61,5%) и

гипоплазия эндометрия (у 55,8%), чем у женщин с низким уровнем аПГ (у 35,1% и 8,1%; $p < 0,05$), при этом шансы развития данных состояний у них были выше в 3 раза (OR 3,0; 95% CI [1,23-7,09]; $p = 0,0154$) и 14,3 раза (OR 14,3; 95% CI [3,89-52,49]; $p = 0,0001$), соответственно.

Во время беременности у женщин с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, более часто диагностировались угрожающий выкидыш в I триместре (у 53,6%), плацентарная недостаточность (у 57,1%) и хронический ДВС-синдром (у 64,3%), чем у серонегативных женщин (у 25%, 28,1% и 37,5%, соответственно; $p < 0,05$), а риск развития данных осложнений беременности был выше в 3,5 раза (OR 3,5; 95% CI [1,33-9,01]; $p = 0,011$), в 2,9 раза (OR 2,9; 95% CI [1,17-7,33]; $p = 0,0213$) и в 3 раза (OR 3,0; 95% CI [1,22-7,38]; $p = 0,0168$), соответственно.

Во время беременности у пациенток с высоким уровнем аПГ (более 30 Ед/мл) чаще, чем при низком уровне антител, диагностировалась гипоплазия хориона в I триместре (у 32,7% и у 2,7%, соответственно; $p = 0,0014$), а вероятность развития данной патологии была выше в 17,5 раза (OR 17,5; 95% CI [2,21-138,54]; $p = 0,0067$).

Ранняя диагностика на этапе планирования беременности, проведение предгестационной подготовки, комплексная терапия во время беременности и профилактика осложнений беременности способствовали достижению высокой частоты живорождения у пациенток с ПНБ, серопозитивных на антитела к ХГЧ и ПГ, соответственно, 94,3% и 92,3%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования получены данные, свидетельствующие о повышенном образовании у женщин с привычным невынашиванием беременности поликлональных антител к гормонам хорионическому гонадотропину человека и прогестерону, в частности, высокоавидных IgG-антител функционально активных подклассов G1 и G2, со специфичностью к пептидной последовательности β -ХГЧ, определяющей биологическую активность гормона, об ассоциации антител с активацией системы комплемента, нарушениями гемостаза и осложнениями беременности, что предполагает участие данных антител в патогенезе ПНБ.

Для женщин с ПНБ характерен широкий спектр антифосфолипидных антител, включающий антитела к аннексину А5, фосфатидилэтаноламину и комплексу фосфатидилсерин/протромбин, определение которых повышает эффективность диагностики АФС. IgG-антитела к β 2-гликопротеину-I и аннексину А5 являются независимыми факторами риска ПНБ на ранних сроках. Антитела к аннексину А5 представляются перспективным диагностическим маркером акушерского АФС.

Применение комплексного подхода к диагностике ПНБ, предусматривающего определение профиля антител к гормонам и антифосфолипидных антител, способствует уточнению патогенеза ПНБ, прогнозированию течения и исхода беременности, персонализированному подходу к назначению терапии.

Выполненная работа открывает перспективное направление для дальнейших исследований в области иммунологии репродукции, связанное с изучением иммунных механизмов нарушения функции репродуктивной системы и развития патологии беременности, опосредованных антителами к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим белкам, поиском новых серологических маркеров и созданием эффективных диагностических тестов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны модифицированные варианты непрямого твердофазного ИФА для определения антител разных изотипов к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону в сыворотке (плазме) крови человека, которые характеризуются высокой точностью определения и воспроизводимостью результатов (коэффициенты вариации менее 7% и 8%, соответственно), широким линейным диапазоном (от 5-6 Ед/мл до 120 Ед/мл), высокой чувствительностью (5-6 Ед/мл) и специфичностью, подтвержденной конкурентным ингибированием взаимодействия антиген-антитело избытком антигена в растворе, а также выделением аффинно очищенных антител из сыворотки крови женщин с привычным невынашиванием беременности.

2. Антитела к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону ассоциируются с привычным невынашиванием беременности на ранних сроках и угрожающим выкидышем в I триместре беременности и являются

независимыми факторами риска данной патологии. Вне беременности у женщин с привычным невынашиванием антитела к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону классов G, M и A выявляются в 5-15 раз и в 4-8 раз чаще, чем у здоровых женщин, а при угрожающем выкидыше антитела (IgM, IgG) к этим гормонам обнаруживаются, соответственно, в 8,6-8,8 и 3,2-4,7 раза чаще, чем при физиологической беременности.

3. Антитела к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону имеют высокую диагностическую значимость для привычного невынашивания беременности на ранних сроках и угрожающего выкидыша в I триместре. При этом диагностическая значимость антител к гормонам классов G и A для привычного невынашивания выше (AUC, соответственно, 0,801 и 0,774; 0,726 и 0,751), чем класса M (AUC 0,665 и 0,621), при наличии антител классов G и A отмечается высокий риск развития данной патологии у женщин (OR 15,7 и 12,1; 9,1 и 4,8). Антитела к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону классов G и M имеют высокую диагностическую значимость для угрожающего выкидыша в I триместре (AUC, соответственно, 0,793 и 0,734; 0,741 и 0,703).

4. Женщины с привычным невынашиванием беременности на ранних сроках характеризуются широким спектром антифосфолипидных антител, включающим антитела к аннексину A5, фосфатидилэтаноламину и комплексу фосфатидилсерин/протромбин, которые выявляются у 42% пациенток, серонегативных на антитела к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I. При этом повышенные уровни антифосфолипидных антител обнаруживаются в 4,6-9,5 раза чаще, чем у здоровых женщин. Антитела к β 2-гликопротеину-I и аннексину A5 класса G являются независимыми факторами риска привычного невынашивания беременности на ранних сроках и имеют высокую диагностическую значимость для данной патологии (AUC 0,710 и 0,746). Включение антител к аннексину A5 в комбинацию антител к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I повышает ее диагностическую значимость для привычного невынашивания (AUC 0,806).

5. Привычное невынашивание беременности на ранних сроках ассоциируется с высокоavidными антителами класса G к хорионическому гонадотропину человека с преобладанием иммуноглобулинов подклассов G1 и

G2. Высокоавидные антитела класса G к прогестерону выявляются при данной патологии реже, по частоте выявления преобладают антитела подкласса IgG1. Антитела к хорионическому гонадотропину человека представляют гетерогенную группу антител, которые взаимодействуют с цельной молекулой гормона, свободными α - и β -субъединицами и имеют разную эпитопную специфичность, включающую эпитопы β -субъединицы C109-119 и C109-145, ответственные за специфичность и биологическую активность гормона. При этом IgG-антитела, способные нейтрализовать биологическую активность гормона, выявляются только у 30% пациенток, позитивных на антитела к хорионическому гонадотропину, риск наличия данных антител повышается в 10,1 раза при уровне антител к гормону выше 48 Ед/мл.

6. У женщин с привычным невынашиванием беременности преобладают IgG-антитела подкласса G2 к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I с высоким и средним уровнем авидности и высокоавидные IgG-антитела к аннексину A5 четырех подклассов. У женщин, серопозитивных на антитела к β 2-гликопротеину-I, с высокой частотой выявляются IgG-антитела к домену I (в 43% случаев). Между уровнями данных IgG-антител наблюдается прямая корреляционная связь средней силы, при уровне IgG-антител к β 2-гликопротеину-I выше 17,6 Ед/мл вероятность наличия антител к домену I повышается в 41,3 раза.

7. У женщин с привычным невынашиванием беременности, серопозитивных на антифосфолипидные антитела и антитела к хорионическому гонадотропину человека, часто наблюдается активация системы комплемента по классическому пути, гипокомплементемия, выявляемая по снижению уровня компонентов комплемента C3 и C4 (у 68,3% женщин), повышенные уровни циркулирующих иммунных комплексов, связывающихся с C1q и C3d (в 43,1% случаев), и анти-C1q IgG-антител (в 18,8% случаев), вероятность образования анти-C1q антител у данных пациенток выше в 9,3 и 8,2 раза, соответственно, чем у здоровых женщин.

8. Образование антител к хорионическому гонадотропину человека у пациенток с привычным невынашиванием беременности ассоциируется с изменениями иммунного статуса, более высокими средними показателями

абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов CD19+ и кластера CD19+CD5+, чем у серонегативных пациенток, с повышенным относительным содержанием клеток кластера CD19+CD5+ по сравнению с референсным диапазоном, повышением уровня общих сывороточных иммуноглобулинов классов М и G (в 60% и 43,3% случаев, соответственно). Вероятность повышения относительного содержания клеток кластера CD19+CD5+ у серопозитивных пациенток в 14 раз выше, чем у серонегативных.

9. Антитела к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону у женщин с привычным невынашиванием имеют прогностическое значение для течения и исхода беременности. При высоком уровне антител (IgG, IgM) к хорионическому гонадотропину (выше 30 Ед/мл) вероятность развития угрожающего выкидыша в I триместре, плацентарной недостаточности и хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания повышается в 2,9-3,5 раза, тогда как при высоком уровне антител к прогестерону в 17,5 раза возрастает риск развития гипоплазии хориона в I триместре беременности. Вне беременности антитела к прогестерону у женщин с привычным невынашиванием ассоциируются с дисменореей и гипоплазией эндометрия, причем вероятность развития гипоплазии эндометрия при наличии данных антител повышается в 14,3 раза.

10. Выявленная взаимосвязь повышенного образования высокоавидных IgG-антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону, принадлежащих к функционально активным подклассам G1 и G2, с активацией системы комплемента, осложнениями и потерей беременности предполагает патогенетическое значение антител к гормонам при привычном невынашивании беременности, что расширяет представления об иммунных механизмах развития данной патологии.

11. Наиболее значимыми диагностическими маркерами привычного невынашивания беременности являются антитела класса G и A к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону, IgG-антитела к β 2-гликопротеину-I и аннексину A5. Определение авидности и подклассов IgG-антител, их эпитопной специфичности представляет дополнительную информацию о патогенетическом значении антител. Проведение комплексного

исследования серологических маркеров и показателей системы комплемента позволяет уточнить патогенез привычного невынашивания, оценить активность аутоиммунного процесса, прогнозировать течение и исход беременности.

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность и научно-исследовательскую работу лаборатории клинической иммунологии, 1-ого и 2-ого отделений акушерских патологий беременности и отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Получено Разрешение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития ФС № 2010/437 от 30 декабря 2010 года на применение новой медицинской технологии «Способ определения антител к хорионическому гонадотропину человека в сыворотке (плазме) крови методом иммуноферментного анализа».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону в сыворотке (плазме) крови показано женщинам с привычным невынашиванием беременности на ранних сроках и данными анамнеза об инфекционно-воспалительных заболеваниях органов малого таза, искусственном прерывании беременности, применении гормональных препаратов или гормональных контрацептивов, аллергических и аутоиммунных заболеваниях, частых инфекционных заболеваниях и носительстве возбудителей вирусных инфекций.

2. Антитела к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону рекомендуется исследовать у женщин с привычным невынашиванием на этапе планирования беременности, что позволяет провести предгестационную подготовку женщин в соответствии с клиническим протоколом [Сидельникова В.М., 2010]. Из-за высокого риска развития осложнений беременности серопозитивным женщинам во время беременности рекомендуется мониторинг уровня антител к гормонам (1 раз в месяц). Патогенетическое значение антител оценивается по уровню IgM- и IgG-антител (>30 Ед/мл), авидности IgG-антител (индекс авидности >70%), преобладанию функционально активных подклассов

IgG1 и IgG2, специфичности антител к эпитопу C109-145, ответственному за биологическую активность хорионического гонадотропина человека.

3. Для диагностики антифосфолипидного синдрома женщинам с привычным невынашиванием рекомендуется в период планирования или на ранних сроках беременности проводить определение антител (IgM, IgG) к кардиолипину, β 2-гликопротеину-I и волчаночного антикоагулянта с подтверждением положительного результата в повторном исследовании с интервалом времени не менее 12 недель. В случае отрицательных результатов данных тестов рекомендуется проводить дополнительное исследование антител (IgM, IgG) к аннексину А5, комплексу фосфатидилсерин/протромбин и фосфатидилэтаноламину. При положительном результате тестов на антифосфолипидные антитела проводится предгестационная подготовка женщин в соответствии с клиническим протоколом [Сидельникова В.М., 2010]. Патогенетическое значение антифосфолипидных антител оценивается по уровню IgM- и IgG-антител, авидности IgG-антител (индекс авидности $>70\%$), преобладанию антител подкласса IgG2 к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I, специфичности антител к домену I. Во время беременности выполняются повторные исследования для контроля эффективности проводимой терапии.

4. Для дополнительной оценки активности аутоиммунного процесса у женщин с антителами к хорионическому гонадотропину человека, прогестерону и антифосфолипидными антителами рекомендуется проводить исследование состояния системы комплемента по уровню компонентов комплемента C3 и C4, циркулирующих иммунных комплексов и анти-C1q антител, способных усиливать активацию комплемента. Комплексная диагностика позволяет уточнить патогенез привычного невынашивания беременности и активность аутоиммунного процесса, прогнозировать течение и исход беременности.

СПИСОК РАБОТ,

ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пономарева, И.В. Аутоантитела к хорионическому гонадотропину человека при привычном невынашивании беременности / И.В. Пономарева, Г.Т. Сухих, Э.Б. Никитин, П.А. Кирющенко, В.М.

Сидельникова, Л.В. Ванько // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1996. - № 4. - С. 450-452.

2. Кирющенко, П.А. Клинико-иммунологическое значение аутоантител к хорионическому гонадотропину при невынашивании беременности / П.А. Кирющенко, Г.Т. Сухих, Л.В. Ванько, И.В. Пономарева // Акушерство и гинекология. - 1996. - № 4. - С. 14-16.

3. Пономарева, И.В. Изучение спектра антител к мембранным фосфолипидам у женщин с привычным невынашиванием беременности / И.В. Пономарева, В.И. Куликов, Г.И. Музя, Л.В. Ванько, В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1997. - Том 123, № 3. - С. 312-315.

4. Пономарева, И.В. Иммуноферментный анализ для определения антител к основным классам клеточных фосфолипидов в сыворотке крови человека / И.В. Пономарева, Г.И. Музя, В.И. Куликов, Г.Т. Сухих // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 7. – С. 35-37.

5. Пономарева, И.В. Антифосфолипидные антитела при осложненном течении беременности / И.В. Пономарева, Ж.А. Городничева, Л.В. Ванько, С.И. Ходова, Л.Е. Мурашко // Акушерство и гинекология. - 2000. - № 2. - С. 12-15.

6. Менжинская, И.В. Расширенное обследование на антифосфолипидные антитела женщин с невынашиванием беременности / И.В. Менжинская, Т.Б. Ионанидзе, Н.К. Тетраушвили, Л.В. Ванько, А.А. Агаджанова, Г.Т. Сухих // Материалы Республиканской научной конференции «Иммунология репродукции», Иваново, 2005. – С. 274–275.

7. Гладкова, К.А. Сенсбилизация к прогестерону в клинике привычного невынашивания беременности первого триместра / К.А. Гладкова, И.В. Менжинская // Материалы VII Российского форума «Мать и дитя», Москва, 2005. – С. 48.

8. Гладкова, К.А. Роль сенсбилизации к прогестерону в клинике привычного невынашивания беременности / К.А. Гладкова, И.В. Менжинская, Г.Т. Сухих, В.М. Сидельникова // Проблемы репродукции.- 2007. - Т. 13. - № 6. - С. 95-98.

9. Менжинская, И.В. Антипрогестероновые антитела в клинике привычной потери беременности / И.В. Менжинская, К.А. Гладкова, В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих // Иммунология. - 2008. - № 1. - С. 34-37.

10. Menzhinskaya, I.V. Autoantibodies to progesterone in women with threatened and spontaneous abortion / I.V. Menzhinskaya, G.A. Mandrykina, R.I.

Ozerova, L.S. Rora, U.E. Dobrokhotova, G.T. Sukhikh // VIth European Congress of Reproductive Immunology (Book of abstracts), Moscow, 2008. – P. 56.

11. Менжинская, И.В. Антитела к прогестерону у женщин с привычным невынашиванием беременности / И.В. Менжинская, К.А. Гладкова, В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих // Материалы XIII международного конгресса по реабилитации в медицине и иммунореабилитации, Дубай, ОАЭ, 2008. – Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9. – № 1. – С. 86.

12. Кирющенко, П.А. Значение патологии матки и особенности предгестационной подготовки женщин с синдромом привычной потери беременности ранних сроков / П.А. Кирющенко, Д.М. Белоусов, В.Н. Верясов, **И.В. Менжинская**, М.С. Алексеева // Акушерство и гинекология. - 2009. - № 5. - С. 15-19.

13. Мандрыкина, Ж.А. Частота антител к прогестерону при спорадическом самопроизвольном выкидыше / Ж.А. Мандрыкина, **И.В. Менжинская**, Р.И. Озерова, Л.С. Рора, Ю.Э. Доброхотова // Акушерство и гинекология. - 2009. - № 5. - С. 20-21.

14. Мандрыкина, Ж.А. Аутосенсбилизация к гормонам при невынашивании беременности / Ж.А. Мандрыкина, **И.В. Менжинская**, Р.И. Озерова, Л.С. Рора, Ю.Э. Доброхотова, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. - 2009. - № 6. - С. 14-16.

15. Менжинская, И.В. Подклассы IgG и авидность аутоантител к хорионическому гонадотропину человека у женщин с нарушениями репродуктивной функции / И.В. Менжинская // Труды межрегионального форума «Актуальные вопросы иммунологии и аллергологии – междисциплинарные проблемы» 27-30 сентября 2010 г., Санкт-Петербург / Российский аллергологический журнал. – 2010. – № 5, вып. 1. – С. 184–185.

16. Менжинская, И.В. Соотношение аутоантител к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам у женщин с нарушениями репродуктивной функции / И.В. Менжинская, О.С. Безнощенко, Л.В. Ванько // Материалы 4-ой Всероссийской конференции «Иммунология репродукции», Пермь, 2010 / Российский иммунологический журнал. – 2010. – Т. 4 (13), № 4. – С. 406.

17. Ионанидзе, Т.Б. Роль аутоантител к кофакторам антифосфолипидного синдрома в ведении пациенток с репродуктивными потерями / Т.Б. Ионанидзе, А.А. Агаджанова, **И.В. Менжинская** // IV Международная конференция по репродуктивной медицине, Москва, 2010 / Проблемы репродукции. – 2010. – Спец. выпуск. – С. 74–75.

18. Менжинская, И.В. Клиническое значение аутоантител к гонадотропным гормонам при нарушениях репродуктивной функции у женщин / И.В. Менжинская, О.С. Безнощенко, П.А. Кирющенко, Л.В. Ванько // Акушерство и гинекология. - 2011. - № 1. - С. 47-51.

19. Менжинская, И.В. Распределение по подклассам IgG и патогенетическая активность аутоантител к хорионическому гонадотропину человека при нарушениях репродуктивной функции у женщин / И.В. Менжинская // Акушерство и гинекология. - 2011. - № 3. – С. 32-36.

20. Менжинская, И.В. Антитела к гормонам репродуктивной системы как возможный фактор риска неблагоприятного исхода в циклах экстракорпорального оплодотворения / И.В. Менжинская, О.С. Безнощенко, Т.Т. Сароян, И.Е. Корнеева, Л.В. Ванько, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. - 2012. - № 2. - С. 41-45.

21. Менжинская, И.В. Ассоциация антител к гонадотропин-рилизинг гормону с нарушениями репродуктивной функции человека / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько, П.А. Кирющенко, Г.В. Тер–Аванесов, Ю.А. Гаврилов, Г.Т. Сухих // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Том 155, № 6. - С. 675-678.

22. Менжинская, И.В. Исследование спектра антител к репродуктивным гормонам при угрозе прерывания беременности на ранних сроках / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько, П.А. Кирющенко, М.А. Тамбовцева, М.М. Кашенцева, Г.Т. Сухих // Материалы XIV Всероссийского научного форума «Мать и Дитя», Москва, 2013. – С. 129–130.

23. Менжинская, И.В. Спектр антител к репродуктивным гормонам при угрозе прерывания беременности / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько, П.А. Кирющенко, М.А. Тамбовцева, М.М. Кашенцева, Г.Т. Сухих // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. - Т. 157, № 6. – С. 717-721.

24. Menzhinskaya, I.V. Autoimmune markers in the first trimester threatened abortion / I.V. Menzhinskaya, L.V. Vanko, P.A. Kiruschenkov, M.A. Tambovtseva, M.M. Kashentseva, G.T. Sukhikh. // 9th International Congress on Autoimmunity, Nice, France, March 26–30, 2014. – P. 836.

25. Менжинская, И.В. Иммунохимические свойства аутоантител к хорионическому гонадотропину у женщин с невынашиванием беременности / И.В. Менжинская, М.М. Кашенцева, Л.В. Ванько, Г.Т. Сухих // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 1. – С. 30-35.

26. Ванян, Р.Э. Спектр аутоантител к гормонам и фосфолипидам у пациенток с «бедным» овариальным ответом в программе экстракорпорального оплодотворения / Р.Э. Ванян, И.В. Менжинская, Л.В. Ванько, Н.В. Долгушина, Е.А. Калинина // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 3. – С. 167-172.

27. Менжинская, И.В. Аутоантитела к гормонам и фосфолипидам у беременных женщин с системной красной волчанкой / И.В. Менжинская, Е.В. Федорова, Л.В. Ванько, М.М. Кашенцева, Н.М. Кошелева, Н.И. Клименченко, Г.Т. Сухих // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 4. – С. 237-242.

28. Dolgushina, N.V. The role of genetic and autoimmune factors in poor ovarian response in IVF programs / N.V. Dolgushina, R. E. Vanyan, M. V. Kuznetsova, I.V. Menzhinskaya, V.V. Kazakova, E.A. Kalinina // Gynecological Endocrinology. - 2015. - Vol. 31, Supplement 1. - P. 65-68.

29. Менжинская, И.В. Распространенность аутоантител к C1q-компоненту комплемента у женщин с невынашиванием беременности и аутоантителами к фосфолипидам и хорионическому гонадотропину / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько, М.М. Кашенцева, П.А. Кирющенков, Г.Т. Сухих // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. - Т. 160, № 8. – С. 228-232.

30. Менжинская, И.В. Распространенность антифосфолипидных антител у женщин с привычным невынашиванием беременности и их диагностическое значение / И.В. Менжинская, М.М. Кашенцева, Л.В. Ванько, Г.Т. Сухих // Российский иммунологический журнал. - 2015. – Т. 9 (18), № 1 (1). – С.134-136.

31. Menzhinskaya, I.V. Prevalence of antiphospholipid antibodies other than antibodies to cardiolipin and β 2-glycoprotein-I in women with recurrent pregnancy loss and their diagnostic value / I.V. Menzhinskaya, L.V. Vanko, L.V. Krechetova, М.М. Kashentseva, G.T. Sukhikh // Final program and abstract book. 14th International Symposium for Immunology of Reproduction. «Progress in reproductive immunology». May 22–24, 2015, Varna, Bulgaria. – P. 27–28.

32. 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.

33. Менжинская, И.В. Распространенность и диагностическое значение антифосфолипидных антител у женщин с привычной потерей беременности / И.В. Менжинская, Т.Б. Ионанидзе, Л.В. Ванько // Тезисы докладов

конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания, Москва, 8–10 декабря 2016 г. - Научно-практическая ревматология. – 2016. – № 54, приложение 3. – С. 39.

34. Менжинская, И.В. Ассоциация антител к гонадотропинам и женским половым гормонам с нарушениями репродуктивной функции / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Акушерство и гинекология. – 2017. - № 9. – С. 20-27.

35. Менжинская, И.В. Характеристика аутоантител к прогестерону у женщин с ранней потерей беременности / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Российский аллергологический журнал. – 2017. - № 1. – С. 90-93.

36. Менжинская, И.В. Состояние системы комплемента у женщин с невынашиванием беременности и аутоантителами к фосфолипидам и хорионическому гонадотропину / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Материалы XVIII Всероссийского научно-образовательный форума «Мать и Дитя», Москва, 27-29 сентября 2017 г. – С. 49–50.

37. Менжинская, И.В. Патологические механизмы развития акушерского антифосфолипидного синдрома / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Акушерство и гинекология. – 2018. - № 1. – С. 5-12.

38. Менжинская, И.В. Активация комплемента у женщин с ранней потерей беременности и аутоантителами к фосфолипидам и хорионическому гонадотропину / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Российский аллергологический журнал. – 2018. – Том 15, № 1 (Часть 2). - С. 58-60.

39. Menzhinskaya, I.V. Association of anti-progesterone antibodies with early pregnancy loss in women / I.V. Menzhinskaya, A.S. Arefieva, L.V. Krechetova, L.V. Vanko // 15th International Symposium for Immunology of Reproduction (Abstract book), June 15–17, 2018, Varna Bulgaria. – P. 49.

40. Менжинская, И.В. Антифосфолипидные антитела как диагностические маркеры акушерского антифосфолипидного синдрома / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Акушерство и гинекология. – 2019. - № 2. – С. 5-12.

41. Менжинская, И.В. Диагностическое и прогностическое значение антител к хорионическому гонадотропину человека при патологии беременности / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Российский аллергологический журнал. – 2019. – Том 16, № 1 (Часть 2). - С. 94-97.

42. Способ определения антифосфолипидных антител: патент № 2128343 Российская Федерация: МПК G01N 33/544 (1995.01) / Пономарева И.В., Музя

Г.И., Куликов В.И., Сухих Г.Т.; заявитель и патентообладатель: Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН (RU). - № 95106943/14; заявл. 03.05.1995; опубл. 27.03.1999, Бюл. № 9.

43. Способ определения аутоантител к прогестерону в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа: патент №2567724 Российская Федерация: МПК51 G01N 33/48 (2006.01) / Менжинская И.В., Ванько Л.В., Gladkova K.A., Кречетова Л.В., Сухих Г.Т.; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НЦ АГиП им. академика В.И.Кулакова» (RU). – №2014153342/15; заявл. 29.12.2014; опубл. 10.11.2015, Бюл. № 31. – 11с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

β2-ГП-I – β2-гликопротеин-I

Ан А5 – аннексин А5

аПГ – антитела к прогестерону

аФЛ – антифосфолипидные антитела

АФС – антифосфолипидный синдром

аХГЧ – антитела к хорионическому гонадотропину человека

БДА – белок-диссоциирующий агент

ВА – волчаночный антикоагулянт

Гем – гемоцианин

ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови

ИА – индекс avidности

КВ – коэффициент вариации

КЛ – кардиолипид

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МКАТ – моноклональные антитела

ОП – оптическая плотность

ПВ – привычный выкидыш

ПГ – прогестерон

ПНБ – привычное невынашивание беременности

ПТ – протромбин

ФС – фосфатидилсерин

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ФС/ПТ – комплекс фосфатидилсерин/протромбин

ФЭ – фосфатидилэтанолламин

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ХЛИА – хемилюминесцентный иммуноанализ

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы