МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Ванько Людмила Викторовна

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……6

ГЛАВА 1. АУТОИММУНИТЕТ И НАРУШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЖЕНЩИН (литературный обзор)……18

1.1 Иммуногенетические аспекты аутоиммунитета…….....20

1.2 Механизмы генерации аутоантигенов и индукции аутоиммунитета…….……30

1.3 Женские половые гормоны и аутоиммунитет……..43

1.4 Антифосфолипидные антитела у женщин с репродуктивными потерями……..……...46

1.4.1 Основные антигенные мишени антифосфолипидных антител….....50

1.4.2 Антифосфолипидные антитела – лабораторные критерии антифосфолипидного синдрома…….……..……58

1.4.3. Антифосфолипидные антитела – перспективные диагностические маркеры антифосфолипидного синдрома.……..63

1.5 Патогенетические механизмы опосредованного антифосфолипидными антителами тромбоза……..…...80

1.5.1 Индуцированная антифосфолипидными антителами активация тромбоцитов, эндотелиальных клеток и моноцитов…….....82

1.5.2 Влияние антифосфолипидных антител на каскад коагуляции и фибринолитическую систему…….……..85

1.5.3 Активация системы комплемента в развитии опосредованного антифосфолипидными антителами тромбоза…….....88

1.6 Патофизиологические механизмы опосредованной антифосфолипидными антителами потери беременности…….……...91

1.6.1 Влияние антифосфолипидных антител на формирование и развитие плаценты……92

1.6.2 Значение системы комплемента в патогенезе индуцированной антифосфолипидными антителами потери беременности……98

1.7 Антитела к хорионическому гонадотропину у женщин с нарушениями репродуктивной функции и репродуктивными потерями……..……102
1.7.1 Молекулярная и антигенная структура хорионического гонадотропина человека…….....103
1.7.2 Биологические функции хорионического гонадотропина человека во время и вне беременности……..…..106
1.7.3 Индуцированное и спонтанное образование антител к хорионическому гонадотропину человека……..……...112
1.8. Антитела к гипофизарным гонадотропинам у женщин с нарушениями репродуктивной функции….……..116
1.9. Гормональная аллергия и аутоиммунитет к половым стероидным гормонам……...121
1.9.1. Биологическая роль прогестерона в организме женщины……122
1.9.2.Гиперчувствительность и аутоантитела к прогестерону у женщин с предменструальным синдромом и невынашиванием беременности…….……...125
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ……130
2.1 Объем и материал исследования……..130
2.2 Стандартные методы исследования……133
2.3 Специальные методы исследования……134
2.3.1 Определение антифосфолипидных антител с использованием иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга и хемилюминесцентного иммуноанализа ……135
2.3.2. Определение антител к хорионическому гонадотропину человека, свободным α- и β-субъединицам, эпитопам β-субъединицы методом иммуноферментного анализа……..……..……....139
2.3.3 Определение антител разных классов к прогестерону методом иммуноферментного анализа…….....143
2.3.4 Определение IgG-антител разных подклассов к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам……144

2.3.5 Способы определения авидности антифосфолипидных антител и антител к гормонам ……..……145
2.3.6 Использование методов хроматографии для выделения аффинно очищенных антител к хорионическому гонадотропину человека и фракции IgG из сыворотки крови женщин……..147
2.3.7 Исследование взаимодействия антител с хорионическим гонадотропином человека с помощью автоматизированного оптического биосенсора ProteON XPR36……..…….150
2.3.8 Оценка состояния системы комплемента у женщин с помощью иммуноферментного анализа.....……..151
2.3.9 Исследование иммунного статуса женщин с применением метода проточной цитофлуориметрии ……....154
2.4 Методы статистического анализа данных……..155
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.……157
3.1 Модификации иммуноферментного анализа для определения антител к гормонам в сыворотке (плазме) крови человека……..157
3.1.1 Модификации ИФА для определения антител разных изотипов к хорионическому гонадотропину человека, свободным α- и β- субъединицам и пептидным последовательностям β-субъединицы гормона……...158
3.1.2 Модификации ИФА для определения антител разных изотипов к прогестерону с использованием конъюгатов прогестерона с БСА и гемоцианином……166
3.2 Физико-химические и иммунохимические свойства, распространенность и диагностическое значение антител к гормонам и антифосфолипидных антител при привычном невынашивании беременности у женщин……176
3.2.1 Распространенность антител к хорионическому гонадотропину человека разных изотипов, авидность и диагностическое значение…..……....176
3.2.2 Характеристика свойств, распространенность и диагностическое значение антител к прогестерону…….....……...188

3.2.3 Профиль и диагностическое значение антифосфолипидных антител у женщин с привычным невынашиванием на ранних сроках…….....197
3.2.4 Спектр и диагностическое значение антител к гормонам и антифосфолипидных антител при угрожающем выкидыше на раннем сроке……..……211
3.3 Исследование специфичности антител к хорионическому гонадотропину и прогестерону у женщин с привычным невынашиванием беременности……..218
3.3.1 Специфичность антител к хорионическому гонадотропину человека и эпитопам β-субъединицы гормона……219
3.3.2 Исследование специфичности антител к прогестерону и перекрестной реактивности с половыми стероидными гормонами…….....229
3.4 Состояние системы комплемента у женщин с антителами к гормонам и антифосфолипидными антителами.……..…….....233
3.5 Особенности иммунного статуса у женщин с привычным невынашиванием беременности, серопозитивных на антитела к хорионическому гонадотропину человека……..…….……237
3.6 Взаимосвязь антител к гормонам с акушерской и гинекологической патологией у женщин с привычным невынашиванием беременности..……241
3.6.1. Особенности клинико-анамнестических данных, течения и исхода беременности у пациенток с антителами к хорионическому гонадотропину человека и их прогностическое значение……..……...242
3.6.2 Ассоциация антител к прогестерону с гинекологическими и экстрагенитальными заболеваниями, осложнениями и исходами беременности.....250
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ……259
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……..……...300
ВЫВОДЫ …….……..303
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ…….....307
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ……..309
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…………...315

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Согласно современным представлениям в организме человека вырабатываются естественные, иммунные и аутоиммунные антитела. В отличие от иммунных антител естественные антитела образуются при отсутствии антигенной стимуляции, принимают участие в формировании нормального иммунного ответа и в регуляции процессов, обеспечивающих гомеостаз в органах и системах организма [172, 381]. При нарушении механизмов аутотолерантности вырабатываются антитела к собственным антигенам с соблюдением общих закономерностей гуморального иммунного ответа. Аутоантитела могут участвовать в патогенезе органоспецифических и системных аутоиммунных заболеваний (АИЗ), служить предвестниками болезни и иметь важное диагностическое и прогностическое значение [415, 537].

Аутоиммунные заболевания наиболее широко распространены среди женщин репродуктивного возраста, что обусловлено иммуностимулирующим действием женских половых гормонов, преобладанием у женщин Th2 ответа, вкладом генов Х хромосом в иммунный ответ [551, 433]. Взаимоотношения между аутоиммунитетом и репродукцией представляют большой научный и практический интерес и активно исследуются уже более трех десятилетий. Аутоиммунитет может оказывать влияние на все стадии репродуктивного процесса, включая оогенез, имплантацию и беременность [149], однако механизмы этого влияния остаются недостаточно выясненными.

При нарушениях репродуктивной функции определяются органоспецифические (антиовариальные, антитрофобластические) и органонеспецифические (антифосфолипидные, антинуклеарные и другие) аутоантитела [125, 149]. Аутоантитела ассоциируются с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), преждевременной недостаточностью яичников (ПНЯ), эндометриозом, неудачами в циклах экстракорпорального оплодотворения

(ЭКО) и могут быть ответственными за развитие спонтанных абортов и преэклампсии [154, 153, 288].

Аутоиммунные нарушения наблюдаются у 20% женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ), которым страдают 2-5% женщин репродуктивного возраста [256, 383]. Антифосфодипидные антитела (аФЛ) являются одним из наиболее частых аутоиммунных этиологических факторов ПНБ [5, 23]. С аФЛ ассоциируются от 7 до 25% случаев необъяснимого привычного выкидыша (ПВ) [419]. Наличие волчаночного антикоагулянта (ВА), антител (IgM, IgG) к кардиолипину (КЛ) и β2-гликопротеину-I (β2-ГП-I) относят к лабораторным классификационным критериям антифосфолипидного синдрома (АФС) [192]. Однако определение спектра антител к фосфолипидам, фосфолипид-связывающим протеинам и их комплексам повышает эффективность диагностики АФС у серонегативных пациентов [226]. Поэтому в настоящее время продолжается поиск новых высокоэффективных диагностических маркеров АФС [28, 248, 409].

В научной литературе имеются сообщения о повышенном образовании антител к гонадотропным и половым стероидным гормонам у женщин с нарушениями репродуктивной функции. Антитела к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) ассоциируются с эндометриозом, СПКЯ и бедным ответом яичников на стимуляцию гонадотропинами [288]. Предполагается, что большая часть антиовариальных аутоантител (АОА) специфична к β-субъединице ФСГ. Имеются единичные противоречивые сообщения о выявлении антител к хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ) при невынашивании беременности [37, 329], бесплодии и неудачах в программах ЭКО [346]. Гиперчувствительность к прогестерону (ПГ) и эстрадиолу выявлена с помощью кожных тестов у женщин с предменструальным синдромом (ПМС) [483] и ПНБ [471, 504, 509]. Принимая во внимание важность биологических функций хорионического гонадотропина и прогестерона в период становления и развития беременности, большое научное и практическое значение имеет исследование роли антител к этим гормонам в развитии осложнений и потери беременности у женщин с ПНБ.

Степень разработанности темы исследования

Аутоантитела разной специфичности часто обнаруживаются у женщин с ПНБ. Однако только аФЛ четко ассоциируются с привычным невынашиванием как у пациенток с АИЗ, так и в генеральной популяции. Мишенями аФЛ могут быть анионные и нейтральные фосфолипиды, фосфолипид-связывающие протеины плазмы и их комплексы с фосфолипидами, а также компоненты комплемента, факторы свертывания крови. В качестве перспективных диагностических маркеров АФС рассматриваются IgA-антитела к β2-ГП-I, антитела к домену I β2-ГП-I, фосфатидилэтаноламину (ФЭ), фосфатидилсерину (ФС), протромбину (ПТ), комплексу фосфатидилсерин/протромбин (ФС/ПТ) и аннексину А5 (Ан А5). Однако из-за противоречивых данных научной литературы необходимы дальнейшие исследования для подтверждения клинико-диагностического значения этих антител при акушерской патологии. Нет единого мнения о патогенетическом значении данных антител при акушерском АФС. Для практического применения тестов требуется проведение их стандартизации.

Описаны отдельные случаи повышенного образования антител к ХГЧ, индуцированного введением гомо- или гетерологичных препаратов гормона, иммунизацией контрацептивной вакциной, созданной на основе его β-субъединицы [543], а также случай спонтанной продукции антител к гормону у женщины с невынашиванием беременности [329]. Показана способность антител к ХГЧ у женщины с бесплодием и невынашиванием беременности нейтрализовать биологическую активность гормона в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [346]. В связи с этим, антитела к ХГЧ рассматриваются как возможная причина самопроизвольной потери беременности и неудач в программах ЭКО. Образование поликлональных аутоантител к стероидным гормонам, включая прогестерон, продемонстрировано с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) у женщин с ПМС [483]. Однако из-за отсутствия объективных методов определения антител к гормонам остаются неисследованными распространенность, иммунохимические свойства, клинико-диагностическое 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 ПНБ 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, направленной на совершенствование диагностики и расширение знаний об иммунных механизмах, участвующих в патогенезе ПНБ 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, пептидным 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, авидности 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 диссеменированного 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, β2-гликопротеину-I и ВА антитела к аннексину А5, комплексу фосфатидилсерин/протромбин и фосфатидилэтаноламину, по авидности, подклассам IgG и эпитопной специфичности. Выявлена ассоциация привычного невынашивания беременности с IgG-антителами к кардиолипину и

β2-гликопротеину-I подкласса G2 с высоким и средним уровнем авидности и высокоавидными IgG-антителами к аннексину А5, повышенная вероятность наличия антител к домену I при средних и высоких уровнях IgG-антител к β2-гликопротеину-I. Установлено, что IgG-антитела к β2-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, пептидным последовательностям 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 β2-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 авидности антител, подклассов IgG и специфичности к домену I β2-гликопротеину-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.

Положения, выносимые на защиту

1. Привычное невынашивание беременности у женщин ассоциируется с повышенным образованием поликлональных антител к хорионическому гонадотропину человека и прогестерону классов M, G и A, 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 β2-гликопротеину-I антитела к аннексину А5, фосфатидилэтаноламину и комплексу фосфатидилсерин/протромбин, определение которых повышает эффективность диагностики антифосфолипидного синдрома. IgG-антитела к β2-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 антител к β2-гликопротеину-I имеется повышенная вероятность наличия антител к домену I. Привычное невынашивание ассоциируется с антителами к кардиолипину и β2-гликопротеину-I подкласса IgG2 со средним и высоким уровнем авидности и высокоавидными IgG-антителами к аннексину A5.

3. У женщин с привычным невынашиванием беременности при повышенном образовании антифосфолипидных антител и антител к хорионическому гонадотропину часто определяется гипокомплементемия, проявляющаяся снижением содержания компонентов комплемента C3 и C4, 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.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения и результаты диссертации соответствуют формуле и области исследований специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология. Диссертационная работа посвящена созданию новых методов диагностики, изучению аутоиммунных и иммунопатологических процессов, лежащих в основе потери беременности, патогенетических аспектов привычного невынашивания беременности, охватывающего значительную часть популяции.

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.

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 2016 (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), Национальной конференции «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (Москва, 2019).

Внедрение и использование результатов исследования

Работа проводилась в рамках:

1. НИР 2005-2007 гг. «Разработка комплекса иммунологических и молекулярно-биологических методов для диагностики и изучения генеза репродуктивной патологии». Фрагмент «Оценка клинической значимости новых методов диагностики антифосфолипидного синдрома и других аутоиммунных нарушений для акушерско-гинекологической практики и перинатологии»;

3. НИР 2008-2010 гг. «Разработка комплекса высокотехнологичных иммунологических и молекулярно-биологических методов диагностики и лечения репродуктивной патологии». Фрагмент «Изучение клинико-диагностической значимости новых методов диагностики аутоиммунных нарушений при акушерско-гинекологической патологии»;

4. НИР 2011-2014 гг. «Изучение молекулярно-биологических и клеточно-иммунологических предикторов формирования патологии гестационного процесса». Фрагмент «Роль аллоиммуных и аутоиммунных механизмов при физиологическом протекании беременности и привычном невынашивании»;

5. НИР 2015-2017гг. «Изучение диагностической и прогностической роли молекулярно-генетических, иммунологических, митохондриальных факторов в преждевременных родах и невынашивании беременности». Фрагмент 2 «Создание проекта тест-системы прогнозирования и диагностики невынашивания беременности».

По теме диссертации опубликовано 43 печатных работы, 27 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

По теме диссертации получены:

1. 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.

2.Способ определения аутоантител к прогестерону в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа: патент №2567724 Российская Федерация: МПК51 G01N 33/48 (2006.01) / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько, К.А. Гладкова, Л.В. Кречетова, Г.Т. Сухих; 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.

2. 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».

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

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Диссертация изложена на 376 страницах компьютерного текста, содержит 46 таблиц и 46 рисунков.

Библиография содержит 606 источника (26 на русском, 580 на английском языках).

ГЛАВА 1. АУТОИММУНИТЕТ И НАРУШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЖЕНЩИН (литературный обзор)

Аутоиммунитет – реагирование иммунной системой на собственные антигены организма, распознаваемые как чужеродные, путем выработки аутоантител и цитотоксических Т-лимфоцитов. В результате этих процессов могут развиваться аутоиммунные заболевания (АИЗ), для которых характерен чрезмерный иммунный ответ к собственным антигенам, приводящий к нарушению функции и повреждению специфического органа или нескольких органов и тканей. Этиология АИЗ еще до конца не выяснена, однако имеются доказательства, указывающие на роль взаимодействия генетических факторов, факторов окружающей среды и образа жизни человека в развитии заболевания [530]. Аутоиммунные заболевания обычно более высоко распространены у женщин, чем у мужчин. Самое высокое соотношение между женщинами и мужчинами среди больных отмечается при системной красной волчанке (СКВ), синдроме Шегрена, аутоиммунном тиреоидите (АИТ) и склеродермии и достигает 7:1-10:1 [500]. Обычно у женщин наблюдается более сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ, чем у мужчин. Различия в функционировании иммунной системы у женщин и мужчин определяются, прежде всего, наличием у женщин двух Х-хромосом и действием женских половых гормонов.

У здоровых людей наблюдается естественная иммунологическая толерантность к собственным антигенам органов и тканей организма, которая формируется в процессе эмбрионального развития. При этом в здоровом организме найден широкий репертуар циркулирующих естественных антител, включающий антитела, способные взаимодействовать с собственными антигенами, или аутоантитела. Аутотолерантность может нарушаться в результате воспалительного процесса, воздействия химических веществ и радиации, вакцинации, молекулярной мимикрии между белками патогенных микробов и человека, редактирования рецепторов, при определенном

генетическом фоне, предрасполагающем к развитию дисфункции иммунной системы и возникновению АИЗ [530].

Определение сывороточных аутоантител используется для диагностики и классификации АИЗ уже более трех десятилетий. Аутоантитела имеют патогенетическое, диагностическое и прогностическое значение и являются маркерами активности заболевания [391]. Со специфичностью аутоантител ассоциируются характер, стадия и тяжесть болезни. Аутоантитела часто обнаруживаются еще на доклинической стадии АИЗ и имеют высокое позитивное предиктивное значение [147, 262, 552]. По типу, уровню и числу присутствующих аутоантител может быть спрогнозировано развитие конкретного АИЗ и его тяжесть у асимптоматических индивидуумов.

Повышенная продукция аутоантител часто ассоциируется у женщин с такими заболеваниями, как необъяснимое бесплодие, эндометриоз, преждевременная недостаточность яичников, синдром поликистозных яичников, которые сопровождаются нарушением репродуктивной функции, а также с повторными неудачами в программах ЭКО [288]. В настоящее время аутоиммунные нарушения относятся к ведущим причинам привычного невынашивания беременности, а антифосфолипидные антитела, направленные к фосфолипидам, фосфолипид-связывающим протеинам и их комплексам, рассматриваются как наиболее частый аутоиммунный этиологический фактор ПНБ [419]. При этом среди патогенетических механизмов потери беременности, опосредованных аФЛ, важное место сегодня отводится не только тромбозу, но и функциональным нарушениям в плацентарной ткани. Сообщается также о повышенной продукции аутоантител к основным гормонам репродуктивной системы (ФСГ, ЛГ и ХГЧ), гиперчувствительности к стероидным гормонам у женщин с нарушениями репродуктивной функции и ПНБ, о способности аутоантител нейтрализовать биологическую активность гормонов в биоанализах *in vivo* и *in vitro* [346, 471, 504].

1.1 Иммуногенетические аспекты аутоиммунитета

В патогенез АИЗ вовлекаются как иммунологические, так и генетические факторы, взаимодействующие посредством сложных механизмов, что подтверждается индивидуальной предрасположенностью пациентов к развитию АИЗ, сходством АИЗ у близнецов и членов семьи первой степени родства (семейный аутоиммунитет) [547]. АИЗ человека, такие как СКВ и ревматоидный артрит (РА), являются комплексными заболеваниями, возникающими в результате взаимодействия между полигенными факторами риска и факторами окружающей среды [530]. Эпигенетические механизмы регулируют многочисленные специфические гены, предрасполагающие к АИЗ [550].

Строгая ассоциация наблюдается между АИЗ и генами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), который известен как система лейкоцитарных антигенов человека (HLA) [282]. Гены HLA характеризуются высоким полиморфизмом и кодируют большинство ассоциированных с иммунной системой протеинов, главной функцией которых является презентация антигенов иммунным клеткам. Например, продукты генов HLA класса I (HLA-A, B и C) являются ответственными за представление эндогенных пептидов, в том числе продуктов внутриклеточных инфекций. Молекулы, закодированные генами HLA класса II, представляют экзогенные пептиды, включая бактериальные антигены, прошедшие антигенный процессинг. Гены HLA класса III кодируют иммунные регуляторные молекулы, такие как фактор некроза опухоли (TNF), компонент комплемента C4 и белки теплового шока [298]. Гены HLA являются важными для надлежащего осуществления иммунного ответа на патоген и регулируют продукцию специфических аутоантител.

Молекулы HLA класса II (HLADR, HLADQ и HLADP) экспрессируются исключительно на иммунокомпетентных или антигенпрезентирующих клетках (АПК), например, макрофагах, и представляют пептиды хелперным Т-лимфоцитам [298]. Локус HLA-DRB1 является наиболее полиморфным в

пределах области HLA-II. Аллели локуса DRB1, по-видимому, определяют образование специфических аутоантител. Полиморфизм локуса может приводить к нарушению ответа на неопасные стимулы или специфические инфекции, содействуя развитию АИЗ.

Генетические факторы, участвующие в формировании иммунного ответа, могут обусловливать нарушение иммунологической толерантности. Гены влияют на процессинг и презентацию антигена, пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов, кодируют иммуноглобулины, антигенраспознающие рецепторы Т-лимфоцитов, а также молекулы, контролирующие деструкцию антигенов [270]. Сейчас понятно, что развитие АИЗ определяется наличием генетической предрасположенности или защиты.

Системная красная волчанка является примером системного АИЗ **с выраженной генетической предрасположенностью.** Генетический анализ однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) выявил в области ГКГ многочисленные независимые локусы, ассоциированные с СКВ [206]. По данным мета-анализа 2015 года, группы аллелей DR3, DR9, DR15 являются факторами риска развития СКВ, тогда как аллели DR4 и DR11, по-видимому, оказывают протективный эффект в отношении волчаночного нефрита [412].

К настоящему времени полногеномное исследование идентифицировало более 50 устойчивых локусов, ассоциированных с предрасположенностью к СКВ [205]. Гены вне области ГКГ, связанные с риском развития СКВ, были сгруппированы в 3 группы: полиморфные гены, участвующие в путях активации интерферонов I типа (TLR7, TLR8, TLR9, IRF3, IRF5, IRF7, Tyk2, STAT4 и другие); гены, вовлеченные в пути активации Т-клеточной (PTPN22, OX40L, PDCD1) и В-клеточной (BANK1, BLK и LYN) сигнальных систем; гены, участвующие в механизмах процессинга иммунных комплексов, удаления некротического и апоптотического материала, включая гены, кодирующие белки комплемента (C1qrs, C2 и C4), полиморфные варианты FcγIIB и FcγIIIB, вариант rs1205 С-реактивного протеина и вариант R77H интегрина альфа М (ITGAM) [536].

Результаты полногеномного поиска ассоциаций показали, что локусы предрасположенности к СКВ (STAT4, IRF5, ITGAM, BANK1, KIAA1542, UBE2L3) и ГКГ ассоциируются с образованием антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК) при СКВ [222]. Кроме того, выявлены ассоциации других генов с наиболее значимыми при СКВ аутоантителами в разных этнических популяциях [270].

В соответствии с новым взгядом на патогенез СКВ и созданием моногенных моделей возникновения СКВ, в настоящее время установлены дефекты генов и хромосом и сопряженные с ними патогенетические механизмы, приводящие к развитию заболевания, среди которых: поломка центральной толерантности в тимусе (делеция в хромосоме 22q11.2, AIRE), потеря периферической толерантности вследствие нарушения числа и функции Treg лимфоцитов (FOXP3, CD25, CTLA4, LRBA), гиперактивация лимфоцитов (PI3K, PLCγ2, PRKCD), нарушение функции В-лимфоцитов и продукции BCR (AICDA, TNFRSF13B, DOCK8), лимфопения (RAG1, RAG2, DCLRE1C, BAFF), повышенный профиль интерферонов I типа (TREX1, STAT1, STAT3), дефекты апоптоза (FASL или CASP10), нарушение удаления клеточного дебриса (COPA, TPP2), дефекты ранних компонентов комплемента (локусы C1q, C1r/s, C2 и C4) [536].

Важное **значение генетических факторов в развитии АФС** демонстрируется в исследованиях на животных моделях и подтверждается семейной распространенностью АФС, а также ассоциациями аФЛ, главным образом, с различными аллелями HLA [269]. Некоторые аллели HLA несут риск продукции аФЛ независимо от клинических особенностей, как при первичном АФС (ПАФС), так и при вторичном АФС на фоне СКВ. Очевидно, что аллели HLA определяют только предрасположенность к продукции аФЛ, которые являются ответственными за клинические проявления АФС.

Популяционные исследования предполагают, что значимыми локусами, предрасполагающими к развитию ПАФС являются DRB1*04 (DR4), DRB1*07 (DR7), DRw53, DQA1*0102, DQA1*0301/2, DQB1*0301/4, DQB1*0604/5/6/7/9

[295]. Первичный АФС имеет генетические отличия от СКВ, так аллель DR3 класса II, который является самым важным при СКВ, менее значим при ПАФС, ассоциированном с аллелями DR4, DR7 и DRw53. Очевидно, СКВ ассоциируется с DR4, DR7, DRw53 и DQB1*0302 только при наличии вторичного АФС и антител к кардиолипину.

У пациентов европейского происхождения аКЛ при СКВ позитивно ассоциируются с HLA-DRB1*04, -DRB1*07, -DQA1*0201, -DQA1*0301, -DQB1*0302, -DRB3*0301, а антитела к β2-гликопротеину-I имеют позитивную ассоциацию с DQB1*0302 [295]. Аллель DRB1*0402 ассоциируется с высоким риском образования антител как к КЛ, так и к β2-ГП-I. При этом 75% пациентов, несущих аллель DRB1*0402, являются позитивными на аКЛ.

Найденная ассоциация между антителами к протромбину и гаплотипами HLA-DQB1*0301, DQA1*03, DRB1*04 демонстрирует наличие общего генетического фона у пациентов с антителами к ПТ и β2-ГП-I, которые являются ответственными за активность волчаночного антикоагулянта [296]. Кроме того, установлено, что антитела к аннексину V положительно ассоциируются с аллелем HLA-DRB1*08, а антитела к протеину S ассоциируются с аллелем HLA-DQB1*0301.

Другие гены, за пределами ГКГ, также вносят свой вклад в развитие АФС. Показано, что полиморфизм Val/Leu247 гена β2-ГП-I, приводящий к замене лейцина валином в позиции 247 в домене V, может вызывать конформационные изменения в молекуле β2-ГП-I и коррелирует с продукцией аβ2-ГП-I у пациентов с ПАФС [363, 581]. Изменение аминокислотной последовательности в молекуле β2-ГП-I может повлиять на ее конформационную перестройку и взаимодействие β2-ГП-I с фосфолипидами. Мета-анализ, проведенный Lee Y.H. и соавт. (2012), выявил значительные ассоциации аллеля Val β2-ГП-I с тромбозом и позитивностью на аβ2-ГП-I [114]. С тромбозом при АФС также значительно ассоциируются полиморфизмы генов, вовлеченных в процессы коагуляции крови и развитие провоспалительного состояния, включая TLR4 [568].

Некоторые гены, вовлеченные в предрасположенность к СКВ, также участвуют в развитии АФС, в частности IRF5 и STAT4. Однонуклеотидный полиморфизм STAT4 играет критическую роль в патогенезе АИЗ, включая СКВ и АФС, независимо от этнической принадлежности пациентов. В японской популяции BANK1, BLK, ОНП в области 1q25.1 ассоциируются не только с СКВ, но и с АФС. Предполагается, что АФС и СКВ имеют в какой-то степени общий генетический фон [363].

Кроме того, у пациентов с АФС описаны дополнительные факторы риска тромбоза, такие как фактор V Лейдена, мутация в гене метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR), гипергомоцистеинемия, недостаточность протеина С или протеина S, приобретенная резистентность к активированному протеину С [269, 369]. Роль этих генетически детерминированных факторов при АФС полностью не выяснена. Однако у пациентов с АФС и гомозиготной мутацией С677Т MHTFR наблюдается повышение уровня гомоцистеина в плазме, тогда как гипергомоцистеинемия может содействовать тяжелому тромбозу.

Большое внимание уделяется исследованию **роли Х-хромосом в развитии аутоиммунитета у женщин.** Тот факт, что АИЗ встречаются у женщин в 10 раз чаще, чем у мужчин, отчасти связан с наличием у женщин двух Х-хромосом в отличие от мужчин, имеющих одну Х- и одну Y-хромосому. Каждая Х-хромосома кодирует около 1100 генов, тогда как Y-хромосома – только 100 генов [433]. На этапе эмбрионального развития у женщин одна из Х-хромосом произвольно выключается из транскрипции, что приводит к мозаичной экспрессии Х-сцепленных генов. Вклад экспрессии генов как отцовской, так и материнской Х-хромосом должен составлять примерно 50%, однако у значительного числа женщин наблюдается инактивация преимущественно одной из родительских Х-хромосом, то есть происходит неравная инактивация или сдвиг Х-инактивации, что может привести к чрезмерной экспрессии некоторых генных продуктов. Показано, что сдвиг Х-инактивации ассоциируется с АИЗ, такими как РА, АИТ и склеродермия, и его частота повышается у женщин с возрастом [559].

На Х-хромосоме идентифицированы некоторые потенциальные гены предрасположенности к СКВ. Повышенный риск развития СКВ у мужчин XXY с синдромом Клайнфельтера и низкий риск СКВ у женщин с одной Х-хромосомой, страдающих синдромом Тернера, предполагают, что действие генов, связанных с Х-хромосомой, является дозированным [559]. В некоторых случаях может иметь место неполная инактивация Х-хромосомы, вызывающая экспрессию гена на обеих Х-хромосомах и способствующая проявлению аутоиммунных факторов, связанных с Х-хромосомой.

На Х-хромосоме расположено много генов, ассоциированных с иммунитетом, таких как CD40L, CXCR3, OGT, FOXP3, TLR7, TLR8, IL2RG, BTK и IL9R [486]. Гены TLR7 и TLR8 имеют критическое значение в развитии АИЗ, подобных СКВ, и являются ответственными за продукцию антирибонуклеопротеиновых и анти-дсДНК антител. Предполагается, что у женщин может быть избыточная экспрессия TLR7 и TLR8, повышающая риск развития СКВ.

В настоящее время идентифицированы многие мутации в генах, связанных с Х-хромосомой, которые влияют на иммунный ответ. Мутации в гене тирозинкиназы Брутона вызывают Х-связанную агаммаглобулинемию. Мутации в гене гамма-цепи рецептора IL-2 ассоциируются с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, связанным с Х-хромосомой, а мутации в гене FOXP3 приводят к Х-связанному синдрому, проявляющемуся иммунной дисрегуляцией, полиэндокринопатией и энтеропатией [440]. Каждое из этих Х-связанных заболеваний проявляется в тяжелой форме у мужчин. На Х-хромосоме закодировано около 7% микроРНК человека (113 микроРНК), тогда как на Y-хромосоме определены только две микроРНК. Имеется доказательство, что микроРНК являются критическими регуляторами иммунных ответов, причем экспрессируются в высоких уровнях в клетках воспаления [197]. Предполагается, что Х-связанные гены микроРНК могут избежать инактивации, а нарушенная экспрессия микроРНК может привести к иммунной дисрегуляции и иммунным

ответам, специфическим для женщин. Показано, что у женщин с СКВ экспрессируются в избытке 18 микроРНК, связанных с Х-хромосомой [426].

В последние несколько лет достигнут большой прогресс в идентификации детальных **эпигенетических механизмов**, имеющих критическое значение в регуляции экспрессии генов и способствующих возникновению АИЗ. Через эпигенетические механизмы внутренние и внешние факторы риска, включая факторы окружающей среды, такие как курение, питание, вирусные инфекции и воздействие химических веществ, могут оказывать влияние на развитие АИЗ [267]. Нарушения эпигенетической регуляции могут иметь патогенетическое значение при АИЗ.

Метилирование ДНК - динамический процесс, вовлекающий события метилирования и деметилирования, которые являются важными для эмбриогенеза, клеточной пролиферации и дифференцировки [236, 539]. Метилирование осуществляется и поддерживается семейством ДНК-метилтрансфераз (DNMT) и обычно производится в области промоторов приблизительно половины всех генов, содержащих CpG динуклеотиды [209]. Гиперметилирование CpG промоторов генов ассоциируется с ингибированием транскрипции, тогда как гипометилирование приводит к активации транскрипции генов.

Деметилирование может быть пассивным или активным. Пассивное деметилирование индуцируется ингибированием DNMTs [261]. Активное деметилирование может зависеть от активности деаминаз цитозина, имеет место преимущественно при дифференцировке клеток и ассоциируется с активацией иммунных клеток.

Нарушенное метилирование ДНК, найденное в Т-лимфоцитах у пациентов с СКВ, возможно, участвует в патогенезе заболевания. Гипометилирование может влиять на структуру хроматина в Т-лимфоцитах, определяя повышенную экспрессию некоторых генов, таких как CD11a, CD70, перфорина и CD40L, и развитие аутореактивных Т-клеток [150]. Показано гипометилирование в генах, регулируемых интерфероном, таких как IFIT1, IFIT3, MX1, STAT1, IFI44L,

USP18, TRIM22 и BST2, в наивных CD4 Т-лимфоцитах у пациентов с СКВ [271]. Это может объяснить механизм активации сигнального пути интерферонов I типа, имеющего важное значение в патогенезе СКВ.

У пациентов с СКВ CD4+ Т-лимфоциты показывают гипометилирование ДНК в области промотора гена CD40L, которое ассоциируется с дифференцировкой Th17 клеток и продукцией IL-17 [150]. Гипометилирование промотора CD5 в В-лимфоцитах при СКВ приводит к их активации и продукции антител [327]. Кроме того, высокий уровень IL-6 в В-клетках может снижать экспрессию DNMT1 и, таким образом, влиять на метилирование CD5.

Реже наблюдается гиперметилирование, например, у пациентов с системным склерозом и сахарным диабетом 1 типа гиперметилируются регуляторные области FOXP3 в CD4+ Т-лимфоцитах периферической крови, что приводит к снижению экспрессии ключевого фактора транскрипции, необходимого для генерации Treg лимфоцитов [225].

Деметилирование ДНК содействует развитию аутоиммунного процесса в случае СКВ. Протеины семейства Tet, катализирующие превращение 5-метил-цитозина в 5-гидроксиметил-цитозин (5-hmC), рассматриваются как ключевые ферменты, которые способствуют процессу активного деметилирования ДНК [335]. Полногеномное картирование 5-hmC в CD4+ Т-лимфоцитах показало, что 5-hmC метят транскрипционные регуляторные области генов линии Т-клеточной дифференцировки, тогда как протеины Tet2 привлекаются к этим областям и стимулируют экспрессию цитокинов в Th1 и Th17 лимфоцитах. У пациентов с СКВ наблюдается повышенная экспрессия генов TET2 и TET3.

Гистоны могут подвергаться посттрансляционным модификациям, включающим ацетилирование и метилирование, которые модулируют структуру хроматина, влияя на его доступность для факторов транскрипции в промоторах и усилителях генов [364]. Обычно гиперацетилирование гистонов H3 и H4 (H3Ac, H4Ac) характеризует активные гены, тогда как деацетилирование гистона приводит к более плотному сворачиванию ДНК вокруг гистонового октамера в нуклеосоме и, как следствие этого, подавлению экспрессии генов.

Предполагается, что нарушенные модификации гистона, а именно повышенные уровни ацетилирования гистона H3 и деметилирование лизина 4 гистона H3 в пределах промотора гена TNFSF7 вызывают чрезмерную экспрессию CD70 и могут способствовать развитию СКВ [294]. Повышенное ацетилирование H3 у пациентов с СКВ положительно коррелирует с активностью заболевания.

МикроРНК вовлекаются в регулирование экспрессии генов в посттранскрипционной манере через связывание с комплементарными последовательностями на мишеневой мРНК, что может привести к трансляционной репрессии, дестабилизации и деградации мРНК. Показано, что экспрессия микроРНК может контролировать динамические аспекты иммунных ответов, которые являются важными для поддержания гомеостаза и защиты хозяина [475].

Общий набор микроРНК с нарушенной экспрессией играет значительную роль в патогенезе большинства АИЗ, модулируя многочисленные гены, связанные с развитием аутоиммунитета, и другие эпигенетические процессы [197]. Нарушения экспрессии микроРНК могут играть важную роль в патогенезе СКВ, а микроРНК могут служить биомаркерами активности заболевания и эффективности лечения.

С помощью микроматричного анализа и секвенирования микроРНК у пациентов с СКВ была выявлена дисрегуляция микроРНК в мононуклеарных клетках периферической крови, таких как микроРНК-21, микроРНК-25, микроРНК-125a, микроРНК-146a, микроРНК-148 и микроРНК-186 [238]. Нарушения экспрессии микроРНК показаны в специфических лимфоцитарных субпопуляциях и плазмацитоидных дендритных клетках. Повышенная экспрессия микроРНК-21 и микроРНК-29 содействовала гипометилированию ДНК в CD4+ Т-лимфоцитах при СКВ [393, 394].

Нарушенная экспрессия других микроРНК, таких как микроРНК-30, микроРНК-146a и микроРНК-155, также может вызвать дерегулирование эпигенетических процессов и, следовательно, способствовать патогенезу АИЗ.

Предполагается, что микроРНК-146а контролирует супрессорную функцию Treg лимфоцитов и опосредованную ими регуляцию иммунного ответа Th1- типа [263].

Таким образом, в патогенез аутоиммунных состояний вовлекаются как иммунологические, так и генетические факторы. АИЗ возникают в результате взаимодействия между полигенными факторами риска и факторами окружающей среды. Наиболее значимыми являются гены ГКГ, кодирующие большинство протеинов иммунной системы, и генетические факторы за пределами ГКГ, регулирующие иммунный ответ. Важные патогенетические механизмы АИЗ сопряжены с потерей центральной или периферической толерантности, нарушением функции Т- и В-лимфоцитов, повышением уровня интерферонов I типа, нарушениями апоптоза и удаления клеточного дебриса, дефектами ранних компонентов комплемента. В случае АФС аллели HLA определяют только предрасположенность к образованию аФЛ, ответственных за клинические проявления АФС, тогда как аФЛ разной специфичности ассоциируются с определенными гаплотипами HLA. За пределами ГКГ важное значение в развитии АФС имеют полиморфизмы гена домена V β2-ГП-I, а также генов, вовлеченных в процессы коагуляции крови и развитие провоспалительного состояния. Сдвиг инактивации Х-хромосомы, несущей гены, ассоциированные с иммунитетом и кодирующие большое число микроРНК, может привести к чрезмерной экспрессии некоторых генных продуктов и способствовать развитию АИЗ у женщин. Нарушения эпигенетических механизмов регуляции генов, процессов метилирования и деметилирования ДНК, ацетилирования и метилирования гистонов, экспрессии микроРНК способствуют развитию АИЗ. Наиболее часто при АИЗ наблюдается гипометилирование ДНК, сопровождаемое активацией транскрипции генов. Нарушения экспрессии микроРНК содействуют гипометилированию ДНК и патогенезу АИЗ.

1.2 Механизмы генерации аутоантигенов и индукции аутоиммунитета

Посттрансляционные модификации (ПТМ) представляют собой ковалентные модификации специфических аминокислот в белке после его синтеза на рибосоме и включают ацетилирование, липидирование, цитруллинирование, фосфорилирование, метилирование и гликозилирование. ПТМ могут возникать путем ферментной модификации или спонтанно [498]. Присутствие ПТМ может определять третичную и четвертичную структуру белка, индуцируя изменения в его полном заряде, и может повлиять на активность протеина, взаимодействие с другими протеинами или молекулами ГКГ, локализацию, деградацию и другие функции [131]. При физиологических условиях ПТМ протеинов обеспечивают осуществление большого числа клеточных событий от активации клеточной сигнальной системы до репликации ДНК. Однако отсутствие, недостаток или избыток этих ПТМ может привести к образованию «новых» протеинов и запуску аутоиммунитета [535]. Частота ПТМ повышается при некоторых клеточных процессах, таких как старение, клеточные стрессы, воспаление, апоптоз и повреждение.

В норме иммунная система не реагирует на собственные протеины в результате распознавания своего и чужого, а аутореактивные Т-лимфоциты элиминируются в тимусе путем негативной селекции. Однако некоторые аутореактивные Т-клетки могут избежать этого процесса и достигнуть периферии. При их активации на периферии может развиться АИЗ. Так как ПТМ осуществляются на периферии и не происходят в идентичной форме в тимусе, модифицированные протеины не могут вызывать иммунологическую толерантность. Следовательно, когда ПТМ возникают в ходе такого клеточного ответа, как воспаление, модифицированные собственные антигены могут быть переработаны АПК и затем представлены аутореактивным Т- и В- лимфоцитам, которые инфильтрируют ткань хозяина, а присутствующий модифицированный

антиген усиливает аутоиммунный ответ, приводя к аутоиммунной патологии [229].

Одной из ПТМ, вовлеченных в развитие аутоиммунитета, является цитруллинирование, которое представляет качественное изменение аутоантигенов за счет ферментативного превращения аргинина в цитруллин и выполняется пептидиларгинин деиминазами (PADs) [301]. Цитруллинирование имеет место при нормальном внутриклеточном гомеостазе, но внеклеточное цитруллинирование белков в тканях является характерным для многих воспалительных состояний. Предполагается, что высокая продукция PADs может приводить к модификации других протеинов, генерируя новые аутоантигены.

Одним из первых идентифицированных цитруллинированных аутоантигенов был основной белок миелина, ассоциированный с рассеянным склерозом [402]. При РА в качестве аутоантигенов выявляются цитруллинированные фибриноген, виментин, коллаген 2 типа и альфа-энолаза, которые экспрессируются в суставах [126, 299]. При этом антитела к цитруллинированному фибриногену и коллагену 2 типа индуцируют воспаление. Взаимодействие аутоантител с цитруллинированной молекулой глюкозой регулируемого протеина 78 (GRP78) на поверхности Т-лимфоцитов может индуцировать активацию сигнального пути и продукцию цитокинов, включая TNF [167].

Применение методов эпитопного сканирования гликопротеинов позволило выявить гликозилированные аутоантигены. В качестве аутоантигенов были идентифицированы гликопептиды коллагена 2 типа с малыми О-связанными олигосахаридами, которые могут активировать Т-лимфоциты, несущие молекулы ГКГ класса II или класса I [168].

При сахарном диабете происходит модификация протеинов путем неферментного гликозилирования или гликирования. В результате присоединения глюкозы посредством реакции Майяра образуются конечные продукты усиленного гликозилирования, которые активируют через специфические рецепторы миелоидные клетки, приводя к нарушению баланса между про- и

противовоспалительными цитокинами и между протеазами и их ингибиторами [437].

Посттрансляционные модификации генерируют изменения аминокислотной последовательности в собственных протеинах и приводят к образованию нео-пептидов, которые распознаются как «чужеродные» и инициируют прогрессивный иммунный ответ, вовлекающий продукцию аутоантител [229]. ПТМ, найденные при СКВ, представлены фосфорилированием, метилированием, ацетилированием и изомеризацией аспарагиновой кислоты [535]. Протеин U1-70k, который является малым нуклеарным рибонуклеопротеином (snRNP), локализованным в ядре, подвергается фосфорилированию по доменам серина и аргинина при апоптозе, ассоциированном с клеточным стрессом, и идентифицируется как аутоантиген при СКВ. У пациентов с СКВ описаны более 20 изоформ U1-70k с различным молекулярным весом и изоэлектрическими точками.

Более того, другими протеинами, которые могут быть модифицированы путем ПТМ, являются комплексные рибонуклеопротеины Ro/SSA и La/SSB, найденные в ядре и цитоплазме. Такие протеины распознаются антителами к Ro/La, представленными у пациентов с СКВ и синдромом Шегрена [485]. Другой ПТМ, ассоциированной с патогенезом СКВ, является метилирование протеинов Sm (Sec1/Munc18), которые представляют собой часть snRNP, включающую протеины U1, U2, U4 и U5 [603].

В дополнение к этим аутоантигенам нуклеосомы, состоящие из октамера гистонов 2H2A, 2H2B, 2H3 и 2H4, подвергаются у пациентов с СКВ ацетилированию, индуцированному апоптозом [108]. Вторая модификация гистона H2B происходит спонтанно путем изомеризации аспарагиновой кислоты при физиологических условиях и распознается аутоантителами как в мышиной модели, так и у людей [230].

При АФС главной мишенью антифосфолипидных антител является молекула β2-ГП-I, ее циркулирующая форма содержит два или более непарных цистеина со свободными тиольными группами, которые экспонируются на

поверхности молекулы β2-ГП-I и взаимодействуют с тромбоцитами или эндотелиальными клетками [606]. ПТМ цистеинов, включающие добавление кислорода, оксида азота (NO) или глютатиона, могут изменить функцию экстрацеллюлярных белков. Частота ПТМ повышается в состоянии оксидативного стресса, который характеризуется повышенной продукцией реактивных форм кислорода, последние реагируют с остатками цистеина, особенно редокс-активного цистеина, образуя обратимые и необратимые окисленные формы. Окисление β2-ГП-I приводит к изменению его структуры и может обеспечить повышение его иммуногенности [395, 398].

У пациентов с АФС отмечаются повышенные уровни окисленной формы β2-ГП-I по сравнению с контрольными субъектами [416]. Предполагается, что эта ПТМ может играть важную роль в патогенезе АФС, а клинические состояния, ассоциированные с повышенным оксидативным стрессом, такие как беременность и инфекция, могут приводить к подъему уровня окисленного β2-ГП-I, повышая риск тромбоза у пациентов, положительных на анти-β2-ГП-I антитела.

У больных АФС описана другая ПТМ, названная сиалированием, которая имеет место в гликановых (полисахаридных) структурах молекулы β2-ГП-I. Сиалирование β2-ГП-I может изменить конформационную стабильность протеина и индуцировать экспозицию другого криптического эпитопа, приводя к межмолекулярному взаимодействию между аминокислотными остатками Arg39–Arg43 в домене I протеина и аутоантителами [277]. Потеря толерантности к β2-ГП-I, химически модифицированному путем ПТМ, рассматривается как возможный патогенетический механизм.

Для понимания пути развития аутоиммунной тромбофилии при АФС необходимо правильно интегрировать все возможные механизмы и факторы, вовлеченные в ПТМ и тромбофилию, включая изменения в структуре и полном заряде β2-ГП-I, эпитопную специфичность и изотипы антител, локализацию антигена, эффекторные клетки, участвующие в иммунном ответе, вовлечение

молекул комплемента в воспалительные реакции и увеличение продукции факторов коагуляции [577].

Внеклеточный протеолиз рассматривается как важный способ генерации аутоантигенов в дополнение к внутриклеточному протеолизу и другим ПТМ [421]. Антигены, представляемые в комплексе с молекулами ГКГ класса I, генерируются внутриклеточной протеасомой, в то время как антигены для классической презентации в комплексе с молекулами ГКГ класса II обрабатываются внутриклеточными лизосомальными протеазами. Предполагается, что экстрацеллюлярный протеолиз может вызывать генерацию аутоиммунных антигенов путем расщепления интактных протеинов с образованием молярного избытка конечных эпитопов (пептидов) для представления в комплексе с молекулами ГКГ класса II. Этот тип протеолиза опосредуется, главным образом, протеазами миелоидных клеток, регулируемыми цитокинами и хемокинами, что связывает процессы врожденного иммунитета с аутоиммунитетом.

Инфекция и воспаление индуцируют цитокины и хемокины и активируют миелоидные клетки, которые высвобождают ферменты. Провоспалительные цитокины, например, TNF и IL-1β, индуцируют протеазы, тогда как противовоспалительные цитокины, такие как INF-β, TGF-β и IL-10 индуцируют ингибиторы протеаз [421]. Одной из наиболее изученных при АИЗ цитокин-регулируемых протеаз является желатиназа B или матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9), которая при рассеянном склерозе локально повышается в цереброспинальной жидкости и расщепляет основной белок миелина, генерируя иммунодоминантные и энцефалитогенные пептиды. Подобным образом, при РА хемокин IL-8/CXCL8 привлекает и активирует внутрисуставные нейтрофилы, которые секретируют коллагеназу (MMP-8) и желатиназу B (MMP-9), расщепляющие коллаген на многочисленные конечные эпитопы, создавая из коллагена 2 типа в 40 раз больше аутоантигенов [168].

Экстрацеллюлярный протеолиз, регулируемый цитокинами и хемокинами и осуществляемый протеазами миелоидных клеток, является центральным в

генерации аутоантигенов и требуется для активации Т-лимфоцитов и образования аутоантител [422]. Кроме того, генерирование конечных эпитопов может осуществляться с помощью ферментов комплемента и других протеаз серина, таких как активаторы плазминогена.

Действие патогенетических факторов на человека может модифицировать продукцию и нарушить баланс между провоспалительными цитокинами и хемокинами и противовоспалительными молекулами в качественной и количественной манере, что приводит к дисбалансу протеаз и ингибиторов протеаз и определяет нагрузку протеаз [421]. В дополнение микробиота также делает свой вклад в нагрузку протеаз, приводя к экстрацеллюлярной деградации молекул хозяина на многочисленные антигенные пептиды. Дополнительные ПТМ микробными ферментами или ферментами хозяина генерируют репертуар аутоантигенов для активации адаптивных иммунных реакций.

Микроорганизмы оказывают влияние на иммунную систему человека [302]. Микробные молекулы влияют на уровни цитокинов и изменения в репертуарах антител и TCR. Присутствие специфических бактериальных видов и ЛПС в микрофлоре кишечника, находящейся под влиянием факторов окружающей среды, как предполагается, способствует предрасположенности к АИЗ у людей [586].

Бактерии продуцируют все классы протеолитических ферментов. Стафилококки и стрептококки генерируют, соответственно, стафилокиназу и стрептокиназу, которые являются активаторами плазминогена и протеазами серина, кишечные бактерии продуцируют металлопротеиназы, включая коллагеназу [421] Тиоловые протеазы бактериальной природы, названные гингипаинами, способствуют развитию периодонтита и ассоциируются с РА. Наружные мембранные протеазы грамотрицательных бактерий с аспарагиновой кислотой в каталитическом центре также могут быть связаны с протеолизом молекул хозяина до конечных эпитопов [143]. Такие микробные протеазы могут дополнять ферменты хозяина в количественной генерации конечных эпитопов в начальной фазе аутоиммунитета.

Существуют примеры цитруллинирования протеинов хозяина бактериальными PADs, в частности, PAD Porphyromonas gingivalis (PPAD), которая может изменить структуру протеинов и нарушить иммунные сигнальные пути у хозяина [365]. Микробные протеазы, такие как гингипаины и бактериальная PPAD, могут перерабатывать хемокины человека, обеспечивая количественные и качественные изменения, приводя к генерации остаточных эпитопных аутоантигенов. Каталитические реакции, опосредованные микробными протеазами, происходят много быстрее, чем реакции, опосредованные PAD человека [445].

Важную роль в индукции аутоиммунитета играют **инфекционные агенты.** Накопленные данные предполагают, что факторы окружающей среды, такие как инфекции, микробиота кишечника, токсические химические вещества и компоненты диеты вносят вклад до 70% в потерю иммунологической толерантности [590]. Инфекционные патогены, включая вирусы, бактерии, грибы и паразиты, являются главными доказанными триггерами аутоиммунитета [341]. Недавно показано, что инфекции представляют собой факторы риска широкого круга, а именно двадцати девяти АИЗ [343].

СКВ, рассеянный склероз и РА являются тремя наиболее изученными заболеваниями, для которых специфические вирусные агенты являются ключевыми в поломке иммунологической толерантности и развитии заболевания [342]. В развитие СКВ вовлекаются такие инфекционные агенты, как вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), ЦМВ, парвовирус В19, Mycobacterium Tuberculosis, Salmonella typhimurium, Vibrio cholera [264, 358]. Инфекция, вызванная ВЭБ, сопровождается продукцией антител к нуклеарному антигену 1 ВЭБ и предрасполагает к образованию аутоантител, перекрестно реагирующих с такими антигенами, как Sm и Ro, а также к развитию клинической формы СКВ [290]. Установлено сходство между пептидами PPPGRRP ВЭБ и PPPGMRPP Sm. Кроме того, развитию волчанки часто предшествует инфекция, вызванная ВЭБ. С СКВ также ассоциируется цитомегаловирусная инфекция [312]. Антиген pp65 ЦМВ запускает гуморальный иммунный ответ у пациентов с СКВ и мышей,

подверженных аутоиммунитету [313]. Показано, что гетерокомплексы амилоидных фибрилл S. typhimurium с экстрацеллюлярной ДНК хозяина, взаимодействуя с рецепторами TLR1-TLR2 дендритных клеток, способны индуцировать повышенные уровни IL6, IL-12, интерферонов I типа и антител к ДНК и хроматину [43].

Однако во многих случаях, ответственной за индукцию аутоиммунитета является не одна инфекция, а совокупность перенесенных инфекционных заболеваний, начиная с раннего детства [342]. Показано, что риск развития АИЗ повышался с возрастанием числа серьезных инфекций, требовавших госпитализации, при наблюдении в течении более 10 лет [343]. Инфекции, перенесенные в детстве, могут быть связаны с развитием АИЗ у взрослых. Описана ассоциация более высоких титров антинуклеарных антител (АНА) с перенесенными в детстве краснухой и свинкой, или диарейными заболеваниями на первом году жизни [344].

Инфекционные агенты запускают АИЗ посредством нескольких механизмов, таких как: молекулярная мимикрия, основанная на подобии между чужеродными и собственными эпитопами и активации перекрестно-реактивных Т-лимфоцитов; эпитопное распространение с расширением специфичности иммунного ответа за счет вовлечения собственных эпитопов, высвобожденных в результате повреждения или воспаления; неспецифическая стимуляция и активация рецепторов распознавания паттернов; высвобождение криптических антигенов в ходе процессинга собственных пептидов и активация аутореактивных Th1-лимфоцитов; вирусная персистенция и поликлональная активация В-лимфоцитов [342].

При АФС триггеры продукции патогенетических антител к мишеневым аутоантигенам, КЛ и β2-ГП-I, еще должны быть открыты. Однако с использованием фаговой пептидной библиотеки показано сходство мишеневых эпитопов β2-ГП-I с частыми инфекционными патогенами, найдена гомология их аминокислотной последовательности или третичной структуры [140]. Молекулярная мимикрия как ключевой механизм, связывающий инфекцию и

АФС, продемонстрирована в экспериментах при индуцировании АФС у мышей иммунизацией различными микробными патогенами. Особенно высокие титры антител к β2-ГП-I были найдены после иммунизации Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrheae или столбнячным токсином [130].

Кроме того, циркулирующие анти-β2-ГП-I антитела идентифицируются в сыворотках пациентов с разными инфекционными заболеваниями, ассоциированными с клиническими проявлениями АФС [99, 110]. Так ревматическая лихорадка и АФС имеют некоторые общие клинические признаки, связанные с поражением нервной системы и сердца, тогда как пептидные последовательности в молекуле β2-ГП-I являются гомологичными протеину M S. pyogenes [140]. В дополнение к этому, синтетические пептиды, имеющие структурное подобие с ФЛ-связывающим регионом молекулы β2-ГП-I, обладают гомологией с такими инфекционными агентами, как ЦМВ, аденовирус человека 2 типа и Bacillus subtilis [273, 274].

Эпитопное распространение может привести к развитию вторичных аутоиммунных ответов к эндогенным эпитопам собственных антигенов, высвобождаемых во время хронического аутоиммунного или воспалительного ответа [254]. Эпитопное распространение может быть следствием изменения в структуре протеина, например, замены аминокислотного остатка аргинина на цитруллин. Кроме того, расширение эпитопной специфичности может происходить от доминантного эпитопа к субдоминантным (криптическим) эпитопам. При этом задействуются такие молекулярные механизмы, как процессинг и презентация антигена, соматическая гипермутация.

Неспецифическая активация представляет собой случайную активацию иммунного ответа на один эпитоп в процессе иммунного ответа на другой и имеет место, когда микробная инфекция стимулирует TLRs и другие рецепторы распознавания паттерна на АПК, приводя к продукции провоспалительных медиаторов, которые, в свою очередь, могут вызвать повреждение ткани [589]. Кроме того, при инфицировании вирусом АПК и параллельном высвобождении

медиаторов возможна случайная активация аутореактивных Th1- и Th17-лимфоцитов [427].

Длительная инфекция, обусловленная вирусом, таким как ВЭБ, может вызывать постоянную активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов, приводя к продукции моноклональных и поликлональных антител, а также иммунных комплексов, и к потере толерантности [590]. Постоянная экспрессия INF I типа и INF-индуцибельных генов во время повторных вирусных инфекций стимулирует продукцию аутоантигенов. Более того, повышенные уровни INF I типа могут активировать эндогенные ретровирусы человека, продуцирующие суперантигены (САГ) [194].

Под воздействием САГ, продуцированных бактериями и вирусами, происходит более широкая неспецифическая активация Т- и В-лимфоцитов независимо от их антигенной специфичности. Являясь высоко потенциальными митогенами, САГ способны запускать избыточную стимуляцию Т-лимфоцитов, приводя к массивному высвобождению Т-клеточных медиаторов и провоспалительных цитокинов, способствующих развитию таких заболеваний, как синдром токсического шока, пищевая токсикоинфекция, ревматическая лихорадка, артрит. САГ взаимодействуют с большой фракцией Т-лимфоцитов (5-30%), среди которых потенциально могут быть субпопуляции, специфические к собственным антигенам [597].

Наиболее изученными и охарактеризованными САГ являются стафилококковые и стрептококковые экзотоксины, продуцируемые Streptococcus pyogenes, S. dysgalactiae, S. equi, а также Staphylococcus aureus и коагулазонегативными стафилококками [302, 366, 454]. Mycoplasma arthritidis и Yersinia pseudotuberculosis продуцируют другие по структуре САГ. Некоторые вирусы имеют протеины со свойствами САГ, среди них вирус бешенства, ВЭБ, эндогенный ретровирус человека, ВИЧ и вирус Эбола [578].

Кроме того, некоторые инфекционные агенты продуцируют молекулы, способные специфически взаимодействовать с В-лимфоцитами, а именно с каркасными областями иммуноглобулинов вне центра связывания традиционного

антигена [345], которые называются «В-клеточными суперантигенами» и могут воздействовать на большую часть В-лимфоцитов человека. К ним относятся протеин А S. aureus, белок gp120 ВИЧ-1 и протеин L Peptostreptococcus magnus. Так гликопротеин gp120 ВИЧ-1, связываясь с рецепторами В-лимфоцитов, экспрессирующими VH3, вызывает поликлональную активацию В-клеток [578].

Вакцинация является эффективным способом предупреждения инфекций, которые имеют высокую распространенность и летальность. Вакцины изготавливаются из ослабленных или убитых микроорганизмов, продуктов их жизнедеятельности, или антигенов, полученных генно-инженерным или химическим путём. В состав препарата вакцины включают адъювант, который запускает, пролонгирует и усиливает антиген специфический иммунный ответ без запуска ответа на собственные антигены [40]. В настоящее время большое внимание уделяется изучению **роли адъювантов в запуске аутоиммунных реакций.**

Адъюванты часто используются в медицине для стимулирования иммунной системы и повышения эффективности вакцинации. В качестве адъювантов применяются соли алюминия, водно-масляные эмульсии (MF59, AF03, AS03), виросомы, монофосфорил-липид А (MPL), комбинированные адъюванты (AS04) [265, 432, 473]. В настоящее время описаны адъюванты, созданные на основе неметилированных CpG динуклеотидов, лигандов TLRs и тафтсина.

Эффект адъюванта достигается через некоторые механизмы, которые воздействуют как на врожденный, так и на адаптивный иммунные ответы [385]. Адъюванты повышают врожденные иммунные ответы путем имитирования эволюционно консервативных молекул (например, бактериальных клеточных стенок, ЛПС, неметилированных CpG-ДНК) и связывания с TLRs. Кроме того, они повышают активность дендритных клеток, лимфоцитов, макрофагов и активируют внутриклеточную систему инфламасом NLRP3 [40]. Микробные компоненты адъюванта активируют АПК, при этом повышается продукция провоспалительных цитокинов и экспрессия молекул, важных для представления антигена, включая молекулы ГКГ класса II и B7-1/2. Эти события врожденного

иммунного ответа обеспечивают более эффективную презентацию антигена клеткам, вовлеченным в адаптивный иммунный ответ, приводя к повышенной активации и клональной экспансии Т-лимфоцитов. Таким образом, адъюванты повышают иммунный ответ на антигены и последующее высвобождение хемокинов и цитокинов Т-хелперами и мачтовыми клетками [42, 156].

В настоящее время наиболее широко используются в медицине алюминиевые адъюванты, которые стимулируют гуморальный иммунный ответ Th2-типа опосредованно через активацию инфламасомы NLRP3 и высвобождение зрелой формы провоспалительного цитокина IL-1β [157]. После инъекции солей алюминия из некротизированных клеток высвобождаются мочевая кислота и ДНК, усиливающие адъювантность алюминия. При этом алюминий стимулирует продукцию и секрецию цитокинов, таких как IL-1β, IL-18 и IL-33 [385], а мочевая кислота приводит к повышению уровня IL-4 [42], который, в свою очередь, повышает экспрессию молекул ГКГ класса II на поверхности моноцитов.

Алюминиевые адъюванты у предрасположенных людей могут индуцировать АИЗ, хотя это случается редко [432]. Среди АИЗ с вакцинациями ассоциируются РА, сахарный диабет 1 типа, рассеянный склероз, СКВ, АФС, васкулиты, недефферецированные заболевания соединительной ткани, иммунная тромбоцитопеническая пурпура и другие [580].

Продемонстрировано, что вакцинация против столбняка и сезонного гриппа ассоциируется с продукцией аФЛ как у человека, так и у экспериментальных животных [337, 374]. Одной из возможных причин развития АФС является механизм молекулярной мимикрии между β2-гликопротеином-I человека и столбнячным токсином [404]. Показана возможность индуцирования АФС у мышей пород BALBc и C57BL/6, не подверженных этому заболеванию, путем гипериммунизации столбнячным токсином, усиленной гидроксидом алюминия и полным адъювантом Фрейнда.

Некоторые адъюванты способны сами по себе вызывать аутоиммунитет и АИЗ [40]. Например, тетраметилпентадекан, известный как пристан, индуцирует заболевание, подобное волчанке, в мышиной модели СКВ [338]. Иммунизация

животных пристаном усиливает продукцию INF I типа моноцитами посредством активации сигнальной системы через рецептор INF I типа, TLR-7 и адаптер протеина MyD88. Иммунизация скваленом у крыс индуцирует артрит, а у мышей - продукцию аутоантител, ассоциированных с СКВ [380].

Существуют некоторые примеры влияния генетического разнообразия на безопасность применения и эффективность вакцин и адъювантов. Так, ранее были идентифицированы 8 гаплотипов в 4 генах IL1A, IL1B, IL1R1 и IL18, ассоциированных с повышенным или пониженным риском развития лихорадки после вакцинации против черной оспы [544], а также показана возможная корреляция между специфическим гаплотипом HLA-DR и артралгией, индуцированной вакциной [297]. Артралгия, миалгия и хроническая усталость являются главными клиническими проявлениями недавно выделенного синдрома, названного «Аутоиммунным/воспалительным синдромом, индуцированным адъювантами» (ASIA) или синдромом Шоэнфелда, который ассоциируется с индивидуальной генетической предрасположенностью, обусловленной носительством, например, HLA-DRB1*01 или HLA-DRB4 [113, 530]. С 2013 года по 2017 год зарегистрировано более 300 случаев ASIA [531]. Наиболее частым аутоиммунным заболеванием, отнесенным к этому синдрому, было недифференцированное заболевание соединительной ткани. Несмотря на различные механизмы действия, в развитие ASIA могут вовлекаться разные адъюванты, включая соли алюминия, AS03, AS04 и MF59.

Таким образом, внеклеточные ПТМ имеют важное значение в генерации аутоантигенов и запуске аутоиммунитета. ПТМ, представленные при АФС окислением и сиалированием, приводят к повышению иммуногенности β2-ГП-I, экспонированию криптического эпитопа и потере толерантности к β2-ГП-I. На начальном этапе АИЗ процессы врожденного иммунитета и микробиота обеспечивают суммарную протеолитическую активность для расщепления интактных протеинов хозяина во внеклеточной среде с образованием конечных пептидных аутоантигенов. ПТМ, осуществляемые с участием ферментов хозяина и микроорганизмов, могут способствовать генерации аутоантигенов,

активирующих Т-лимфоциты в процессе презентации в комплексе с молекулами ГКГ. Инфекционные патогены являются доказанными триггерами широкого круга АИЗ. Во многих случаях ответственной за индукцию аутоиммунитета является не одна инфекция, а совокупность перенесенных инфекций, накопленных с детства. Ключевыми механизмами запуска АИЗ инфекционными агентами являются молекулярная мимикрия, эпитопное распространение, неспецифическая активация иммунного ответа, высвобождение криптических эпитопов, вирусная персистенция. Бактериальные и вирусные суперантигены вызывают широкую поликлональную активацию Т- и В-лимфоцитов, включая аутореактивные клоны. Адъюванты, применяемые при вакцинации против инфекций, воздействуют на врожденный и адаптивный иммунный ответ, некоторые из них могут стимулировать гуморальный иммунный ответ Th2-типа и вызывать АИЗ или ASIA у генетически предрасположенных людей.

1.3 Женские половые гормоны и аутоиммунитет

Аутоиммунные заболевания наиболее широко распространены среди молодых женщин репродуктивного возраста, что отчасти обусловлено иммуностимулирующим действием женских половых гормонов, особенно эстрогенов, и пролактина (ПРЛ) [403, 433, 551]. Не только эндогенные гормоны человека, но и эстрогены окружающей среды (фитоэстрогены, микоэстрогены, эстрогены продуктов животного происхождения и другие), а также гормональные контрацептивы и гормонозаместительная терапия, действуя совместно с другими факторами, способствуют преодолению иммуннологической толерантности к собственным антигенам [268].

Эстрогены продуцируются, главным образом, фолликулярным аппаратом яичников и в небольших количествах корой надпочечников. Эстрогеновые рецепторы экспрессируются в женском репродуктивном тракте, а также

идентифицируются на B- и T-лимфоцитах, дендритных клетках, нейтрофилах, макрофагах, NK-клетках, клетках тимуса, костного мозга и эндотелия [244]. После связывания с гормоном рецепторы эстрогенов (ERs α и β) перемещаются к ядру, где взаимодействуют с эстрогеновым ответным элементом (Estrogen-Response Element (ERE)) в области промоторов генов или с универсальным фактором транскрипции NF-kB, контролирующим экспрессию генов, связанных с регуляцией иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [193].

Эстрогены стимулируют быстрое созревание Т- и В-лимфоцитов, понижают В-клеточный лимфопоэз в костном мозге, снижая продукцию IL-7 стромальными клетками, и содействуют избеганию В-клетками негативной селекции [223]. Эстрогены способствуют экстрамедуллярному гемопоэзу, при котором развивающиеся вне костного мозга аутореактивные Т- и В-лимфоциты могут избежать негативной селекции, что содействует накоплению аутореактивных клеток [304]. Эстрогены способствуют выживанию аутореактивных В-лимфоцитов на периферии, по-видимому, путем повышения экспрессии молекул регулятора апоптоза Bcl-2, поверхностной молекулы CD22 В-клеток и активации других генов, таких как shp-1 и vcam-1 [189]. Кроме того, эстрогены индуцируют транскрипцию гена индуцируемой активацией дезаминазы (AID) в неиммунных тканях, что приводит к нестабильности ДНК, нарушению сигнальных и/или апоптотических путей и запуску продукции аутоантител [243, 304]. Эстрогены стимулируют дифференцировку, созревание и активацию ДК, их взаимодействие с рецептором ERα способствует активации регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), который активно вовлекается в развитие аутоиммунного процесса [189].

В периовуляторный период и во время беременности эстрадиол вызывает противовоспалительные эффекты путем ингибирования продукции и сигнальных путей провоспалительных цитокинов (TNF, IL-1β и IL-6) и активации NK-клеток, а также путем индуцирования экспрессии противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10 и TGF-β) [377] и повышения функциональной активности и количества Treg лимфоцитов [258]. В низких концентрациях эстрадиол стимулирует продукцию TNF, INF-γ, IL-1β и NK-клетки, тогда как образование антител В-

лимфоцитами усиливается, как при высоких, так и при низких уровнях эстрадиола [377].

Из-за сдвига от провоспалительного иммунного ответа Th1/Th17-типа к противовоспалительному ответу Th2/Treg-типа некоторые АИЗ, включая СКВ, опосредованные, главным образом, Th2-цитокинами, имеют тендендию к возникновению или обострению во время беременности, тогда как течение АИЗ, опосредованных Th1-цитокинами, например, РА, у беременных улучшается [502, 545]. В послеродовом периоде, когда уровни Th2-цитокинов падают вследствие изменения баланса между эстрогенами и андрогенами и повышения уровня пролактина, наблюдается тенденция к началу или обострению АИЗ, опосредованных иммунным ответом Th1-типа.

Пролактин также как эстрогены оказывает стимулирующий эффект на иммунную систему и способствует аутоиммунитету. Пролактин специфически влияет на функцию В-лимфоцитов, усиливает пролиферативный ответ на антигены и митогены, повышает продукцию иммуноглобулинов, цитокинов и аутоантител [502]. Гиперпролактинемия часто ассоциируется с мультиорганными или органоспецифическими АИЗ, такими как СКВ, РА, синдром Шегрена и другими. При некоторых заболеваниях наблюдается корреляция между уровнем ПРЛ и активностью патологического процесса.

Пролактин является пептидным гормоном ацидофильных клеток передней доли гипофиза, однако ПРЛ может синтезироваться в экстрагипофизарных сайтах, включая лимфоциты. Рецепторы ПРЛ относятся к суперсемейству цитокиновых рецепторов и широко экспрессируются на иммунных клетках, а именно на моноцитах, макрофагах, Т-лимфоцитах и особенно В-лимфоцитах, NK-клетках, гранулоцитах и эпителиальных клетках тимуса.

Пролактин играет важную роль при врожденном и адаптивном иммунном ответе, участвует в регулировании созревания и дифференцировки CD4+ Т-лимфоцитов и повышения экспрессии рецептора IL-2, при этом уровень ПРЛ коррелирует с числом В-лимфоцитов и CD4+ Т-лимфоцитов [502]. Пролактин индуцирует снижение апоптоза транзиторных В-лимфоцитов и может иметь

важное значение в поломке механизма В-клеточной толерантности к собственным антигенам. Повышение сывороточного уровня ПРЛ ослабляет опосредованную BCR клональную делецию и контроль за редактированием рецептора, снижает порог активации анергических В-лимфоцитов и, таким образом, способствует аутореактивности [459, 461].

Пролактин стимулирует развитие АПК, экспрессирующих молекулы ГКГ класса II и ко-стимулирующие молекулы CD40, CD80, CD86 [502]. Кроме того, гиперпролактинемия воздействует на созревание дендритных клеток, сдвигая функцию к провоспалительному фенотипу с повышенной продукцией INF-α [460]. ПРЛ повышает продукцию IL-6 и INF-γ и регулирует уровень IL-2, а также усиливает продукцию иммуноглобулинов [502]. У пациенток с гиперпролактинемией вырабатывается множество аутоантител, включая антитела к ПРЛ, ЭК, Ro, La, КЛ и β2-ГП-I. Пролактин снижает супрессорный эффект, оказываемый Treg лимфоцитами [189]. У пациентов с СКВ при повышенной экспрессии рецептора ПРЛ отмечается сниженное процентное содержание и функция Treg клеток.

Таким образом, эстрогены и пролактин оказывают стимулирующее воздействие на иммунную систему у женщин, влияют на лимфопоэз, созревание и дифференцировку иммунных клеток, содействуют развитию аутоиммунитета, способствуя выживанию и накоплению аутореактивных клеток, запуску и усилению продукции аутоантител.

1.4 Антифосфолипидные антитела у женщин с репродуктивными потерями

В настоящее время у женщин наблюдается высокая частота репродуктивных потерь, так частота потерь оплодотворенных яйцеклеток достигает 75%, а клинически подтвержденных беременностей – 15% [153]. Более того, 2-5% женщин репродуктивного возраста страдают привычным

невынашиванием беременности. К известным факторам риска ПНБ относятся анатомические, гормональные, хромосомные и аутоиммунные нарушения, однако более чем в 50% случаев причина привычного выкидыша остается необъяснимой [98]. Хотя у пациенток с ПНБ часто находят аутоантитела разной специфичности, только аФЛ четко ассоциируются с ПНБ как у пациенток с аутоиммунными заболеваниями, так и в генеральной популяции. Антифосфолипидные антитела выявляются у 10% женщин с ПНБ, тогда как генетические и анатомические этиологические факторы ПНБ обнаруживаются суммарно у 5-15% пациенток [153]. От 7% до 25% случаев необъяснимого ПНБ на ранних сроках ассоциируются с наличием аФЛ [419].

Еще в 1983 году Hughes G.R. сформулировал концепцию синдрома, ассоциированного с тромбозом, выкидышами, церебральными нарушениями и волчаночным антикоагулянтом. Позже было установлено, что с позитивным ВА ассоциируются не только антитела к кардиолипину, но и другие аФЛ. В 1987 году Harris E.N. и соавт. ввели в обращение термин «антифосфолипидный синдром». В 1999 году были опубликованы предварительные Международные классификационные критерии АФС, сформулированные на VIII Международном симпозиуме по антифосфолипидным антителам в Саппоро (1998), согласно которым ПВ в сроке до 10 недель беременности относился к клиническим, а ВА и аКЛ – к лабораторным критериям АФС.

Хотя первоначально считали, что аФЛ реагируют непосредственно с фосфолипидами, последующие исследования, проведенные в начале 1990-ых годов показали, что в образование критических эпитопов для аФЛ вовлекаются фосфолипид-связывающие протеины, а причиной тромбоза при АФС является не прямое, а белок-опосредованное взаимодействие аФЛ с анионными ФЛ, при этом для реагирования антител с ФЛ часто требуется присутствие β2-ГП-I. Кроме того, у пациентов, страдающих СКВ и АФС, были идентифицированы антитела, которые взаимодействовали непосредственно с β2-ГП-I, иммобилизованным на отрицательно заряженной поверхности. Было доказано, что β2-ГП-I является

главной мишенью аФЛ, а антитела к β2-ГП-I играют центральную роль в патогенезе АФС [27, 118, 478, 594].

В 2006 году критерии АФС, принятые в Саппоро, были пересмотрены и дополнены рабочей группой, созданной на XI Международном конгрессе по антифосфолипидным антителам в Сиднее [348]. К клиническим классификационным критериям АФС, принятым в 2006 году и действующим в настоящее время, относятся сосудистый тромбоз и осложнения беременности, а именно:

– один или более клинических эпизодов артериального, венозного тромбоза или тромбоза мелких сосудов в любой ткани или органе с гистопатологическим подтверждением;

– один и более случаев необъяснимой внутриутробной гибели морфологически нормального плода после 10-ой недели гестации;

– один или более случаев преждевременных родов морфологически нормального ребенка до 34-ой недели гестации из-за эклампсии или тяжелой преэклампсии или плацентарной недостаточности;

– три или более необъяснимых последовательных спонтанных аборта до 10-ой недели гестации.

На основе наблюдений, проведенных в течение последнего десятилетия, установлены различия между акушерским и сосудистым АФС. В настоящее время акушерский АФС признается особой формой, отличной от сосудистого АФС [418, 419, 541]. Показано, что у пациентов может наблюдаться сосудистый тромбоз без осложнений беременности или, напротив, только акушерские проявления АФС. Одновременно тромбоз и самопроизвольный выкидыш развиваются только в 2,5-5% случаев беременностей на фоне АФС [418]. Анализ данных мультицентрового исследования, включающего 1000 больных АФС, показал, что в 53,1% случаев пациенты имеют первичный АФС, в 36,2% случаев – АФС, ассоциированный с СКВ, в 10,7% случаев – АФС, ассоциированный с другими заболеваниями [401].

К лабораторным критериям АФС, принятым в настоящее время, относят наличие ВА, антител классов M и G к кардиолипину в концентрации выше 40

MPL-, GPL-U/ml или выше 99-го процентиля от нормы, антител классов M и G к β2-ГП-I в титре выше 99-го процентиля от нормы, присутвующих в двух или более случаях при определении с интервалом не менее 12 недель [348]. Выделяют следующие лабораторные категории: категория I – позитивность более чем на один вид аФЛ, категория II - позитивность на один вид аФЛ, а именно на ВА (IIa), аКЛ IgG/IgM (IIb) или анти-β2-ГП-I IgG/IgM (IIc) [152, 279].

В ряде исследований показано, что пороговый уровень для аКЛ, соответствующий 40 MPL-, GPL-Ед/мл, является более специфическим для диагностики сосудистого АФС, а пороговый уровень, соответствующий 99-ому процентилю от нормы, – для акушерского АФС [217]. Для постановки диагноза АФС необходимо сочетание, по крайней мере, одного клинического и одного лабораторного критерия АФС. Присутствие у больного нескольких лабораторных критериев одновременно указывает на высокий риск развития тромбоза.

Классификационные критерии, принятые в Сиднее, расширили необходимый временной интервал до повторного обследования пациентов с позитивными результатами на аФЛ от 6 до 12 недель, чтобы избежать ложноположительных результатов на аКЛ, обусловленных транзиторной инфекцией, или ошибочного определения ВА вследствие угнетения свертывания крови вслед за острым тромботическим событием.

Определение антител к КЛ и β2-ГП-I проводится с применением иммуноферментного анализа в соответствии с рекомендациями Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза [523]. Для исследования профиля аФЛ предлагается использовать иммуноблоттинг, который отличается плотным ориентированным расположением ФЛ на мембране из поливинилиденфторида (PVDF), аналогичным таковому в двухслойных мембранах живых клеток [503]. Для определения антител к КЛ, β2-ГП-I и домену I β2-ГП-I создан автоматизированный хемилюминесцентный иммуноанализ (ХЛИА), характеризующийся экспрессностью, высокой чувствительностью, специфичностью, точностью определения и хорошим совпадением результатов с ИФА [199].

Согласно современным представлениям, антифосфолипидные антитела – это большое гетерогенное семейство антител. Мишенями аФЛ являются анионные фосфолипиды (кардиолипин (КЛ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидная кислота (ФК) и др.), нейтральные фосфолипиды (фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилхолин (ФХ) и сфингомиелин (СМ)), фосфолипид-связывающие протеины плазмы (β2-ГП-I, аннексины, протромбин, протеин С, протеин S, кининогены, прекалликреин, тромбомодулин) и их комплексы с ФЛ, компоненты комплемента, факторы свертывания крови и другие антигены [5, 12]. В связи с этим проведение исследования широкого спектра аФЛ повышает эффективность диагностики АФС, особенно у больных, серонегативных на антитела, отнесенные к действующим лабораторным критериям АФС [226].

1.4.1 Основные антигенные мишени антифосфолипидных антител

Фосфолипиды представляют собой сложные липиды, содержащие глицерин, жирные кислоты, фосфорную кислоту и азотистое основание, и входят в состав всех клеточных мембран, где они, являясь амфифильными веществами, образуют двойной слой. ФХ и ФЭ являются наиболее распространенными фосфолипидами клеточных мембран и составляют в них, соответственно, 40-50% и 20-50% всех фосфолипидов. Относительно минорными мембранными фосфолипидами являются ФИ, СМ и специфический для митохондрий КЛ. ФС является минорным по количественному содержанию и составляет 2-10% всех фосфолипидов [583]. Клеточная мембрана характеризуется асимметричным распределением разных классов ФЛ во внешнем и внутреннем слоях. Нейтральные фосфолипиды, такие как СМ и ФХ, локализуются на внешней стороне мембраны в комбинации с небольшим количеством ФЭ. Внутренняя (цитозольная) часть мембраны состоит

преимущественно из ФЭ, ФС и ФИ, а также небольшого количества ФХ и СМ. Таким образом, в норме анионные фосфолипиды не присутствуют на внешней поверхности клеточных мембран.

Разные типы клеток, ткани и органеллы имеют характерный фосфолипидный состав, так КЛ локализуется, главным образом, в сердечной ткани на внутренней мембране митохондрий, где он составляет не менее 20% всех фосфолипидов [583]. Во время апоптоза, опосредованного рецептором программирумой клеточной смерти, КЛ и его метаболиты, прежде всего монолизокардиолипин (МКЛ), перемещаются из митохондрий к другим внутриклеточным органеллам и к поверхности клетки, экспонированные КЛ и МКЛ могут стать мишенью аФЛ, главным образом, в результате их взаимодействия с β2-ГП-I [406].

Лизо(бис)фосфатидная кислота (LBPA) относится по структуре к КЛ и представлена на внутренних мембранах поздних мультивезикулярных эндосом, вовлеченных в сортинг протеинов [407]. Предполагается, что аутоантитела к LBPA могут взаимодействовать с LBPA в эндосомах, проникая внутрь клетки-мишени, в экзосомах, выделяемых клетками, а также при экспонировании LBPA на поверхности клетки в результате апоптоза.

Во время апоптоза происходит ремоделирование липидных мембран [407]. На ранних стадиях апоптоза совершается экстернализация ФС на наружную поверхность плазматической мембраны, это перемещение ФС вызывается снижением АТФ-зависимой аминофосфолипидной транслоказы и инактивацией неспецифической скрамблазы. Экспонирование ФС наблюдается в стареющих эритроцитах, подлежащих разрушению макрофагами, в лимфоцитах и других клетках, подвергшихся апоптозу, в активированных тромбоцитах и эндотелиальных клетках (ЭК). Отрицательно заряженная фосфолипидная поверхность создает матрицу для активации протромбиназы и реакций свертывания крови. Трофобласт при дифференцировке и образовании синцития, инвазии в экстрацеллюлярный матрикс также экспонирует ФС. Так как слияние клеток и рост синцития продолжаются почти всю беременность, клетки

трофобласта, по-видимому, являются единственными в организме, длительно экспонирующими отрицательно заряженные ФЛ.

ФЭ является нейтральным ФЛ в диапазоне pH от 2 до 7 и типичным цвиттерионным ФЛ, главным липидным компонентом микробных мембран [504]. Молекулы ФЭ имеют головную группу фосфорилэтаноламина как общий структурный признак, но различаются по составу жирных кислот. ФЭ ассиметрично распределяется в клеточной мембране: одна третья часть располагается в наружном слое, а две третьих – во внутреннем слое [583]. В связи с этим, возможно, что первоначально у пациентов с АФС происходит экспонирование ФЭ в наружном слое мембраны, способствующее связыванию антител. Для связывания антител необходим переход ФЭ из ламеллярной фазы в гексагональную и наличие таких протеинов-кофакторов, как высоко- или низкомолекулярные кининогены, а в некоторых случаях прекалликреина и фактора XI [504]. ФЭ индуцирует специфические конформационные изменения в кининогенах, распознаваемые антителами.

В экспериментах *in vitro* показана антикоагулянтная роль ФЭ, который поддерживает оптимальную активность активированного протеина С (APC) в плазме и вызывает повышение скорости инактивации фактора Va комплексом APC [492]. Кроме того, ФЭ воздействует на протеин С через стимуляцию протеина S, который является кофактором APC в деградации фактора Va. ФЭ ингибирует активность коагуляции в системе фактор Xa-протромбин, а также способствует клеточному захвату ингибитора протеина С, вовлеченного в регулирование активности протромбиназного комплекса. ФЭ в гексагональной фазе может нейтрализовать ВА в присутствии протромбина. Роль в модуляции гемостаза подтверждается обнаружением ФЭ на люминальной эндотелиальной поверхности, где может проявляться его антикоагулянтная роль [438].

Хотя первоначально считалось, что аФЛ реагируют непосредственно с фосфолипидами, последующие исследования показали, что в образование критических антигенных эпитопов вовлекаются многие фосфолипид-связывающие протеины. В конце 1990-ых годов было выяснено, что аФЛ

взаимодействуют с протеинами плазмы, локализованными на анионных фосфолипидных поверхностях. К наиболее важным антигенным мишеням аФЛ относятся β2-ГП-I, ПТ и Ан А5.

β2-ГП-I является одноцепочечным гликопротеином плазмы, состоящим из 326 аминокислот, с молекулярным весом 50 kDa и содержит 5 гомологичных повторов или доменов [594]. Домены I-IV имеют регулярную последовательность и состоят каждый из 62 аминокислот, а домен V является уникальным и отличается высоким содержанием остатков лизина, образующих положительно заряженную область, которая определяет аффинность β2-ГП-I к анионным ФЛ. Исследования показали, что димеризация β2-ГП-I повышает аффинность взаимодействия с анионными ФЛ в 1000 раз, а бивалентные взаимодействия β2-ГП-I с анионными ФЛ имеют важное значение в стимулировании развития тромбоза. В норме содержание β2-ГП-I в плазме человека находится в диапазоне от 50 до 500 мг/мл, тогда как с возрастом и у пациентов с АФС содержание β2-ГП-I повышается [166].

Через домен V β2-ГП-I может связываться с липидными мембранами, а домены I-IV, обращенные наружу, с экспонированными эпитопами могут взаимодействовать с антителами к β2-ГП-I [430]. Установлено, что потенциальный сайт связывания антител, реагирующих с β2-ГП-I, локализуется в домене I молекулы β2-ГП-I [356]. В плазме β2-ГП-I циркулирует в закрытой конформации в виде петли, но после связывания с анионной фосфолипидной поверхностью β2-ГП-I принимает открытую конформацию, подобную хоккейной клюшке, и экспонирует криптический эпитоп в домене I для взаимодействия с антителами к β2-ГП-I [135].

Хотя главными клетками, продуцирующими β2-ГП-I, являются гепатоциты, присутствие мРНК β2-ГП-I было продемонстрировано с помощью ПЦР в реальном времени в фетальных астроцитах, в клетках кишечника, плаценты, в ЭК, лимфоцитах, астроцитах и нейронах [407]. Кроме того, мРНК β2-ГП-I экспрессируется в моноцитах периферической крови человека, причем у

пациентов с АФС и СКВ наблюдается повышенная экспрессия β2-ГП-I в моноцитах, коррелирующая с экспрессией TF.

β2-ГП-I взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности различных типов клеток, включая эндотелиальные клетки, моноциты, тромбоциты, трофобласты и децидуальные клетки, а также факторами коагуляции с важными последствиями, относящимися к патофизиологии АФС [594, 595]. Комплексы антител с β2-ГП-I связываются с множеством рецепторов, например, TLR2 и TLR4, аннексином A2, гликопротеином 1bα и LRP8 в LDL рецепторах.

β2-ГП-I, как известно, является естественным антикоагулянтом, который ингибирует протромбиназу, теназу и активацию факторов XII и XI, влияет на антикоагулянтный эффект протеинов C и S, а также регулирует активность плазминогена [594, 595]. Исследования *in vitro* продемонстрировали участие β2-ГП-I в регуляции гемостаза, так как β2-ГП-I ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную аденозиндифосфатом (АДФ), и контактную активацию свертывания крови по внутреннему пути. Предполагается, что β2-ГП-I содействует удалению ЛПС из циркуляции фагоцитами [606]. Кроме того, β2-ГП-I связывается с гепарином, липопротеинами, окисленными ЛПНП, активированными тромбоцитами, а также апоптотическими клетками, способствуя удалению из организма мёртвых клеток. Недавно показано, что β2-ГП-I функционирует как регулятор комплемента, опосредуя расщепление C3/Cb и усиливая функцию ингибитора активации комплемента фактора H [605].

Другой мишенью аФЛ является аннексин A5, принадлежащий к большому семейству кальций зависимых протеинов аннексинов. Аннексины вовлекаются в процесс экзоцитоза и эндоцитоза. Некоторые аннексины функционируют как антикоагулянтные и противовоспалительные протеины. Они вовлекаются в сигнальную трансдукцию, образование ионных каналов мембран, клеточную пролиферацию, апоптоз, развитие опухолей и т.д. [47].

Аннексин A5 является внеклеточным аннексином и экспрессируется повсеместно в организме, наиболее обильно в почках, печени и плаценте, располагается на мембранах клеток, находящихся в контакте с плазмой крови, в

том числе эндотелиоцитах, тромбоцитах и клетках трофобласта. Аннексин А5 представляет собой негликозилированный одноцепочечный протеин с молекулярным весом 36 кДа, образованный из 319 аминокислотных остатков [47]. Аннексин А5 имеет консервативный COOH-терминальный коровый домен, состоящий из 4 гомологичных повторов (I-IV), каждый из которых длиной около 70 аминокислотных остатков, и NH2-терминальный домен, содержащий кальций-связывающие сайты [272, 477]. Аннексин А5 присутствует в крови здоровых людей в низких концентрациях (0,6-28 мкг/л) [442]. Однако, по данным Uszyński W. и соавт. (2006), содержание аннексина А5 в плаценте составляет 122,65 +/- 33,14 нг/мг белка, в плодовых оболочках – 136,31 +/- 49,30 нг/мг белка, а в миометрии – 65,40 +/- 30,72 нг/мг белка, то есть содержание Ан А5 в плаценте приблизительно в 6000 раз выше, чем в плазме крови [187].

Аннексин А5 имеет потенциальную антикоагулянтную активность *in vitro*, которая основана на высокой аффинности взаимодействия с отрицательно заряженными фосфолипидами, прежде всего ФС, экспонированным на наружной стороне плазматической мембраны активированных клеток (тромбоцитов, ЭК и др.) или клеток, подверженных апоптозу, и способности вытеснять факторы коагуляции с фосфолипидных поверхностей, а также значительно пролонгирует фосфолипид-зависимые реакции коагуляции [47]. Хотя Ан А5 является мономерным белком при связывании его с фосфолипидной поверхностью или при высоких концентрациях Ca^{2+} образуются тримеры, а в результате их взаимодействия формируется двухмерная решетка, которая служит защитным щитом над поверхностью, экспонирующей ФЛ, и блокирует доступность ФЛ для фосфолипид-зависимых ферментов коагуляции [52]. Фосфолипидная каталитическая поверхность требуется для сборки и активации ферментных каскадов, включающих комплекс тканевого фактора и фактора VIIa, теназный комплекс и протромбиназный комплекс. Разрушение антикоагулянтного щита Ан А5 антифосфолипидными антителами рассматривается как возможный механизм тромбоза и потери беременности [97, 469].

Продемонстрировано, что Ан А5 обильно экспрессируется на апикальной поверхности микроворсин синцитиотрофобласта, а также на культивированных ЭК пупочной вены человека [527]. Уменьшение Ан А5 на апикальной поверхности плацентарного трофобласта и сосудистых ЭК, вступающих в контакт с текущей кровью, приводит к усилению коагуляции плазмы и тромбозам. Предполагается, что антикоагулянтная активность Ан А5 защищает развивающийся плод. У мышей Ан А5 выполняет функцию тромбомодулятора в плацентарном кровотоке и необходим для поддержания целостности плаценты [49]. Введение антител к Ан А5 беременным мышам индуцирует плацентарный тромбоз и некроз и приводит к потере беременности [49].

Кроме того, аннексин А5 имеет важную роль в регуляции апоптоза. Каждый тип клеток имеет молекулярный механизм экспонирования ФС на клеточной поверхности во время апоптоза. Аннексин А5 связывается с апоптотическими клетками, экспонирующими ФС, и, таким образом, может ингибировать прокоагулянтную и провоспалительную активность умирающих клеток [151].

Мишенью аФЛ также является протромбин (ПТ) или фактор II (FII) свертывания крови, K-зависимый одноцепочечный гликопротеин с молекулярным весом 72 kDa. ПТ циркулирует в плазме в концентрации 0,1 мг/мл и имеет период полужизни 60 часов [160]. ПТ состоит из 579 аминокислот и содержит четыре домена, связанных тремя промежуточными звеньями: N-терминальный Gla-домен (остатки 1-46), названный так вследствие посттрансляционных модификаций, два кринглa, кринглl (остатки 65-143) и кринглl-2 (остатки 170-248), и домен сериновой протеазы (остатки 285-579) [513]. Кринглы обычно опосредуют взаимодействие между протеинами. Так кринглl-1 и кринглl-2 взаимодействуют с FVa и FXa в процессе образования протромбиназного комплекса. Важно отметить, что кринглl-2 является местом взаимодействия с аутоантителами к ПТ у пациентов с АФС и СКВ.

Протромбин синтезируется, главным образом, в клетках печени как неактивный зимоген, состоящий из 622 аминокислот, хотя повышенные уровни мРНК обнаруживаются также в нейронах и клетках глии центральной нервной

системы [564]. До секреции в плазму ПТ подвергается посттрансляционным модификациям, включающим удаление пептида в N-терминальном конце (43 аминокислоты), три N-гликозилирования в позициях 78, 100 и 373 и превращение первых 10 остатков глютаминовой кислоты (Glu) в γ-карбоксиглутаминовую кислоту (Gla) [512]. Присутствие гликанов в позиции 373 повышает термодинамическую стабильность протеина и защищает его от протеолиза. Gla домен, локализованный во фрагменте 1 молекулы ПТ, обеспечивает кальций-зависимое связывание ПТ с отрицательно заряженными ФЛ.

Активация протромбина в тромбин – ключевая реакция системы свертывания крови. Протромбин физиологически активируется протромбиназным комплексом (активированные фактор X и фактор V, ионы Ca^{2+} и ФЛ). Как только ПТ связывается с отрицательно заряженным ФЛ, протромбиназный комплекс превращает ПТ в тромбин путем последовательного ферментного расщепления в двух сайтах Arg320 и Arg271 [160, 513]. Тромбин, в свою очередь, запускает полимеризацию фибриногена в фибрин, связывается с тромбомодулином на поверхности ЭК и активирует протеин С, который затем проявляет свою антикоагулянтную активность путем расщепления активированного фактора V, лишая протромбиназный комплекс его наиболее важного ко-фактора. Из-за этой негативной обратной связи протромбин/тромбин ведет себя как непрямой антикоагулянт.

Протромбин существует в двух формах в состоянии равновесия, закрытой (≈ 80%) и открытой (≈ 20%) [160]. Антипротромбиновые антитела могут быть направлены против криптических эпитопов, которые экспонируются, когда ПТ связывается с ФЛ. В отличие от β2-ГП-I протромбину для связывания с анионными ФЛ требуются ионы Ca^{2+}, в их присутствии N-терминальный регион ПТ подвергается конформационному изменению, приводящему к экспонированию гидрофобного участка, критического для связывания с ФЛ. Второе конформационное изменение приводит к экспонированию гидрофильной расщелины, образованной лизином, серином и Gla остатком, которая может быть комплементарна по форме и заряду полярной группе ФС [353]. Во

взаимодействии ПТ и мембран, содержащих ФС, кроме электростатических эффектов, важное значение имеет образование хелатного комплекса между ионами Ca^{2+} и группами-донорами электронов, такими как Gla остатки протеина, фосфатные и карбоксильные группы и аминогруппы ФС. Предполагается, что аПТ могут индуцировать в экспериментах *in vitro* удлинение времени свертывания путем повышения аффинности ПТ к отрицательно заряженным ФЛ, конкурируя с факторами свертывания за имеющиеся каталитические фосфолипидные поверхности.

Распознавание ПТ антителами зависит, главным образом, от формы антигена, представленной на твердой фазе. Антитела связываются с ПТ, адсорбированным на анионной поверхности полистирольного микропланшета, облученного гамма лучами, или иммобилизованным при посредстве ионов Ca^{2+} на микропланшете, обработанном ФС. Связывание ПТ с ФС повышает чувствительность определения, благодаря усиленному образованию двухвалентных трехмолекулярных иммунокомплексов [220].

1.4.2 Антифосфолипидные антитела – лабораторные критерии антифосфолипидного синдрома

Антифосфолипидные антитела представляют собой гетерогенное семейство аутоантител, которые ассоциируются с тромбозом и осложнениями беременности, в первую очередь, с привычным выкидышем. К лабораторным классификационным критериям АФС, принятым в настоящее время, относятся волчаночный антикоагулянт, обнаруживаемый в плазме с использованием коагуляционных тестов *in vitro*, и антитела (IgM, IgG) к КЛ и β2-ГП-I, определяемые в сыворотке или плазме крови с помощью ИФА [348].

Волчаночный антикоагулянт представляет собой гетерогенную группу антител класса IgG, включающую антитела к отрицательно заряженным ФЛ, которые реагируют с ФЛ и пролонгируют *in vitro* время свертывания в фосфолипид-зависимых тестах коагуляции таких, как активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) или тест с разведенным ядом гадюки Рассела (англ. Diluted Russell's Viper Venom Test (dRVVT)) [576]. Многие пациенты с положительной реакцией на ВА не имеют волчанки, а главным клиническим проявлением у них является прокоагулянтный эффект скорее, чем антикоагулянтный. Термин «антикоагулянт» отражает удлинение тестов фосфолипид-зависимого свертывания, которое является следствием специфичности ВА к фосфолипидам. ВА продуцирует свой лабораторный эффект путем удлинения времени рекальцификации в анализах с ограниченным содержанием ФЛ. Наличие ВА может быть подтверждено демонстрацией нормализации времени рекальцификации при добавлении экзогенных ФЛ [576].

Антительную специфичность ВА в каждом случае трудно или невозможно определить, однако часть антител демонстрирует авидность к отдельным протеинам, таким как ПТ или β2-ГП-I. Антитела, которые связываются с ПТ, могут уменьшать его время полужизни в циркуляции, приводя к приобретенной форме гемофилии с ассоциированным риском кровотечения. Кроме редких случаев приобретенной гемофилии, пациенты с положительной реакцией на ВА, по-видимому, представляют повышенный риск клинически важной тромбоцитопении, венозной и артериальной тромбоэмболии и потери беременности [383]. Парадоксально, но *in vivo* ВА ассоциируется с тромботическими заболеваниями [418].

Анализ результатов исследований, опубликованных с 1988 года по 2000 год, продемонстрировал значительную ассоциацию ВА с тромбозом во всех случаях (OR в диапазоне от 5,71 до 9,4), тогда как аКЛ значимо ассоциировались с тромбозом только в 50% случаев [379]. Однако мета-анализ 2014 года показал, что у пациенток без СКВ как ВА, так и аКЛ значительно ассоциируются с

повышенным риском артериального тромбоза, а ВА также связан с высоким риском венозного тромбоза [481].

Антикардиолипиновые антитела и ВА ассоциируются не только с тромбозом, но и привычным выкидышем и неблагоприятным исходом беременности [23, 192, 383]. Распространенность аКЛ в общей акушерской популяции составляет 1-5% [418], а у пациенток с отягощенным акушерским анамнезом - в диапазоне от 20% до 40% [192, 419]. Частота выявления ВА у женщин с потерей беременности колеблется от 0 до 14 % и в среднем составляет 8,3% [418]. При наличии аКЛ и отрицательном тесте на ВА у женщин, не получавших антикоагулянтную терапию или преднизолон, вероятность живорождения была на 36-48% ниже, чем у женщин без аФЛ [410].

У женщин с двумя или более необъяснимыми последовательными выкидышами ВА ассоциировался с выкидышами в I триместре и потерями плода во II триместре, а aβ2-ГП-I – с потерями беременности в I триместре [57]. По данным Cris J.C. и соавт. (2000), ВА и IgG aβ2-ГП-I являются независимыми факторами риска необъяснимой ранней потери беременности и ассоциируются со значительным риском потери плода во время последующей беременности, несмотря на лечение низкими дозами аспирина [82].

По результатам мета-анализа 2006 года, ВА значимо ассоциируется с поздней привычной потерей плода (до 24 недель) у женщин без АИЗ (OR 7,79; 95% CI [2,3-26,45]), в то время как IgG аКЛ ассоциируются как с ранней потерей беременности (до 13 недель) (OR 3,56; 95% CI [1,48-8,59]), так и с поздней привычной потерей плода (OR 3,57; 95% CI [2,26-5,65]), а IgM аКЛ – с поздней привычной потерей плода (OR 5,61; 95% CI [1,26-25,03]). При этом ассоциация ВА была более выраженной, чем аКЛ [112]. Показано, что ВА является основным предиктором осложнений беременности после 12 недель гестации, ассоциированных с аФЛ [447]. По данным мета-анализа (2011), ВА более строго и постоянно ассоциируется с осложнениями, опосредованными плацентой, а именно преэклампсией, синдромом задержки роста плода и поздней потерей плода [528].

Однако не все женщины, позитивные на ВА, были подвержены потере беременности. Повышенные уровни аβ2-ГП-I имели предиктивное значение для потери беременности у женщин, позитивных на ВА (OR 9,6; 95% [CI 1,6-56,4]), при этом риск потери был выше у женщин с более чем двумя выкидышами или потерями плода (OR 13,1; 95% CI [1,4-126,3]) [63].

У пациентов с АФС и СКВ наиболее частыми изотипами аβ2-ГП-I были IgM и IgA [198]. Определение IgG аβ2-ГП-I имело клиническое значение для идентификации пациентов с более высоким риском венозного и артериального тромбоза. Персистентная позитивность на IgG аβ2-ГП-I ассоциировалась с венозным тромбозом, а на IgM – с артериальным тромбозом. Показано, что положительные результаты ИФА на IgG-антитела к β2-ГП-I служат полезным прогностическим маркером тромбозов [9].

Женщины с ПНБ, серопозитивные на аβ2-ГП-I, независимо от наличия аКЛ и ВА не имели клинических различий по акушерским осложнениям и неонатальным исходам [109]. Использование аβ2-ГП-I в качестве маркера акушерского АФС позволило дополнительно диагностировать АФС у беременных женщин с плохими акушерскими исходами и негативными тестами на ВА и аКЛ, провести соответствующее лечение и достигнуть высокой частоты живорождения (более 90%) у пролеченных женщин.

Группа исследователей de Laat H.B. и соавт. (2004) предложили метод определения и с его помощью выявили аβ2-ГП-I-зависимый ВА у 43% пациентов с АИЗ [136]. Предполагается, что аβ2-ГП-I с активностью ВА являются ответственными за тромбоэмболические осложнения при АФС. По данным мультицентрового исследования (2011), риск тромбоза при положительном результате анализа на аβ2-ГП-I-зависимый ВА в 3 раза выше, чем при положительном результате классического анализа на ВА [45].

Тестирование женщин с необъяснимыми акушерскими осложнениями без АИЗ на ВА, аКЛ и аβ2-ГП-I (IgM/IgG) показало, что тройная позитивность и/или предшествующая тромбоэмболия были независимыми маркерами тромбоэмболии (OR 57,5; 95% CI [2,7-1160]) и неуспешной последующей беременности (OR 34,4;

95% CI [3,5-335,1]) [70]. У пациенток с ПАФС неблагоприятные исходы беременности имели место более часто при наличии двух или более положительных лабораторных тестов, чем при одном положительном тесте [372].

У носителей аФЛ двойная или тройная позитивность (ВА, аКЛ и/или аβ2-ГП-I) является также фактором риска будущих тромботических событий, особенно у пациентов с АИЗ, в то время как одинарная позитивность на аФЛ, по-видимому, не несет повышенного риска тромбоза [435]. Частота первого тромботического события у носителей двойной или тройной позитивности при наблюдении в течение года была в 2 раза выше, чем у носителей одинарной позитивности.

Forastiero R. (2014) подчеркнул важность недавно полученных данных о том, что пациентки с тройной позитивностью (ВА, аКЛ и аβ2-ГП-I) представляют высокий риск для венозного и артериального тромбоза и для акушерских осложнений [255]. Риск тромбоза повышается с каждым дополнительно обнаруженным аФЛ. Более высокая распространенность первого тромботического события наблюдается у асимптоматических носителей с тройной позитивностью по сравнению с пациентами с одинарной позитивностью на аФЛ.

Анализ частоты осложнений при последующих беременностях у женщин с акушерским АФС, получающих лечение низкомолекулярным гепарином и низкими дозами аспирина, показал, что предшествующая потеря плода была фактором риска последующей потери плода, преэклампсии, преждевременных родов и распространенности осложнений, обусловленных нарушениями формирования плаценты [177]. Женщины с привычным выкидышем и АФС имели более высокий риск преэклампсии, осложнений, обусловленных нарушениями в плаценте, и неонатальной смертности [371]. По заключению авторов, для акушерского АФС необходима терапия, включающая, в большей степени, профилактику поздних осложнений беременности и соответствующая типу потери беременности.

Таким образом, ВА и аКЛ значимо ассоциируются с повышенным риском тромбоза и ПНБ, при этом ассоциация ВА более выраженная, чем аКЛ.

Повышенные уровни аβ2-ГП-I имеют предиктивное значение для потери беременности у женщин, позитивных на ВА. Выявление IgG аβ2-ГП-I ассоциируется с более высоким риском тромбоза, аβ2-ГП-I-зависимый ВА является ответственным за тромбоэмболические осложнения при АФС. Наличие тройной позитивности на ВА, аКЛ и аβ2-ГП-I представляет высокий риск венозного и артериального тромбоза и акушерских осложнений. Женщины с привычным выкидышем и АФС имеют высокую вероятность развития преэклампсии, осложнений, обусловленных нарушениями в плаценте, и неонатальной смертности.

1.4.3 Антифосфолипидные антитела – перспективные диагностические маркеры антифосфолипидного синдрома

Кроме принятых в настоящее время лабораторных критериев АФС, включающих ВА, антитела (IgG, IgM) к КЛ и β2-ГП-I, как перспективные диагностические маркеры АФС рассматриваются некоторые аутоантитела, направленные к негативно заряженным ФЛ, фосфолипид-связывающим протеинам и факторам коагуляции, например, протромбину или комплексу ФС/протромбин, аннексину А5, определенным доменам β2-ГП-I [414]. Повышенный интерес фокусируется на поиске новых маркеров и создании эффективных тестов, более специфических для АФС, чем существующие.

Кроме антител к КЛ, у пациентов с АФС идентифицируются антитела, взаимодействующие с другими отрицательно заряженными фосфолипидами. Исследования Gharavi A.E. и соавт. ранее показали, что антитела к КЛ перекрестно реагируют как с ФС, так и с ФИ [72]. Из антител к негативно заряженным ФЛ антитела к ФИ и ФС были наиболее изучены при тромбозе и осложнениях беременности, отнесенных к АФС. По мнению ряда авторов, все эти аФЛ, особенно аФС, являются более специфичными для АФС по сравнению с

аКЛ, которые часто обнаруживаются при инфекционных заболеваниях и других состояниях [178, 273]. Однако еще должны быть определены оптимальные условия выполнения исследований и проведена стандартизация данных анализов. Даже при использовании двух наборов разных производителей не удалось установить достоверную диагностическую значимость антител к ФС для АФС [218].

Фундаментальная наука поддерживает значимость не только аКЛ, но и других аФЛ в патогенезе ПНБ. С использованием модельной системы *in vitro* показано, что аФС ингибируют развитие и инвазию трофобласта [400]. Антитела к ФС тормозят образование синцитиотрофобласта и снижают синтез ХГЧ [84]. Как низкомолекулярный, так и нефракционированный гепарин снижают связывание аФС и аКЛ в исследованиях *in vitro* [260]. Более того, по данным клинических исследований, лечение гепарином женщин с ПНБ, позитивных на аФЛ, может способствовать улучшению их состояния и рождению жизнеспособного потомства [259].

Исследователи в разных странах поддерживают использование панели фосфолипидов для скрининга аФЛ, включающей не только КЛ, но также ФС, ФИ, фосфатидилглицерол и другие отрицательно заряженные фосфолипиды, для более полной идентификации пациенток с АФС [85, 157, 431]. Продемонстрировано, что у 10% женщин с ПНБ, негативных на аКЛ, выявляются антитела к другим ФЛ [598]. Предполагается, что у значительного числа женщин с ПНБ не удалось бы идентифицировать АФС при тестировании только на аКЛ.

Пациенты с ПАФС имели значительно более высокую распространенность аФЛ по сравнению с женщинами с ПНБ. В противоположность, 66% женщин с ПНБ были негативными на все аФЛ, а распространенность антител к КЛ и другим анионным фосфолипидам составляла, соответственно 6% и 12% [449]. Титры этих антител были значимо выше у пациенток с ПАФС, чем у женщин с ПНБ.

Однако пациентки с ПНБ имели более высокую распространенность антител к анионным ФЛ или ФЭ, по сравнению со здоровыми женщинами или беременными с физиологической беременностью [259]. Большинство женщин с

ПНБ, позитивных на антитела к КЛ или анионным ФЛ, имели средний титр аФЛ. Хотя наличие антител к анионным ФЛ в настоящее время не относится к классификационным критериям АФС, показано, что у 64% беременных женщин с этими антителами лечение гепарином и аспирином было эффективным, а беременность завершилась рождением жизнеспособных новорожденных [259]. По-видимому, определение аФЛ, соответствующих принятым в настоящее время критериям АФС, а именно ВА, аКЛ и аβ2-ГП-I, является недостаточным для полной идентификации АФС у женщин с ПНБ или патологией, отнесенной к АФС.

По данным систематического обзора литературы (2018), у пациентов с установленным диагнозом АФС средняя медианная частота выявления аФС классов IgG и IgM составляет 55% [29-87%] и 35% [16-65%] [451]. При этом более высокая распространенность аФС наблюдается при первичном АФС, чем при вторичном. Средняя распространенность аФС (IgG, IgM) при акушерском АФС составляет 5,4% и 21,6%, при тромботическом АФС – 45,9% и 28,6%. При этом независимая ассоциация между аФС и тромбозом и осложнениями беременности не найдена. Однако предполагается, что повышенные титры антител к ФС и ФИ или смеси фосфолипидов могут указывать на риск тромботических и акушерских проявлений АФС [434].

Таким образом, хотя фундаментальная наука поддерживает значимость антител к анионным ФЛ в патогенезе ПНБ, еще должна быть проведена стандартизация анализов и определена диагностическая значимость этих антител как возможных маркеров АФС. Предполагается, что включение негативно заряженных ФЛ, отличных от КЛ, в панель для скрининга аФЛ будет способствовать более полной идентификации АФС у женщин с ПНБ.

Кроме антител к отрицательно заряженным фосфолипидам и их комплексам с белками плазмы у пациенток с АФС выявляются антитела к нейтральным ФЛ, таким как ФЭ. Еще в 1989 году Staub H.I. и соавт. впервые описали случай ПАФС, при котором ВА сопровождался антителами не к КЛ, а к ФЭ. Результаты ИФА были подтверждены реакцией ингибирования и выделением

аффинно очищенных антител к ФЭ. Активность ВА ингибировалась ФЭ в гексагональной фазе, в связи с этим было сделано предположение, что ВА может представлять субпопуляцию аФЭ [508].

Позже было сделано предположение, что некоторые аФЭ являются специфическими не к самому ФЭ, а направлены к ФЭ-связывающим протеинам плазмы, а именно к кининогенам с высокой и низкой молекулярной массой, а также к протеинам, связывающим высокомолекулярный кининоген, фактору XI, прекалликреину и протромбину [76, 515]. Показано, что кининогены и/или протеины, связывающие высокомолекулярный кининоген, служат кофакторами аФЭ. При этом ФЭ индуцирует специфические конформационные изменения в кининогенах, распознаваемые аФЭ [517]. Так как система калликреин-кининоген-кинин в репродуктивном тракте играет важную роль в регуляции тромбоза, гемостаза, ангиогенеза и в защите против инвазивной бактериальной инфекции, аутоантитела к протеинам, вызывающие нарушения в данной системе, могут ассоциироваться с потерей беременности [516].

Еще в 1996 году Sugi T. и McIntyre J.A. выдвинули гипотезу, что при связывании аФЭ комплекс тромбоцит-кининоген не может обеспечивать рефрактерность тромбоцитов к активации тромбином, вследствие этого возникает предрасположенность к агрегации тромбоцитов и тромбозу [514]. В подтверждение данной гипотезы кининоген-зависимые IgG аФЭ, выделенные из плазмы некоторых пациентов, вызывали заметное повышение агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином [508].

Взаимосвязь между аФЭ и тромбозом менее изучена в отличие от аКЛ, аβ2-ГП-I и ВА. Показано, что распространенность аФЭ значимо выше при АФС и необъяснимом тромбозе по сравнению с контролем [67]. Однако значимой разницы в распространенности аФЭ между ПАФС и необъяснимым тромбозом не наблюдалось, при этом в обоих случаях преобладали антитела класса IgM. При необъяснимом тромбозе аФЭ часто были единственными аФЛ.

В последующем мультицентровом исследовании аФЭ были найдены у 15% пациентов с тромбозом и только у 3% здоровых доноров, в 63% случаев аФЭ

были единственными антителами [75]. Кроме того, в исследовании случай-контроль установлено, что аФЭ были независимым фактором риска венозного тромбоза. По мнению авторов, выраженная ассоциация между наличием аФЭ и тромбозом предполагает необходимость определения аФЭ у пациентов с тромбозом, особенно негативных на аКЛ, аβ2-ГП-I и ВА. Позже у пациентов с «серонегативным» АФС с помощью метода тонкослойной хроматографии была показана высокая частота выявления аФЛ, отличных от критериев АФС (в 58,3% случаев), в 30,5% случаев определялись аФЭ [561].

Показано, что результат определения аФЭ в ИФА зависит от используемого микропланшета, от источника получения ФЭ, состава и физико-химических свойств антигена, в том числе от длины и степени насыщения жирных кислот в молекуле ФЭ, концентрации липидных компонентов в буфере [491, 508, 589].

В последние годы большой научный интерес представляют исследования ассоциации аФЭ с осложнениями беременности. Показано, что кроме антител к КЛ, у 10,1% женщин с ПНБ выявлялись другие аФЛ, включая аФЭ [598]. Антитела к ФЭ более строго ассоциировались с ранней потерей беременности по сравнению с антителами к анионным ФЛ, аКЛ и ВА [450]. Часто аФЭ были единственными найденными аФЛ у пациенток с необъяснимым ПНБ на ранних сроках [82]. По данным Sugi T. и соавт. (2004), аФЭ являются более значимым фактором риска ПНБ, чем аКЛ и аβ2-ГП-I [77].

Найдена строгая ассоциация между ПНБ и аФЭ, зависимыми от наличия кининогенов или других плазматических протеинов, в 90,5% случаев IgG аФЭ были кининоген-зависимыми [516]. По данным анализа эпитопного картирования, мишеневым антигенным сайтом этих антител был LCD27 (Leu331-Met357) в третьем домене (D3) кининогенов, в главном сайте связывания тяжелой цепи кининогена с тромбоцитами и ЭК [361].

Пассивная иммунизация мышей аФЭ (или анти-LDC27 антителами) вызывала незначительное повышение резорбции плодов, но заметно индуцировала тромбоз и кровоизлияние в плацентах и повышала плацентарный апоптоз [36]. Это исследование подтвердило патогенетическое значение аФЭ при

осложнениях беременности, а также важность LDC27 как мишеневого антигена кининоген-зависимых аФЭ.

Недавно полученные данные о значимом повышении агрегации нормальных тромбоцитов, стимулированных γ-тромбином, под воздействием антител к LDC27, поддерживают гипотезу о том, что аФЭ могут вызывать ПНБ вследствие нарушения нормальных антитромботических эффектов кининогенов [493].

Таким образом, аФЭ являются независимым фактором риска венозного тромбоза и часто выявляются при серонегативном АФС. Антитела к ФЭ ассоциируются с ранней потерей беременности и являются более значимым фактором риска ранней ПНБ, чем аКЛ и аβ2-ГП-I. В большинстве случаев аФЭ при ПНБ являются кининоген-зависимыми и могут вызывать ПНБ вследствие нарушения нормальных антитромботических эффектов кининогенов. Однако еще необходима оптимизация условий проведения и стандартизация анализа на аФЭ.

Большинство исследований аФЛ фокусировались, главным образом, на оценке антител классов IgG и IgM, и только немногочисленные исследования были посвящены патогенетическому значению IgA аФЛ. При этом были получены противоречивые данные о распространенности IgA антител к КЛ и β2-ГП-I и их клиническом значении [489, 534]. В настоящее время IgA аФЛ не включены в классификационные критерии АФС, так как методы определения IgA аФЛ еще не стандартизированы, это затрудняет сравнение результатов, полученных в разных лабораториях [245]. Кроме того, имеется ограниченная доступность соответствующих стандартов, необходимых для оценки результатов тестов, не принят универсальный пороговый уровень. На результаты сравнительного анализа полученных данных также могут оказывать влияние различия в этническом составе изученных популяций.

Показано, что у пациентов с СКВ и АФС часто выявляются аФЛ класса IgA, у некоторых пациентов с клиническими признаками АФС IgA аβ2-ГП-I являются единственными обнаруженными антителами, а определение IgA в дополнение к IgM и IgG повышает чувствительность диагностики АФС [292, 355].

Более высокая частота и уровни IgA аβ2-ГП-I наблюдаются у пациентов с СКВ и АФС одновременно. Однако IgA аКЛ обычно обнаруживаются в ассоциации с IgG и/или IgM аКЛ.

Найдена ассоциация между повышенными уровнями антител к КЛ и β2-ГП-I класса IgA и тромботическими событиями у пациентов с СКВ. Изолированные IgA аβ2-ГП-I у пациентов с СКВ ассоциировались с высоким риском тромбоэмболических событий (OR 4,28, 95% CI 1,33-13,56) [322]. IgA аβ2-ГП-I выявлялись у 20% пациентов с СКВ и значимо ассоциировались с историей венозного тромбоза, тромбозы отмечались чаще, чем у пациентов с IgA аКЛ [389]. IgA аβ2-ГП-I более строго ассоциировались с тромбозом глубоких вен и инсультом, чем IgM аβ2-ГП-I. В связи с этим предлагается включить IgA аβ2-ГП-I в классификационные критерии АФС для пациентов, страдающих СКВ.

Несколько исследований продемонстрировали ассоциацию IgA аФЛ с акушерскими осложнениями у пациенток с системными АИЗ. Показан более высокий уровень и частота выявления IgA аβ2-ГП-I у пациенток с СКВ и необъяснимым ПВ по сравнению со здоровыми женщинами [323]. При этом IgA-антитела к β2-ГП-I выявлялись у женщин с ранними потерями беременности независимо от IgG-антител. Тогда как в другом исследовании у пациенток с акушерскими признаками АФС, такими как необъяснимый ПВ или внутриутробная гибель плода, между уровнями IgA и IgG аβ2-ГП-I наблюдалась значительная корреляция [374]. Частота позитивности на IgA аβ2-ГП-I у данных пациенток была выше, чем у здоровых женщин. Предполагается, что определение IgA аβ2-ГП-I позволит дополнительно идентифицировать женщин с клиническими признаками АФС, не выявленных при традиционном тестировании.

По результатам многоцентрового исследования (2013), изолированная позитивность на IgA аβ2-ГП-I ассоциировалась с повышенным риском тромбоза как артериального, так и венозного, 77% пациентов, позитивных на IgA аβ2-ГП-I, имели клинические признаки АФС [582]. Ранее тромбогенные эффекты IgA аКЛ были продемонстрированы *in vivo* на мышиной модели тромбоза, при этом

введение IgA аКЛ от пациентов с АФС приводило к тромбообразованию у мышей [321, 339]. Murthy V. и соавт. на той же мышиной модели тромбоза показали *in vivo*, что IgA аβ2-ГП-I индуцировали больше тромбов и более высокие уровни TF по сравнению с контрольным IgA [582]. Тестирование на IgA аβ2-ГП-I было рекомендовано при подозрении на АФС, когда другие тесты на аФЛ являются негативными.

Однако результаты исследований, опубликованных с 1990 года по 2012 год, не предоставляют достаточных доказательств эффективности дополнительного тестирования на IgA-антитела к КЛ и β2-ГП-I вследствие низкой распространенности этих антител, их значительной ассоциации с другими аФЛ, отсутствия улучшения диагностической точности при рутинном тестировании [534].

В систематическом обзоре 2015 года продемонстрирована высокая распространенность аФЛ, не включенных в действующие лабораторные критерии АФС, у пациентов с АФС по сравнению с контрольной группой, среди наиболее распространенных аФЛ были IgA аβ2-ГП-I [248]. По данным трех перекрестно-секционных исследований, распространенность IgA аβ2-ГП-I составляла 56,3% у пациентов с АФС, 34,4% в группе сравнения с другими АИЗ и 13,1% в контрольной группе, в то время как распространенность IgA аКЛ была, соответственно, 20,9%, 5,4% и 2,8%. Требуются дальнейшие проспективные исследования с достаточным размером групп и соответствующей методологией, изучающие некритериальные аФЛ при АФС и в контрольной группе, чтобы оценить истинную пользу этих антител в ведении пациентов с АФС и возможность их включения в существующую панель лабораторных критериев АФС.

Таким образом, повышенные уровни IgA-антител к КЛ и к β2-ГП-I ассоциируются с тромботическими событиями и акушерскими осложнениями у пациенток с системными АИЗ. IgA аβ2-ГП-I выявляются у пациенток с необъяснимым ПВ, ранними потерями беременности или гибелью плода. Изолированная позитивность на IgA аβ2-ГП-I ассоциируется с повышенным

риском тромбоза. Определение IgA аβ2-ГП-I может дополнительно идентифицировать женщин с клиническими признаками АФС. Однако ассоциация IgA аФЛ с клиническими проявлениями АФС часто теряется в отсутствие других аФЛ, а тесты для определения IgA аФЛ являются еще нестандартизованными.

В конце 1990-ых годов исследования, фокусировавшиеся на идентификации в молекуле β2-ГП-I сайтов связывания со специфическими антителами, показали, что аβ2-ГП-I могут связываться с каждым из пяти доменов β2-ГП-I, это подтверждалось взаимодействием аβ2-ГП-I с пептидами, соответствующими аминокислотным последовательностям в доменах I-IV, и нарушением связывания антител с β2-ГП-I при разрыве аминокислотной последовательности в домене V в положении 316-317. Однако в дальнейших исследованиях были получены доказательства, которые идентифицировали иммунодоминантный эпитоп в домене I [240].

Создание вариантов β2-ГП-I человека с точечными мутациями в домене I дало возможность установить главный эпитоп, включающий аргинин 39-аргинин 43, аспарагиновую кислоту 8 – аспарагиновую кислоту 9 и, возможно, область связывания между доменами I и II, при этом наиболее важный остаток – R39 [137, 579]. Этот эпитоп является зависимым от конформационной структуры молекулы β2-ГП-I. В циркулярной конформации β2-ГП-I домен I взаимодействует с доменом V, при этом криптический эпитоп прячется. Когда β2-ГП-I принимает S-форму, эпитопы закрываются углеводными цепями доменов III и IV, предупреждая связывание β2-ГП-I с антителами. Только после удаления углеводных цепей антитела к домену I были способны связываться с β2-ГП-I [430]. В открытой форме в J-конфигурации криптический эпитоп β2-ГП-I экспонируется и становится доступным для связывания с антителом. У мышей антитела к домену I продуцировались только после введения β2-ГП-I в открытой форме, комплекса β2-ГП-I/КЛ или самого домена I, но не доменов II-V [328].

Некоторые факторы, например, оксидативный стресс, могут привести к экспонированию на поверхности молекулы β2-ГП-I криптического эпитопа. У

здоровых людей в плазме преобладает свободная тиоловая форма β2GPI с разорванным дисульфидным мостом, тогда как в условиях оксидативного стресса в этих сайтах образуются дисульфидные связи, что, возможно, приводит к экспонированию криптического эпитопа В-клеткам [275]. Показано, что у пациентов с АФС уровень окисленного β2-ГП-I в плазме значимо выше, чем у асимптоматических носителей аФЛ и здоровых доноров. Кроме того, связывание аβ2-ГП-I, полученных от пациентов с АФС, с β2-ГП-I после обработки оксидоредуктазой снижается [416].

В эксперименте *in vivo* у крыс, обработанных ЛПС, отложение β2-ГП-I-зависимых IgG аФЛ человека на эндотелии наблюдалось немедленно после инфузии [566]. По-видимому, β2-ГП-I может подвергаться конформационному изменению при связывании с фосфолипидной поверхностью клеток-мишеней, экспонируя криптический эпитоп, который становится доступным для специфических антител. Приведенное доказательство предполагает, что β2-ГП-I становится иммуногенным вследствие конформационного изменения. Домен I, являясь скрытым, не индуцирует иммунной толерантности в противоположность другим доменам. Следовательно, домен I может индуцировать образование специфических аутоантител более легко, чем другие домены [121].

Совсем недавно было установлено, что экспонирование домена I в иммобилизованном β2-ГП-I значительно различается в имеющихся коммерческих иммуноферментных тест-системах в связи с гетерогенностью методов очистки или процедур наслоения [584]. Отмечалось, что β2-ГП-I экспонирует домен I только при наслоении на микропланшеты с гидрофильной поверхностью [324]. Изменения конформации β2-ГП-I приводят к значительной вариабельности результатов анализов, наблюдаемой при детекции антител к домену I.

Недавно был создан хемилюминесцентный иммуноанализ, который основан на использовании рекомбинантного домена I, связанного с парамагнитными частицами, и применении технологии BIO-FLASH [121]. При сравнении ХЛИА и ИФА наблюдалось хорошее совпадение количественных и

качественных результатов и подобная эффективность дифференцировки пациентов с АФС от здоровых доноров [120, 594].

Немного исследований было посвящено изучению распространенности антител к домену I β2-ГП-I и их ассоциации с клиническими проявлениями АФС. Распространенность антител к домену I при ПАФС была выше, чем при вторичном АФС, ассоциированном с другими системными АИЗ [120, 199]. Была зарегистрирована строгая ассоциация между антителами к домену I и позитивным тестом на ВА, который является наиболее мощным предиктором клинических событий при АФС [379]. Большинство клинических исследований фокусировалось на ассоциации антител к домену I с тромбозом. Многие авторы подтвердили взаимосвязь между антителами к домену I и тромботическими событиями как в венозном, так и артериальном сосудистом русле [117, 227, 324]. В большом многоцентровом исследовании была продемонстрирована ассоциация антител к домену I с тромбозом (OR 3,5; 95% CI [2,3-5,4]) и осложнениями беременности (OR 2,4; 95% CI [1,4-4,3]), более выраженная, чем у аβ2-ГП-I, определяемых с помощью стандартного анализа [529]. Антитела к домену I были идентифицированы как преобладающие у пациентов с сосудистым и акушерским АФС и выявлялись, соответственно у 78,2% и 61,3% пациентов [227].

По данным недавнего систематического обзора (2015), распространенность IgG антител к домену I β2-ГП-I составляет у пациентов с АФС 44%, в группе сравнения с другими АИЗ – 31,6%, у здоровых доноров – 3,3% [248]. Высокая распространенность IgG антител к домену I β2-ГП-I у пациентов с АФС в крупных исследованиях представляет большой интерес, так как эти аФЛ строго вовлекаются в патогенез АФС.

Кроме АФС, антитела к домену I β2-ГП-I представляли главную эпитопную специфичность при таких АИЗ, как СКВ и недифференцированное заболевание соединительной ткани. В контрольных популяциях, напротив, позитивность на антитела к домену I была довольно низкой. IgG аβ2-ГП-I, изолированные из сыворотки носителей аФЛ, пациентов с лепрой или детей с атопическим дерматитом распознавали преимущественно эпитопы домена IV или V [105, 170,

227]. Предполагается, что соотношение между антителами к домену I и доменам IV и V, может быть использовано для дифференцировки патогенных аβ2-ГП-I от непатогенных.

Кроме того, у пациентов с тройной позитивностью на аФЛ в средних или высоких титрах и более высоким риском развития осложнений наблюдаются высокая частота и высокие титры антител к домену I β2-ГП-I [66, 227]. В связи с этим, предполагается, что IgG антитела к домену I могут повысить предиктивное значение профиля аФЛ и быть полезными для стратификации пациентов с АФС по риску осложнений.

Таким образом, ассоциация антител к домену I с тромбозом и осложнениями беременности является более выраженной, чем у аβ2-ГП-I, определяемых с помощью стандартного анализа. Антитела к домену I являются преобладающими у пациентов с АФС по сравнению с антителами к другим доменам β2-ГП-I. Наблюдается выраженная корреляционная связь между антителами к домену I β2-ГП-I и позитивностью на ВА. Включение антител к домену I в профиль определяемых аФЛ может повысить его диагностическую значимость для АФС.

В 1994 году были впервые обнаружены антитела к аннексину А5 у женщин с предшествующей историей привычной потери плода и у женщин с преэклампсией [54]. Затем было показано, что IgG-антитела к Ан А5 могут представлять независимый фактор риска необъяснимой ранней потери плода (OR 3,2; 95% CI 1,2-8,1) [81]. В последующие годы были доложены результаты нескольких исследований с противоречивыми выводами. В некоторых из них авторы нашли ассоциацию аАн А5 с потерями беременности [53, 69, 100, 449], а в других пришли к противоположному заключению [50, 60].

Показано, что 5,5% женщин с ПНБ и только 1,1% здоровых женщин были позитивными на аАн А5 [53]. Антитела к Ан А5 класса G ассоциировались с первой ранней потерей беременности (OR 3,2; 95% CI [1,1-9,1]), даже у пациенток, негативных на классические аФЛ [99]. Как показал многофакторный регрессионный анализ, антитела к β2-ГП-I и Ан А5 ассоциируются,

соответственно, с ранними и поздними привычными выкидышами и являются независимыми маркерами риска ПВ [69].

Bizzaro N. и соавт. (2005) в ретроспективном исследовании показали, что аАн А5 ассоциируются с необъяснимым ПНБ независимо от присутствия аКЛ [449]. Частота выявления аАн А5 у пациенток с ПНБ составляла 17%, у пациенток, негативных на аКЛ, – 19%. Однако в проспективном исследовании, проведенном в группе здоровых женщин, значение аАн А5 для прогнозирования выкидыша не было подтверждено [32].

В противоположность, Alijotas-Reig J. и соавт. (2010) не нашли ассоциации между аАн А5 и ПВ или необъяснимой потерей плода в ретроспективном исследовании при небольшом размере исследуемых групп [50]. В другом исследовании у пациенток с ПВ позитивность на аАн А5 ассоциировалась с позитивностью на аФЛ, при этом аАн А5 не были независимым фактором риска для ПВ [60].

В плазме крови у женщин с ПВ, позитивных на аФЛ, на 6-ой и 8-ой неделе беременности были найдены более высокие уровни Ан А5 по сравнению с такими же пациентками без аФЛ. Предполагается, что аФЛ могут вытеснять Ан А5 с анионной фосфолипидной поверхности синцитиотрофобласта и, таким образом, способствовать активации коагуляции [444]. Продемонстрировано, что IgG аАн А5 играют важную роль в развитии состояния гиперкоагуляции как при первичном, так и при вторичном АФС [484].

Сообщается о высокой распространенности IgM и IgG аАн А5 у пациенток с идиопатическим ПВ по сравнению с рожавшими здоровыми женщинами, при этом IgM-антитела к Ан А5 имеют более высокую диагностическую точность в отношении ПВ и ассоциируются с более высоким риском ПВ, чем IgG [56]. В другом исследовании повышенные уровни IgM-антител к Ан А5 у пациенток с АФС ассоциировались с ПНБ (OR 23,8; 95% CI [2,2-262,5]) [443].

По данным Bećarević M. и соавт. (2016), ПНБ ассоциируется с двойной позитивностью на IgM аАн А5 и ВА или тройной позитивностью на IgM-антитела к Ан А5, β2-ГП-I и ВА, тогда как венозный тромбоз ассоциируется с тройной

позитивностью на IgM-антитела к Ан А5, β2-ГП-I и IgG аКЛ[133]. Предполагается, что клинические проявления ПАФС усиливаются с повышением числа положительных тестов на традиционные аФЛ и IgM аАн А5.

В лаборатории Rand J.H. (2004) был создан функциональный анализ, основанный на концепции, что Ан А5 обладает потенциальными антикоагулянтными свойствами, образует защитный щит из двумерных кристаллов над фосфолипидной поверхностью трофобласта или сосудистого эндотелия, блокируя доступность фосфолипидов для критических ферментов реакций коагуляции [210]. Тест на резистентность к антикоагулянтной активности Ан А5 является двухстадийным коагуляционным анализом, который имитирует этот механизм на фосфолипидных суспензиях и оценивает влияние плазмы пациента на активность Ан А5 [191, 210, 472].

Показано, что пациенты с АФС, ассоциированным с сосудистым тромбозом, имеют резистентность к антикоагулянтной активности Ан А5, которая представляет новый механизм тромбоза при АФС [210]. При этом плазмы от пациентов с тромбоэмболией и аФЛ уменьшают как связывание Ан А5 с фосфолипидами, так и антикоагулянтную активность Ан А5. Согласно объединенным данным резистентность к Ан А5 имеется у половины (52%) пациентов с АФС и лишь у 2-5% здоровых доноров. Результаты анализа на резистентность к антикоагулянтной активности Ан А5 хорошо коррелируют с аФЛ, распознающими домен I β2-ГП-I, в когорте пациентов с АФС [191].

Женщины с ПНБ имеют сниженные антикоагулянтные соотношения по сравнению с контролем (188% против 238%), пониженные уровни Ан А5 в плазме, сниженное связывание Ан А5 с фосфолипидами [472]. Эти данные поддерживают концепцию значимой роли Ан А5 в сохранении беременности. При акушерском АФС часто находят резистентность к антикоагулянтной активности Ан А5 и повышенные уровни IgG антител к домену I β2-ГП-I [479], между которыми наблюдается обратная корреляционная связь. Предполагается, что резистентность к активности Ан А5 может быть механизмом потери

беременности, ассоциированным с антителами к домену I β2-ГП-I или аФЛ другой специфичности.

Таким образом, данные о наличии ассоциации между антителами к Ан А5 и потерей беременности, полученные в генеральной популяции, остаются противоречивыми. Однако опосредованное аФЛ разрушение защитного кристаллического щита из Ан А5 на поверхности синцитиотрофобласта или эндотелия может быть механизмом, приводящим к тромбозу и потере беременности при АФС. IgM аАн А5 ассоциируются с ПНБ, а двойная и тройная позитивность на аФЛ, включая IgM аАн А5, - также с венозным тромбозом. Пациенты с АФС и сосудистым тромбозом проявляют резистентность к антикоагулянтной активности Ан А5.

Еще в 1980-ых годах впервые были обнаружены антитела к протромбину (аПТ) у пациентов с положительным тестом на ВА, показано важное значение аПТ для активности ВА, ингибирование ВА протромбиназной активности, опосредованной эндотелиальными клетками, взаимодействие фракции IgG, обладающей активностью ВА, с комплексом фосфолипидов с ПТ.

Распознавание ПТ антителами в значительной степени определяется формой, в которой антиген представлен на твердой фазе. Антитела связываются с ПТ, иммобилизованным на планшетах, облученных рентгеновскими лучами (аПТ) [214], или с комплексом ФС/ПТ, образованным в присутствии ионов кальция, в котором ПТ подвергается конформационному изменению (аФС/ПТ) [220]. Хотя аПТ и аФС/ПТ, по-видимому, относятся к различным популяциям аутоантител, они могут обнаруживаться у одного пациента одновременно.

Имеющиеся данные поддерживают существование двух типов аПТ с активностью ВА и без нее. Так Pengo V. и соавт. (2010) доложили об аПТ, которые имели более низкую распространенность в когорте пациентов с ВА по сравнению с аβ2-ГП-I и не ассоциировались с клиническими признаками АФС [452]. В противоположность, Atsumi T. и соавт. (2000) обнаружили аФС/ПТ, которые строго коррелировали с ВА [115].

По данным систематического обзора Galli M. и соавт. (2003), ассоциация между аПТ и тромбозом была значимой только в 17 случаях из 46 [58]. По результатам многофакторного анализа только в 2 случаях из 8 аПТ были признаны независимыми факторами риска тромбоза, а в 3 случаях аПТ лишь повышали риск, обусловленный наличием ВА или аКЛ.

По результатам проспективного исследования, выявление IgG аПТ ассоциируется с повышенным риском тромбоза и предсказывает более высокий риск тромбоэмболических событий, главным образом, у пациентов с позитивным ВА [33]. IgG аПТ являются наиболее полезным предиктором тромбоза у пациентов с СКВ [138]. Добавление к тройной позитивности на аКЛ, аβ2-ГП-I и ВА четвертой позитивности на аПТ ассоциируется с повышением риска тромбоза в 30 раз.

Многие исследования также показали, что определение аФС/ПТ является полезным для диагностики АФС у пациентов с системными АИЗ, особенно при негативных рутинных тестах, так как наличие аФС/ПТ ассоциируется с тромботическими проявлениями АФС [103, 115]. Кроме ассоциации с венозным тромбозом и активностью ВА, сообщается, что аФС/ПТ являются строгим независимым фактором риска акушерских осложнений в когорте пациентов с системными АИЗ [211].

Важность аФС/ПТ как диагностического маркера АФС поддерживается сообщением об обнаружении повышенных уровней аФС/ПТ у 5,6% пациентов с подозрением на АФС в отсутствие аКЛ и аβ2-ГП-I [68]. Кроме того, при тестировании шести аФЛ в 23 возможных комбинациях показано, что профиль, включающий ВА, аβ2-ГП-I и аФС/ПТ, имел лучшую диагностическую точность как для АФС в целом, так и отдельно для тромбоза и потери беременности (OR 3,73(95% CI [1,82–5,38]); OR 3,75(95% CI [2,13–6,62]) и OR 4,82(95% CI [2,17–10,72]), соответственно) и лучшую специфичность при сравнении с другими комбинациями тестов, включая профиль текущих классификационных критериев АФС [169].

По данным систематического обзора, аПТ и аФС/ПТ являются факторами риска тромботических событий [101]. Хотя оба вида антител к ПТ повышают риск тромбоза, наличие аФС/ПТ сопряжено с более высоким риском артериального и/или венозного тромбоза, чем наличие аПТ (OR 5,11; 95 % CI [4,2–6,3] и OR 1,82; 95 % CI [1,44–2,75), соответственно).

В немногочисленных исследованиях изучалась ассоциация антипротромбиновых антител с неблагоприятными исходами беременности, в некоторых случаях не удалось найти ассоциацию между аПТ и патологией беременности [79]. В противоположность, Akimoto T. и соавт. (2001) выявили строгую специфическую ассоциацию между различными типами аПТ и тяжелой преэклампсией и спонтанным абортом [104]. Исследование Bertolaccini M.L. и соавт. (2005) показало значительную ассоциацию как аФС/ПТ, так и аПТ с необъяснимой гибелью морфологически нормального плода после 10 недели гестации [103]. Позже клиническое значение аПТ и аФС/ПТ у женщин с неблагоприятными исходами беременности было подтверждено в исследованиях Marozio L. и соавт. [102] и Vlagea A. и соавт. [80]. Сообщалось, что аФС/ПТ являются более строгим независимым фактором риска акушерских осложнений по сравнению с ВА, аКЛ и анти-β2-ГП-I [211].

По данным Zigon P. и соавт. (2015), у женщин с акушерскими проявлениями, отнесенными к АФС, выявлялась высокая распространенность аФС/ПТ и аКЛ (соответственно 13% и 12,4%), за которыми следовали ВА (7,7%) и аβ2-ГП-I (7,1%) [81]. Антитела к КЛ и ФС/ПТ представляли повышенный риск для акушерских осложнений (OR 7,4; 95% CI [1,6–34,5]; OR 7,4; 95% CI [1,5–35,2]). Однако аКЛ коррелировали только с поздними осложнениями беременности и преждевременными родами, тогда как аФС/ПТ были единственными аФЛ, ассоциированными с ПВ на ранних сроках, а также с поздними осложнениями беременности и преждевременными родами. При этом 7% пациенток были позитивными на аФС/ПТ и негативными на все другие тестированные аФЛ, а 63% из них страдали ПНБ на ранних сроках. Предполагается, что несмотря на низкую диагностическую значимость аФС/ПТ

для потери беременности (значение AUC 0,549), тестирование на аФС/ПТ может улучшить диагностику АФС за счет повышения чувствительности.

Недавно в международном мультицентровом исследовании показано, что определение IgG антител к комплексу ФС/ПТ имеет высокую диагностическую точность как при сосудистом, так и при акушерском АФС [246]. При определении клинически значимых тестов для акушерского АФС тест на IgG-антитела к комплексу ФС/ПТ признается пригодным для использования в рутинной практике у пациенток с ПНБ [212]. Так как аФС/ПТ могут быть единственными аФЛ у пациенток с клиническими признаками АФС, определение ФС-зависимых аПТ может способствовать более полной идентификации пациентов с АФС.

Таким образом, существуют две разные субпопуляции антипротромбиновых антител, одна связывается с ПТ на анионной поверхности, другая - с комплексом ФС/ПТ. Хотя, как аПТ, так и аФС/ПТ являются факторами риска тромбоза, наличие аФС/ПТ сопряжено с более высоким риском тромбоза, чем аПТ. При этом аФС/ПТ строго коррелируют с активностью ВА в отличие от аПТ. У пациентов с системными АИЗ аФС/ПТ являются независимым фактором риска акушерских осложнений. Определение IgG аФС/ПТ имеет высокую диагностическую значимость как при сосудистом, так и при акушерском АФС и может способствовать более полной идентификации пациентов с АФС, однако требуется проведение стандартизации данных анализов.

1.5 Патогенетические механизмы опосредованного антифосфолипидными антителами тромбоза

Установлена выраженная ассоциация аФЛ с тромботическими событиями, на животных моделях АФС получены доказательства причинной роли аФЛ в сосудистых нарушениях как в венозном, так и в артериальном русле [93, 565]. Развитию тромбоза у пациентов с АФС содействуют многочисленные механизмы,

вовлекающие клетки сосудистого русла (ЭК, моноциты и тромбоциты) и гуморальные факторы, регулирующие гемостаз (факторы коагуляции, естественные антикоагулянты и фибринолитическая система), и воспаление (клетки воспаления, растворимые медиаторы воспаления и инфекционные агенты). Активация тромбоцитов, ЭК и моноцитов в сочетании с нарушениями в естественной антикоагулянтной и фибринолитической системах в ответ на действие аФЛ приводят к провоспалительному и протромботическому состоянию у пациентов с АФС. Основные механизмы протромботического действия аФЛ представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Возможные механизмы протромботического действия антифосфолипидных антител.

Нарушение функции естественных антикоагулянтов • Ингибирование антикоагулянтной активности β2-ГП-I • Нарушение функции системы протеина С, протеина S • Снижение активности антитромбина III • Вытеснение аннексина А5 с анионной фосфолипидной поверхности Клеточно-опосредованные нарушения • Повышенная прокоагулянтная активность эндотелиальных клеток – Повышенная экспрессия и активация TF – Повышенная экспрессия молекул адгезии – Нарушенный фибринолиз – Сниженная продукция простациклина – Нарушенная функция синтазы оксида азота • Повышенная активация/агрегация тромбоцитов и повышенная продукция тромбоксана А2 • Повышенная экспрессия моноцитами TF и оксидативный стресс

Действительно, показано, что воздействие аФЛ приводит к активации тромбоцитов, а также ЭК и моноцитов [86, 390, 420], к дисбалансу между простациклином ЭК и тромбоцитарным тромбоксаном А2. В экспериментах *in*

vivo и *in vitro* активация ЭК и моноцитов в присутствии аФЛ подтверждалась повышенной экспрессией молекул клеточной адгезии и тканевого фактора (TF). Под воздействием аФЛ ингибируется фибринолиз, нарушается функция естественных антикоагулянтов, включая систему протеина С, протеина S, антитромбин III, активируется коагуляция [595].

Однако тромботические события у пациентов с аФЛ возникают только изредка. Согласно гипотезе «двойного удара» аФЛ индуцируют прокоагулянтный фенотип клеток, что является «первым ударом», тогда как воспаление служит наиболее важным инициирующим фактором («вторым ударом») в развитии тромбоза и является центральным механизмом в патогенезе АФС [429, 595].

1.5.1 Индуцированная антифосфолипидными антителами активация тромбоцитов, эндотелиальных клеток и моноцитов

Частое обнаружение тромбоцитопении у пациентов с АФС и в животных моделях АФС было первым указанием на вовлечение тромбоцитов в патогенез АФС [234]. Кроме того, доказательство этого обеспечивалось корреляцией IgG аβ2-ГП-I с повышенной мочевой экскрецией тромбоксана B2, который является неактивным продуктом метаболизма тромбоксана A2, продуцируемого тромбоцитами и обладающего потенциальной агрегационной и вазоконстрикторной активностью [62].

Взаимодействие аФЛ с тромбоцитами зависит от экспонирования анионных фосфолипидов, особенно ФС, и присутствия димерного β2-ГП-I на поверхности тромбоцитов. Исследования показали, что аФЛ повышают экспрессию гликопротеинов на мембране тромбоцитов, особенно гликопротеина IIb/IIIa, который является главным рецептором фибриногена [86]. Показано, что аполипопротеин E рецептор 2 (ApoER2) и субъединица GPIbα рецептора GPIb-V-IX на мембране тромбоцитов играют важную роль в опосредованной аФЛ

активации тромбоцитов через митоген-активируемую протеинкиназу p38 (p38 MAPK) и в последующем тромбообразовании. По-видимому, активация этого сигнального пути опосредуется взаимодействием рецепторов с β2-ГП-I или комплексом β2-ГП-I/aβ2-ГП-I [577].

Pierangeli S.S. и соавт. показали активацию клеток эндотелия аФЛ в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на мышиных моделях, которая коррелировала с усилением тромбообразования [87]. При этом моноклональные и поликлональные аФЛ человека индуцировали экспрессию молекул клеточной адгезии ICAM-1, E-селектина, P-селектина и VCAM-1, которые необходимы для адгезии лейкоцитов и тромбообразования [439]. Тогда как у пациентов с аФЛ и тромбозом находили повышенные уровни растворимых молекул адгезии, таких как VCAM-1 и P-селектина.

Антитела к β2-ГП-I, выделенные из сыворотки крови больных ПАФС, в культуре ЭК человека индуцируют экспрессию генов, кодирующих хемокины (MIP 3, CCL20, CXCL3, CX3CL1, CXCL5, CXCL2, CXCL1), провоспалительные цитокины (IL-6, IL-1β, IL-8, TNF-α, рецепторы IL-18) и факторы роста (колониестимулирующие факторы гранулоцитов/макрофагов, фактор роста фибробластов) [13]. Хемокины вызывают рекрутирование и пролиферацию мононуклеарных клеток и гранулоцитов с усилением адгезии моноцитов к сосудистому эндотелию и накоплением макрофагов и нейтрофилов в ткани плаценты, что способствует развитию тромботических осложнений и акушерской патологии у больных АФС.

Многие исследователи приводят доказательства ключевой роли тканевого фактора в тромботических проявлениях АФС. ЭК и моноциты, обработанные аФЛ, имеют повышенную экспресию мРНК и белка TF наряду с повышенной секрецией IL-1β, IL-6 и IL-8 [234, 557, 601]. TF является специфическим высоко аффинным рецептором фактора коагуляции FVII/FVIIa и функционирует как ко-фактор FVIIa, формируя с FVIIa активный комплекс, который в присутствии ионов Ca2+ активирует фактор X. Этот процесс запускает физиологическую коагуляцию крови и тромбоз. Кроме того, у пациентов с АФС выявляются

повышенные уровни VEGF в плазме и повышенная экспрессия тирозинкиназных рецепторов (VEGFR1 (Flt-1)) на поверхности моноцитов, стимуляция которого VEGF может приводить к дальнейшему повышению экспрессии TF в моноцитах [587].

Активация ЭК, инициированная аФЛ, опосредуется через активацию сигнального пути p38 MAPK и нуклеарного фактора κB (NF-κB) [420], который после стимуляции проникает в ядро и индуцирует координированную экспрессию около 5000 генов, вовлеченных в воспаление, апоптоз, презентацию молекулами ГКГ класса I и внутриклеточную сигнальную систему. Путь p38 MAPK играет критическую роль в опосредовании эффекта аФЛ на различные типы клеток, включая моноциты, тромбоциты и ЭК. Активация p38 MAPK повышает активность цитокинов, таких как TNF-α, IL-1β, воспалительный цитокин макрофагов 3b, после воздействия комплекса β2-ГП-I/aβ2-ГП-I повышается экспрессия TF в моноцитах.

Исследования *in vivo* и *in vitro* показывают, что аннексин А2 (Ан А2) является высокоаффинным рецептором, через который β2-ГП-I связывается с клетками-мишенями. Однако Ан А2 не является трансмембранным протеином и не имеет пути внутриклеточной сигнальной трансдукции. Предполагается, что трансмембранный протеин TLR4 может ассоциироваться с Ан А2 на поверхности клетки и действовать как адаптор, облегчая внутриклеточную сигнальную трансдукцию [571]. Недавно подтверждена главная роль сигнальной системы TLR4 в опосредованной β2-ГП-I активации ЭК [31].

Allen K.L. и соавт. (2012) подтвердили критическую роль TLR4 в активации ЭК, индуцированной aβ2-ГП-I, и продемонстрировали, что сигнальный путь TLR4 опосредуется через мультипротеиновый комплекс на поверхности ЭК, который включает Ан А2, TLR4, кальретикулин и нуклеолин [31]. Каждый из этих протеинов является важным для активации ЭК. Имеется доказательство, что только IgG от пациентов с сосудистым тромбозом, но не осложнениями беременности, могли вызывать фосфорилирование p38 MAPK, NK-κB и повышение активности TF в моноцитах через TLR4.

Аннексин А2 опосредует активацию ЭК комплексом β2-ГП-I/aβ2-ГП-I и экспрессию прокоагулянтного фенотипа, повышение уровней TF, VCAM1 и других воспалительных молекул в циркуляции [595]. Аннексин А2 скорее, чем Fcγ-рецепторы является главным специфическим рецептором моноцитов, который вовлекается в усиление продукции TF, опосредованное β2-ГП-I и индуцированное aβ2-ГП-I [601].

В качестве рецепторов для β2-ГП-I на мембранах клеток были идентифицированы TLR2, мегалин, ApoER2, гликопротеин Ibα (GPIbα) и тромбоцитарный фактор 4 (PF4) [420]. На ЭК экспрессируются ApoER2, которые участвуют в связывании β2-ГП-I-зависимых аФЛ и содействуют последующей активации ЭК. Моноклональные и поликлональные аФЛ индуцируют продукцию TNF-α моноцитами через активацию внутриклеточного TLR8 [306]. Эндогенная стимуляция TLR7 и TLR8 играет роль в индуцированной аФЛ активации плазмацитоидных ДК и моноцитов, соответственно [90], а также в продукции провоспалительных медиаторов у пациентов с АФС [569].

1.5.2 Влияние антифосфолипидных антител на каскад коагуляции и фибринолитическую систему

Антифосфолипидные антитела могут воздействовать на каскад коагуляции, представляющий серию реакций, в которых профермент протеазы серина и его гликопротеиновый кофактор активируются, образуют активный комплекс и катализируют следующую реакцию в каскаде, в конечном итоге, приводя к образованию поперечно сшитого фибрина. При этом последовательно происходит активация плазменных факторов свертывания на фосфолипидных поверхностях и образование их комплексов. Активированный фактор IX (FIXa) является особенно важным, так как его недостаточность приводит к гемофилии В. FIXa образует

комплекс с FVIIIa, генерируя FXa, а впоследствии FXa работает в комплексе с FVa, превращая протромбин в тромбин [17].

Антипротромбиновые антитела, изолированные от пациентов с АФС и проявляющие активность ВА, усиливают связывание протромбина с поверхностью ЭК и имеют тромбогенные свойства *in vivo* [29]. Некоторые аПТ могут связывать тромбин и предупреждают его инактивацию антитромбином, содействуя тромбозу [319]. Неконтролируемая активация тромбина может активировать тромбоциты и также содействовать тромбогенному состоянию.

Chen P.P. и коллеги изолировали моноклональные IgG аФЛ от пациентов с АФС и показали, что 10 из 12 моноклональных аФЛ реагировали с FIXa, шесть аФЛ, реагирующих с тромбином, также взаимодействовали с FXa и значительно ингибировали инактивацию FXa антитромбином [506]. Последующий анализ плазмы пациентов с АФС продемонстрировал присутствие IgG антител к FIXa у 28,9% и IgG антител к FXa у 13,2% пациентов [65, 417]. Эти данные имеют особую важность, так как FIXa находится выше в каскаде коагуляции, чем тромбин, неконтролируемый FIXa может в большей степени содействовать тромбозу, чем неконтролируемый тромбин.

Активированный протеин С вместе с его неэнзиматическим кофактором протеином S является главным антикоагулянтом, который функционирует путем связывания и инактивации FVa и FVIIIa [283]. APC является протеазой серина, имеющей гомологичный ферментный домен с тромбином. Показано, что моноклональные аФЛ, реагирующие с тромбином, могут связываться с APC и препятствовать осуществлению его антикоагулянтной функции [35].

Антитромбин III является другим естественным антикоагулянтом, функция которого состоит в инактивации FXIIa, FXIa, FXa, FIXa, FVIIa и тромбина, причем эти эффекты стимулируются гепарином. Изолированные аФЛ, как было показано, ингибируют гепарин-зависимую активацию антитромбина в исследованиях *in vitro* вплоть до 80% [155]. Ингибирование активности антитромбина III может стимулировать тромбогенное состояние, так как многие активированные факторы остаются неконтролируемыми.

При активации фибринолитической системы профермент плазминоген превращается в плазмин, который затем разрушает фибрин, являющийся главным компонентом тромба. Этот процесс опосредуется преимущественно действием тканевого активатора плазминогена (tPA), активность которого регулируется, главным образом, ингибитором активатора плазминогена типа I (PAI-1), относящимся к ингибиторам протеазы серина [367]. Моноклональные аФЛ, реагирующие с тромбином, проявляют также значительное связывание с плазмином, нарушая фибринолиз. IgG-антитела к плазмину были обнаружены в плазме у 28% пациентов с АФС и нарушали растворение фибрина плазмином [318].

Из-за значительной гомологии плазмина и tPA аФЛ, реагирующие с плазмином, также взаимодействовали с tPA и в некоторых случаях понижали активность tPA в превращении плазминогена в плазмин [320]. Антитела к tPA были найдены в плазме у 15% пациентов с АФС и проявляли обратную корреляцию с активностью tPA.

Экспериментально доказано, что Ан А2 на поверхности клетки стимулирует активацию плазминогена tPA [52]. Более того, антитела к Ан А2 ассоциируются с историей тромбоза и наиболее распространены у пациентов с АФС, чем у здоровых доноров, пациентов с неаутоиммунным тромбозом или пациентов с СКВ без тромбоза. В экспериментах *in vitro* IgG-антитела к Ан А2 ограничивали генерацию плазмина ЭК вены пуповины человека от 34% до 83% [118].

Кроме того, аФЛ могут индуцировать тромбоз в плаценте и сосудистом русле путем нарушения функции естественного антикоагулянта Ан А5, разрушая антикоагулянтный щит, образованный Ан А5 над потенциально тромбогенными мембранными поверхностями трофобласта и эндотелия, экспрессирующими анионные ФЛ [82, 468]. Сосредоточение Ан А5 на фосфолипидной поверхности приводит к вытеснению факторов свертывания и предотвращает образование прокоагулянтных комплексов. У женщин с аФЛ и потерями беременности наблюдается значительное снижение содержания Ан А5, покрывающего межворсинчатые пространства в плаценте, по сравнению с контролем [97]. В

экспериментах *in vitro* продемонстрирована способность аФЛ вытеснять Ан А5 с поверхности монослоя клеток трофобласта и ЭК и усиливать коагуляцию плазмы, контактирующей с этими клетками [97]. Антифосфолипидные антитела мешают связыванию Ан А5 с анионными фосфолипидами и проявлению его антикоагулянтной активности [82]. Согласно гипотезе Rand J.H., нарушение связывания Ан А5 с отрицательно заряженными фосфолипидными поверхностями играет важную тромбогенную роль. При этом тромбоз рассматривается как результат вытеснения фосфолипид-связывающего протеина Ан А5 с фосфолипидной поверхности [82, 469]. Предлагается функциональный тест для оценки резистентности к антикоагулянтной активности Ан А5 в плазме и выявления этого механизма тромбоза у пациентов с аФЛ [527].

1.5.3 Активация системы комплемента в развитии опосредованного антифосфолипидными антителами тромбоза

Протеины комплемента вовлекаются в патогенез аФЛ-индуцированного тромбоза. Показано, что активация системы комплемента ассоциируется с протромботическим состоянием, обусловленным образованием мембраноатакующего комплекса, анафилатоксинов С3а и С5а, которые, взаимодействуя со специфическими рецепторами на поверхности моноцитов и ЭК, активируют эти клетки и индуцируют продукцию протромботических молекул, таких как TF. Недавно было доложено о взаимном влиянии системы комплемента и тромбоцитов, которое может способствовать связанной с комплементом тромбогенности [182].

Pierangeli S.S. и соавт. (2005) установили, что активация комплемента является главным условием увеличения размера тромба в мышиной модели тромбоза, обусловленного аФЛ [181]. Сниженное тромбообразование у мышей $C3^{-/-}$ и $C5^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа, а также уменьшение размера

тромбов у мышей, обработанных моноклональными анти-C5 антителами, подтвердило важную роль C3 и C5 при тромбозе, связанном с аФЛ [476].

Активация комплемента является распространенной при тромботическом АФС [179]. В сыворотке крови пациентов с ПАФС обнаруживались более низкие сывороточные уровни C3, C4 и CH50 по сравнению со здоровыми донорами и повышенные уровни C3a и C4a, что было проявлением гипокомплементемии вследствие активации системы комплемента и потребления протеинов комплемента. Однако ни у кого из пациентов с ПАФС не обнаруживались молекулы C5a, а уровень C5 у пациентов оставался в пределах нормального диапазона. Это могло быть обусловлено ингибиторным влиянием регуляторных факторов комплемента, таких как фактор H, мембранный кофакторный протеин (MCP), фактор ускоряющий распад (DAF) и рецептор 1 комплемента (CR1), которые, действуя на этапах каскада комплемента после образования C3a, предотвращают активацию поздних компонентов комплемента и продукцию C5a [360]. Установлено, что β2-ГП-I тоже функционирует как регулятор комплемента [605], содействует деградации и дальнейшему расщеплению C3/C3b и усиливает функцию фактора H. Кроме того, у пациентов с АФС распространены аутоантитела к фактору H, связанные с повторным венозным тромбозом [251].

У пациентов с АФС активация комплемента по классическому пути запускается иммунными комплексами через активацию компонента C1, при этом субкомпонент C1q связывается с иммунными комплексами, происходит изменение его конформации с последующим расщеплением C2 [533]. C1q участвует в клиренсе иммунных комплексов и апоптотических телец, причем нарушение этой функции C1q может привести к развитию аутоиммунитета [359, 446]. Недавно установлено, что C1q может напрямую взаимодействовать с анионными ФЛ и ФЛ-связывающими протеинами и активировать путь комплемента в отсутствие иммунных комплексов [352, 386]. Однако инициатор активации классического пути комплемента у пациентов с АФС остается неустановленным.

В научной литературе описаны высокоаффинные анти-C1q аутоантитела, которые распознают наиболее иммуногенную коллагеноподобную часть молекулы C1q [359, 408, 446]. Анти-C1q антитела выявляются при целом ряде системных аутоиммунных и инфекционных заболеваний. Распространенность анти-C1q аутоантител при СКВ составляет 30-60%, тогда как в здоровой популяции частота встречаемости анти-C1q аутоантител колеблется от 2% до 8% [2, 382]. Определение анти-C1q антител имеет прогностическое значение для развития волчаночного нефрита, его рецидивов и используется для мониторинга активности заболевания [2, 219].

В сыворотке больных АФС часто обнаруживаются анти-C1q антитела, титр которых не ассоциируется с каким-либо специфическим клиническим проявлением АФС или определенными аФЛ [183]. Однако тяжесть АФС, по-видимому, коррелирует с наличием анти-C1q антител, что подтверждается более высокой распространенностью анти-C1q антител у больных АФС с повторными рецидивами. Анти-C1q антитела ассоциируются с активацией комплемента и могут участвовать в патогенезе АФС, особенно в случае рефрактерных эпизодов.

У пациентов с АФС могут продуцироваться аутоантитела к связанной форме C1q на отрицательно заряженной фосфолипидной поверхности клеток и тканей, подобно антителам к фосфолипид-связывающим протеинам, например, β2-ГП-I. При этом анти-C1q антитела, связываясь с C1q на фосфолипидной поверхности, усиливают активацию комплемента. В настоящее время анти-C1q антитела рассматриваются как отдельный вид аФЛ, а C1q как ФЛ-связывающий протеин.

Согласно гипотезе Oku K. и соавт. (2016) при АФС комплемент постоянно активируется по классическому пути, но обычно до этапа образования C3 [183]. Однако при усилении активации комплемента биологическими стрессорами или триггерами «второго удара», такими как инфекция и повреждение ткани, ингибиторные функции регуляторов комплемента преодолеваются и продуцируется C5a. При наличии анти-C1q антител под действием «второго удара» прокоагулянтная активность чрезмерно повышается, приводя к

необходимости антитромботического лечения. Эта гипотеза объясняет роль анти-C1q антител в рецидивировании тромбоза у пациентов с АФС.

Таким образом, у пациентов с АФС является распространенной гипокомплементемия вследствие активации классического пути комплемента, часто обнаруживаются аутоантитела к C1q компоненту комплемента, высокие сывороточные титры этих антител ассоциируются с тяжелой формой АФС с рецидивами тромбоза. Анти-C1q антитела способствуют усилению активации комплемента и тромбообразованию.

1.6 Патофизиологические механизмы опосредованной антифосфолипидными антителами потери беременности

На экспериментальных моделях получены доказательства роли тромбоза в развитии осложнений беременности, отнесенных к клиническим проявлениям АФС, однако в эпидемиологических исследованиях это подтверждается не всегда. По данным систематического обзора, только одна треть женщин с аФЛ демонстрируют признаки тромбоза в маточно-плацентарных сосудах [588]. В настоящее время имеются доказательства прямого воздействия аФЛ на клетки трофобласта, влияющего на их свойства, включая миграцию, инвазию и дифференцировку. При этом усиливается апоптоз, нарушаются пролиферация, инвазивность, экспрессия молекул адгезии и секреция ХГЧ [384, 572]. Возможные патогенетические механизмы потери плода при АФС представлены в таблице 1.2. Имеются доказательства влияния аФЛ на трансформацию материнских спиральных артерий, созревание и дифференцировку децидуальных клеток [595]. Осложнения беременности могут ассоциироваться с провоспалительным состоянием в тканях маточно-плацентарной области. На экспериментальных моделях продемонстрирована роль комплемента, TF, TNF-α и хемокинов CC при опосредованной аФЛ потере плода.

Таблица 1.2 – Патогенетические механизмы потери беременности, опосредованные действием антифосфолипидных антител.

- Тромбоз в плацентарной ткани
- Локальное воспаление
- Активация комплемента
- Нарушение формирования и развития плаценты
  - – Индукция апоптоза и повреждение эмбриональных и плацентарных клеток
  - – Ингибирование пролиферации и дифференцировки клеток трофобласта
  - – Снижение инвазивности трофобласта, нарушение процессов адгезии и инвазии трофобласта
  - – Снижение секреции хорионического гонадотропина
  - – Индукция воспалительного фенотипа трофобластических и децидуальных клеток
  - – Нарушение дифференцировки клеток эндометрия
  - – Нарушение ангиогенеза

1.6.1 Влияние антифосфолипидных антител на формирование и развитие плаценты

При физиологических условиях β2-ГП-I обычно экспрессируется на мембране клеток трофобласта, что поддерживает прямую реактивность аФЛ с трофобластом, а также плацентарный тропизм аФЛ. Во время формирования плаценты происходит ремоделирование ткани, при котором клетки трофобласта, экспрессируют отрицательно заряженные фосфолипиды, преимущественно ФС, на наружной поверхности клеточной мембраны, обеспечивая связывание β2-ГП-I. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано взаимодействие мышиных и человеческих моноклональных аФЛ и поликлональных антител, полученных от больных АФС, с монослоем клеток трофобласта, зависимое от присутствия β2-ГП-I [572]. Моноклональные антитела к β2-ГП-I оказывают ингибиторный эффект

на пролиферацию клеток линии хориокарциномы человека и на дифференцировку вневорсинчатого трофобласта [39, 41]. Необходимость β2-ГП-I для оптимальной имплантации и плацентарного морфогенеза подтверждается выявлением у мышей, потерявших β2-ГП-I, соответствующих дефектов на ранних сроках беременности [396].

Под воздействием аФЛ может нарушаться созревание, дифференцировка и инвазивность клеток трофобласта. Гистологические исследования подтвердили, что в плацентах женщин с ПНБ часто наблюдается неадекватная глубина инвазии цитотрофобласта (54%) и нарушение образования синцития (44%) [332]. При ранней потере беременности, ассоциированной с аФЛ, нарушения эндоваскулярной инвазии трофобласта являются более частыми, чем тромбоз в межворсинчатом пространстве, по сравнению с потерями беременности другой этиологии или физиологической беременностью [204].

В экспериментах на эмбрионах крыс и в культурах плацентарных эксплантатов, инкубированных с поликлональными IgG от больных СКВ и АФС, ассоциированными с потерей беременности, или с моноклональными антителами к ФС, было продемонстрировано усиление апоптоза клеток [572]. Обработка аФЛ стимулировала апоптоз клеток трофобласта, нарушая экспрессию регуляторов апоптоза Bax и Bcl-2 [61]. Воздействие аФЛ также могло приводить к изменению механизма смерти клеток трофобласта, а именно замене апоптоза на некроз, что подтверждалось снижением экспрессии TRAIL и других генов, потенциально вовлеченных в апоптоз, после обработки аФЛ в экспериментах *in vitro* [573]. На мышиной модели показана важная роль в предупреждении потери плода, вызванной системным воспалением и аФЛ, рецептора D6 с функцией ловушки для воспалительных хемокинов, который экспрессируется в плаценте на внедряющихся вневорсинчатых трофобластах и на апикальной стороне клеток синцитиотрофобласта [463].

Недавно показано, что аФЛ могут влиять на функцию и жизнеспособность синцитиотрофобласта, проникая в клетки посредством рецепторов липопротеинов низкой плотности [91] и вызывая дисфункцию митохондрий [213]. Как мышиные

моноклональные, так и человеческие поликлональные аФЛ нарушают функцию митохондрий и повышают высвобождение из них цитохрома С [91]. Это могло быть одним из механизмов, приводящих к смерти клеток синцитиотрофобласта под воздействием аФЛ, так как цитохром С запускает стадию реализации программы апоптоза. В других популяциях клеток трофобласта аФЛ вызывают негативные клеточные эффекты, передавая сигнал через рецептор врожденного иммунитета TLR4 и запуская активацию инфламмасомы NLRP3 [34, 89, 315].

Под влиянием аФЛ заметно снижается образование синцития клетками цитотрофобласта *in vitro* [572]. Так как для слияния клеток трофобласта требуется активация инициаторных каспаз, воздействие аФЛ на экспрессию каспаз в клетках трофобласта может служить механизмом нарушения образования синцития [88]. Мышиные моноклональные антитела к ФС и β2GPI, а также поликлональные IgG больных АФС, как было показано, препятствуют межтрофобластическому слиянию, снижают инвазивность трофобласта и секрецию ХГ [572]. Кроме того, аФЛ ингибируют продукцию трофобластом плацентарного лактогена человека. Воздействие аФЛ, приводящее к снижению секреции ХГ трофобластом, опосредуется через TLR4 [84, 315]. Это негативное влияние аФЛ на эндокринную функцию синцитиотрофобласта может быть результатом прямого действия аФЛ на продукцию гормонов или опосредованного через нарушение образования синцития.

Формирование и развитие плаценты характеризуется тонко настроенной регуляцией экспрессии молекул клеточной адгезии и молекул сигнальных систем, активации MMPs, ангиогенеза и трансформации спиральных артерий. Под влиянием аФЛ может изменяться экспрессия трофобластом отдельных интегринов и кадгеринов, потенциально воздействующих на его инвазию в децидуальную оболочку [94]. Показано, что аФЛ нарушают инвазию трофобласта, вызывая снижение экспрессии интегрина-1 и VE-кадгерина и повышение экспрессии интегрина-α5 и Е-кадгерина, так как первые усиливают инвазивность цитотрофобласта, а последние ее ограничивают. Обработка клеток трофобласта аФЛ снижала экспрессию матриксных металлопротеиназ [202, 399] и повышала

экспрессию ингибиторов металлопротеиназ [231]. У пациенток с АФС наблюдалась пониженная экспрессия гепарин-связывающего фактора роста, подобного эпидермальному фактору роста (HB-EGF), что также могло играть роль в нарушении развития плаценты [202].

Адекватная инвазия трофобласта в материнскую децидуальную оболочку является критической для успешной беременности. При недостаточной эндоваскулярной инвазии трофобласта в материнские спиральные артерии сильные потоки крови могут вызывать физическое или оксидативное повреждение плаценты и способствовать ранней потере беременности [144]. Позже во время беременности, если инвазия трофобласта не трансформирует материнские спиральные артерии в сосуды большего диаметра, адаптированные для эффективного тока крови, плацента может подвергнуться повреждению вследствие ишемии и реперфузии [347]. Это может привести к другим осложнениям беременности, таким как преэклампсия и задержка внутриутробного развития плода, которые также ассоциируются с аФЛ.

Антифосфолипидные антитела, особенно, aβ2-ГП-I, взаимодействуют не только с трофобластом, но также с децидуальными стромальными клетками человека, таким образом, влияя на материнскую часть плаценты. Имеются доказательства влияния аФЛ на трансформацию материнских спиральных артерий, а также на созревание и дифференцировку клеток эндометрия в децидуальные [572]. По данным систематического обзора, децидуальная оболочка у женщин с АФС характеризуется признаками воспаления. Связываясь с монослоем децидуальных стромальных клеток, поликлональные и моноклональные β2-ГП-I-зависимые аФЛ индуцировали в них провоспалительный фенотип, который проявлялся повышенной экспрессией ICAM-1 и секрецией TNF-α [233]. В биоптатах эндометрия, взятых у пациенток с АФС и ПНБ, были обнаружены нарушения дифференцировки клеток эндометрия и снижение уровня экспрессии регуляторного протеина комплемента DAF [334].

Ангиогенез в эндометрии ингибировался аФЛ в экспериментах *in vitro* в культуре эндометриальных ЭК человека и *in vivo* на мышиной модели [572]. На

модели трансформации спиральных артерий в матригеле *in vitro* были продемонстрированы пониженная миграция и нарушенное взаимодействие клеток трофобласта с ЭК под влиянием аФЛ [111]. Поликлональные аФЛ человека значительно снижали число и полную длину образованных сосудистых трубок, продукцию VEGF и матриксных металлопротеиназ, активность связывания фактора транскрипции NF-κB с ДНК в эндометриальных ЭК человека, а также уменьшали образование новых сосудов у инокулированных мышей [202].

Лишь малая часть исследований посвящена сигнальным путям, которые активируются аФЛ в трофобластических и децидуальных клетках. Предполагается, что несколько рецепторов опосредуют взаимодействие аβ2-ГП-I с клетками трофобласта и децидуальной оболочки [233]. Рецепторы Ан А2 и TLR4, как было показано, являются одинаково важными для активации моноцитов, трофобластических и децидуальных клеток [89, 233]. Кроме того, недавно установлено, что член семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности ApoER2 опосредует изменение функции клеток трофобласта и осложнения беременности, индуцированные аФЛ [107]. Под влиянием аФЛ через вовлечение TLR4 и ApoER2 нарушается миграция клеток трофобласта. Нарушение инвазии клеток трофобласта под воздействием IgG пациенток с акушерским АФС опосредуется TLR4 через MyD88-зависимый внутриклеточный путь [465]. Под влиянием аФЛ уменьшается активность передатчика сигнала и активатора транскрипции 3 (STAT3) и экспрессия IL-6 в клетках трофобласта, что также ограничивает их миграцию [92]. В связи с этим женщины с аФЛ и ПНБ имеют повышенный риск развития акушерских осложнений, связанных с нарушенной глубокой плацентацией, в том числе преэклампсии. Более того, аФЛ, негативно действующие на ангиогенез в эндометрии человека, вызывают активацию фактора транскрипции NF-κB в эндометриальных клетках [92], который контролирует экспрессию ряда важных генов, кодирующих цитокины, хемокины, молекулы клеточной адгезии, рецепторы иммунокомпетентных клеток, факторы роста и реактанты острой фазы воспаления.

Антифосфолипидные антитела воздействовали в экспериментах *in vitro* на продукцию клетками трофобласта не только гормонов, но и цитокинов и других сигнальных молекул. Показано, что аβ2-ГП-I могли запускать воспалительный ответ в клетках трофобласта, повышая секрецию IL-8, моноцитарного хемотаксического протеина-1(MCP-1), GRO-α /CXCL1, и IL-1β [89]. Обнаружение очагов воспаления в плацентах, подверженных воздействию аФЛ, указывает на провоспалительные изменения в клетках трофобласта, продуцирующих цитокины [554]. Кроме того, цитокины могут воздействовать на маточно-плацентарное окружение и проникать в материнскую циркуляцию, оказывая общее действие на системы организма матери.

Показано, что аФЛ повышают секрецию клетками трофобласта IL-1β в экспериментах *in vitro* [34, 89]. IL-1β является плейотропным цитокином, который рекрутирует моноциты и нейтрофилы и активирует макрофаги. Кроме того, IL-1β может также усиливать апоптоз клеток трофобласта [458]. По этой причине повышенные уровни IL-1β могут влиять не только на иммунные клетки в окружении развивающейся плаценты, но также могут прямо регулировать функцию и жизнеспособность трофобласта на клеточном уровне. Возможно, в присутствии аФЛ изменяется продукция трофобластом других сигнальных молекул, например, провоспалительных цитокинов и антиангиогенных факторов, что также может играть роль в развитии неблагоприятных исходов беременности при АФС.

1.6.2 Значение системы комплемента в патогенезе индуцированной антифосфолипидными антителами потери беременности

В последние годы много внимания уделяется исследованию связи между активацией каскада комплемента и акушерским АФС [420, 595]. Salmon J.E. и de Groot P.G. показали важность системы комплемента в патогенезе потери

беременности, индуцированной аФЛ/аβ2-ГП-I, и выдвинули гипотезу, согласно которой аФЛ, связанные с трофобластом, активируют систему комплемента по классическому пути, генерируя продукты расщепления, вызывающие плацентарное повреждение и потерю или задержку роста плода [488]. Важная роль активации системы комплемента в развитии данных осложнений была продемонстрирована на мышиной модели АФС, индуцированного пассивным переносом аФЛ человека [184, 185]. Оба пути активации комплемента как классический, так и альтернативный способствовали развитию фетоплацентарного повреждения у мышей [567].

Данные, полученные на животных моделях потери беременности, индуцированной аФЛ, и повышенного тромбоза, индуцированного повреждением, доказывали, что факторы комплемента C3 и C5 являются важными проксимальными медиаторами повреждения ткани, а продукт расщепления компонента C5 анафилатоксин C5a представляет ключевой медиатор [184, 185, 490]. Образование комплекса C5a с рецептором C5a (C5aR) играет центральную роль в мышиной модели фетальной потери, опосредованной аФЛ, и приводит к повышенному воспалению вследствие высвобождения TNF-α и TF материнскими нейтрофилами. Специфически связываясь с децидуальной тканью, аФЛ вызывают быстрое повышение экспрессии TNF-α на децидуальном и системном уровнях, которое отсутствует у C5-дефицитных мышей. TNF-α может оказывать прямой токсический эффект на клетки трофобласта и поддерживать активацию иммунных клеток в плаценте. Блокирование взаимодействия C5a с C5aR с помощью антител или антагониста C5aR предупреждало развитие осложнений беременности у мышей, а вакцинация мышей против TNF-α приводила к уменьшению частоты фетальной резорбции, индуцированной аФЛ [570].

Анафилатоксин C5a стимулировал активацию и миграцию нейтрофилов в децидуальную оболочку у мышей, обработанных аФЛ. Связывание C5a с C5aR на нейтрофилах индуцировало экспрессию TF, что усиливало оксидативный стресс, обеспечивая механизм повреждения трофобласта и потери беременности,

запущенный аФЛ [185]. Предполагается, что активация моноцитов под воздействием C5a может приводить к изменению баланса ангиогенных факторов во время беременности путем повышения уровня растворимого рецептора-1 VEGF (sVEGFR-1) и понижения уровня VEGF, и к осложнениям беременности, ассоциированным с аФЛ [180].

Хотя механизм действия аФЛ, опосредованный активацией системы комплемента, был четко установлен у мышей, значение системы комплемента в патогенезе потери плода у женщин остается менее ясным. Иммуногистохимические доказательства активации комплемента были найдены в абортивном материале и плацентах женщин с АФС [588]. В плацентарных биоптатах, взятых у женщин с АФС, было обнаружено повышенное количество воспалительных инфильтратов, состоящих преимущественно из макрофагов, а не полиморфноядерных лейкоцитов как в мышиной модели [554]. Кроме того, у женщин по сравнению с мышиной моделью имеются существенные отличия в анатомических структурах в зоне маточно-плодового взаимодействия, а также в контроле активности комплемента в плаценте.

По данным систематического обзора, в плацентах у женщин, позитивных на аФЛ, на апикальной мембране синцитиотрофобласта и вневорсинчатом трофобласте часто находят отложения C4d, что подтверждает запуск аФЛ активации классического каскада комплемента [588]. Однако не сообщалось об отложениях компонента C3 или продуктов его распада (C3b или C3c), активация и расщепление которого необходимы для превращения C5 в анафилатоксин C5a. Только одно исследование показало повышенное содержание компонентов C4d и C3b в цитоплазме клеток трофобласта [249]. По-видимому, это может быть объяснено строгим контролем активности комплемента в плаценте у женщин. Три протеина, контролирующие комплемент, экспрессируются на синцитиотрофобласте и вневорсинчатом трофобласте: CD46 (MCP), CD55 (DAF) и CD59 (протектин) [588]. Предполагается, что в плацентах у женщин с аФЛ может быть повышена экспрессия CD55, предупреждающего расщепление C3 в присутствии C4b, и CD46, стимулирующего протеолитическую деградацию C3b

[186]. В противоположность у мышей экспрессируется только один регуляторный протеин комплемента Crry, обладающий активностями подобными CD55 и CD46. Недавнее проспективное исследование выявило мутации в регуляторных протеинах комплемента у 7 из 40 пациенток с аФЛ, у которых развилась преэклампсия. Предполагается, что активация комплемента может играть роль в инициации преэклампсии у некоторых женщин с аФЛ [405].

Viall C.A. и Chamley L.W. в систематическом обзоре (2015) проанализировали гистопатологические особенности плацент женщин, позитивных на аФЛ, и выявили шесть признаков, которые наиболее часто обнаруживаются в плацентах этих женщин по сравнению с контрольными и включают: плацентарный инфаркт, нарушение ремоделирования спиральных артерий, воспаление децидуальной оболочки, увеличение синцитиальных узлов, снижение образования синцитиокапиллярных мембран и отложение продукта расщепления комплемента C4d [588].

Женщинам с акушерским АФС с целью улучшения исхода беременности наиболее часто рекомендуется лечение, основанное на комбинации нефракционированного или низкомолекулярного гепарина и низких доз аспирина [249, 419]. Первоначально гепарин использовали из-за его противотромботической активности, позже была установлена способность гепарина ограничивать активацию комплемента, индуцированную аФЛ, и последующее воспаление плаценты [186]. Показано, что гепарин ингибирует связывание аФЛ с фосфолипидами на поверхности трофобластов, а также связывание β2-ГП-I с анионными фосфолипидами, предупреждая отложение аβ2-ГП-I в тканях. Он может ингибировать взаимодействие между β2-ГП-I и рецепторами семейства липопротеинов низкой плотности, которые играют ключевую роль в поглощении аФЛ синцитиотрофобластом. Гепарин может также противодействовать негативному влиянию аФЛ на жизнеспособность клеток трофобласта, образование синцития, секрецию цитокинов и гормонов, дифференцировку эндометриальных ЭК человека и ангиогенез [48, 419]. Аспирин, стимулируя образование липоксинов, включая 15-эпи-липоксин A4,

может способствовать предупреждению негативных эффектов аФЛ на миграцию трофобластов и взаимодействие клеток трофобласта с ЭК [347].

Вероятность хорошего исхода при правильном ведении беременности у женщин с АФС составляет около 75-80%, однако имеется значительная доля женщин (около 22%), резистентных к стандартной терапии [405]. В этом случае назначение низкой дозы преднизолона (10 мг) от момента установления беременности до 14 недель гестации может быть эффективным для повышения частоты живорождения [242, 253]. По данным мультицентрового клинического исследования, эффективность лечения женщин с АФС и ПНБ с использованием иммуноглобулина для внутривенного введения была значимо ниже по сравнению с лечением низкомолекулярным гепарином и низкими дозами аспирина: частота живорождения составляла в первом случае 39,5%, а во втором – 72,5% [22].

Установлено, что антималярийное средство гидроксихлорохин снижает трофобластическую экспрессию β2-ГП-I и TLR4, предупреждает коагуляцию на поверхности трофобласта, а также негативное воздействие аФЛ на миграцию, инвазию и слияние клеток трофобласта, секрецию ХГ [94, 213].

С использованием мышиных моделей *in vivo* и *in vitro* было продемонстрировано, что ингибиторы комплемента, особенно компонентов C3 и C4, предупреждают индуцированные аФЛ тромбоз и осложнения беременности [184, 185]. Анафилатоксин C5a и его рецептор рассматриваются как особо перспективные мишени для ингибирования комплемента.

Таким образом, поскольку опосредованные аФЛ тромботические события не могут объяснить все акушерские проявления АФС, рассматриваются другие патогенетические механизмы, которые нашли экспериментальное подтверждение, такие как прямое воздействие аФЛ на формирование, развитие и функционирование плаценты. Учитывая важное патогенетическое значение аФЛ, целесообразно проводить скрининг на носительство аФЛ среди женщин фертильного возраста на этапе подготовки к беременности для своевременного предупреждения возможных акушерских осложнений. Понимание патофизиологических механизмов, вовлеченных в инициацию и развитие

тромбоза и осложнений беременности при АФС, открывает новые возможности для создания и применения таргетной терапии у пациентов с АФС, особенно резистентных к традиционной терапии.

1.7 Аутоантитела к хорионическому гонадотропину человека у женщин с нарушениями репродуктивной функции и репродуктивными потерями

На современном этапе исследование аутоантител к мишеневым антигенам репродуктивной и эндокринной систем при нарушениях репродуктивной функции человека представляет большой научный интерес. Мишенями аутоантител могут служить гонадотропины и их рецепторы, стероид-продуцирующие клетки, стероидогенные ферменты и стероидные гормоны, желтое тело, зона пеллюцида и ооцит, эндометрий [125, 149, 153, 288].

Хорионический гонадотропин человека имеет важное значение для осуществления репродуктивной функции женщин и вынашивания беременности. ХГЧ находит клиническое применение у женщин для индукции овуляции и поддержания лютеиновой фазы в стимулированном менструальном цикле, а также у мужчин для диагностики и лечения нарушений репродуктивной функции, например, для оценки функции клеток Лейдига, лечения крипторхизма, гипогонадотропного гипогонадизма и задержки полового созревания.

Описаны случаи повышенной продукции антител к ХГЧ, индуцированной применением гомо- и гетерологичных препаратов гормона [215, 280], контрацептивной вакцины, созданной на основе β-субъединицы ХГЧ [543], а также случай спонтанной продукции антител у женщины с невынашиванием беременности [329]. Показана возможность образования высокоаффинных антител к ХГЧ, способных нейтрализовать биологическую активность гормона в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [329, 346]. Антитела к ХГЧ рассматриваются как

возможная причина невынашивания беременности, бесплодия и неудач в циклах ЭКО [23, 346].

1.7.1 Молекулярная и антигенная структура хорионического гонадотропина человека

Хорионический гонадотропин человека является гетеродимерным плацентарным гормоном, представителем семейства гликопротеиновых гормонов, включающего также лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и тиреотропный гормон (ТТГ). Гликопротеиновые гормоны состоят из двух субъединиц (α- и β-), связанных нековалентно друг с другом, при этом α-субъединица ХГЧ идентична α-субъединицам гормонов гипофиза (ЛГ, ФСГ и ТТГ), кодируется на хромосоме 6 и состоит из 92 аминокислот, связанных пятью дисульфидными мостиками. Бета-субъединица ХГЧ (β-ХГЧ) является специфической для гормона, кодируется шестью генами, локализованными в кластере генов на хромосоме 19 вместе с геном β-субъединицы ЛГ [30]. Она состоит из 145 аминокислот, в том числе 12 цистеинов, образующих 6 дисульфидных связей в положениях 9-57, 38-90, 34-88, 23-72, 26-110 и 93-100, причем первые три образуют «цистиновый узел», имеющий видовую специфичность и определяющий пространственную конформацию и стабильность β-субъединицы, аналогичное строение имеет и α-субъединица [511, 542]. Из цистинового узла выступают две полные петли (первая и третья) с одной стороны и одна большая петля (вторая) с другой стороны. Аминокислотная последовательность первых 114 аминокислот β-ХГЧ гомологична β-ЛГ на 85%, β-ФСГ на 36%, β-ТТГ на 46%. Высокая гомология между ЛГ и ХГЧ и тот факт, что они взаимодействуют с общим рецептором, определяет сходство их биологических и иммунологических свойств.

Важную часть молекулы ХГЧ составляют углеводы [173], на которые приходится около 30% молекулярной массы. Имеются углеводные цепочки, присоединенные N-гликозидной или О-гликозидной связью по остаткам аспарагина или серина, соответственно. О-связанные олигосахариды имеют простую структуру и не влияют на биологическую активность гормона, тогда как N-связанные углеводные цепочки отличаются более сложным строением и характеризуются видовой и тканевой специфичностью [26, 511]. Альфа-субъединица ХГЧ содержит два N-связанных углеводных комплекса, тогда как β-субъединица имеет 6 олигосахаридных цепей, две из которых присоединены N-гликозидной связью, а четыре О-гликозидной связью. Углеводные компоненты ХГЧ обеспечивают соединение субъединиц, поддерживают конформацию молекулы, защищают полипептидные цепи от расщепления протеолитическими ферментами. Комбинация двух белковых цепей и 8 боковых углеводных цепочек объясняет значительную гетерогенность структуры ХГЧ.

Многочисленные варианты ХГЧ, например, свободные субъединицы и продукты деградации гормона, обнаруживаются в крови и моче [134]. Конечный вариант деградации β-ХГЧ кор-фрагмент состоит из двух фрагментов с аминокислотной последовательностью 6-40 и 55-92, удерживаемых вместе дисульфидными связями. В плаценте во время беременности синтезируются 5 из 15 существующих вариантов ХГЧ: обычный ХГЧ, гипергликозилированный ХГЧ (ХГЧ-Г), свободные α- и β- субъединицы и О-гликозилированная свободная α-субъединица ХГЧ-Г [175]. Остальные 10 вариантов являются продуктами деградации в результате расщепления макрофагами и протеазами в сосудистом русле и почках.

Существуют несколько вариантов изоформ гликозилирования ХГЧ [134, 175]. Гликозилирование обеспечивает корректный внутриклеточный фолдинг, сборку субъединиц, секрецию, активацию рецептора и определяет время полужизни в циркуляции. Молекулярная гетерогенность ХГЧ обуславливается вариабельностью в разветвлении углеводов и сиалировании. Несмотря на огромное число вариантов гликозилирования (более 3000 изоформ для α-ХГЧ и

13800 для β-ХГЧ), наблюдается только 14 главных вариантов α-ХГЧ и 12 вариантов β-ХГЧ. Гипергликозилированный ХГЧ содержит много больше N- и O-связанных олигосахаридов, включая олигосахариды двойного молекулярного размера (гексасахариды вместо трисахаридов), в результате этого молекулярный вес ХГЧ повышается от 36-37 кД до 40-41 кД в зависимости от степени гликозилирования [174].

С помощью панели моноклональных антител были определены 26 эпитопов на молекулах, отнесенных к ХГЧ [239, 546]. Шестнадцать эпитопов локазизуются на интактной цельной молекуле гормона ХГЧ: эпитопы β1-β5, β8 и β9; α1-α5; с1-с4. Семь из этих эпитопов представлены как на свободной, так и на ассоциированной β-субъединице ХГЧ (β1-β5, β8 и β9). Иммунодоминантной структурой ХГЧ и молекул, относящихся к β-ХГЧ, является молекулярная область, соответствующая кор-фрагменту β-ХГЧ. Большинство эпитопов β-ХГЧ локализуются в двух главных антигенных областях: на пептидной цепи верхушек 1-ой и 3-ей петель (эпитопы β2-6) и вблизи цистинового узла (например, эпитопы β1, β7 и β10). Эпитоп β1, расположенный в области цистинового узла, является высоко специфичным для ХГЧ и его производных и не присутствует на ЛГ и β-ЛГ [145].

Эпитопы β6 (1-ая и 3-я петли β-ХГЧ) и β7 (цистиновый узел) присутствуют на свободной β-ХГЧ и кор-фрагменте β-ХГЧ, но не на цельной молекуле ХГЧ. Эпитоп β14, который относится к кор-фрагменту β-ХГЧ (аминокислоты 1-112) и, возможно, цистиновому узлу, является специфическим для свободной β-ХГЧ [546]. Четыре эпитопа β10-β13 представлены только на кор-фрагменте β-ХГЧ.

Эпитопы, относящиеся к β-ХГЧ, но не определяемые на кор-фрагменте β-ХГЧ (1-112), локализуются на С-терминальном пептиде β-ХГЧ (113-145). Эпитоп β8 представляет собой иммунодоминантную линейную антигенную область в самом конце С-терминального пептида β-ХГЧ (133-144), состоящую из трех эпитопных вариантов (β8.1, β8.2 и β8.3) [144]. На него, по-видимому, частично оказывают влияние гликаны в положении 132 и/или 138 (эпитопы β8.2 и β8.3)

[546]. Эпитоп β9 соответствует области 113-116 С-терминального пептида β-ХГЧ. Эпитопы β8 и β9 являются специфическими для ХГЧ и β-ХГЧ [546, 549].

Эпитоп α6, относящийся ко 2-ой петле α-ХГЧ, и α7, расположенный в карбоксильной терминальной области α-ХГЧ, являются специфическими для неассоциированной α-ХГЧ. Моноклональные антитела к эпитопам α2, α4 и α6 не вытесняют ХГЧ с его рецептора, в то же время одно из МКАТ, направленных к α1-α5, связывается с ХГЧ и α-ХГЧ и полностью блокирует связывание гормона с рецептором [549]. По крайней мере, 4 эпитопа с1-с4 представлены только на молекуле ХГЧ, но не на свободной β-субъединице или кор-фрагменте β-ХГЧ [145]. Эпитопы с1 и с2 располагаются на интактной молекуле ХГЧ и чувствительны к надрезанию 2-ой петли β-ХГЧ. Эпитопы с3 и с4 представлены также на надрезанной производной ХГЧ [546].

1.7.2 Биологические функции хорионического гонадотропина человека во время и вне беременности

ХГЧ является одной из самых ранних молекул, продуцируемых эмбрионом, его мРНК транскрибируется уже на восьмиклеточной стадии [585], а бластоциста продуцирует белок до имплантации [161, 378]. Первоначально клетками вневорсинчатого инвазивного цитотрофобласта продуцируется ХГЧ-Г, который содействует росту клеток цитотрофобласта, инвазии трофобласта и имплантации эмбриона [174]. ХГЧ-Г определяется в сыворотке крови и моче при ранней беременности и составляет на третьей неделе гестации во время имплантации 90% от общего содержания ХГЧ [224, 316]. ХГЧ-Г ассоциируется с процессами инвазии, его продукция снижается по мере прогрессирования беременности.

После имплантации синцитиотрофобласт активно продуцирует обычный ХГЧ. Продукция ХГЧ плацентой достигает максимального уровня на 10-11-ой

неделе гестации, а затем с 12-ой недели продукция ХГЧ снижается и остается на низком уровне в последующие сроки беременности. Обычный ХГЧ выполняет много функций во время беременности: обеспечивает продукцию прогестерона, ангиогенез в сосудистой системе матки, иммуносупрессию к вторгающейся плацентарной ткани, дифференцировку растущих клеток цитотрофобласта, рост матки параллельно с ростом плода, отсутствие сокращений в миометрии матки в течение беременности, а также оказывает влияние на рост и развитие органов плода [11, 175, 496]. Таким образом, гипергликозилированный и обычный ХГЧ являются независимыми молекулами с полностью отдельными биологическими функциями.

Действие ХГЧ, как и ЛГ, опосредуется одним и тем же рецептором ЛГ/ХГЧ, который является членом большого семейства трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCRs), но некоторые функции ХГЧ реализуются через маннозный рецептор (CD206) [462]. Экспрессия рецептора ЛГ/ХГЧ показана во многих тканях репродуктивных органов, при этом люминальные и гландулярные эпителиальные клетки содержат больше рецепторов ЛГ/ХГЧ, чем клетки стромы, миометрия и сосудистые гладкомышечные клетки [556].

ХГЧ бластоцисты играет важную роль в обеспечении иммунной толерантности к фетальному аллотрансплантату, усиливает ангиогенез в эндометрии и активно участвует в развитии плаценты [46]. При подготовке к имплантации бластоцисты ХГЧ оказывает паракринное влияние на эндометриальные клетки (эпителиальные, стромальные, клетки миометрия, эндотелиальные и иммунные клетки), повышает экспрессию рецептора прогестерона [46, 175]. В присутствии ХГЧ значительно возрастает способность клеток к адгезии, отмечается высокая экспрессия трофинина, который является медиатором гомофильной адгезии апикальной поверхности клеток трофэктодермы и эпителия [340].

Более того, селективно уменьшая экспрессию инсулиноподобного фактора роста (IGF) или протеина-1, связывающего IGF (IGF-BP-1), ХГЧ отсрочивает

децидуальную реакцию стромы эндометрия. ХГЧ способствует модуляции рецептивности эндометрия и его дифференцировке во время ранней имплантации [221]. Наконец, повышая секрецию ММР-9 трофобластом и уменьшая экспрессию тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP-1, -2 и -3) в эндометрии, ХГЧ осуществляет регулирование глубины имплантации [221, 310].

ХГЧ-Г блокирует апоптоз в клетках цитотрофобласта и содействует росту клеток, так как β-субъединица ХГЧ-Г может связываться с рецептором трансформирующего фактора роста (TGF-β) на клетках цитотрофобласта вследствие наличия в молекуле TGF-β структуры, аналогичной цистиновому узлу β-субъединицы гормона [519]. ХГЧ-Г способствует росту клеток цитотрофобласта и образованию ворсинчатых структур, тогда как ХГЧ обеспечивает дифференцировку цитотрофобласта в синцитиотрофобласт. Их комбинированное действие приводит к образованию ворсин.

При назначении ХГЧ наблюдается значительное ингибирование секреции IGF-BP-1, колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) и стимулирование экспрессии лейкемия-ингибирующего фактора (LIF), VEGF и ММР-9 [310, 354]. Эти эффекты демонстрируют важное паракринное действие ХГЧ на децидуализацию, тканевое ремоделирование, имплантацию, васкуляризацию и ангиогенез.

В последнее десятилетие были получены доказательства иммуномодулирующего действия ХГЧ путем влияния на Т-лимфоциты, ДК, регуляторные В-лимфоциты и маточные NK-клетки [311, 496]. На животных моделях показано, что ХГЧ может ингибировать аутореактивные Т-клетки путем индукции индоламин-2,3-диоксигеназы и предупреждать начало АИЗ. ХГЧ ингибирует созревание ДК и снижает способность ДК к стимулированию Т-клеток, поддерживая толерогенный фенотип ДК. При этом ХГЧ регулирует по-разному периферические и местные ДК в зависимости от типа ткани, обеспечивая иммунологическую толерантность к фетальным аллоантигенам и в то же время сохраняя способность реагировать на патогены.

ХГЧ, продуцированный клетками трофобласта, привлекает Treg клетки в зону плодово-материнского взаимодействия, способствует индукции дифференцировки Т-лимфоцитов в Treg клетки путем ингибирования экспрессии фосфорилированных AKT и ERK (киназы, регулируемые внеклеточными сигналами), а также усилению супрессивного влияния Treg клеток на Т-эффекторные клетки [307, 357]. При физиологической беременности наблюдается корреляция между уровнями ХГЧ и Treg клеток, которая становится слабой при спонтанных абортах или внематочных беременностях. Поддержка ХГЧ толерогенной активности ДК способствует экспансии Treg клеток и предупреждению аборта.

Комбинированная терапия ХГЧ и иммуноглобулином восстанавливает нарушенное соотношение Th17/Treg в пользу Treg клеток у пациенток с необъяснимым ПВ или другими осложнениями беременности [496]. ХГЧ и синтетические олигопептиды β-ХГЧ повышают уровень Treg клеток и их функциональную активность, и, более того, предупреждают дифференцировку Th0 клеток в Th17 клетки и супрессируют активность субпопуляции Th17 клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины. Помимо этого, ХГЧ смещает баланс IL-4/IFN-γ, способствуя переключению иммунного ответа по Th2-типу. ХГЧ стимулирует Treg клетки либо прямо путем связывания с рецептором ЛГ/ХГЧ на Т-клетках либо непрямым путем через изменение фенотипа и функции других популяций иммунных клеток, таких как ДК, или уровня стероидных гормонов, прогестерона и эстрогена. Измененный профиль гликозилирования и/или присутствие сиалированных антигенов на ХГЧ может повлиять на привлечение и экспансию иммунных клеток, обеспечивающих толерантность.

Предполагается, что во время беременности ХГЧ управляет экспансией Breg лимфоцитов CD19+CD24hiCD27+, которые экспрессируют рецептор ЛГ/ХГ, активно продуцируют специфический для этих клеток противовоспалительный цитокин IL-10, контролируют АИЗ и могут вызывать толерантность к аллотрансплантату, ингибируя дифференцировку Т-эффекторных клеток и ДК и активируя Treg клетки [284]. Адекватный подъем ХГЧ в первом триместре может

стимулировать генерацию и функциональную активность Breg клеток. У пациенток, страдающих спонтанным абортом, наблюдается значительное снижение количества Breg клеток по сравнению со здоровыми беременными женщинами [196]. ХГЧ повышает не только количество и активность Breg клеток, но и усиливает продукцию IL-10 [388]. Кроме того, ХГЧ снижает образование плазматических клеток, а также индуцирует синтез антител, асимметрично гликозилированных в области Fab-фрагмента, что является важным механизмом толерантности к аллоантигенам плода, опосредованным В-клетками, на ранних сроках беременности.

ХГЧ привлекает макрофаги в зону плодово-материнского взаимодействия и может содействовать выполнению ими функций, важных для сохранения беременности. Установлено, что макрофаги играют важную роль в ремоделировании спиральных артерий, инвазии трофобласта, имплантации бластоцисты и защите плода от внутриматочной инфекции, продуцируют цитокины, факторы ремоделирования ткани, ростовые и ангиогенные факторы, удаляют апоптотические клетки [250].

ХГЧ оказывает регулирующее действие на пролиферацию NK-клеток, способствует их фенотипическому созреванию, ассоциированному с усилением цитотоксической и цитокин-продуцирующей активности. Взаимодействие ХГЧ на уровне моноцитов может осуществляться не только через рецептор ЛГ/ХГ, но и через TLR4, не исключая взаимодействия с маннозным рецептором [11]. Маточные NK-клетки становятся предоминантной субпопуляцией лимфоцитов в децидуальной оболочке в первом триместре беременности (70% всех лейкоцитов) и играют ключевую роль в поддержании и регуляции ранней беременности, особенно в процессах ремоделирования маточных спиральных артерий и инвазии трофобласта, продуцируют множество цитокинов, хемокины, факторы роста и ангиогенные факторы [250].

ХГЧ содействует контролированной инвазии трофобласта и местной иммунной толерантности к трофобласту с привлечением механизма программируемой клеточной гибели, опосредованного взаимодействием Fas-

рецептора с Fas-лигандом, индуцируя апоптоз в Т-клетках и клетках эндометрия [309]. Кроме того, ХГЧ повышает экспрессию компонентов комплемента С3 и С4 и гликоделила, что может способствовать адаптации эндометрия к беременности [311].

Некоторые авторы докладывают о продукции β-ХГЧ или ХГЧ в низких количествах вне беременности в разных тканях у здоровых женщин, в частности, в кишечнике, мочевыделительном и респираторном трактах и в фаллопиевых трубах [188, 375, 470, 604]. Рецепторы ЛГ/ХГЧ были идентифицированы в некоторых гонадальных и негонадальных тканях, в том числе описаны в эндометрии, плаценте, плодовых и децидуальной оболочках [375, 556]. В первоначальных иммуногистохимических исследованиях и при использовании *in situ* гибридизации было показано, что гландулярные клетки эндометрия экспрессируют и продуцируют β-ХГЧ в маточном эпителии, главным образом, во время секреторной фазы [604].

ХГЧ присутствует в измеримых количествах в жидкости в полости матки и гомогенате эндометрия (около 5 мЕд на 10 мг ткани) [604]. Предполагается, что эндогенный эндометриальный ХГЧ является ответственным за развитие предецидуальных клеток в эндометрии в секреторной фазе и может индуцировать и контролировать дифференцировку гландулярных и стромальных клеток эндометрия паракринным и/или эндокринным способом. Адекватная гландулярная секреция ХГЧ оптимизирует секреторную дифференцировку эндометрия и подготавливает его к имплантации эмбриона и успешной гестации. Подобно экзогенному ХГЧ, повышенная продукция ХГЧ в эндометрии может поддерживать морфологическую и функциональную дифференцировку стромальных фибробластов в децидуальные клетки, индукцию VEGF, IGF-BP1 и актина гладких мышц (αSMA), а также результирующее образование эпителиальных бляшек. Эндогенный ХГЧ может действовать прямо на рецептор ЛГ/ХГЧ эндотелиальных клеток или через регулирование VEGF и способствовать инициации микроваскуляризации в подготовке рецептивного эндометрия. При

этом ХГЧ рассматривается как подходящий маркер для оценки рецептивности эндометрия в период имплантации эмбриона.

1.7.3 Индуцированное и спонтанное образование антител к хорионическому гонадотропину человека

Антитела к ХГЧ были найдены при разных патологических состояниях репродуктивной системы, как у женщин, так и у мужчин. Еще во второй половине 70-ых годов XX века были описаны случаи продукции антител к гонадотропинам после назначения препаратов менопаузальных гонадотропинов и ХГЧ. Доклады нередко содержали противоречивые данные о наличии или отсутствии антител к ХГЧ в сыворотке крови, демонстрировали у молодых здоровых женщин продукцию антител к ХГЧ/ЛГ, не влияющих на биологическую активность гормона. Однако, несмотря на это, некоторые исследователи предполагали, что аутоиммунитет к гонадотропинам мог быть причиной недостаточности гонад [276].

Затем в 80-90-ых годах были описаны новые случаи продукции антител к ХГЧ, индуцированной применением гомо- или гетерологичных препаратов гормона. Задокументировано появление антител к ХГЧ в сыворотке крови во время лечения препаратом ХГЧ у пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом и одновременно развитие вторичной резистентности гонад с плохим ответом яичек на терапию ХГЧ [280]. Было показано, что, хотя ХГЧ является по происхождению гормоном человека и определяется в норме у мужчин, введение экзогенного ХГЧ может индуцировать образование антител у молодых здоровых мужчин даже после короткого курса назначения [411].

Появление антител к ХГЧ наблюдалось у женщины после повторных курсов менопаузальных гонадотропинов и ХГЧ, назначенных для индукции овуляции [156]. В сыворотке крови были найдены IgG-антитела, которые преимущественно

связывались с интактной молекулой ХГЧ, однако не нейтрализовали биологическую активность гормона в биоанализе *in vivo*, не вызывали резистентность гонад к ХГЧ и не связывались с плацентарной тканью.

Wass M. и соавт. еще в 1978 году сообщили о наличии антител к ХГЧ/ЛГ в сыворотке здоровых доноров. IgG-антитела к ХГЧ были выделены с помощью аффинной хроматографии из сывороток, собранных от беременных и лактирующих женщин, детей 4-10 лет и здоровых взрослых, пациентов с карциномой, и идентифицированы в РИА с использованием меченных радиоактивным йодом антител к IgG человека [592]. Антитела к ХГЧ были найдены также у беременных женщин с невынашиванием беременности в анамнезе. Антитела взаимодействовали в равной степени с ХГЧ и ЛГ, в меньшей степени с α- и β- субъединицами ХГЧ. Однако аффинность антител была слишком низкой, чтобы повлиять на биологическую активность гормона.

На основе ХГЧ создавалась контрацептивная вакцина для контроля фертильности у женщин, действие которой было основано на индукции образования антител к гормону [521]. Выбор ХГЧ в качестве антигена и мишени для вакцины был основан на возможности блокирования биологической активности гормона в экстрацеллюлярном пространстве специфическими антителами без вовлечения компонентов клеточного звена иммунного ответа, а также простоте определения наличия и титров антител в крови. Так как ХГЧ, продуцируемый трофобластом имплантированного эмбриона, стимулирует продукцию прогестерона желтым телом яичников, необходимого для поддержания беременности, нарушение этого процесса антителами к ХГЧ должно неизбежно привести к прерыванию беременности.

Научное доказательство прерывания ранней беременности антителами к ХГЧ было получено в исследованиях на обезьянах (павианах) [331]. Кроме того, на основе мышиных моноклональных антител PiPP с высокой аффинностью ($1{,}9 \times 10^{10}$ M^{-1}) связывания ХГЧ были получены рекомбинантные химерические антитела (cPiPP), которые полностью блокировали влияние ХГЧ на прирост веса матки у незрелых мышей *in vivo* и продукцию тестотерона клетками Лейдига *in*

vitro, а также на образование синцития в культуре клеток цитотрофобласта и продукцию ПГ плацентарными клетками. Эти наблюдения подтвердили пригодность антител к ХГЧ для нехирургического прерывания беременности.

Три контрацептивные вакцины, основанные на использовании β-ХГЧ, С-терминального пептида β-ХГЧ или гетеровидового димера β-ХГЧ с α-ЛГ овцы, прошли клинические испытания на безопасность и эффективность применения для контроля фертильности у женщин, которые показали, что наступление беременности может быть предупреждено иммунизацией против ХГЧ [521, 543]. Вакцина на основе гетеровидового димера запускала продукцию антител, нейтрализующих биологическую активность ХГЧ, и предупреждала наступление беременности у сексуально активных женщин без нарушения овуляции, регулярности менструального цикла и профиля кровотечения. Выраженный контрацептивный эффект наблюдался при уровне антител к ХГЧ выше 50 нг/мл. Уровень антител к ХГЧ подкласса IgG1 в значительной степени коррелировал со способностью сывороток иммунизированных женщин нейтрализовать биологическую активность гормона [207]. Главным недостатком вакцины было то, что антитела с уровнем выше порогового продуцировались в течение 3 месяцев только у 60% женщин, а для планирования семьи необходимо обеспечить 80-95%-ную эффективность защиты от наступления беременности [521].

Спонтанная продукция аутоантител к ХГЧ/ЛГ класса G была описана у женщины, ранее не получавшей гормональной терапии, после второго самопроизвольного выкидыша в 6 недель гестации [329]. Антитела нейтрализовали активность ХГЧ в биоанализе *in vivo* при определении веса матки после инъекции ХГЧ у крыс линии Вистар в препубертатном периоде. Антитела были направлены к цельной молекуле ХГЧ, обладали высокой аффинностью связывания как ХГЧ ($Ka>2x10^{10}$ л/моль), так и ЛГ ($Ka>0,5x10^{10}$ л/моль), и нейтрализовали биологическую активность обоих гормонов. Последовавший за прерыванием беременности длительный период аменореи мог быть следствием перекрестной реактивности антител с эндогенным ЛГ *in vivo*, что подтверждалось восстановлением нормального менструального цикла при падении титра антител.

Высокая способность антител к ХГЧ к нейтрализации биологической активности гормона, позволила сделать заключение, что самопроизвольное прерывание беременности у женщины могло быть следствием действия этих антител. Быстрое развитие антительного ответа отражало скорее повторное стимулирование антигеном, чем первичный иммунный ответ. По мнению авторов, возможное присутствие анти-ХГЧ/ЛГ иммунокомпетентных клеток до оплодотворения и их повторное стимулирование гормоном, секретируемым на ранних сроках беременности, могло вызвать самопроизвольный аборт, обусловленный аутоантителами к ХГЧ.

Позже антитела к ХГЧ были обнаружены у пациентки с 9-летней историей вторичного бесплодия, которая, однако, имела регулярный менструальный цикл, проявляла хороший гормональный и фолликулярный ответы на стимуляцию гонадотропинами в циклах ЭКО, но при этом на протяжении продолжительного времени страдала ПНБ, ассоциированным с повышенным уровнем антител к ХГЧ [346]. Присутствие антител к ХГЧ у женщины определили по связыванию сыворотки крови с рекомбинантным ХГЧ, меченным ^{125}I, и подтвердили выделением из сыворотки аффинно очищенных IgG. В отличие от предыдущего случая антитела имели более низкую аффинность (Ка 1,4x10^6 л/моль), но более высокую связывающую способность (418 нмоль/л; 348 МЕ/л), которая была достаточной, чтобы нейтрализовать эндогенный ХГЧ во время имплантации и даже максимальные сывороточные уровни гормона после инъекции экзогенного ХГЧ (5000 МЕ) для индукции овуляции. Антитела имели низкую перекрестную реактивность с рекомбинантным ФСГ и ЛГ и ингибировали биологическую активность ХГЧ в исследованиях *in vitro* при использовании трансформированных мышиных клеток Лейдига линии МА10. Было сделано предположение, что ХГЧ, неоднократно назначаемый в течение длительного лечения бесплодия и продуцируемый при спонтанных беременностях, вызывал бустер эффекты, которые поддерживали титр антител. Кроме того, предполагается, что эндогенный ХГЧ мог стать иммуногенным в результате структурных изменений, вызванных мутацией в одном из генов β-ХГЧ. По

заключению авторов, персистирующие антитела к ХГЧ были ответственными за развитие вторичного бесплодия у женщины.

У пациенток ЭКО с антителами к ХГЧ наблюдалась более низкая частота наступления беременности и повышенная частота самопроизвольных выкидышей по сравнению с негативной контрольной группой [122]. Эти показатели частоты были сравнимы с наблюдаемыми у женщин с антифосфолипидными и антитрофобластическими антителами. Таким образом, была показана необходимость определения антител к ХГЧ у пациенток, подвергшихся процедуре ЭКО.

1.8. Антитела к гипофизарным гонадотропинам у женщин с нарушениями репродуктивной функции

Фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны - гонадотропные гормоны передней доли гипофиза, которые вырабатываются базофильными клетками второго типа. Гипофизарные гонадотропины являются основными гормонами, необходимыми для полового созревания и осуществления репродуктивной функции человека. ФСГ играет центральную роль в репродуктивной системе, тогда как мутации в генах ФСГ и его рецептора ассоциируются со снижением овариального ответа к гормону и нарушением репродуктивной функции женщины [560].

Секреция ФСГ стимулируется гипоталамическим гонадотропин-рилизинг гормоном и происходит в импульсном режиме. У женщин рецептор ФСГ экспрессируется в яичнике на гранулезных клетках, окружающих ооцит. ФСГ способствует развитию доминантного фолликула и созреванию яйцеклетки в фолликулярную фазу менструального цикла. Вместе с лютеинизирующим гормоном ФСГ запускает выработку фолликулами эстрадиола. ФСГ оказывает паракринное влияние на развитие преантральных фолликулов [562]. Поддержка

ФСГ придает преовуляторному фолликулу способность к овуляции и образованию желтого тела в ответ на подъем ЛГ в середине цикла [362].

ФСГ представляет собой гликопротеиновый гормон с молекулярной массой около 30 кДа и является гетеродимером, состоящим из α-субъединицы общей для всех гонадотропинов (92 аминокислоты) и уникальной β-субъединицы (111 аминокислот). Полипептидные цепи гонадотропинов гликозилированы, что имеет важное значение для устойчивости в крови, клиренса и биологической активности гормонов [575]. Карбоксильный конец α-субъединицы ФСГ и связанные с ней углеводные остатки вовлекаются во взаимодействие с рецептором и активацию. Кроме того, в специфическом связывании с рецептором важную роль играют остатки Асп (88, 90 и 93) цистеиновой петли β-субъединицы ФСГ [257].

Исследования аутоиммунного процесса, специфически вовлекающего гонадотропины, проводились уже более 30 лет назад, когда с помощью метода иммунофлуоресценции были найдены антитела к клеткам, секретирующим гонадотропины, в сыворотках пациентов, страдающих крипторхизмом. Позже антитела, направленные к гонадотропным клеткам и самим гонадотропинам, обнаруживали в высоком титре в сыворотках пациентов, страдающих гипогонадотропным гипогонадизмом, синдромом Каллмана, лимфоцитарным гипофизитом с изолированной гонадотропной недостаточностью, аутоиммунным полиэндокринным синдромом, а также при других клинических состояниях, вовлекающих ось гипофиз-гонады [441]. Для исследования антигипофизарных антител использовались разные методы, включая иммунофлуоресценцию, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ и другие.

Пациенты с бесплодием широко обследовались с помощью ИФА на присутствие циркулирующих антител, снижающих активность ФСГ и ЛГ. Аутоантитела к гонадотропинам часто ассоциировались у женщин с овариальным аутоиммунитетом, овариальными заболеваниями, вызывающими бесплодие, а также с неудачами в циклах ЭКО [288]. У мужчин также были найдены аутоантитела к гонадотропинам, которые могли нарушать тестикулярный сперматогенез и вызывать апоптоз сперматогенных клеток [540].

Во многих исследованиях оценивалось участие антител к гонадотропинам в патофизиологии бесплодия. У женщин с низким овариальным ответом на введение менопаузального гонадотропина человека часто выявлялись антитела к ФСГ (89%), ЛГ (65%), а также к ткани яичников (77%) [247]. На этом основании было сделано предположение, что антитела к гонадотропинам могут модифицировать ответ на гормональное лечение при бесплодии и ассоциироваться с антиовариальными антителами. Аутоантитела, реагирующие с ЛГ в ИФА, были обнаружены у пациенток с ПНЯ, в сыворотке которых содержались АОА [425]. В последующем исследовании антитела к ФСГ были обнаружены с использованием гранулезных клеток в сыворотке крови у пациенток с ПНЯ, у женщин с бедным овариальным ответом, а также неожиданно у женщин с хорошим ответом на стимуляцию суперовуляции в программе ЭКО [293].

Позже с помощью иммуноблоттинга с экстрактами ткани яичника человека, метода иммунофлуоресценции при окрашивании гипофизарных клеток и ИФА с очищенным ФСГ было получено подтверждение, что ФСГ может быть аутоантигеном, распознаваемым аутоантителами, ассоциированными с бесплодием [44]. Установлено, что аминокислотная последовательность 78-93 β-цепи ФСГ является одним из главных эпитопов ФСГ, с которым реагируют сыворотки, содержащие АОА.

Показано, что у пациенток с необъяснимым бесплодием антитела к гонадотропинам не всегда связаны с АОА [501]. Антитела к гонадотропинам распознавали ФСГ, ЛГ, их отдельные α- и β-субъединицы и в меньшей степени ТТГ и пролактин. Если АОА выявлялись у женщин с подобной частотой независимо от применения гонадотропинов, то антитела, распознающие ФСГ и ЛГ, более часто обнаруживались у женщин после лечения гонадотропинами. Предполагается, что антитела к гонадотропинам могут представлять отдельный маркер овариального аутоиммунитета при необъяснимом бесплодии, так как они коррелируют с АОА и выявляются у женщин, не получавших лечение гормонами. Однако у пациенток с овариальным аутоиммунитетом может запускаться

иммунный ответ к гонадотропинам, связанный с проведением гормонального лечения.

Haller K. и коллеги наблюдали присутствие антител, направленных к ФСГ, в сыворотке крови здоровых небеременных женщин, а также более низкие уровни антител к ФСГ во время неосложненной беременности и повышенные уровни этих антител у женщин с бесплодием [326, 466]. По мнению авторов, бесплодие независимо от причины его возникновения может быть фактором риска образования анти-ФСГ антител, а повышенная продукция анти-ФСГ IgM может быть связана с общей предрасположенностью к аутоиммунитету у женщин с бесплодием. Уровень анти-ФСГ IgM-антител был выше у пациенток, которые ранее подвергались процедуре ЭКО [466]. По-видимому, повторно выполненная овариальная пункция усиливала антиовариальный аутоиммунитет при бесплодии, вызванном заболеваниями, ассоциированными с нарушениями иммунной регуляции, такими как эндометриоз и СПКЯ.

Специфичность гормона и связывание его с рецептором определяются β-субъединицей ФСГ, которая кодируется геном FSHB в 11p13 [257]. По данным Haller K. и соавт. (2007), продукция анти-ФСГ антител классов M и G не ассоциировалась с гаплотипами гена FSHB, но могла быть связана с общей предрасположенностью к аутоиммунитету или с предыдущими попытками ЭКО [466]. Анти-ФСГ IgA-антитела ассоциировались с наличием HLA-DQB1*03 аллеля, а не с причиной бесплодия, историей предыдущих попыток ЭКО или присутствием других аутоантител [165]. В связи с этим обнаруженные анти-ФСГ IgA-антитела могли быть не аутоантителами, а аллоантителами, которые появились в результате ответа слизистой оболочки половых органов женщины на ФСГ семенной жидкости партнера.

Предполагается, что анти-ФСГ антитела могут нарушать функцию экзогенного и эндогенного ФСГ, например, путем образования иммунных комплексов с ФСГ и индуцирования его выведения, или путем нарушения связывания ФСГ с рецептором. Эта гипотеза поддерживается данными о том, что анти-ФСГ антитела в сыворотке коррелируют с антителами, направленными к

аминокислотной последовательности 78-93 β-цепи ФСГ человека, названной доменом V14D, который является иммунодоминантным и определяет специфичность связывания ФСГ с рецептором [44, 326]. Показано, что эндометриоз и СПКЯ ассоциируются с более высокими уровнями анти-ФСГ и анти-V14D IgA-антител, а эндометриоз - также с анти-V14D IgG-антителами [326]. Предполагается, что анти-ФСГ IgG-антитела, направленные к эпитопу 78-93 на β-субъединице ФСГ, могут модулировать распознавание и связывание ФСГ с рецептором и имеют значение в патофизиологии бесплодия.

В дальнейшем было исследовано влияние сывороточных анти-ФСГ антител на фолликулогенез и присутствие анти-ФСГ в фолликулярной жидкости у пациенток в стимулированных циклах ЭКО [165, 287]. Установлено, что повышенные уровни сывороточных анти-ФСГ антител классов G и A в день извлечения ооцитов ассоциировались с плохим овариальным ответом на стимуляцию ФСГ. Кроме того, рассчитанная пороговая величина более 1,0 единицы оптической плотности предсказывала бедный овариальный ответ (≤3 ооцитов). В фолликулярной жидкости присутствовали анти-ФСГ IgG- и IgA-антитела, уровни которых положительно коррелировали с их сывороточными уровнями и с концентрацией ФСГ в фолликулярной жидкости, а также IgM-антитела в следовых количествах. Анти-ФСГ IgG-антитела, по-видимому, аккумулировались в растущем фолликуле, проникая из сыворотки в фолликулярную жидкость путем диффузии с ФСГ во время овариальной стимуляции. Предполагается, что анти-ФСГ IgG- и IgA-антитела в созревающих фолликулах могут оказывать местное влияние, нарушая действие ФСГ. Уровни анти-ФСГ IgM-антител в фолликуле были очень низкие по сравнению с их сывороточными уровнями, что объясняется низким содержанием суммарных IgM в фолликулярной жидкости, составляющим приблизительно 10% от концентрации в плазме [507].

По мнению Haller-Kikkatalo K. и соавт. (2012), определение анти-ФСГ антител может иметь дополнительное значение в предикции исхода овариальной гиперстимуляции наряду с возрастом женщины и такими клиническими

параметрами, как число фолликулов в раннюю фолликулярную фазу спонтанного менструального цикла или овариальный объем [288]. Более того, если влияние анти-ФСГ антител на овариальный ответ обнаруживается у пациенток в цикле ЭКО, когда сверхфизиологические дозы ФСГ назначаются для стимуляции фолликулогенеза, то значение этих антител в естественном цикле может быть еще более важным. Предполагается, что иммуносупрессивная терапия может повысить частоту наступления беременности у пациенток с бесплодием, серопозитивных на анти-ФСГ антитела.

1.9. Гормональная аллергия и аутоиммунитет к половым стероидным гормонам

В настоящее время широко исследуется гиперчувствительность к половым стероидным гормонам и продукция специфических аутоантител к ним у женщин с нарушениями репродуктивной функции [448, 471, 483]. Еще в первой половине XX века был введен термин «гормональная аллергия» и предложены кожные тесты для определения чувствительности к яичниковым гормонам у пациентов с эндокринными нарушениями. Показана возможность пассивной передачи с сывороткой от пациентов с гиперчувствительностью положительной реакции здоровым людям. Позже в сыворотке у пациентки с бесплодием и периодической сыпью были идентифицированы IgG-антитела, взаимодействующие с прогестинами и обладающие высокой аффинностью связывания 17α-гидроксипрогестерона [317].

Нарушение иммунологической толерантности к половым стероидным гормонам не является редким событием. Расстройства, отнесенные к гиперчувствительности и нарушению иммунного ответа на половые гормоны, встречаются более часто в ситуациях, связанных с воздействием избытка женских половых гормонов, например, во время беременности, менструального цикла,

приема гормональных контрацептивов, или эстрогенов окружающей среды [509]. Аллергия к половым стероидным гормонам ассоциируется с осложнениями и неблагоприятными исходами беременности, в частности, чрезмерной рвотой беременных [574], повышенным риском преждевременных родов у женщин с предшествующей дисменореей [453], ранними репродуктивными потерями на этапе имплантации с последующим вторичным бесплодием [124].

1.9.1. Биологическая роль прогестерона в организме женщины

Прогестерон является важным гормоном женской репродуктивной системы, который осуществляет регуляцию репродуктивной функции. Прогестерон воздействует на многочисленные ткани и органы, включая мозг, молочные железы, матку, яичники и шейку матки [281], вовлекается в регулирование менструального цикла и имплантации, имеет важное значение в наступлении и поддержании беременности, содействует выживанию эмбрионального аллотрансплантата. ПГ является важным в подготовке эндометрия к имплантации и регулировании инвазии и миграции клеток трофобласта. ПГ играет роль в обеспечении маточной рецептивности путем блокирования пролиферативного эффекта эстрогена и индуцирования генов, а также действует как негативный регулятор инвазии трофобласта, контролируя активность матриксных металлопротеиназ [286].

Названный «гормоном беременности» прогестерон имеет критическое значение в поддержании беременности посредством таких механизмов, как модуляция материнского иммунного ответа и супрессия воспалительного ответа, поддержка лютеиновой фазы, уменьшение сократимости матки и улучшение маточно-плацентарной циркуляции [455]. Прогестерон широко применяется в лечении бесплодия для поддержания функции желтого тела в естественных или стимулированных циклах, а также для профилактики и лечения осложнений

беременности, таких как угрожающий выкидыш и угрожающие преждевременные роды [149, 164, 285, 392].

Продукция ПГ запускает морфологические и физиологические изменения в эндометрии, обеспечивая рецептивность эндометрия и подходящее окружение для эмбриона в период окна имплантации (с 5-ого по 10-ый день после выброса ЛГ). Главными мишенями ПГ в матке являются стромальные и эпителиальные клетки эндометрия, гладкомышечные клетки миометрия, стромальные фибробласты и гландулярные эпителиальные клетки шейки матки. Влияние ПГ на эти клетки реализуется путем прямого воздействия на специфические прогестероновые рецепторы или опосредованно путем модуляции продукции факторов роста и цитокинов в зоне плодово-материнского взаимодействия. Действие ПГ осуществляется через три мембранных рецептора и два внутриклеточных рецептора, относящихся к суперсемейству ядерных рецепторов.

Прогестерон (17α-гидроксипрогестерон и 16α-гидроксипрогестерон) продуцируется во время менструального цикла и на ранних сроках беременности желтым телом яичника, эта продукция ПГ поддерживается ХГЧ до 6-8 недели гестации [173], а затем ПГ синтезируется плацентой из холестерола матери [370], а после первого триместра из 17-гидроксипрегненолона, продуцированного в коре надпочечников плода [163]. Уровень 17α-гидроксипрогестерона в плазме постепенно повышается до 32 недели гестации [370]. Тогда как 16α-гидроксипрогестерон продуцируется стероидогенной тканью, однако физиологическое значение этого стероида остается неясным.

Прогестерон обеспечивает децидуализацию эндометрия для нормальной имплантации эмбриона, содействует инвазии вневорсинчатого трофобласта в децидуа путем ингибирования его апоптоза [266]. Кроме действия на ткани-мишени матери, важное значение для сохранения беременности имеет имуносупрессивная активность ПГ, направленная на клеточный и гуморальный иммунные ответы и способствующая формированию в организме матери иммунологической толерантности по отношению к антигенам плода, наследуемым от отца [482, 522]. Плацентарный ПГ ингибирует иммунные ответы,

которые могут быть причиной повреждения плаценты или плода. Так как рецепторы ПГ экспрессируются на мачтовых клетках человека, NK-клетках, макрофагах, плазмацитоидных ДК, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитах, прогестины могут прямо модулировать функции этих клеток.

Во время беременности гормоны содействуют рекрутированию ключевых клеток врожденного иммунного ответа, таких как NK-клетки, макрофаги, ДК и мачтовые клетки, в зону плодово-материнского взаимодействия [368]. Повышенный уровень ПГ снижает цитотоксичность NK-клеток и продукцию INF-γ [397, 456]. Прогестерон ингибирует экспрессию оксида азота и IL-1 в макрофагах, содействующих тканевому ремоделированию и ангиогенезу [314], влияет на активацию мачтовых клеток матки, имеющих важное значение в имплантации и ремоделировании спиральных артерий [387]. Гормональная стимуляция (ПГ, эстрадиол и ХГЧ) приводит к формированию толерогенного фенотипа у активированных костномозговых ДК, уменьшению секреции провоспалительных цитокинов и снижению активации Т-лимфоцитов [333]. Прогестерон ингибирует способность ДК, моноцитов и макрофагов представлять антигены лимфоцитам [522].

С наступлением беременности в периферической крови увеличивается количество лимфоцитов, несущих рецепторы ПГ. Эстрадиол и ПГ вовлекаются в поддержание баланса между Th1- и Th2-лимфоцитами, содействуя преобладанию Th2 иммунного ответа, благоприятствующего физиологическому течению беременности [305]. ПГ способен супрессировать пролиферацию и дифференцировку CD4+ Т-лимфоцитов, дифференцировку и эффекторные функции Th1/Th17 клеток, повышать дифференцировку Th2/Treg клеток [524]. В присутствии ПГ лимфоциты высвобождают прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (PIBF), который изменяет профиль секреции цитокинов в сторону преобладания Th2-цитокинов, а также регулирует секрецию асимметричных антител [520]. Действие ПГ на В-лимфоциты включает снижение класс-свич рекомбинации и зависимой от Т-лимфоцитов продукции антител [522].

Кроме того, ПГ может супрессировать пути дифференцировки В-лимфоцитов при многих АИЗ.

1.9.2. Гиперчувствительность и аутоантитела к прогестерону у женщин с предменструальным синдромом и невынашиванием беременности

Гиперчувствительность к эстрогену или прогестерону играет важную роль у женщин с предменструальным синдромом и связанными с ним кожными заболеваниями [448]. Предменструальные дерматиты ассоциируются с гиперчувствительностью к эстрогенам. Прогестероновый дерматит, включающий циклическую предменструальную аллергическую сыпь (уртикарию) и ангионевротический отек, связан с гиперчувствительностью к эндогенному прогестерону [505]. В связи с отсутствием простого лабораторного диагностического теста и частыми кожными проявлениями гормональной аллергии в настоящее время для диагностики гиперчувствительности к половым стероидным гормонам применяется кожное тестирование [252, 303, 509].

В 2006 году впервые у женщин с астмой, мигренью и суставными болями, ассоциированными с менструальным циклом, с помощью ИФА была продемонстрирована продукция поликлональных антител (IgG, IgM, IgE) к стероидам, несмотря на малый размер их молекул [483]. Предполагается, что ПГ, эстрогены и их метаболиты после связывания с тканевыми белками или белками плазмы человека, например, альбумином или глобулином, могут распознаваться иммунной системой как полноценные антигены и запускать развитие Th2-лимфоцитов, регулирующих гуморальный ответ, в том числе образование IgE. Были обнаружены антитела к ПГ, гидрокортизону и эстрогену, но не к исходной для стероидов молекуле холестерола, что указывает на специфичность этих антител к определенным химическим структурам. Самые высокие уровни антител выявлялись к 17α-гидроксипрогестерону, по-видимому, ОН-группа в положении

C_{11} является значимой в образовании антигенной детерминанты у пациенток с гормональной аллергией. По-видимому, при связывании с соответствующими антигенами (гормонами и их метаболитами) и антителами к ним индуцируется дегрануляция мачтовых клеток и базофилов, что приводит к высвобождению гистамина, Th2-цитокинов и секреции лейкотриена, а в результате к системной анафилаксии в виде аллергической реакции и бронхиальной астмы.

В экспериментах на животных показано влияние антител к ПГ на наступление и развитие беременности. При активной иммунизации против ПГ путем введения конъюгата ПГ с БСА или кроличьих антиидиотипических антител, специфических для антипрогестероновых моноклональных антител, наблюдался антифертильный эффект, а введение высокоаффинных антипрогестероновых антител беременным лабораторным животным приводило к прерыванию беременности [158, 592].

Itsekson A.M. и коллеги (2007) с помощью внутрикожных тестов с женскими половыми гормонами, проведенных во II фазу менструального цикла, выявили гиперчувствительность к ПГ и/или эстрогену у женщин с 3 и более ранними потерями беременности и предложили использовать кожное тестирование для диагностики сенсибилизации к гормонам не только при ПМС, но и при ПНБ [471]. Предполагается, что нарушение иммунного ответа на женские половые гормоны могло развиться во время предыдущей беременности, осложненной выкидышем, в результате предшествующего приема гормональных контрацептивов или перекрестной реакции с кортикостероидами, использованными местно. Неадекватный иммунный ответ на ПГ, оказывая влияние на осуществление физиологической функции ПГ, может приводить к дефектам лютеиновой фазы, последующим нарушениям имплантации и физиологического течения беременности. Этот факт должен приниматься во внимание врачами-акушерами, которые дополнительно назначают препараты ПГ, чтобы поддержать беременность у женщин с необъяснимым привычным невынашиванием.

Хотя большинство кожных реакций опосредованы иммуноглобулинами Е, предполагается, что их идентификация может быть проявлением образования поликлональных антител разных изотипов, характерного для большинства аутоиммунных состояний. Предполагается, что гиперчувствительность к стероидным гормонам может приводить к повышенной активности NK-клеток и преобладанию Th1 иммунного ответа, с которыми ассоциируется самопроизвольный выкидыш [471].

Подобно предыдущему исследованию, Ellaithy M.I. и соавт. (2013) показали значительную ассоциацию между первичным необъяснимым ПНБ и реактивностью в кожных тестах с женскими половыми гормонами [504]. Положительная реакция в кожном тесте как с ПГ, так и с эстрадиолом наблюдалась через 20 минут почти в половине случаев, в дальнейшем частота положительной реакции повышалась в период от 24 часов до одной недели. По мнению авторов, имеется несколько возможных механизмов гормональной аллергии. Один из механизмов включает связывание ПГ, эстрогена или их метаболитов с протеинами крови, после чего они действуют как антигены и стимулируют развитие Th2-лимфоцитов, а в дальнейшем синтез IgE или других антител. При связывании антител с мачтовыми клетками, базофилами и соответствующими антигенами (гормонами или их метаболитами), происходит дегрануляция этих клеток, высвобождение гистамина, лейкотриенов и Th2-цитокинов. Результирующая реакция гиперчувствительности немедленного типа наблюдается спустя 20 минут, а поздняя фаза реакции - в пределах нескольких часов. Второй механизм предусматривает взаимодействие лимфоцитов с комплексом гормона с протеинами, стимуляцию пролиферации лимфоцитов и синтеза цитокинов, в результате развивается реакция гиперчувствительности замедленного типа, которая наблюдается позже в период от 24 часов до нескольких дней [483].

Roby R.R. и коллеги в 2006 году предположили возможность лечения некоторых расстройств, связанных гиперчувствительностью к половым стероидным гормонам, путем инициирования десенсибилизации [483].

Десенсибилизирующая терапия эффективно облегчала симптомы ПМС у 50-87% женщин с гиперчувствительностью к женским половым гормонам [448]. Кроме этого, коррекция гиперчувствительности к половым гормонам у женщин с ПНБ повышала шансы успешного исхода беременности [349].

Prieto-Garcia A. и соавт. (2011) впервые показали, что применение протокола быстрой десенсибилизации у женщин с аутоиммунным прогестероновым дерматитом перед процедурой ЭКО может приводить к наступлению успешных беременностей [124]. По рекомендации Foer D. и соавт. (2016), женщины с циклической формой течения аллергии, особенно пациентки ЭКО, должны обследоваться на гиперчувствительность к ПГ [457].

Таким образом, результаты недавно проведенных немногочисленных клинических исследований позволяют рассматривать антитела к гонадотропинам и женским половым гормонам как возможный фактор риска развития у женщин нарушений репродуктивной функции, включая бесплодие, неудачи в циклах ЭКО, и невынашивания беременности. Своевременное выявление антител или гиперчувствительности к гормонам и проведение соответствующих лечебных и профилактических мероприятий может повысить эффективность программ ЭКО и ПЭ при бесплодии, предупредить развитие осложнений беременности и улучшить исход беременности у женщин с ПНБ. В связи с этим исследования аутоантител к гормонам репродуктивной системы, в первую очередь, к ХГЧ и ПГ, представляют перспективное и недостаточно изученное направление в области иммунологии репродукции.

На сегодняшний день отсутствуют объективные тесты для скрининга на антитела к ХГЧ и ПГ, в то же время остается нерешенной проблема стандартизации анализов для определения аФЛ, продолжается поиск новых более эффективных диагностических маркеров АФС. Остается много дискуссионных вопросов, касающихся патогенетического значения антител и возможных механизмов участия антител в патогенезе потери беременности, диагностической значимости антител для привычного невынашивания беременности. До настоящего времени существует необходимость проведения крупных

исследований для определения распространенности антител к гормонам у пациенток с невынашиванием беременности и здоровых женщин, проспективных исследований для выявления прогностического значения антител для развития осложнений и исхода беременности. В связи с выше изложенным актуальным является проведение комплексного исследования антифосфолипидных антител и антител к гормонам ХГЧ и ПГ, включающего совершенствование методов выявления, изучение распространенности, физико-химических и иммунохимических свойств антител, определение их патогенетического, диагностического и прогностического значения при привычном невынашивании беременности у женщин.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объем и материал исследования

Работа выполнялась на базе лаборатории клинической иммунологии и 2-ого отделения акушерского патологии беременности (отделения терапии и профилактики невынашивания беременности) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Проведение исследования было одобрено Комиссией по этике Центра (протокол №33 от 14.12. 2012 г.). От каждой женщины было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

В исследование были включены 452 женщины с привычным невынашиванием беременности, из них 210 женщин с привычным невынашиванием на ранних сроках (до 12 недель гестации), 275 женщин вне беременности и 177 беременных женщин, и 47 беременных с угрожающим выкидышем на раннем сроке. Диагноз ПНБ и угрожающего выкидыша был поставлен в соответствии с международной классификацией болезней (МКБ-10). Проводили одномоментные исследования случай-контроль, в которых определяли распространенность, физико-химические и иммунохимические свойства, диагностическое значение антител к гормонам ХГЧ и ПГ и антифосфолипидных антител, показатели системы комплемента и иммунного статуса. При этом группу сравнения составляли 282 относительно здоровые фертильные женщины, 194 женщины вне беременности и 88 женщин в I или II триместре физиологически протекающей беременности без самопроизвольных потерь беременности в анамнезе.

Критерии включения в группу женщин с ПНБ:

– три и более случаев самопроизвольного прерывания беременности;

– наступление беременностей в естественном цикле;

– возраст пациенток 20-40 лет;

– информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Критерии включения в группу с угрожающим выкидышем на раннем сроке:

– одноплодная беременность, наступившая в естественном цикле;

– угроза прерывания беременности в I триместре (ощущение тяжести, боли внизу живота или области крестца, кровянистые выделения);

– возраст пациенток 20-40 лет;

– информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Критерии включения в контрольную группу:

– физиологически протекающая одноплодная беременность в I и II триместре, наступившая в естественном цикле;

– 1 или 2 физиологические беременности и роды в течение последних 5 лет до включения в исследование у небеременных женщин;

– возраст женщин 20-40 лет;

– информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Выполнялись проспективные когортные исследования, включающие динамическое наблюдение за течением беременности у женщин с привычным невынашиванием и повторное определение уровня антител к ХГЧ и ПГ во время беременности с частотой 1 раз в месяц.

Критерии включения:

– три и более случаев самопроизвольного прерывания беременности в анамнезе;

– одноплодная беременность в I триместре, наступившая в естественном цикле;

– возраст пациенток 20-40 лет;

– информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

При выполнении проспективных исследований беременные женщины с ПНБ были разделены по уровню антител к ХГЧ и ПГ на две подгруппы:

подгруппа I – с высоким уровнем антител к ХГЧ (n=56) или антител к ПГ (n=52) , превосходящим более чем в 2 раза средний уровень антител у здоровых женщин без потерь беременности (более 30 Ед/мл); подгруппа II – с низким уровнем антител к ХГЧ (n=32) или антител к ПГ (n=37), соответсвующим нормальному диапазону или превосходящим средний уровень антител у здоровых женщин менее чем в 2 раза (менее 30 Ед/мл). Конечной точкой исследования было определение частоты осложнений беременности в подгруппах с высоким и низким уровнем антител к гормонам и отношение шансов (OR) развития осложнений беременности в этих подгруппах.

Критериями исключения, общими для всех групп служили:

– пороки развития половых органов;

– носительство хромосомных перестроек;

– выраженные эндокринные нарушения;

– беременность после ЭКО и переноса эмбриона;

– многоплодная беременность;

– наличие инфекций, передаваемых половым путем;

– тяжелые экстрагенитальные и аутоиммунные заболевания.

Материалом для исследования служила сыворотка или плазма периферической венозной крови. Забор крови проводился из локтевой вены в утренние часы натощак. Взятие цельной периферической крови проводили в вакуумные пластиковые пробирки типа SARSTEDT (Германия) объёмом 10,0 мл с активатором свертывания или пробирки объемом 5,0 мл с добавленным в качестве антикоагулянта 3,2%-ным натрием лимоннокислым трехзамещенным двухводным в соотношении с кровью 1:9.

Образцы сыворотки крови хранили при температуре 2–8ºС не более 5 дней, образцы цитратной плазмы не более 4 часов, далее хранение осуществлялось при температуре минус 20ºС в течение 1 месяца или при температуре минус 70ºС в течение 1 года.

2.2 Стандартные методы исследования

В соответствии с поставленными задачами в исследование были включены женщины, обратившиеся в научно-поликлиническое отделение центра за период 2000-2016 гг. по поводу привычного невынашивания беременности, которые прошли клинико-лабораторное обследование в соответствии со схемой и клиническим протоколом, разработанными и принятыми во 2-ом отделении акушерском патологии беременности (отделении терапии и профилактики невынашивания беременности) центра [22]. Данная схема обследования предусматривала:

– подробный сбор анамнеза (количество, характер, сроки прерывания предыдущих беременностей, становление менструальной функции, наследственность, условия жизни, наличие профессиональных вредностей, учет соматических, аутоиммунных заболеваний);

– объективный осмотр (определение состояния слизистых наружных половых органов, влагалища, шейки матки, положения, величины матки, состояния придатков);

– кариотипирование супругов;

– гистеросальпингографию;

– ультразвуковое исследование органов малого таза в I и во II фазах менструального цикла;

– клинический и биохимический анализ крови;

– общий анализ мочи;

– гормональные исследования (определение гормонов ФСГ, ЛГ, пролактина, ТТГ, Т4 свободного, тестостерона, эстрадиола дегидроэпиандростерона сульфата (ДГАС), 17-оксипрогестерона (17-ОП) на 2-3 день I фазы менструального цикла, прогестерона во II фазе на 21-23 день цикла, во время беременности ХГЧ, прогестерона);

– гемостазиологическое исследование крови с определением фибриногена по Клауссу, протромбина по Квику, международного нормализованного отношения (МНО), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), показателей тромбоэластограммы (r+k, Ma, ИТП), агрегации тромбоцитов с АДФ, растворимых комплексов мономеров фибрина (РКМФ), волчаночного антикоагулянта с помощью теста с разведенным ядом гадюки Рассела (dRVVT);
– бактериоскопию и бактериологическое исследование влагалищного секрета и отделяемого цервикального канала, исследование методом ПЦР клеток цервикального канала на наличие ВПГ, ЦМВ, хламидий, микоплазм, уреаплазм;
– определение HBsAg, реакции Вассермана, антител (IgM, IgG) к вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1, гепатита С, цитомегаловирусу, вирусу простого герпеса I и II типа, вирусу краснухи, к хламидии трахоматис, токсоплазме гондии в крови.

2.3 Специальные методы исследования

Базовым методом исследования служил иммуноферментный анализ, который использовался для определения спектра антифосфолипидных антител, антител к гормонам ХГЧ и ПГ разных классов (M, G, A, E) и подклассов IgG 1-4, авидности антител, а также показателей системы комплемента. Для проведения ИФА применялись автоматическое промывное устройство типа PW40 (Bio-Rad, США) или Wellwash (ThermoFisher Scientific, Finland), орбитальный шейкер для микропланшет типа S-3L (ELMI, Республика Латвия), фотометр микропланшетный типа MULTISCAN EX (Thermo Electron (Shanghai) Instruments Co., Китай), автоматический иммуноферментный анализатор Freedom EVOlyzer (Tecan, Австрия). Иммуноферментные наборы использовались согласно инструкции по применению фирмы-производителя. Для проведения хемилюминесцентного иммуноанализа использовался автоматический

хемилюминесцентный анализатор ACL Acustar™ (Instrumentation Laboratory, США).

2.3.1 Определение антифосфолипидных антител с использованием иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга и хемилюминесцентного иммуноанализа

Для качественного определения профиля аФЛ классов M и G в сыворотке крови использовали наборы «Anti-phospholipid Dot» (MEDIPAN GMBH, Германия), основанные на использовании метода иммуноблоттинга и включающие комплект реагентов и 20 пронумерованных тест-полосок из поливинилденфторидной (PVDF) мембраны, на которые нанесены контрольное поле с положительным контролем и тестовые поля, содержащие по одному очищенному антигену в каждом поле. В наборах для определения спектра аФЛ тестовые поля содержали четыре антигена (КЛ, ФС, ФИ и β2-ГП-I).

На первой стадии анализа на каждую тест-полоску, размещенную в инкубационной ванне, наносилась сыворотка крови и проводилась инкубация при 20±2ºС в течение 30 минут, антитела из исследуемых образцов связывались с антигенами, иммобилизованными на мембране. Не связавшиеся компоненты удалялись из инкубационной ванны путем декантирования и промывания тест-полоски. На второй стадии анализа полоски со связавшимися сывороточными антителами инкубировались с антителами к IgM или IgG человека, меченными пероксидазой хрена, при 20±2ºС в течение 15 минут. Избыток конъюгата удалялся из ванны путем декантирования и промывания тест-полоски. Затем полоски помещали в раствор субстрата, в результате ферментативной реакции на мембране осаждался продукт лилового цвета в виде поперечной полосы. Ферментативную реакцию останавливали путем двухэтапного промывания буфером, а затем дистиллированной водой. Результат реакции оценивали после

высыхания тест-полоски путем сравнения с прилагающимся шаблоном интерпретации. Указанная на шаблоне интенсивность соответствующих полей с антигенами служила для оценки положительного или отрицательного результата. При этом появлялась полоса положительного контроля при правильном проведении анализа и полной реакционной способности всех реагентов.

Содержание антител к фосфолипидам (КЛ, ФС, ФЭ) и фосфолипид-связывающим протеинам (β2-ГП-I, Ан А5, ПТ), комплексу ФС/ПТ в сыворотке крови определяли методом непрямого твердофазного ИФА с использованием коммерческих иммуноферментных наборов для количественного определения аФЛ классов M и G (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Характеристика иммуноферментных тест-систем для количественного определения антифосфолипидных антител, использованных в исследовании.

Вид антител	Фирма-производитель	Чувствительность тест-системы	Нормальный диапазон
Антитела к КЛ	ORGENTEC Diagnostika	IgM: 0,5 MPL-Ед/мл IgG: 1 GPL-Ед/мл	IgM<10MPL-Ед/мл IgG<10 GPL-Ед/мл
Антитела к β2-ГП-I	ORGENTEC Diagnostika	IgM: 0,5 Ед/мл IgG: 0,5 Ед/мл	IgM<5 Ед/мл IgG<5 Ед/мл
Антитела к ФС	ORGENTEC Diagnostika	IgM:0,5 Ед/мл IgG: 0,5 Ед/мл	IgM <10 Ед/мл IgG <10 Ед/мл
Антитела к Ан А5	ORGENTEC Diagnostika	IgM: 1 Ед/мл IgG: 1 Ед/мл	IgM<5 Ед/мл IgG<5 Ед/мл
Антитела к ПТ	ORGENTEC Diagnostika	IgM: 1 Ед/мл IgG: 1 Ед/мл	IgM<10 Ед/мл IgG<10 Ед/мл
Антитела к ФЭ	AESKU. DIAGNOSTICS	IgM: 1 Ед/мл IgG: 1 Ед/мл	IgM<12 Ед/мл IgG<12 Ед/мл
Антитела к комплексу ФС/ПТ	AESKU. DIAGNOSTICS	IgM: 1 Ед/мл IgG: 1 Ед/мл	IgM<12 Ед/мл IgG<12 Ед/мл

Количественное определение аФЛ проводилось в соответствии с инструкцией по применению фирмы-производителя, прилагаемой к набору. В лунки микропланшета, покрытые высокоочищенным препаратом соответствующего фосфолипида или фосфолипид-связывающего протеина, вносили 6 калибраторов, отрицательный и положительный контроли и образцы сыворотки крови, предварительно разведенные 1:100 по объему в буфере для разведения. Присутствующие в образцах антитела связывались с антигеном, иммобилизованным на поверхности лунок, во время инкубации при 20±2ºС в течение 30 минут. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки путем декантирования и 3-х-кратного промывания планшета в лунки добавляли конъюгат антител против IgG, IgM человека с пероксидазой хрена в рабочем разведении для выявления аутоантител в комплексах с иммобилизованным на твердой фазе антигеном и инкубировали при 20±2ºС в течение 15 минут. Избыток конъюгата удаляли вытряхиванием, планшет промывали 3 раза. Затем добавляли раствор хромогенного субстрата, содержащий 3,3’,5,5’-тетраметилбензидин (ТМБ), и проводили инкубацию при 20±2ºС в течение 15 минут. Цвет раствора изменялся на голубой. Ферментативную реакцию останавливали добавлением равного объема стоп-раствора, содержащего кислоту. Цвет раствора изменялся на желтый, интенсивность окрашивания была прямо пропорциональна концентрации специфических IgM или IgG в образце. Оптическую плотность измеряли на микропланшетном фотометре MULTISCAN EX при 450 нм. Концентрацию антител в исследуемом образце определяли по 4-параметрической калибровочной кривой зависимости ОП от концентрации антител, построенной в линейно-логарифмических координатах.

Для определения антител (IgM, IgG) к β2-ГП-I и IgG-антител к домену I β2-ГП-I применяли хемилюминесцентный иммуноанализ с использованием автоматического хемилюминесцентного анализатора ACL Acustar™ (Instrumentation Laboratory, США), наборов HemosIL Acustar (Instrumentation Laboratory, Испания) и QUANTA Flash (Inova Diagnostics, США). В таблице 2.2 представлены фирмы-производители наборов, чувствительность определения и

нормальный диапазон концентраций для тест-систем, использованных в исследовании.

Таблица 2.2 – Характеристика наборов реагентов для хемилюминесцентного иммуноанализа, использованных в исследовании для определения антител к β2-ГП-I и домену 1 β2-ГП-I

Наименование антител	Фирма-производитель	Чувствительность тест-системы	Нормальный диапазон
Антитела к β2-ГП -I	Instrumentation Laboratory, Испания	IgM: 1,1 Ед/мл IgG: 6,4 Ед/мл	IgM< 20 Ед/мл IgG< 20 Ед/мл
Антитела к домену I β2-ГП-I	Inova Diagnostics, Inc., США	IgG: 3 CU	IgG< 20 CU

Присутствующие в образцах сыворотки крови антитела к β2-ГП-I связывались с очищенным β2-ГП-I человека, наслоенным на магнитные частицы. После инкубации, магнитного разделения и этапа промывания в кювету добавлялись антитела к IgM или IgG человека, меченные изолюминолом, которые связывались с антителами к β2-ГП-I на магнитных частицах. После второй инкубации, магнитного разделения и этапа промывания добавлялись реагенты, запускающие люминесцентную реакцию. Свет, испускаемый в результате реакции измерялся оптической системой ACL Acustar™ в относительных единицах света (RLUs). Количество RLUs было прямо пропорционально концентрации антител к β2-ГП-I класса G или M в образцах. Для оценки результатов анализа использовалась 4-х параметрическая логистическая кривая. При измерении калибраторов сохраненная в анализаторе кривая, специфическая для лота, трансформировалась в рабочую кривую, специфическую для прибора.

С помощью ХЛИА проводили полуколичественное определение IgG-антител к домену I β2-ГП-I в сыворотке крови человека или цитратной плазме с использованием наборов QUANTA Flash. Парамагнитные частицы с наслоенным

очищенным рекомбинантным доменом I β2-ГП-I хранились в реагентном картридже при условиях, поддерживающих антиген в реактивном состоянии. При использовании картриджа в первый раз в пробирку, содержащую частицы, добавляли буферный раствор и ресуспендировали в нем частицы. Реагентный картридж затем помещали внутрь анализатора ACL Acustar™. В пластиковой кювете выполнялось разведение образца сыворотки крови 1:10. Малые количества разведенной сыворотки пациента, частиц с доменом I β2-ГП-I и буфера для анализа смешивались во второй кювете, которая после этого инкубировалась при 37ºС. Затем частицы намагничивались и промывались несколько раз. В кювету добавлялись антитела к IgG человека, меченные изолюминолом, и проводилась инкубация при 37ºС. Частицы намагничивались и промывались повторно. При добавлении в кювету «триггер»-реагента запускалась люминесцентная реакция. Свет, произведенный в результате этой реакции, измерялся оптической системой ACL Acustar™ в относительных единицах света (RLUs), количество которых было пропорционально количеству IgG-антител, связанных с доменом I β2-ГП-I на частицах. На основе предварительно построенной кривой, специфической для лота, при исследовании двух калибраторов создавалась рабочая кривая, специфическая для прибора, которая использовалась для расчета хемилюминесцентных единиц (CU) по величине RLUs, полученной для каждого образца, и оценки результатов.

2.3.2. Определение антител к хорионическому гонадотропину человека, свободным α- и β-субъединицам, эпитопам β-субъединицы методом иммуноферментного анализа

С помощью модификаций непрямого твердофазного ИФА проводили исследование антител к цельной молекуле ХГЧ, свободным α- и β- субъединицам гормона или синтетическим пептидам β-ХГЧ классов M, G, A, E.

Иммобилизацию ХГЧ на полистирольные микропланшеты высокой сорбционной емкости Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Дания) проводили двумя способами: путем пассивной адсорбции ХГЧ на полистирол или путем образования иммунохимической связи с адсорбированными на полистироле мышиными МКАТ к α-субъединице ХГЧ. С помощью титрования в двух направлениях по методу «шахматной доски» с использованием серийных последовательных разведений определяли оптимальные концентрации антигенов для адсорбции на твердую фазу и рабочие разведения конъюгатов, при которых достигались высокие значения ОП положительных контрольных сывороток с разным содержанием антител при низких значениях ОП отрицательных контрольных сывороток (менее 0,2 ед. ОП) и фонового сигнала в лунках с буферным раствором вместо исследуемого образца, а, следовательно, наибольшие соотношения ОП положительных и отрицательных контролей и сигнал/фон.

Первый способ использовали для иммобилизации на полистирол ХГЧ и отдельных α- или β-субъединиц ХГЧ. Раствор ХГЧ, α-ХГЧ или β-ХГЧ (Sigma-Aldrich; ООО «Биалекса», Россия) в 0,1 М фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) (pH 7,4±0,2) в концентрации 5 мкг/мл вносили в лунки по 100 мкл и инкубировали при 20±2ºС в течение 18±2 часов. Раствор из лунок удаляли вытряхиванием, планшет промывали ФСБР, содержащим 0,05% по объему твина-20 (ФСБР-Т), 3 раза по 300 мкл в лунку на автоматическом промывателе. Свободные центры связывания на поверхности твердой фазы блокировали 1%-ным раствором БСА в ФСБР, раствор вносили по 200 мкл в лунку и инкубировали при 20±2ºС в течение 90±5 минут. После инкубации раствор удаляли вытряхиванием, лунки промывали трижды ФСБР-Т на автоматическом промывателе.

Согласно второму способу иммобилизации ХГЧ в лунки микропланшета Nunc MaxiSorp вносили по 100 мкл раствора МКАТ к α-ХГЧ в ФСБР в концентрации 1,25 мкг/мл и инкубировали при 20±2ºС в течение 18±2 часов. Раствор из лунок удаляли вытряхиванием, планшет промывали ФСБР-Т по 300 мкл в лунку 3 раза на автоматическом промывателе. Поверхность твердой фазы

обрабатывали 1%-ным раствором БСА в ФСБР, раствор вносили по 200 мкл в лунку и инкубировали при 20±2ºС в течение 90±5 минут. После 3-х-кратного промывания планшета ФСБР-Т в лунки добавляли раствор ХГЧ в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, в концентрации 0,6 мкг/мл по 100 мкл в лунку, инкубировали на орбитальном шейкере при 180±20 об/мин при 20±2ºС в течение 60±5 минут. Затем планшет промывали ФСБР-Т 4 раза.

Положительные и отрицательные контрольные сыворотки, исследуемые образцы сыворотки крови, предварительно разведенные 1:100 по объему в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, вносили в лунки планшета по 100 мкл и инкубировали на орбитальном шейкере при 20±2ºС в течение 60±5 минут. После 4-х-кратного промывания ФСБР-Т в лунки вносили МКАТ к IgM, IgG или IgA человека, меченные пероксидазой хрена (АО «Вектор-Бест», Россия), в разведениях 1:3000, 1:4000 и 1:3000, соответственно, в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, по 100 мкл, инкубировали на орбитальном шейкере при 20±2ºС в течение 60±5 минут. Избыток конъюгата удаляли из лунок вытряхиванием, планшет промывали ФСБР-Т 4 раза. В лунки добавляли по 100 мкл субстратно-хромогенного раствора, содержащего ТМБ и перекись водорода (H_2O_2) (АО «Вектор-Бест»), инкубировали при 20±2ºС в течение 15±5 минут. Ферментативную реакцию останавливали добавлением равного объема стоп-реагента, содержащего 0,5 М H_2SO_4 (АО «Вектор-Бест»). Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на микропланшетном фотометре MULTISKAN EX при длине волны 450 нм. Результат считали положительным, если средняя ОП исследуемого образца сыворотки крови превышала более чем на два стандартных отклонения среднюю ОП контрольных сывороток здоровых женщин (n=30).

При определении антител к ХГЧ класса IgE образцы сыворотки крови разводили 1:10 по объему в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, вносили в лунки по 100 мкл и инкубировали на орбитальном шейкере при 600 об/мин и 20±2ºС в течение 120±10 минут. После 4-х-кратного промывания в лунки вносили антитела к IgE человека, меченные пероксидазой хрена (АО «Вектор-Бест»), в разведении 1:2000 по объему в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, по 100 мкл, инкубацию

проводили на орбитальном шейкере при 180±20 об/мин при 20±2ºС в течение 60±5 минут.

Контролировали неспецифическое связывание конъюгатов с поверхностью твердой фазы, при этом ИФА проводили как описано выше, но на этапе реакции антиген-антитело вместо образца сыворотки кроки вносили буферный раствор для разведения. Кроме того, контролировали взаимодействие сывороточных антител с IgG мыши или БСА. Для этого в лунках микропланшета Nunc MaxiSorp адсорбировали IgG мыши из 100 мкл раствора в ФСБР в концентрации 1,25 мкг/мл при 20±2ºС в течение 18±2 часов или БСА из 100 мкл 1%-ного раствора БСА в ФСБР при 20±2ºС в течение 180±10 минут без иммобилизации специфического антигена, а ИФА выполняли как описано выше.

Для определения эпитопной специфичности антител к ХГЧ в ИФА использовали микропланшеты NUNC IMMOBILIZER AMINO (Thermo Fisher Scientific Nunc A/S), предназначенные для прочной иммобилизации лигандов на поверхности лунок за счет образования ковалентных связей между аминогруппами, тиоловыми и гидроксильными группами и электрофильными группами на полистироле. Иммобилизацию синтетических пептидов β-ХГЧ проводили в соответствии с протоколом, приведенным в инструкции фирмы-производителя микропланшетов.

В лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора пептида β-ХГЧ С109-119 или С109-145 (Bachem AG, Швейцария) в 100 мМ карбонатном буфере (pH 9,6) в концентрации 50 мкг/мл и инкубировали на орбитальном шейкере при 180±20 об/мин при 20±2ºС в течение 120±10 минут. Раствор из лунок удаляли вытряхиванием, планшет промывали ФСБР-Т по 300 мкл 3 раза на автоматическом промывателе. Затем планшет обрабатывали 1%-ным раствором БСА, раствор вносили по 200 мкл в лунку и инкубировали при 20±2ºС в течение 90±10 минут. Планшет промывали ФСБР-Т 3 раза. Далее ИФА выполняли как описано выше для определения антител к ХГЧ за исключением того, что образцы сыворотки крови исследовали в разведении 1:50 по объему, а конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена использовали в разведении 1:3000 по объему.

2.3.3 Определение антител разных классов к прогестерону методом иммуноферментного анализа

Для определения аПГ на поверхность лунок полистирольных микропланшетов Nunc MaxiSorp иммобилизовали конъюгат прогестерона с БСА (ПГ-3-БСА или ПГ-11-БСА (Sigma-Aldrich) или конъюгат производной ПГ гидроксипрогестерона с гемоцианином (ПГ-3-Гем или ПГ-11-Гем) (Michigan Diagnostics, США). Раствор конъюгата ПГ с БСА или Гем в ФСБР в концентрации 1,25 мкг/мл вносили по 100 мкл в лунку и инкубировали при 20±2ºС в течение 18±2 часов. Раствор из лунок удаляли вытряхиванием, планшет промывали ФСБР-Т по 300 мкл 3 раза на автоматическом промывателе. Поверхность лунок обрабатывали 1%-ным раствором БСА в ФСБР, раствор вносили по 200 мкл в лунку и инкубировали при 20±2ºС в течение 90±10 минут. Планшет промывали ФСБР-Т трижды. Образцы сыворотки крови разводили в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, 1:100 по объему, вносили в лунки по 100 мкл и инкубировали на орбитальном шейкере при 180±20 об/мин при 20±2ºС в течение 60±5 минут. Планшет промывали ФСБР-Т 4 раза. В лунки планшета вносили мышиные МКАТ к IgM, IgG или IgA человека, меченные пероксидазой хрена (АО «Вектор-Бест»), соответственно, в разведениях 1:3000, 1:4000 и 1:1500 по объему в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, по 100 мкл в лунку и инкубировали на орбитальном шейкере при 180±20 об/мин при 20±2ºС в течение 60±5 минут. После 4-х-кратного промывания в лунки вносили субстратно-хромогенный раствор, содержащий ТМБ и H_2O_2 (АО «Вектор-Бест»), инкубировали при 20±2ºС в течение 15±5 минут. Ферментативную реакцию останавливали добавлением равного объема стоп-реагента (АО «Вектор-Бест»), содержащего 0,5 М H_2SO_4. Оптическую плотность измеряли на фотометре MULTISKAN EX при длине волны 450 нм. Результат ИФА считали положительным, если средняя ОП

исследуемого образца превышала среднюю ОП контрольных сывороток здоровых женщин (n=30) более чем на два стандартных отклонения.

2.3.4 Определение IgG-антител разных подклассов к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам

Подклассы IgG-антител к ХГЧ, ПГ, КЛ, β2-ГП-I и Ан А5 определяли в ИФА с использованием для выявления антител в комплексе антиген-антитело на твердой фазе мышиных МКАТ к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека, конъюгированных с биотином, и стрептавидина, меченного пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США). ИФА для определения аФЛ выполняли в соответствии с инструкцией по применению набора, конъюгаты МКАТ с биотином к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека вносили в разведениях 1:4000, 1:6000, 1:4000, 1:12000 в 0,1 М фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,4±0,2), содержащем 0,05% по объему твина-20 и 0,5% БСА, по 100 мкл в лунки и инкубировали на орбитальном шейкере при 180±20 об/мин при 20±2ºС в течение 60±5 минут, а после 3-х-кратного промывания в планшет вносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена в разведении 1:1000 в том же буфере по 100 мкл в лунки и инкубировали при 20±2ºС в течение 30 минут. Оптическую плотность измеряли на фотометре MULTISKAN EX при длине волны 450 нм. Результат считали положительным, если средняя ОП исследуемого образца сыворотки крови превышала более чем на два стандартных отклонения среднюю ОП контрольных сывороток здоровых женщин (n=20).

Определении подклассов IgG-антител к ХГЧ проводили аналогичным способом, ИФА выполняли, как описано выше в параграфе 2.3.2, конъюгаты мышиных МКАТ с биотином к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека использовали в разведениях 1:4000, 1:12000, 1:4000, 1:12000 по объему, соответственно, а конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена - в разведении 1:1000 по объему.

При определении подклассов IgG-антител к ПГ анализ выполняли, как описано в параграфе 2.3.3, конъюгаты мышиных МКАТ с биотином к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека использовали в разведениях 1:2000, 1:4000, 1:4000, 1:4000 по объему, конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена - в разведении 1:1000 по объему. Далее анализ и оценку результатов проводили как описано выше для аФЛ.

2.3.5 Способы определения авидности антифосфолипидных антител и антител к гормонам

Для определения авидности аФЛ ИФА проводили в соответствии с инструкцией по применению набора за исключением того, что на этапе взаимодействия антител с иммобилизованным на твердой фазе антигеном в лунки вносили исследуемые образцы сыворотки крови, разведенные в буферном растворе, содержащем повышенную концентрацию NaCl (0,5 М) вместо физиологической (0,15 М), как описано Čučnik S. и соавт. (2004) [291]. После измерения ОП в лунках на фотометре MULTISKAN EX при длине волны 450 нм рассчитывали индекс авидности (ИА) по формуле:

$$ИА = \frac{ОП_1}{ОП_2} \times 100\%, \quad (1)$$

где $ОП_1$ – ОП в лунках, в которых реакция антиген-антитело проводилась в буфере, содержащем 0,5 М NaCl;

$ОП_2$ – ОП в лунках, в которых использовался реакционный буфер с физиологической концентрацией NaCl (0,15 М).

Уровень авидности антител оценивали как высокий при ИА более 70%, как средний или гетерогенный при 30%< ИА <70% и как низкий при ИА менее 30%.

Авидность антител к ХГЧ и ПГ определяли в ИФА двумя способами. Первый способ был аналогичным описанному для аФЛ, при этом ИФА выполняли, как описано в параграфе 2.3.2 или 2.3.3, за исключением того, что в лунки вносили исследуемые образцы сыворотки крови, разведенные в буферном растворе, содержащем повышенную концентрацию NaCl (0,5 М) вместо физиологической (0,15 М). Индекс авидности рассчитывали по формуле (1), приведенной выше для аФЛ.

Согласно второму способу после инкубации с исследуемой сывороткой крови, образования комплекса антиген-антитело на твердой фазе и 4-х-кратного промывания ФСБР-Т планшета в лунки вносили белок-диссоциирующий агент (БДА) (АО «Вектор-Бест»), удаляющий с поверхности твердой фазы низкоавидные антитела, и проводили инкубацию при 20±2ºС в течение 15 минут. После удаления БДА из лунок вытряхиванием планшет промывали ФСБР-Т 4 раза. Далее ИФА проводили как описано в параграфах 2.3.3 или 2.3.4. После измерения ОП рассчитывали показатель ИА антител по формуле:

$$ИА = \frac{ОП_1}{ОП_2} \times 100\%, \qquad (2)$$

где $ОП_1$ — ОП в лунках, обработанных БДА;

$ОП_2$ — ОП в лунках с тем же исследуемым образцом без обработки БДА.

Уровень авидности антител к ХГЧ или ПГ оценивали по значению ИА аналогичным образом, как и уровень авидности аФЛ: при ИА более 70% - высокий, при 30%< ИА <70% - средний или гетерогенный, при ИА менее 30% - низкий.

2.3.6 Использование методов хроматографии для выделения аффинно очищенных антител к хорионическому гонадотропину человека и фракции IgG из сыворотки крови женщин

Для получения очищенных антител к ХГЧ из пулированной сыворотки крови женщин с ПНБ проводили аффинную хроматографию с использованием CNBr-активированной сефарозы 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). Сухую сефарозу в количестве 3,0 г замачивали для набухания в 1 мМ HCl в течение 15 минут, а затем промывали на фильтре из пористого стекла (пористость G3) тем же раствором из расчета 200 мл раствора на 1 г сухого геля. Затем гель промывали связывающим буфером (5 мл на 1 г сухого геля) 0,1М раствором бикарбоната натрия (pH 8,3), содержащим 0,5 М NaCl, и немедленно переносили в раствор ХГЧ (2 мг/мл; ООО «Биалекса») в том же буфере, соблюдая соотношение объемов геля и буфера 1:2. Эту смесь, содержащую протеин и гель, инкубировали при 20±2ºС в течение 2 часов при мягком перемешивании. Измерение концентрации белка после инкубации с активированной сефарозой показало, что в растворе осталось не более 10% исходного белка. Для блокирования оставшихся активных групп на CNBr-активированной сефарозе 4B гель переносили в буфер, содержащий 0,2 М глицин (pH 8,0), и инкубировали при 4ºС в течение 16 часов. От избытка не связавшегося протеина адсорбент промывали 4-5 раз попеременно буферными растворами с высоким и низким pH, соответственно, 0,1 М ацетатным буфером (pH 4,0) и связывающим 0,1 М раствором бикарбоната натрия (pH 8,3), содержащим 0,5 М NaCl.

Для выделения антител к ХГЧ через колонку с 10 мл сефарозы 4B, связанной с ХГЧ, пропускали 40 мл пулированной сыворотки крови, положительной на антитела к ХГЧ, со скоростью 0,1-0,4 мл/мин при 4ºС в течение 18 часов с использованием перистальтического насоса. Затем колонку промывали ФСБР, контролируя содержание белка в элюате с помощью проточного ультрафиолетового детектора Uvicord SII (Pharmacia LKB). После снижения

концентрации белка до нуля специфически связавшиеся с ХГЧ антитела элюировали с использованием 3 М раствора $MgCl_2$. Элюат собирали с помощью коллектора фракций FRAC-100 (Pharmacia). Содержащие белок фракции объединяли и пропускали через колонку с сефадексом G-25 (Pharmacia) для быстрой замены элюирующего раствора на ФСБР методом гель-фильтрации. Полученный препарат объемом 20 мл помещали в диализный мешок и концентрировали в 10 раз путем диализа против карбоксиметилцеллюлозы (Aquacide 11, Calbiochem) до конечной концентрации белка в препарате 1 мг/мл. В концентрированный белковый препарат добавляли NaN_3 (0,08%) и хранили при 4ºС.

Для подтверждения иммуноглобулиновой природы полученного белкового препарата проводили иммуноэлектрофорез в 1%-ном агарозном геле в 0,05М мединал-вероналовом буфере (рН 8,6), сочетающий электрофорез с иммунодиффузией, с использованием контрольной сыворотки человека и моноспецифических сывороток к иммуноглобулинам М, G и А человека производства Нижегородского НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. После образования линий преципитации гель отмывали, препарат высушивали при 20±2ºС и окрашивали 1% раствором амидо черного 10В в 7%-ной уксусной кислоте. После отмывания препарата до обесцвечивания фона полосы преципитации сохраняли темно-синюю окраску.

Выделение фракции IgG из сывороток крови пациенток с ПНБ, положительных на антитела к ХГЧ, осуществляли с использованием суперпарамагнитных частиц Ecomag™ Protein A/G (Bioclone, США), состоящих из двуокиси кремния и окиси железа, с поверхностью которых ковалентно связан рекомбинантный комбинированный протеин A/G (чистота препарата ≈80%), и предназначенных для быстрого и эффективного одностадийного выделения IgG из образцов сыворотки, плазмы или асцитной жидкости. Суспензия частиц Ecomag™ Protein A/G с диаметром 1μm-10 μm и концентрацией 50 мг/мл в 10 мМ трис-HCl буферном растворе (рН 7,4), содержащем 0,15 М NaCl, 0,1% БСА, 1 мМ

ЭДТА и 0,1% NaN_3, обладают связывающей способностью около 2,5 мг IgG на 1 мл суспензии частиц.

Выделение IgG из образцов сыворотки крови человека проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя с использованием буферных растворов фирмы Bioclone. Перед использованием флакон с магнитными частицами осторожно перемешивали встряхиванием до полного ресуспендирования частиц в буфере. В чистую пробирку объемом на 1,5 мл вносили 200 мкл суспензии, пробирку помещали на 1 минуту в магнитный сепаратор и, не вынимая ее из сепаратора, удаляли супернатант. Затем пробирку извлекали из сепаратора и осадок магнитных частиц промывали 5 объемами (по отношению к исходному объему суспензии магнитных частиц) промывающего буфера, содержащего 57,7 мМ Na_2HPO_4 и 42,3 мМ NaH_2PO_4, pH 7,0 (буфер № 1). Далее пробирку снова помещали в магнитный сепаратор и через 1 минуту, не вынимая ее из сепаратора, удаляли супернатант. Промывку повторяли 2 раза. Магнитные частицы ресуспендировали в буфере №1, тщательно перемешивали на вортексе и переносили по 100 мкл в лунки микропланшета из пластика с низкой сорбционной способностью. Затем в лунки с магнитными частицами добавляли по 20 мкл сыворотки крови, тщательно перемешивали пипетированием, после чего планшет инкубировали при 20±2ºС в течение 60±10 минут на орбитальном шейкере при 200 об/мин. Затем планшет помещали в магнитный сепаратор и через 1 минуту отбирали супернатант из лунок с магнитными частицами. Далее частицы промывали буфером №1 по 300 мкл на лунку как описано выше. Связавшиеся с магнитными частицами иммуноглобулины элюировали добавлением в лунки элюирующего буфера, содержащего 0,2 М глицин-HCl, pH 2,5 (буфер №2), по 100 мкл на лунку, тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали при 4º С в течение 10 минут, периодически перемещивая. Планшет помещали на 1 минуту в магнитный сепаратор и, не вынимая его из сепаратора, тщательно собирали супернатант, содержащий элюированные антитела, который переносили в пробирки с 40 мкл нейтрализующего буфера, содержащего 1,0 М трис-HCl, pH 9,0 (буфер №3), и перемешивали на вортексе. Далее во все образцы

добавляли по 200 мкл стабилизирующего буфера (буфер №4) для обеспечения стабилизации антител при хранении.

2.3.7 Исследование взаимодействия антител с хорионическим гонадотропином человека с помощью автоматизированного оптического биосенсора ProteON XPR36

Взаимодействие сывороточных антител с ХГЧ исследовали в режиме реального времени с помощью автоматизированного оптического биосенсора ProteON XPR36 (Protein Interaction Array System; Bio-Rad, США), в котором используется метод поверхностного плазмонного резонанса и специальные микрофлюидные сенсорные чипы (6x6), позволяющие проводить одновременно анализ 36 независимых реакций между исследуемыми молекулами без применения каких-либо меток. На золотую поверхность сенсорной призмы чипа, покрытую полимерным слоем модифицированного альгината, иммобилизовали биомолекулы в виде монослоя путем связывания аминогрупп белка с активными карбоксильными группами на поверхности чипа.

В исследовании использовали чип GLC (6x6), предназначенный для исследования взаимодействия белок-белок, буферы, растворы и реагенты ProteOn для оптимизации связывания аминогрупп, иммобилизации, регенерации и создания протокола. Перед нанесением белка многоканальный чип GLC промывали раствором, содержащим 50 мМ NaOH и 1М NaCl, для стабилизации поверхности чипа. Затем чип активировали смесью 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил) карбодиимид гидрохлорида (0,13 М) и N-гидроксисульфосукцинимида (0,03 М) в течение 120 сек. Мышиные МКАТ к α-субъединице ХГЧ иммобилизовали на поверхность чипа в 10 мМ ацетатном буферном растворе (pH 4,0) в концентрации 3 мкг/мл по 150 мкл на один канал в течение 400 сек, мониторируя связывание белка в режиме реального времени,

при этом уровень полученного сигнала достигал 4600 RU (резонансных единиц). Реакцию иммобилизации завершали обработкой поверхности чипа 1 М раствором этаноламина (pH 8,5) в течение 200 сек. ХГЧ иммобилизовали непосредственно на поверхность чипа в концентрации 30 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере с pH 5,5 по 150 мкл на канал в течение 400 сек или наносили на дорожки с иммобилизованными МКАТ к α-ХГЧ, предварительно промытые 100 мМ HCl, в концентрации 60 мкг/мл в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, по 300 мкл и инкубировали в течение 400 сек. На одну дорожку белок не наносили, ее использовали в качестве контрольной. Сигнал от ФСБР (pH 7,4) оценивали как нулевой. Сыворотки крови пациенток с ПНБ разводили 1:50 по объему в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, вносили в соответствующие каналы чипа (скорость введения 100 мкл/мин) и инкубировали при 25ºС в течение 690 сек. Затем после промывания чипа 100 мМ HCl на те же дорожки наносили МКАТ к β-ХГЧ в разведении 1:500 по объему в ФСБР-Т, содержащем 0,5% БСА, и инкубировали в течение 690 сек. Сенсограммы на пяти дорожках с разными образцами сыворотки крови записывались одновременно.

2.3.8 Оценка состояния системы комплемента у женщин с помощью иммуноферментного анализа

Для оценки состояния системы комплемента определяли концентрации компонентов комплемента С3 и С4, циркулирующих иммунных компексов (ЦИК), способных к связыванию с С1q (ЦИК-С1q) и связанных С3d (ЦИК-С3d), и антител к С1q компоненту комплемента (анти-С1q антител) в сыворотке крови с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем. Чувствительность определения, нормальный диапазон концентраций и фирма-производитель наборов, использованных в исследовании, приведены в таблице 2.3. Количественное определение ЦИК, компонентов комплемента С3 и С4 и

анти-С1q антител проводилось в соответствии с инструкциями по применению фирм-производителей, прилагаемыми к наборам.

Таблица 2.3 – Характеристика иммуноферментных тест-систем для определения циркулирующих иммунных комплексов, компонентов комплемента и антител к компонентуС1q, использованных в исследовании.

Наимено-вание аналита	Фирма-производитель	Чувствитель-ность тест-системы	Нормальный диапазон
ЦИК-С1q	BUHLMANN LABORATORIES AG, Швейцария	<1 мкг-экв/мл	N<3,2 мкг- экв/мл
ЦИК-С3d	IBL INTERNATIONAL, Германия	0,7 мкг-экв/мл	N<16 мкг-экв/мл
С3	AssayPro, США	0,5 мкг/мл	N 0,5-1,9 мг/мл
С4	AssayPro, США	0,3 мкг/мл	N 0,2-0,5 мг/мл
анти-С1q антитела	ORGENTEC Diagnostika, Германия	0,5 Ед/мл	N<10 Ед/мл

Для определения ЦИК-С1q сыворотку или плазму крови инкубировали с компнентом комплемента С1q человека, адсорбированным на поверхности лунок микропланшета. Иммунные комплексы из исследуемого образца взаимодействовали с иммобилизованным компонентом С1q. После этапа промывания добавляли конъюгат протеина А с щелочной фосфатазой, который связывался с Fc областью IgG человека. После этапа промывания в лунки вносили субстратный раствор, содержащий паранитрофенил-фосфат. После остановки ферментативной реакции измеряли ОП на фотометре MULTISKAN EX при длине волны 405 нм.

Для определения ЦИК-С3d использовали микропланшет с адсорбированными на поверхности лунок анти-С3d моноклональными

антителами. При добавлении в лунки разведенной сыворотки ЦИК, содержащие C3d, связывались с антителами на твердой фазе. После проведения инкубации при комнатной температуре и промывания планшета в лунки добавляли МКАТ к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, которые взаимодействовали с IgG в связанных иммунных комплексах. После инкубации и промывания планшета в лунки вносили субстратный раствор, содержащий ТМБ. При наличии в лунках ЦИК-C3d субстратный раствор окрашивался в темно-синий цвет. Добавление стоп-раствора изменяло цвет окраски на желтый. Оптическую плотность измеряли на фотометре MULTISKAN EX при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски была пропорциональна количеству ЦИК-C3d в исследуемой сыворотке.

Концентрации компонентов комплемента C3 и C4 в образцах сыворотки или плазмы крови определяли методом конкурентного ИФА с использованием микропланшетов с иммобилизованными поликлональными антителами к компоненту комплемента C3 или C4 человека. Компонент комплемента C3 или C4 в стандартах и образцах конкурировал с биотинилированным компонентом комплемента за связывание с иммобилизованными антителами. На следующем этапе анализа использовали конъюгат стрептавидин-пероксидаза. После добавления субстратного раствора, проведения и остановки ферментативной реакции измеряли ОП раствора на фотометре MULTISKAN EX при 450 нм. Концентрацию компонентов комплемента C3 или C4 определяли по среднему значению ОП с использованием калибровочной кривой и учетом фактора разведения.

Определение анти-C1q антител в сыворотке (плазме) крови проводили методом непрямого твердофазного ИФА с использованием микропланшета с иммобилизованным высокоочищенным компонентом C1q человека. Специфические антитела из исследуемого образца сыворотки или плазмы крови связывались с иммобилизованным на поверхности лунок антигеном. На этапе промывания несвязавшиеся или неспецифически связанные компоненты сыворотки (плазмы) удалялись с поверхности твердой фазы. Добавленный

ферментный конъюгат взаимодействовал с иммобилизованным комплексом антиген-антитело. После инкубации избыток конъюгата удалялся на этапе промывания. Внесение в лунки субстратно-хромогенного раствора приводило к запуску ферментативной реакции и развитию синего окрашивания. Добавление кислоты останавливало ферментативную реакцию, генерируя конечный продукт желтого цвета. Интенсивность окрашивания, коррелировавшую с концентрацией анти-C1q антител в исследуемом образце, оценивали путем измерения ОП раствора на фотометре MULTISKAN EX при длине волны 450 нм. Концентрацию анти-C1q антител определяли с помощью калибровочной кривой по среднему значению ОП образца.

2.3.9 Исследование иммунного статуса женщин с применением метода проточной цитофлуориметрии

Для фенотипической характеристики лимфоцитов периферической крови использовали метод проточной цитофлуориметрии с применением меченных флуоресцеина изотиоцианатом и фикоэритрином моноклональных антител к поверхностным рецепторам лимфоцитов CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD56 (BD Biosciences, США). Согласно стандартной процедуре окрашивания цельную кровь инкубировали с МКАТ в темноте, затем эритроциты лизировали и одновременно фиксировали лейкоциты раствором FACS Lyse (BD Biosciences). После центрифугирования и удаления надосадочной жидкости клетки ресуспендировали в ФСБР. Измерение сигнала и анализ данных осуществляли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur с помощью программы Cell Quest (Becton Dickinson, США). Гейт лейкоцитов выявляли с использованием МКАТ к CD45 (Dako, Дания). Субпопуляции лейкоцитов (лимфоциты, моноциты, нейтрофилы) определяли по показателям прямого и бокового светорассеяния.

Определение концентрации общих иммуноглобулинов классов M, G и A в плазме крови проводили турбидиметрическим методом на анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом АБхФк-02 «НПП-ТМ» (ООО НПП «Техномедика», Россия) с применением коммерческих наборов для определения IgM, IgG и IgA человека (Human, Германия). В кювету, содержащую буфер и антисыворотку к иммуноглобулинам человека, вносили исследуемый образец, инкубировали при 37ºС в течение 10 минут. Измерение проводили против холостой пробы, не содержащей антисыворотку. Количественное содержание иммуноглобулинов определяли по калибровочной кривой. Нормальные диапазоны концентраций общих иммуноглобулинов составляют: IgA – 0,7-3,0 г/л, IgG – 8-16 г/л, IgM – 0,5-2 г/л.

2.4 Методы статистического анализа данных

По результатам проведенных исследований формировали базы данных с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Математическую обработку полученных данных проводили с применением методов вариационной статистики и пакетов прикладных программ Microsoft Office Excel 2010, Statistica for Windows версия 10, MedCalc версия 12.

Нормальность распределения значений в выборках оценивали с помощью W-теста Шапиро-Уилка, теста Колмогорова-Смирнова. Рассчитывали параметрические (t-критерий Стьюдента) и непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни, критерий χ^2 Пирсона). При нормальном распределении данные представляли средней арифметической и стандартным отклонением (M±SD), при отклонении распределения от нормального приводили медиану (Me), минимальное и максимальные значения, 25-ый и 75-ый процентили. Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$. Корреляционную связь между выборками оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона: как

слабую при значении коэффициента корреляции r от 0 до ±0,299, как среднюю при r от ±0,3 до ±0,699, как сильную при r от ±0,7 до ±1. Диагностическую значимость серологических маркеров для акушерской патологии определяли с использованием ROC-анализа (Receiver Operating Characteristics) по показателям чувствительности, специфичности, площади под кривой (AUC), позитивной и негативной прогностической значимости. Для оценки предиктивного значения серологических маркеров применяли метод логистической регрессии и рассчитывали коэффициенты регрессии. Прогностическое значение серологических маркеров для патологии беременности также оценивали путем расчета показателя отношения шансов (OR).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Модификации иммуноферментного анализа для определения антител к гормонам в сыворотке (плазме) крови человека

Непрямой твердофазный ИФА модифицировали для определения антител к ХГЧ и ПГ разных классов и подклассов IgG в сыворотке (плазме) крови человека. Условия проведения ИФА оптимизировались таким образом, чтобы обеспечить высокую чувствительность и специфичность определения антител, снизить возможное неспецифическое связывание компонентов сыворотки крови и реагентов с поверхностью твердой фазы, обеспечить высокую точность и воспроизводимость результатов.

Путем титрования в двух направлениях по методу «шахматной доски» с использованием серийных разведений определяли оптимальные концентрации антигенов для иммобилизации на твердую фазу и рабочие разведения конъюгатов антител к иммуноглобулинам человека с пероксидазой хрена, при которых достигались высокие уровни ОП положительных на антитела к гормонам образцов и низкие уровни ОП отрицательных образцов (менее 0,2 ед. ОП) и фонового сигнала, а, следовательно, наиболее высокие соотношения ОП положительных к ОП отрицательных на антитела к гормонам образцов и сигнал/фон. Контролировалось возможное неспецифическое связывание компонентов сыворотки крови и конъюгатов с твердой фазой. После иммобилизации антигена Свободные центры связывания на полистирольной повехности с иммобилизованным антигеном блокировали инертным белком. После каждого этапа анализа избыток реагентов из лунок микропланшета удаляли декантированием, лунки промывали буферным раствором, содержащим детергент, для эффективного удаления избытка реагентов. Разведение сыворотки крови и конъюгата выполняли с использованием буферного раствора,

содержащего детергент и инертный белок для предотвращения неспецифической адсорбции компонентов сыворотки крови или конъюгата. Контролировалась точность и сходимость результатов измерений, выполненных в одинаковых условиях в одном исследовании, и воспроизводимость результатов измерений, выполненных в повторных исследованиях, с использованием образцов с низким, средним и высоким содержанием антител к гормонам.

3.1.1 Модификации ИФА для определения антител к хорионическому гонадотропину человека, свободным α- и β-субъединицам и пептидным последовательностям β-субъединицы гормона

Для приготовления микропланшетов, сенсибилизированных ХГЧ или пептидами β-ХГЧ, использовали три способа иммобилизации антигенов на твердую фазу: путем пассивной адсорбции, иммунохимического связывания антигена с иммобилизованными МКАТ или ковалентного присоединения антигена к активированной поверхности твердой фазы. Первый способ предусматривал пассивную адсорбцию ХГЧ на твердую фазу с произвольной пространственной ориентацией молекул гормона на полистироле. Во втором способе иммобилизация ХГЧ осуществлялась за счет образования иммунохимической связи между антигенными детерминантами α-субъединицы гормона и иммобилизованными на полистироле МКАТ к α-ХГЧ, в результате на поверхности твердой фазы экспонировались преимущественно эпитопы β-субъединицы ХГЧ. При выборе варианта ИФА для определения антител к ХГЧ второму способу иммобилизации антигена отдавалось предпочтение в связи с функциональной важностью β-субъединицы гормона, содержащей эпитопы, определяющие его специфичность и биологическую активность. Третий способ использовали для прочной иммобилизации малых по размеру пептидов β-ХГЧ

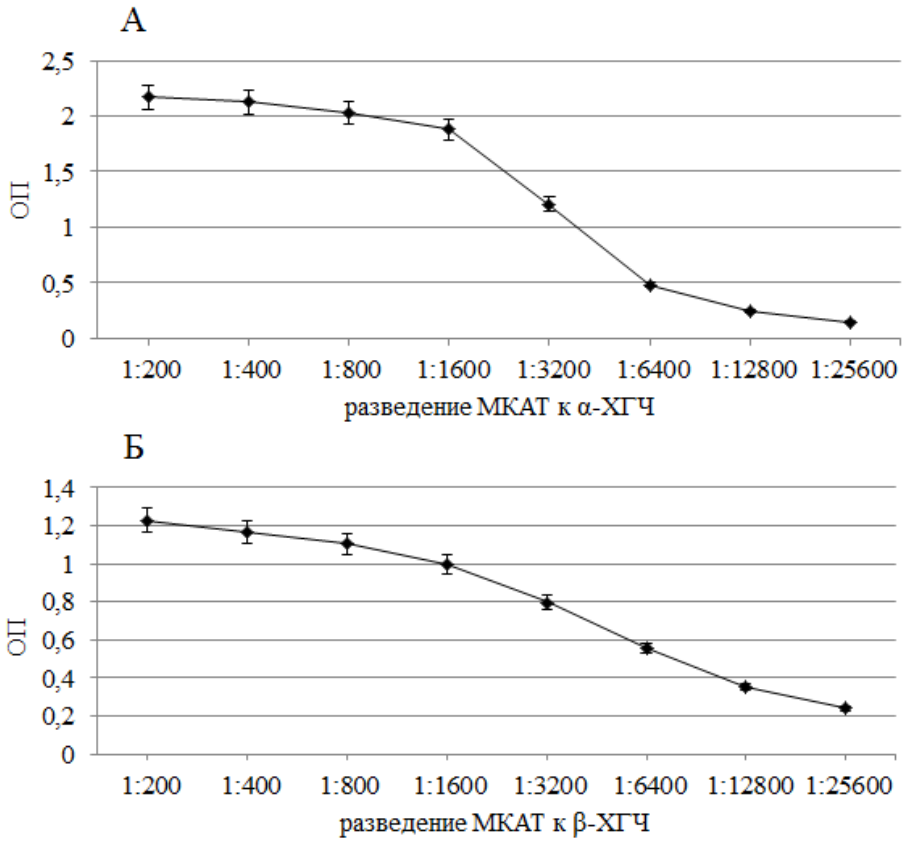
С109-145 и С109-119 путем образования ковалентной связи с активированной химическим способом поверхностью твердой фазы.

Оптимизировали условия проведения ИФА для определения антител к ХГЧ и синтетическим пептидам β-ХГЧ. Оптимальная концентрация ХГЧ для пассивной адсорбции гормона на твердую фазу составила 5 мкг/мл. Экспонирование эпитопов α- и β-субъединицы ХГЧ на поверхности сенсибилизированных микропланшетов оценивалось с помощью мышиных МКАТ к α- и β-субъединице гормона и антивидового конъюгата кроличьих антител против IgG мыши с пероксидазой хрена (рисунок 3.1). При этом наблюдалось более высокое связывание с иммобилизованным гормоном МКАТ к α-ХГЧ, чем МКАТ к β-ХГЧ, это позволило предположить, что на сенсибилизированном микропланшете в большей степени были представлены детерминанты α-субъединицы ХГЧ.

При иммобилизации ХГЧ на твердую фазу посредством МКАТ к α-субъединице гормона наибольшие значения соотношения ОП положительного и отрицательного на аХГЧ образцов и соотношения сигнал/фон были получены при концентрации МКАТ к α-ХГЧ 1,25 мкг/мл и концентрации ХГЧ в диапазоне 0,6-1,25 мкг/мл.

С использованием образцов сыворотки крови женщин с ПНБ (n=23) исследовали взаимодействие сывороточных антител с ХГЧ, иммобилизованным путем прямой адсорбции (вариант 1) или посредством МКАТ к α-ХГЧ (вариант 2), а также контролировали возможное неспецифическое связывание сывороточных антител с иммобилизованными IgG мыши (1,25 мкг/мл) или БСА (1%-ный раствор). При определении IgM-антител во втором варианте ИФА был получен более высокий медианный уровень ОП (0,478 [0,251-0,891]), чем в первом (0,410 [0,174-0,638], p=0,0066), а при определении IgG-антител значимых различий между уровнями ОП в двух вариантах ИФА не наблюдалось (соответственно, 0,366 [0,262-1,117] и 0,302 [0,154-0,701], p=0,1798). Уровни ОП при взаимодействии сывороточных антител (IgM, IgG) с ХГЧ были выше, чем при

взаимодействии с IgG мыши (соответственно, 0,139 [0,070-0,201] и 0,099 [0,075-0,214]) или БСА (соответственно, 0,110 [0,059-0,184] и 0,078 [0,054-0,132]), адсорбированными на твердой фазе (p<0,0001).



А - кривая титрования МКАТ к α-ХГЧ;

Б - кривая титрования МКАТ к β-ХГЧ.

Рисунок 3.1 – Взаимодействие МКАТ к α- и β-субъединице ХГЧ с гормоном ХГЧ, иммобилизованным на твердой фазе путем пассивной адсорбции

Между уровнями антител к ХГЧ, измеренными в двух вариантах ИФА при пассивной адсорбции ХГЧ на полистирол или иммобилизации, опосредованной МКАТ к α-ХГЧ, наблюдалась прямая корреляционная связь: сильная между уровнями IgM-антител (r=0,79; p<0,0001) и средней силы между уровнями IgG-антител (r=0,5837; p=0,0035).

Рабочие разведения конъюгатов антител к иммуноглобулинам человека классов M, G, A и E с пероксидазой хрена определяли путем серийных последовательных двукратных разведений конъюгатов по наибольшим значениям соотношения ОП положительного и отрицательного на аХГЧ образцов и сигнал/фон. Условия проведения ИФА и рабочие разведения конъюгатов, выбранные для определения антител к ХГЧ, приводятся в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Условия проведения ИФА для определения антител разных классов к ХГЧ в сыворотке крови человека при иммобилизации ХГЧ на твердую фазу посредством МКАТ к α-ХГЧ.

Класс антител	Разведение сыворотки крови	Концентрация МКАТ к α-ХГЧ, мкг/мл	Концентрация ХГЧ, мкг/мл	Рабочее разведение конъюгата
IgM	1:100	1,25	0,6-1,25	1:3000-1:6000
IgG	1:100	1,25	0,6-1,25	1:4000-1:8000
IgA	1:100	1,25	0,6-1,25	1:3000
IgE	1:10	1,25	0,6-1,25	1:2000

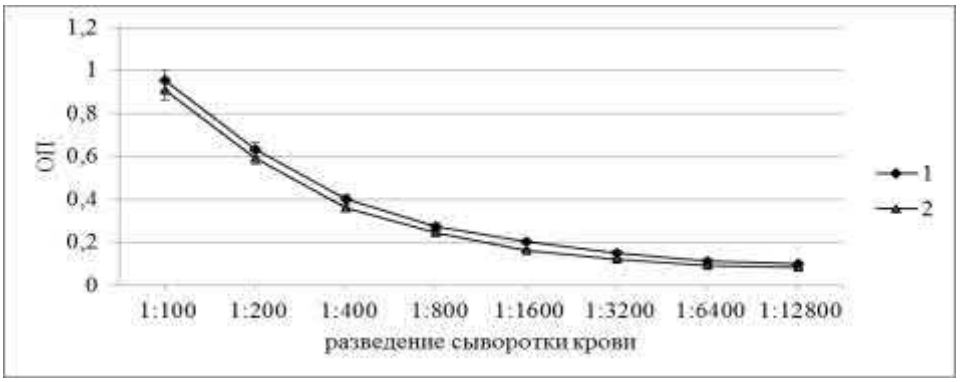
Рабочие разведения конъюгатов МКАТ к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека с биотином и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена определяли путем титрования в двух направлениях методом «шахматной доски» по уровню ОП и величине соотношения ОП положительного и отрицательного на IgG аХГЧ образцов сыворотки крови и сигнал/фон. Рабочие разведения конъюгатов МКАТ с биотином составили: к IgG1 – 1:4000, к IgG2 – 1:12000, к IgG3 – 1:4000, к IgG4 – 1:12000. Рабочее разведение конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена составило 1:1000.

Синтетические пептиды β-ХГЧ С109-119 и С109-145 малого размера для обеспечения прочного связывания иммобилизовали на микропланшеты NUNC IMMOBILIZER AMINO путем образования ковалентных связей между свободными аминными, тиоловыми и гидроксильными группами пептидов и стабильными электрофильными группами на поверхности лунок.

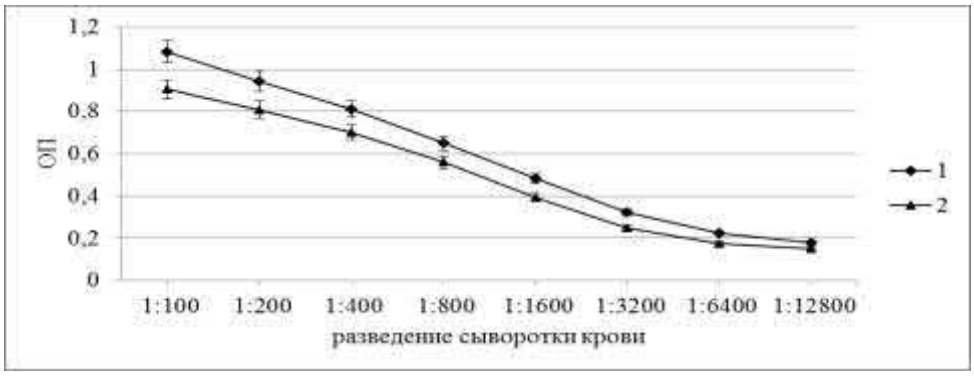
Наиболее высокие значения ОП положительных образцов и соотношения сигнал/фон были получены при концентрации пептидов β-ХГЧ для сенсибилизации микропланшета 50 мкг/мл. Рабочие разведения конъюгатов антител к IgM и IgG человека с пероксидазой хрена для определения антител к пептидам С109-119 и С109-145 были одинаковыми и составляли, соответственно, 1:2500-1:5000 и 1:3000-1:6000. На рисунке 3.2 представлены кривые титрования сыворотки крови пациентки с ПНБ, содержащей высокий уровень антител к пептидам β-ХГЧ С109-119 и С109-145.

Оценивалась возможность количественного выражения результатов ИФА при определении антител к ХГЧ классов М и G на основе построения калибровочной кривой в линейных координатах с простой линейной интерполяцией от точки к точке. Для построения калибровочной кривой использовали внутрилабораторную стандартную сыворотку с высоким содержанием антител к ХГЧ, созданную путем пулирования положительных на аХГЧ сывороток крови пациенток с ПНБ. Содержание антител к ХГЧ выражали в условных единицах в миллилитре (Ед/мл), что позволило измерять концентрацию антител в сыворотке крови или плазме. Содержание антител в стандартной сыворотке приняли равным 120 условных Ед/мл. Для приготовления калибровочных проб выполняли двукратные разведения стандартной сыворотки от 1:100 до 1:3200. В таблице 3.2 представлено содержание антител класса М и G к ХГЧ в условных Ед/мл в калибровочных пробах, полученных путем разведения стандартной сыворотки.

А



Б



А – определение антител класса М к пептидам β-ХГЧ; Б – класса G.

1 – при иммобилизации на твердой фазе пептида С109-119; 2 – С109-145.

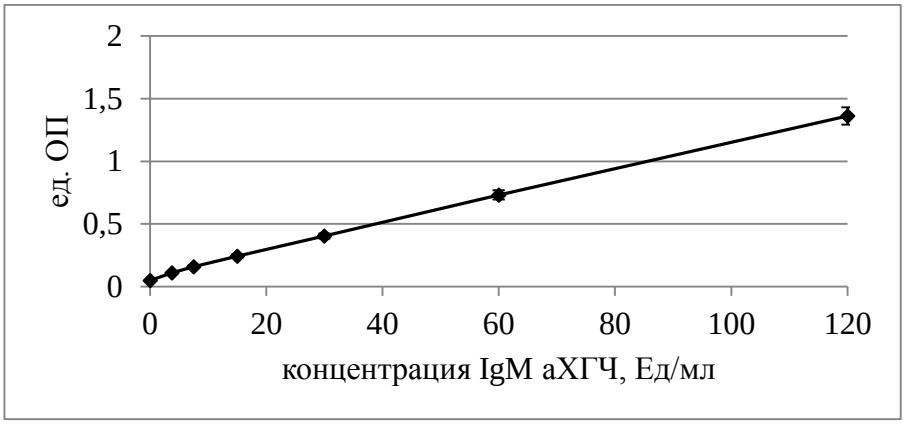
Рисунок 3.2 – Кривые титрования сыворотки крови, положительной на антитела классов М и G к пептидным последовательностям β-ХГЧ С109-119 и С109-145.

Таблица 3.2 – Соответствие разведения стандартной положительной сыворотки крови и содержанию антител класса М и G к ХГЧ в калибровочных пробах.

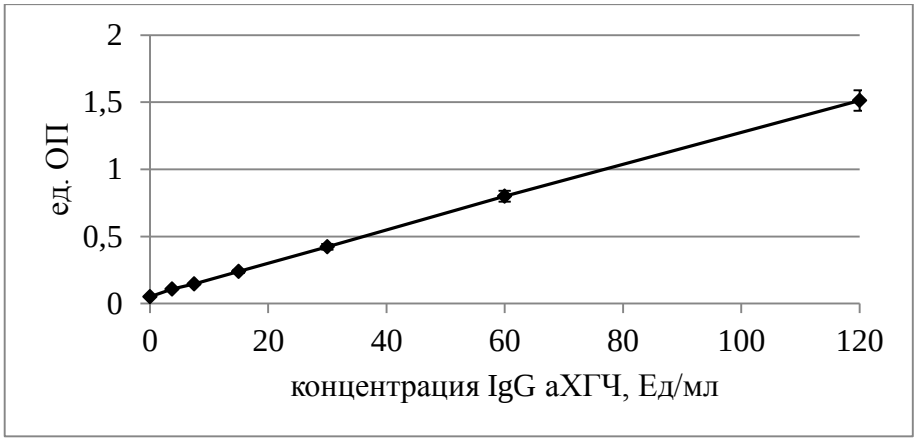
№ калибровочной пробы	Разведение сыворотки	Концентрация аХГЧ, Ед/мл
1	1:100	120
2	1:200	60
3	1:400	30
4	1:800	15
5	1:1600	7,5
6	1:3200	3,75

Построенные калибровочные кривые характеризовались линейной зависимостью сигнала (ОП) от содержания антител в сыворотке крови в пределах широкого диапазона концентраций от 5-6 Ед/мл до 120 Ед/мл (рисунок 3.3). Чувствительность ИФА, как наименьшее количество определяемых анализируемых антител, составляла при определении IgM аХГЧ 5 Ед/мл, а при определении IgG аХГЧ – 6 Ед/мл.

А y=0, 011x+0,075



Б y=0,013x+0,024



А – калибровочная кривая для IgM аХГЧ,

Б – калибровочная кривая для IgG аХГЧ.

Рисунок 3.3 – Калибровочные кривые для определения концентрации антител к ХГЧ классов M и G в сыворотке (плазме) крови человека.

Точность определения антител к ХГЧ в ИФА оценивалась путем расчета коэффициентов вариации (КВ) по результатам измерения трех внутрилабораторных контрольных сывороток с низким, средним и высоким содержанием антител к ХГЧ. Величину КВ определяли по результатам 10 параллельных измерений каждой сыворотки в одном исследовании (таблица 3.3). Воспроизводимость результатов в повторных исследованиях оценивалась с использованием внутрилабораторных контрольных сывороток по величине КВ, рассчитанного по результатам 10 параллельных измерений каждой сыворотки в 6 исследованиях, проведенных в разные дни.

Таблица 3.3 – Точность и воспроизводимость результатов ИФА при определении антител к ХГЧ в положительных образцах сыворотки крови женщин с ПНБ

Образцы сыворотки крови	Содержание антител (Ед/мл)	КВ (%) в одном исследовании	КВ (%) в повторных исследованиях
Позитивные на IgM			
№1	25	5,4	7,5
№2	52	5,8	7,2
№3	85	6,8	7,7
Позитивные на IgG			
№1	23	5,5	7,2
№2	64	6,0	7,6
№3	96	6,3	7,8

Таким образом, для определения антител к ХГЧ был выбран модифицированный вариант ИФА, в котором использовались микропланшеты, сенсибилизированные ХГЧ посредством МКАТ к α-ХГЧ, с ориентированным расположением молекул ХГЧ на поверхности твердой фазы и экспонированием β-субъединицы ХГЧ. ИФА для определения антител к ХГЧ в сыворотке (плазме) крови человека характеризовался высокой чувствительностью, точностью

определения и воспроизводимостью результатов, широким диапазоном концентраций с линейной зависимостью сигнала от содержания антител к ХГЧ в исследуемом образце. Для определения антител к пептидным последовательностям β-ХГЧ был выбран вариант ИФА с использованием микропланшетов NUNC IMMOBILIZER AMINO, обеспечивающих прочное ковалентное связывание пептидов β-ХГЧ С109-119 и С109-145. Определены оптимальные концентрации антигенов для иммобилизации на твердую фазу и рабочие разведения антител к иммуноглобулинам человека разных классов и подклассов IgG, меченных пероксидазой хрена или биотином, а также конъюгата стрептавидин-пероксидаза.

3.1.2 Модификации ИФА для определения антител разных изотипов к прогестерону с использованием конъюгатов прогестерона с БСА и гемоцианином

Проводилась адаптация метода ИФА для определения антител к ПГ разных классов и подклассов IgG в сыворотке (плазме) крови человека. Так как молекула ПГ имеет малые размеры и молекулярный вес, для обеспечения надежной иммобилизации, высокой концентрации молекул ПГ на поверхности твердой фазы, использовали конъюгат ПГ с БСА, содержащий до 12-16 молекул ПГ на одну молекулу белка. Проводилось определение оптимальных условий сенсибилизации твердой фазы, рабочих разведений конъюгатов антител к иммуноглобулинам человека разных классов с пероксидазой хрена. Кроме того, оценивалась эффективность использования конъюгатов ПГ-3-БСА или ПГ-11-БСА, различающихся по положению ковалентной связи в молекуле ПГ, а также конъюгатов производной ПГ с гемоцианином в ИФА для определения антител к ПГ в сыворотке (плазме) крови человека. Преимуществом конъюгатов ПГ с

гемоцианином является высокое содержание молекул ПГ на одну молекулу гемоцианина (до 120-150 молекул ПГ на 1 молекулу Гем).

В одном из вариантов модифицированного ИФА использовали микропланшет, сенсибилизированный конъюгатом ПГ-3-БСА. Оптимальные концентрации конъюгата ПГ-3-БСА для адсорбции на твердую фазу и рабочие разведения конъюгатов антител к иммуноглобулинам человека классов M, G и A, меченных пероксидазой хрена, определяли путем титрования в двух направлениях методом «шахматной доски» с использованием сывороток крови с разным содержанием антител к ПГ. Наибольшие соотношения ОП положительного и отрицательного на антитела к ПГ образцов и соотношения сигнал/фон были получены при концентрациях ПГ-3-БСА для сенсибилизации микропланшетов в диапазоне 1,25-2,5 мкг/мл.

Экспонирование ПГ на поверхности твердой фазы было подтверждено в ИФА с помощью кроличьих поликлональных антител к ПГ и конъюгата антител к IgG кролика с пероксидазой хрена. Кроличьи антитела к ПГ взаимодействовали с иммобилизованным на твердой фазе конъюгатом ПГ-3-БСА. На рисунке 3.4 представлена кривая титрования кроличьих антител к ПГ на микропланшете с иммобилизованным ПГ-3-БСА, их титр составлял 1:3200.

Сравнительное исследование взаимодействия сывороток крови женщин с ПНБ, содержащих антитела к ПГ (n=18), с ПГ-3-БСА и БСА, иммобилизованными на твердой фазе, показало, что медианные уровни ОП при взаимодействии сывороточных антител классов M и G с иммобилизованным ПГ-3-БСА (соответственно, 0,633 [0,352-1,058] и 0,643 [0,309-1,556]) были значимо выше, чем при взаимодействии с иммобилизованным БСА (соответственно, 0,206 [0,106-0,279] и 0,181 [0,108-0,256]; $p<0,0001$).

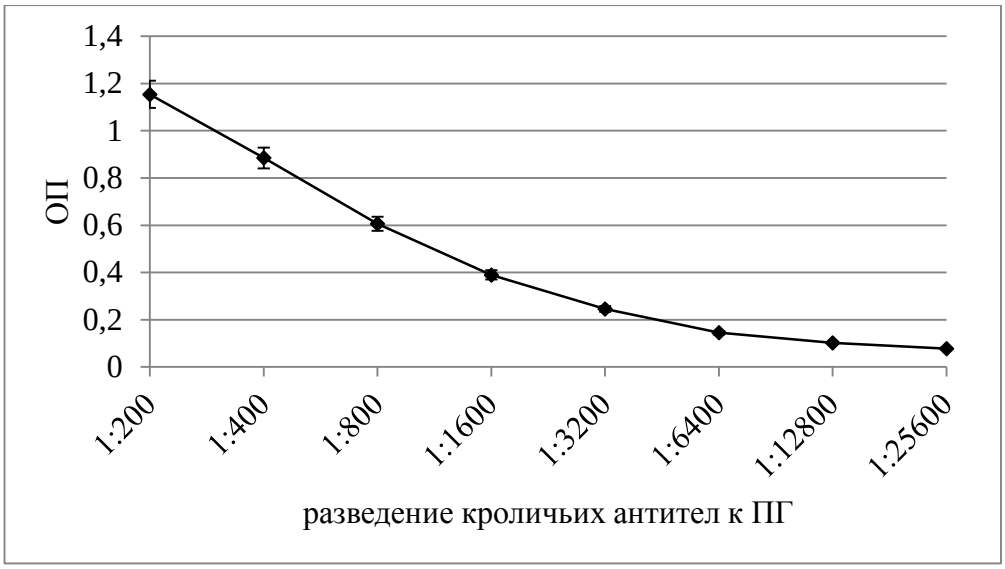


Рисунок 3.4 – Кривая титрования кроличьих поликлональных антител к ПГ на микропланшете с иммобилизованным конъгатом ПГ-3-БСА.

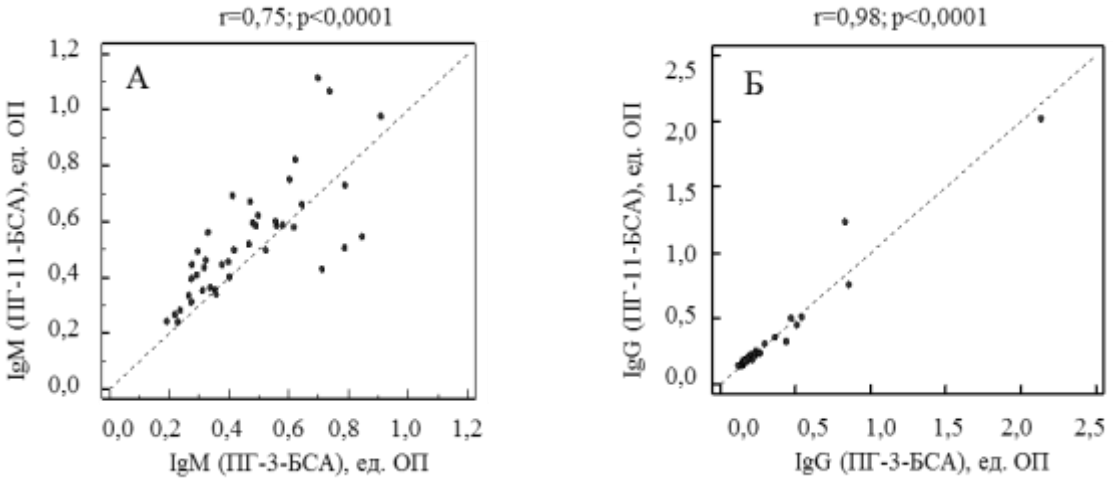
С использованием в ИФА микропланшетов, сенсибилизированных конъюгатами ПГ-3-БСА или ПГ-11-БСА, проводили исследование сывороток крови пациенток с ПНБ на антитела к ПГ классов M и G (n=42). При этом сывороточные антитела обоих классов связывались как с ПГ-3-БСА, так и с ПГ-11-БСА, а медианные уровни ОП в двух вариантах ИФА значимо не различались (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Взаимодействие сывороточных антител у женщин с ПНБ (n=42) с иммобилизованными на твердой фазе конъюгатами ПГ-3-БСА и ПГ-11-БСА.

Класс антител	Уровень ОП * при иммобилизации на твердой фазе		p-значение
	ПГ-3-БСА	ПГ-11-БСА	
IgM	0,416 [0,192-0,909]	0,498 [0,24-1,113]	0,1306
IgG	0,204 [0,118-2,137]	0,207 [0,135-2,015]	0,6972

Примечание к таблице 3.4. * – Me, минимальное и максимальное значение ОП, ед. ОП

Между уровнями антител (IgM, IgG) к ПГ в сыворотке крови у женщин с ПНБ, полученными при использовании в ИФА микропланшетов, сенсибилизированных конъюгатами ПГ-3-БСА или ПГ-11-БСА, наблюдалась сильная прямая корреляционная связь: r=0,75 (p<0,0001) для IgM и r=0,98 (p<0,0001) для IgG (рисунок 3.5).



А – корреляционная связь между уровнями IgM аПГ;

Б – между уровнями IgG аПГ

Рисунок 3.5 – Корреляционная связь между уровнями антител к ПГ классов M и G при определении с использованием в ИФА конъюгатов ПГ-3-БСА и ПГ-11-БСА.

Рабочие разведения конъюгатов антител к иммуноглобулинам человека классов M, G и A с пероксидазой хрена, использованных в ИФА, определяли при иммобилизации на твердой фазе ПГ-3-БСА в концентрации 1,25 мкг/мл путем серийных последовательных двукратных разведений по наибольшим значениям

соотношения ОП положительных к ОП отрицательных на аПГ образцов сыворотки крови и сигнал/фон. В таблице 3.5 представлены выбранные условия проведения ИФА для определения антител к ПГ классов M, G и A в сыворотке крови человека. Рабочие разведения конъюгатов МКАТ к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека с биотином составляли: к IgG1 – 1:2000, к IgG2 – 1:4000, к IgG3 – 1:4000, к IgG4 – 1:4000. Рабочее разведение конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена составляло 1:1000.

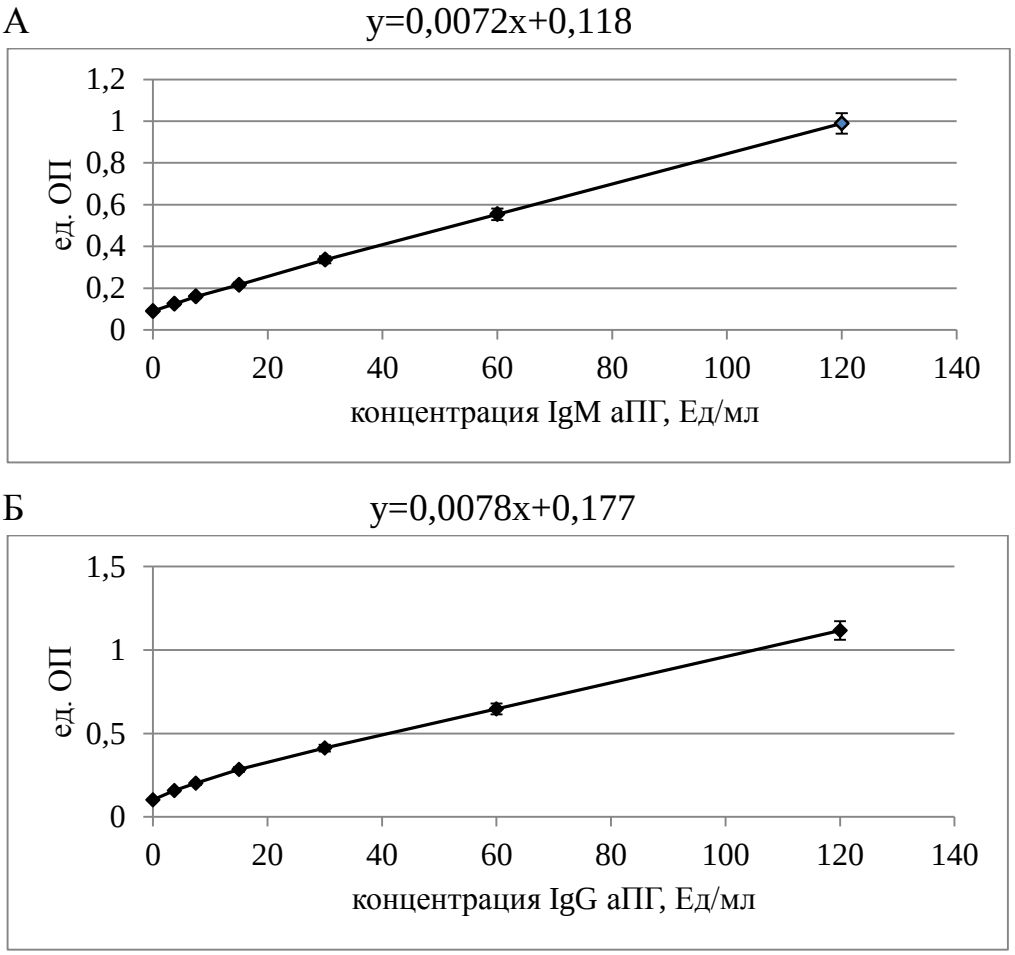
Таблица 3.5 – Условия проведения ИФА для определения антител к ПГ классов M, G и A в сыворотке крови человека.

Класс антител	Разведение сыворотки крови	Концентрация ПГ-3-БСА, мкг/мл	Рабочее разведение конъюгата
IgM	1:100	1,25-2,5	1:1500-1:3000
IgG	1:100	1,25-2,5	1:3000-1:6000
IgA	1:100	1,25-2,5	1:750-1:1500

Для количественного выражения результатов ИФА при определении антител классов M и G к ПГ и построения калибровочной кривой была использована внутрилабораторная стандартная сыворотка, созданная путем объединения сывороток крови пациенток с ПНБ, положительных на антитела к ПГ. Содержание антител к ПГ выражали в условных единицах в миллилитре (Ед/мл), что позволило количественно оценивать содержание антител в образце сыворотки (плазмы) крови. Содержание антител к ПГ в стандартной сыворотке приняли равным 120 условных Ед/мл. Для приготовления калибровочных проб выполняли двукратные разведения стандартной сыворотки от 1:100 до 1:3200 как описано для антител к ХГЧ, при этом соответствие разведения стандартной

сыворотки содержанию антител класса M и G к ПГ в условных Ед/мл в калибровочных пробах было аналогичным, приведенному в таблице 3.2.

С использованием калибровочной кривой, построенной в линейных координатах с простой линейной интерполяцией от точки к точке и выражением содержания антител в условных единицах в миллилитре (Ед/мл), определяли относительную концентрацию антител к ПГ в сыворотке крови или плазме (рисунок 3.6).



А – калибровочная кривая для IgM аПГ,

Б – калибровочная кривая для IgG аПГ,

Рисунок 3.6 – Калибровочные кривые для определения концентрации антител к ПГ классов M и G в сыворотке (плазме) крови человека.

Построенные калибровочные кривые характеризовались линейной зависимостью сигнала (ОП) от содержания аПГ в сыворотке крови в широком диапазоне концентраций от 5-6 Ед/мл до 120 Ед/мл. Чувствительность определения антител к ПГ классов М и G в ИФА составляла, соответственно, 6 Ед/мл и 5 Ед/мл.

Точность определения и воспроизводимость результатов ИФА определяли с использованием трех контрольных сывороток с низким, средним и высоким содержанием аПГ. Точность результатов ИФА при определении антител к ПГ оценивалась путем расчета КВ по результатам 10 параллельных измерений содержания аПГ в сыворотках в одном исследовании (таблица 3.6). Воспроизводимость результатов в повторных исследованиях оценивалась по величине КВ, рассчитанных по результатам 10 параллельных измерений каждой сыворотки в 6 исследованиях, проведенных в разные дни. При этом коэффициенты вариации в обоих случаях не превышали 8%.

Таблица 3.6 – Точность и воспроизводимость результатов ИФА при определении антител к ПГ в позитивных образцах сыворотки крови женщин с ПНБ

Образцы сыворотки крови	Содержание аПГ, Ед/мл	КВ (%) в одном исследовании	КВ (%) в повторных исследованиях
Позитивные на IgM			
№1	23	5,2	6,8
№2	48	5,6	7,8
№3	84	6,4	7,6
Позитивные на IgG			
№1	26	5,3	7,1
№2	54	6,2	7,6
№3	89	6,5	7,3

Оценивалась эффективность использования для сенсибилизации микропланшетов и проведения ИФА конъюгатов производной ПГ, а именно гидроксипрогестерона, с гемоцианином (ПГ-11-Гем, ПГ-3-Гем). Присутствие ПГ на поверхности твердой фазы подтверждали с использованием кроличьих поликлональных антител к ПГ и антивидового конъюгата с пероксидазой хрена (рисунок 3.7). Полученные при титровании антител высокие значения ОП свидетельствовали о высоком содержании ПГ на поверхности лунок.

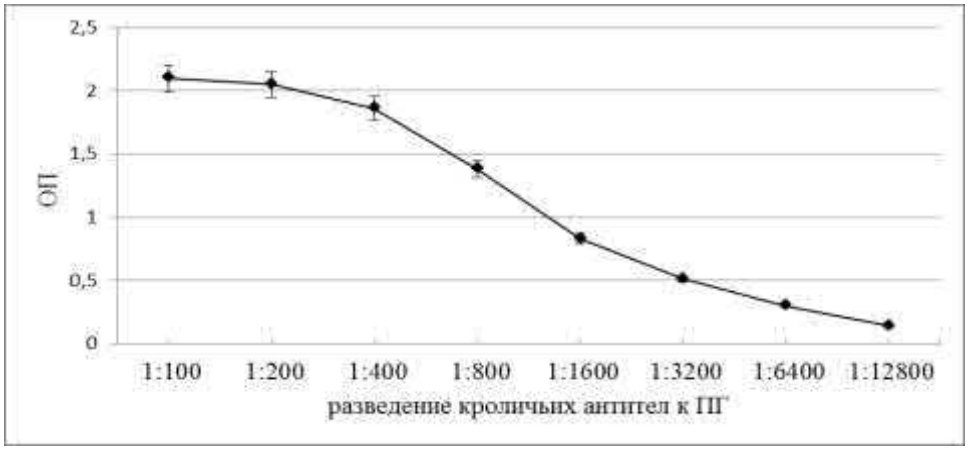
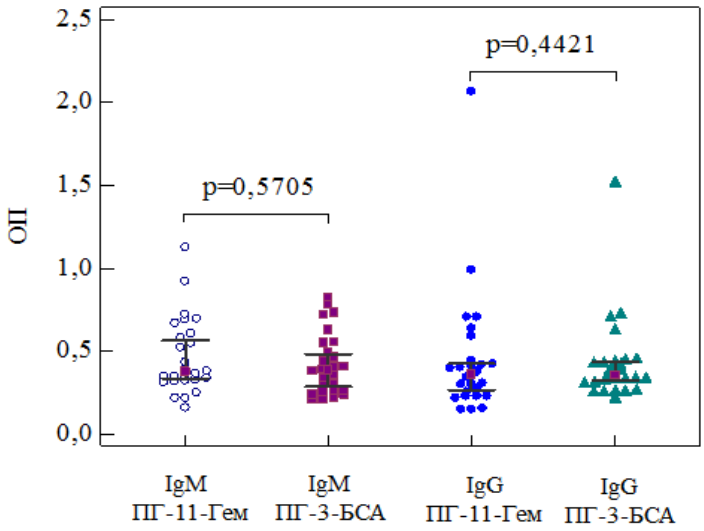


Рисунок 3.7 – Кривая титрования кроличьих поликлональные антител к ПГ при использовании в ИФА конъюгата ПГ-11-Гем.

С использованием микропланшетов, сенсибилизированных ПГ-11-Гем (1-ый вариант) или ПГ-3-БСА (2-ой вариант), проводили сравнительное исследование сывороток крови пациенток с ПНБ (n=26) на наличие антител к ПГ. При этом медианные уровни антител к ПГ, полученные с использованием двух вариантов ИФА, значимо не различались и составляли: в 1-ом варианте – IgM 0,378 [0,162-1,13] и IgG 0,363 [0,152-2,07]; во 2-ом варианте – IgM 0,389 [0,208-0,825] и IgG 0,356 [0,225-1,53] ($p>0,05$) (рисунок 3.8).

Однако при использовании в ИФА конъюгата ПГ-11-Гем отмечались более высокий уровень сигнала, низкое неспецифическое связывание сывороток и

антивидовых конъюгатов с твердой фазой, более высокие соотношения ОП положительного и отрицательного образцов (в 1,3-2 раза выше) и сигнал/фон, а, следовательно, более высокая чувствительность определения. В этом варианте ИФА при титровании сывороток крови пациенток с ПНБ были получены более высокие титры антител (1:800-1:1600), чем во втором варианте (1:400-1:800), что также подтверждало его более высокую чувствительность.

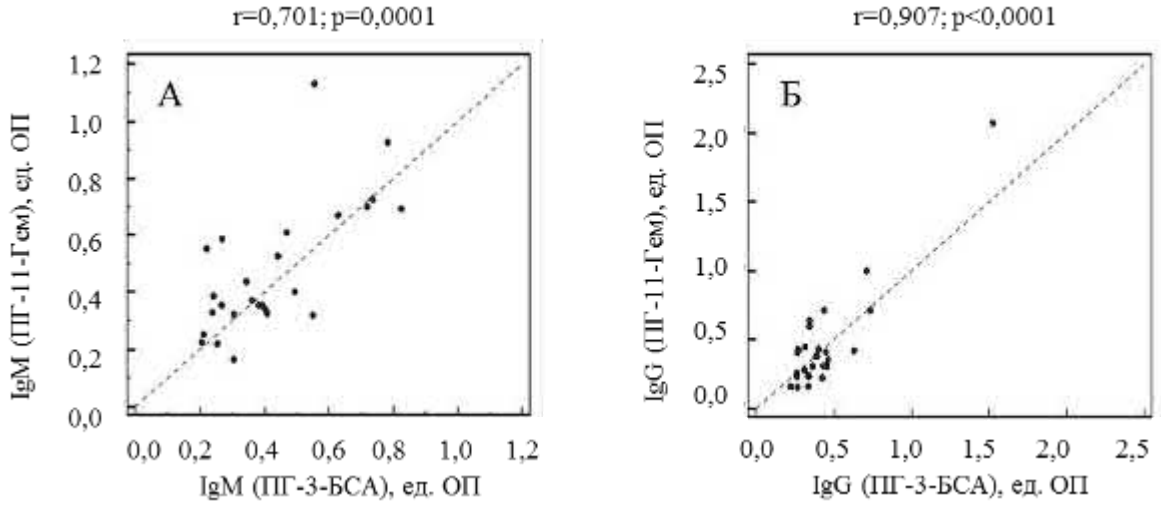


Представлены Me, 95% CI, значения ОП,

значения p при сравнении результатов двух вариантов ИФА

Рисунок 3.8 – Уровни IgM- и IgG-антител к ПГ в сыворотке крови пациенток с ПНБ, полученные при использовании в ИФА конъюгатов ПГ-11-Гем и ПГ-3-БСА.

По частоте положительных результатов на IgM- и IgG-антитела к ПГ первый вариант ИФА (10 (38,5%) и 12 (46,2%) случаев) не отличался от второго варианта (9 (34,6%) в обоих случаях) ($p>0,05$). Между уровнями IgM и IgG аПГ в обоих вариантах ИФА наблюдалась сильная прямая корреляционная связь с коэффициентами корреляции, соответственно, $r=0,701$ ($p=0,0001$) и $r=0,907$ ($p<0,0001$) (рисунок 3.9).



А – корреляционная связь между уровнями IgM аПГ, полученными в двух вариантах ИФА, Б - между уровнями IgG аПГ

Рисунок 3.9 – Корреляционная связь между уровнями IgM- и IgG-антител к ПГ в сыворотке крови женщин с ПНБ при определении методом ИФА с использованием конъюгатов ПГ-11-Гем и ПГ-3-БСА.

Таким образом, показана эффективность использования в ИФА для определения антител к ПГ конъюгатов ПГ с БСА или Гем. Определены оптимальные концентрации конъюгатов ПГ с БСА для иммобилизации на твердую фазу и рабочие разведения конъюгатов антител к иммуноглобулинам человека разных классов и подклассов IgG с пероксидазой хрена. На взаимодействие сывороточных антител классов M и G с конъюгатами ПГ-3-БСА и ПГ-11-БСА не влияло положение ковалентной связи в молекуле ПГ. ИФА для определения антител к ПГ в сыворотке (плазме) крови человека характеризовался высокой чувствительностью, специфичностью, точностью и воспроизводимостью результатов, широким диапазоном концентраций с линейной зависимостью ОП от содержания антител к ПГ в сыворотке крови. При использовании конъюгата ПГ с гемоцианином (ПГ-11-Гем) для сенсибилизации микропланшетов в ИФА

достигалась более высокая чувствительность определения антител к ПГ, чем при использовании конъюгата ПГ с БСА.

3.2 Физико-химические и иммунохимические свойства, распространенность и диагностическое значение антител к гормонам и антифосфолипидных антител при привычном невынашивании беременности у женщин

Кроме специфичности антител и классов иммуноглобулинов важное клиническое значение имеет определение авидности антител и подклассов IgG, обладающих уникальными структурными и функциональными свойствами. Как известно, IgG-антитела разных подклассов имеют биологически важные функциональные различия по способности активировать систему комплемента, связыванию с поверхностными клеточными Fcγ-рецепторами, блокирующей активности, возможности проникновения через плацентарный барьер [12, 15]. Определение изотипов, эпитопной специфичности и авидности антител дает возможность оценить их патогенетическое значение.

3.2.1 Распространенность антител к хорионическому гонадотропину человека разных изотипов, их авидность и диагностическое значение

Из немногочисленных сообщений известно о возможности продукции антител, способных связываться с ХГЧ и нейтрализовать биологическую активность гормона, у женщин с нарушениями репродуктивной функции, в частности с бесплодием и неудачными попытками ЭКО, и невынашиванием беременности. В настоящем исследовании с использованием модификаций ИФА изучалась распространенность и уровень антител к ХГЧ у пациенток с ПНБ и у

здоровых женщин, диагностическое значение данных антител, распределение антител по классам и подклассам IgG, их авидность.

Сравнительный анализ результатов определения уровня антител к ХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках (исследуемая группа, n=94) и здоровых женщин (группа сравнения, n=82) вне беременности показал, что в исследуемой группе наблюдалась повышенная продукция антител к ХГЧ, принадлежащих к разным классам (M, G, A, E), по сравнению со здоровыми женщинами (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – 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*	OR, 95% CI	p
	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; ** – значимые различия при сравнении с IgE.

У пациенток с ПНБ повышенные уровни IgG (у 64,9%) и IgA (у 55,3%) были найдены в сыворотке крови значимо чаще, чем IgE (у 30,9%; $p<0,01$). Антитела к ХГЧ классов G и A выявлялись у пациенток с ПНБ в 14,9 и 8,9 раза чаще, чем в группе сравнения ($p<0,0001$). Антитела к ХГЧ классов M, G, A и E были найдены

в разных комбинациях. Наиболее часто выявлялись одиночные IgM или IgG аХГЧ, комбинации IgG+IgA, IgG+IgA+IgE, IgM+IgA, IgM+IgG+IgA или все четыре класса иммуноглобулинов одновременно (рисунок 3.10).

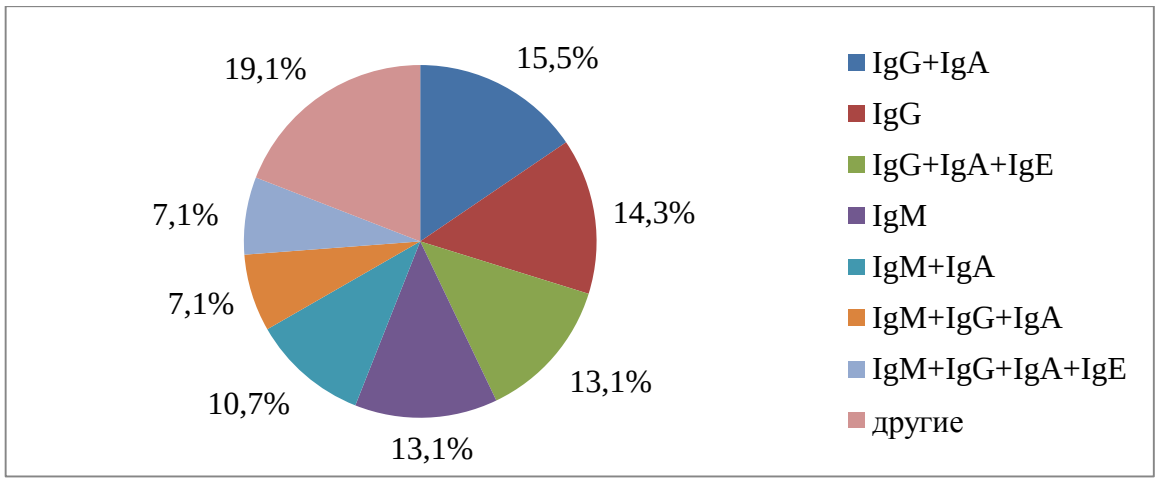
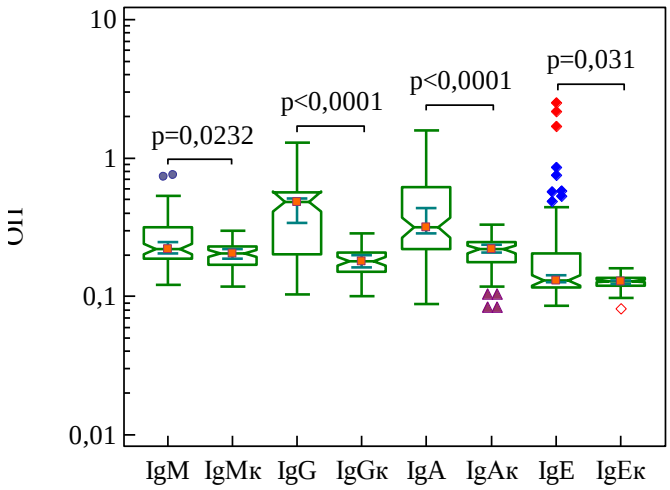


Рисунок 3.10 – Частота выявления антител разных классов к ХГЧ и их комбинаций у пациенток с ПНБ на ранних сроках.

В большинстве случаев IgA и IgE выявлялись в сочетании с повышенными уровнями иммуноглобулинов других классов (соответственно, в 49 (94,2%) и 27 (93,1%) случаях). В двух случаях (6,9%) наблюдался высокий уровень IgE (ОП>2,0) на фоне незначительного повышения IgG или IgA, а в трех случаях (5,8%) отмечался высокий уровень IgA без существенного повышения уровня иммуноглобулинов других классов.

На рисунке 3.11 представлены уровни антител разных классов к ХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ и здоровых женщин вне беременности. Медианные уровни аХГЧ классов M, G, A и E в исследуемой группе были статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p<0,05$). У пациенток с ПНБ медианные уровни специфических IgG и IgA были значимо выше, чем медианные уровни IgM и IgE ($p<0,0001$).



Представлены Me, 95% CI, 25-ый и 75-ый процентили,
минимальные и максимальные значения,
значения p при сравнении исследуемой и контрольной групп.

Рисунок 3.11 – Уровни антител к ХГЧ классов M, G, A, E в сыворотке крови у пациенток с ПНБ и здоровых женщин вне беременности.

Исследование корреляционной зависимости между уровнями аХГЧ разных классов показало, что между уровнями IgM и IgG наблюдалась умеренная обратная корреляционная связь, а между уровнями IgG и IgA определялась слабая прямая корреляционная связь (таблица 3.8). Корреляционная связь между уровнями IgE и иммуноглобулинов других классов не выявлена.

Состав IgG-антител к ХГЧ по подклассам исследовали у 48 серопозитивных пациенток с ПНБ на ранних сроках. В сыворотке крови выявлялись IgG аХГЧ, принадлежащие к четырем подклассам. Наиболее часто отмечалось повышение уровня IgG-антител подклассов IgG1, IgG2 и IgG4 (таблица 3.9). IgG-антитела подклассов IgG1 и IgG2 были найдены значимо чаще, чем IgG3 ($p<0,05$).

Таблица 3.8 – Корреляционная связь между уровнями антител разных классов к ХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ.

Классы антител	IgM	IgG	IgA	IgE
IgM	1,0	r= –0,3258 p=0,0014	r= –0,1476 p=0,1557	r= –0,1587 p=0,1265
IgG	r= –0,3258 p=0,0014	1,0	r=0,2839 p=0,0055	r=0,05801 p=0,5787
IgA	r= –0,1476 p=0,1557	r=0,2839 p=0,0055	1,0	r=0,01117 p=0,9149

Таблица 3.9 – Частота выявления IgG-антител разных подклассов к ХГЧ в сыворотке крови у женщин с ПНБ на ранних сроках (n=48) .

Подклассы IgG	Частота выявления		p-значение*
	абс. число	%	
IgG1	27	56,3	0,0393
IgG2	29	60,4	0,014
IgG3	16	33,3	–
IgG4	25	52,1	0,0978

Примечание. * – значение p при сравнении с частотой выявления IgG3-антител

У пациенток, серопозитивных на IgG аХГЧ, комбинация антител подклассов IgG1, IgG2 и IgG4 выявлялась в 20,8% случаев, тогда как одиночные IgG1-антитела или сочетания IgG1 с IgG2 или IgG4 определялись в 12,5% случаев

(p=0,4136) (рисунок 3.12). Повышение уровня аХГЧ всех четырех подклассов одновременно было обнаружено только в 4 (8,3%) случаях.

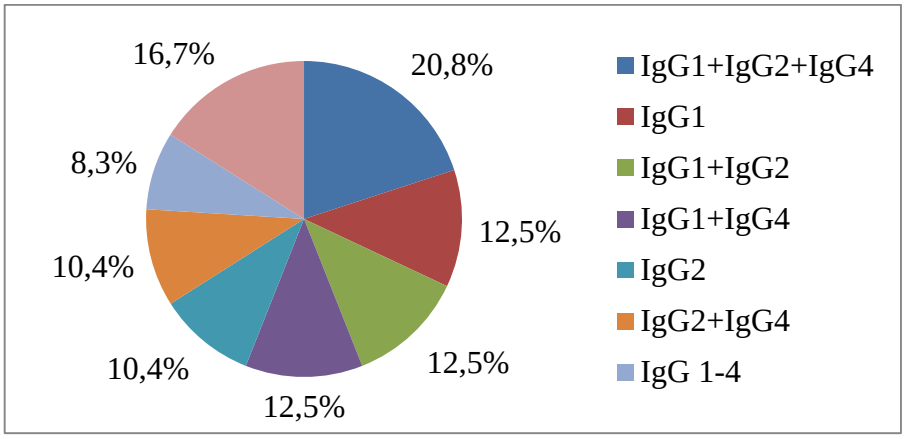
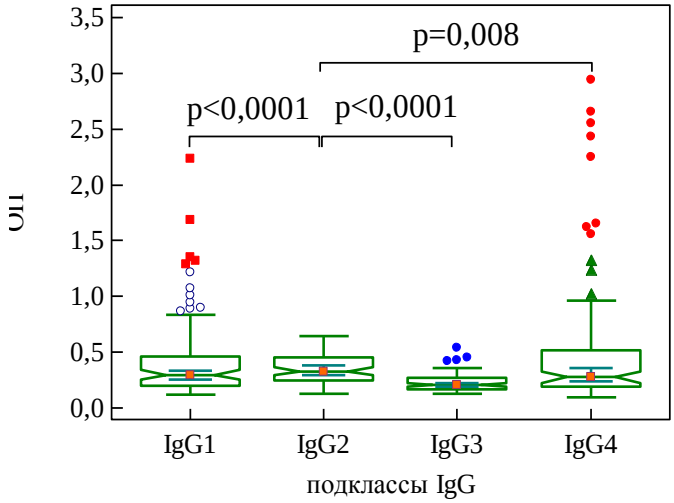


Рисунок 3.12 – Наиболее частые комбинации аХГЧ разных подклассов IgG в сыворотке крови у женщин с ПНБ.

На рисунке 3.13 представлены уровни IgG аХГЧ четырех подклассов в сыворотке крови у пациенток с ПНБ. Медианный уровень IgG2 аХГЧ был статистически значимо выше, чем медианные уровни IgG-антител других подклассов (p<0,01). Обращает на себя внимание частое обнаружение высокого уровня IgG4-антител (в 8 (16,7%) случаях).

Авидность IgG-антител к ХГЧ определяли в ИФА двумя способами с использованием хаотропных агентов: путем проведения реакции антиген-антитело в реакционном буфере с повышенным содержанием NaCl (0,5 М) или путем применения белок-диссоциирующего агента с высоким содержанием мочевины (5 М) после образования комплекса антиген-антитело. При этом средние показатели рассчитанного по формуле ИА составляли, соответственно, 63,2±9,3% и 62,1±10,8% и существенно не различались (p=0,63). Между значениями индексов авидности IgG аХГЧ, полученными двумя способами,

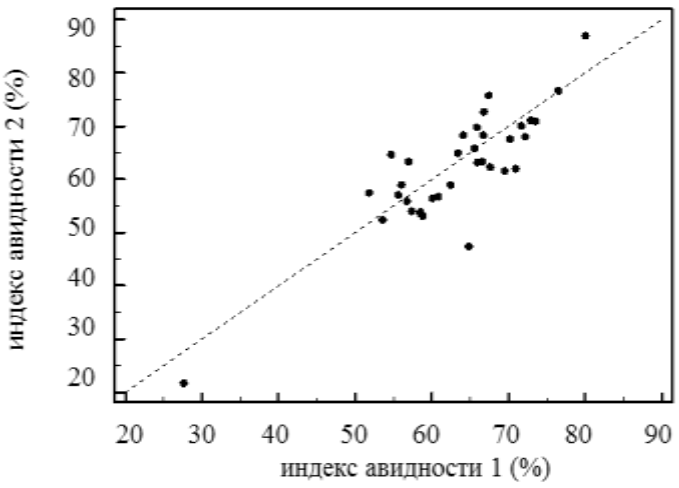
наблюдалась сильная прямая корреляционная связь (r=0,86; p<0,0001) (рисунок 3.14).



Представлены Me, 95% CI, 25-ый и 75-ый процентили, минимальные и максимальные значения, значения p при сравнении уровня антител разных подклассов.

Рисунок 3.13 – Уровни IgG аХГЧ четырех подклассов в сыворотке крови у пациенток с ПНБ при определении методом ИФА.

Высокая авидность IgG-антител к ХГЧ с ИА, превышающим 70%, наблюдалась у 27 (56,3%) пациенток. Таким образом, более половины пациенток с ПНБ, позитивных на IgG аХГЧ, имели высокоавидные антитела. Оба способа определения авидности продемонстрировали хорошее совпадение результатов в случае IgG аХГЧ.

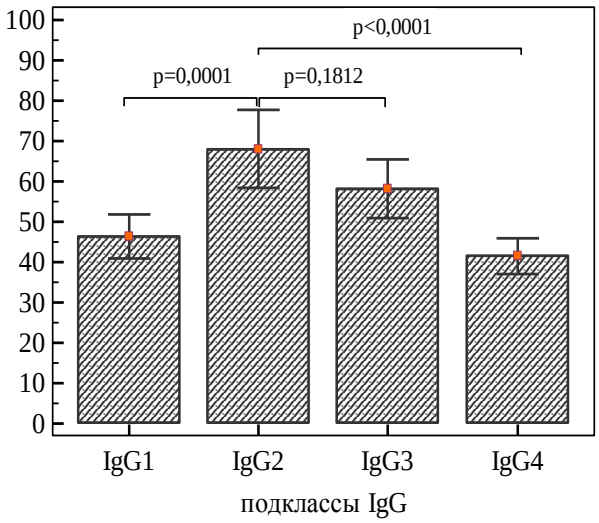


1 – определение ИА с использованием реакционного буфера, содержащего 0,5 М NaCl; 2 – с использованием белок-диссоциирующего агента, содержащего 5 М мочевины.

Рисунок 3.14 – Корреляционная связь между значениями индекса авидности IgG-антител к ХГЧ, полученными двумя способами определения.

Определение авидности IgG-антител к ХГЧ разных подклассов показало, что средний индекс авидности антител подкласса IgG2 (68,1±18%) был значимо выше средних индексов авидности IgG1 (46,3±16,9%; p=0,0001) и IgG4 (41,5±8,3%; p<0,0001) (рисунок 3.15). Средний ИА IgG3-антител (58,1±7,9%) был значимо выше ИА IgG4 (p=0,0002). Высокоавидные антитела подкласса IgG2 выявлялись значимо чаще (в 21 (43,8%) случае), чем высокоавидные IgG1-антитела (в 4 (8,3%) случаях) (p=0,0002).

Для оценки значения антител к ХГЧ для прогнозирования развития ПНБ на ранних сроках был проведен логистический регрессионный анализ, в котором в качестве предикторов рассматривались антитела к ХГЧ разных классов, а зависимой переменной было наличие у женщин ПНБ на ранних сроках. В таблице 3.10 приведены показатели, отражающие предиктивное значение антител, коэффициенты регрессии для составления уравнения логистической функции.



Представлены M±SD, значения p при сравнении

ИА IgG-антител разных подклассов

Рисунок 3.15 – Средние значения индекса авидности IgG-антител разных подклассов к ХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ.

Наиболее высокие показатели процента корректно классифицированных случаев были получены при использовании в качестве независимых переменных IgG- и IgA-антител к ХГЧ и составили, соответственно, 76,7% и 75%.

Таблица 3.10 – Показатели логистического регрессионного анализа для прогнозирования риска ПНБ на ранних сроках по уровню антител к ХГЧ.

Класс антител	χ2	p-значение	Коэффициент регрессии	p-значение	% верной класифика-ции
IgM	20,4	<0,0001	8,4	0,0002	60,8
IgG	79,4	<0,0001	10,9	<0,0001	76,7
IgA	62,1	<0,0001	10,7	<0,0001	75,0
IgE	23,2	<0,0001	13,0	0,0032	56,8

Для оценки качества полученной модели были построены ROC-кривые и проведен ROC-анализ, который показал, что IgG- и IgA-антитела к ХГЧ имели более высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках по сравнению с IgM и IgE. Показатели чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической значимости приведены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 – Диагностическая значимость антител к ХГЧ для ПНБ 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[0,59-0,734]	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 – критериальное значение, Se – чувствительность, Sp – специфичность, PPV – положительная прогностическая значимость, NPV – отрицательная прогностическая значимость, AUC – площадь под ROC-кривой

Значения площади под кривой для IgG- и IgA-антител существенно не различались (p=0,5683) и значимо превосходили аналогичные показатели для IgM (p=0,0113 и p=0,0299) и IgE (p=0,0001 и p=0,0016). Построенные ROC-кривые позволяли эффективно классифицировать пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин по уровням IgG и IgA аХГЧ (рисунок 3.16) и соответствовали хорошему качеству модели.

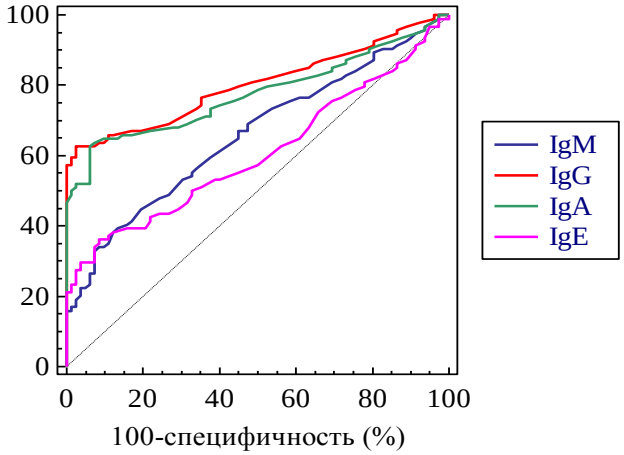


Рисунок 3.16 – ROC-кривые вероятности ПНБ на ранних сроках в зависимости от уровня антител к ХГЧ классов M, G, A, E в сыворотке крови (значения AUC, соответственно, 0,665, 0,801, 0,774 и 0,608 при p<0,05).

С помощью регрессионного анализа был определен оптимальный пороговый уровень для оценки результатов ИФА при определении аХГЧ у пациенток с ПНБ. С использованием данных порогов отсечения для оценки результатов ИФА показано, что при наличии аХГЧ у женщин наблюдается высокий риск развития ПНБ на ранних сроках, более высокий при выявлении IgG (OR 15,7; 95% CI [6,97-35,44]; p<0,0001) и IgA аХГЧ (OR 12,1; 95% CI [5,64-25,94]; p<0,0001), чем при выявлении IgM (OR 3,9; 95% CI [1,94-7,94]; p=0,0001) и IgE аХГЧ (OR 2,6; 95% CI [1,36-5,12]; p=0,0042).

По данным логистического регрессионного анализа комбинации аХГЧ разных классов имели более высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках (таблица 3.12). Так, для комбинаций IgG+IgM и IgG+IgM+IgA были получены более высокие показатели AUC (>0,9) по сравнению с аналогичными показателями для иммуноглобулинов отдельных классов (p<0,05), а также более высокие проценты верной классификации (>80%; p<0,01).

Таблица 3.12 – Диагностическая значимость комбинаций антител разных классов к ХГЧ для ПНБ на ранних сроках.

Комбинации иммуноглобулинов	χ^2	AUC, 95% CI	% верной классификации	p-значение
IgM+IgG	113,42	0,905 [0,852-0,944]	81,7%	p<0,0001
IgG+IgA	106,69	0,876 [0,818-0,921]	84%	p<0,0001
IgM+IgG+IgA	137,75	0,937 [0,890-0,968]	88,6%	p<0,0001
IgM+IgG+IgA+IgE	141,52	0,940 [0,894-0,970]	90,3%	p<0,0001

Одновременное определение антител разных классов к ХГЧ может быть использовано для диагностики ПНБ на ранних сроках. На основе вычисленных коэффициентов регрессии составлено уравнение логистической функции, с помощью которого может быть рассчитана вероятность ПНБ на ранних сроках у женщин с антителами к ХГЧ:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-9{,}58 + 13{,}8\,IgM + 12{,}7\,IgG + 9{,}9\,IgA)}}$$

где IgM, IgG, IgA – уровни антител к ХГЧ, соответствующего класса.

Таким образом, вне беременности у пациенток с ПНБ на ранних сроках наблюдается повышенное образование антител к ХГЧ, более часто классов G, A и M, чем E. Антитела к ХГЧ являются независимым фактором риска ПНБ на ранних сроках. Частота выявления и уровень аХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ выше, чем у здоровых женщин. IgG аХГЧ представлены у женщин с ПНБ четырьмя подклассами, по частоте выявления преобладают IgG1 и IgG2. Высокоавидные IgG-антитела к ХГЧ выявляются у серопозитивных пациенток более чем в 50% случаев. Антитела подкласса IgG2 отличаются более высокой авидностью по сравнению с IgG1 и IgG4. Определение антител к ХГЧ, особенно классов G и A имеет высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних

сроках, при их обнаружении риск развития ПНБ у женщин выше, чем при обнаружении аХГЧ классов М и Е. Определение комбинации аХГЧ разных классов имеет более высокую диагностическую значимость, чем антител одного класса. Антитела к ХГЧ в значительной степени ассоциируются с ПНБ на ранних сроках и могут служить диагностическим маркером данной патологии.

3.2.2 Характеристика свойств, распространенность и диагностическое значение антител к прогестерону

Гиперчувствительность к ПГ показана с помощью внутрикожных тестов с гормональным препаратом у женщин при привычном невынашивании беременности, бесплодии и неудачах в циклах ЭКО. В данном исследовании с помощью разработанных модификаций ИФА проводилось определение распространенности и уровня антител к ПГ разных классов и подклассов IgG, авидности антител, их диагностического значения при ПНБ у женщин.

На наличие антител к ПГ классов M, G и A исследовали сыворотку крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках (исследуемая группа, n=90) и у здоровых женщин (группа сравнения, n=90) вне беременнности (таблица 3.13). У пациенток с ПНБ с высокой частотой выявлялись аПГ классов М (у 40%), G (у 48,9%) и А (у 44,4%), значимо чаще, чем у здоровых женщин без потерь беременности (соответственно, у 15,5%, 11,1% и 13,3%). По сравнению со здоровыми женщинами у пациенток с ПНБ IgM аПГ определялись в 3,6 раза, IgG – в 7,6 раза, а IgA – в 5,2 раза чаще ($p<0,001$).

У пациенток с ПНБ, позитивных на аПГ (n=80), наиболее часто выявлялись одиночные IgG или IgM и их комбинации с IgA, такие как IgG+IgA, IgM+IgG+IgA (рисунок 3.17). При этом IgA обнаруживались преимущественно в комбинации с IgG и/или IgM, одиночные IgA выявлялись значимо реже, чем одиночные IgG

(p=0,0149) или IgM (p=0,0388). Сочетание IgG+IgA наблюдалось значимо чаще, чем сочетание IgM+IgA (p=0,0053).

Таблица 3.13 – Частота выявления антител к ПГ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ и здоровых женщин вне беременности при определении с помощью ИФА.

Класс антител	Частота выявления, абс. число (%)		p-значение	OR, 95% CI	p-значение
	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. * – значения p при сравнении двух групп

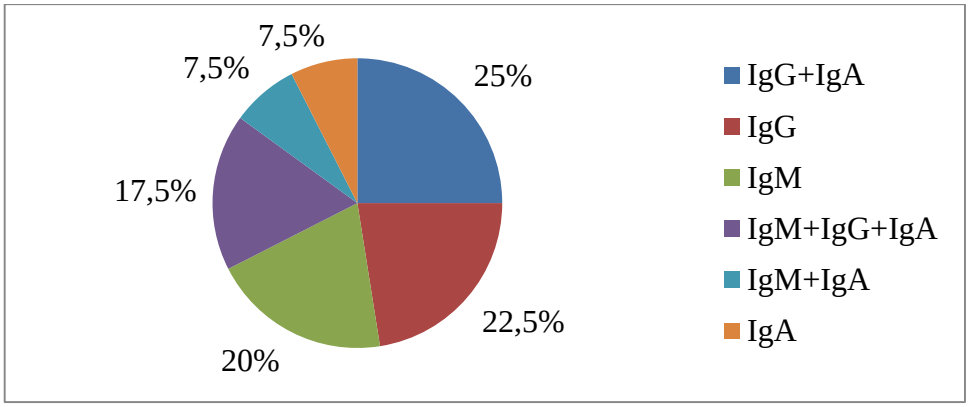
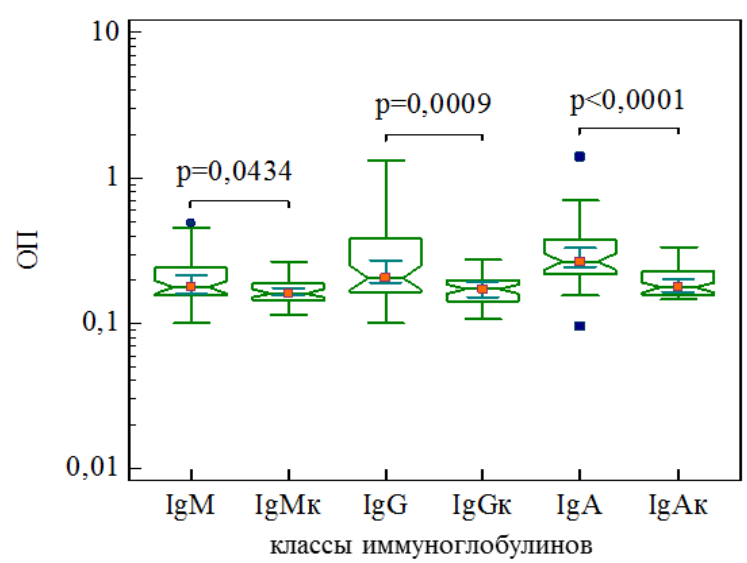


Рисунок 3.17 – Частота выявления антител к ПГ классов M, G, A и их комбинаций у пациенток с ПНБ на ранних сроках.

На рисунке 3.18 представлены результаты определения уровня аПГ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин. Средние уровни аПГ классов M, G и A в исследуемой группе были значимо выше, чем в контрольной группе (p<0,05).



Представлены Me, 95% CI, 25-ый и 75-ый процентили,
минимальные и максимальные значения,
значения p при сравнении исследуемой и контрольной групп

Рисунок 3.18 – Уровни антител к ПГ классов M, G, A у пациенток с ПНБ и здоровых женщин вне беременности.

При исследовании корреляционной зависимости между уровнями IgG и IgA аПГ в сыворотке крови у женщин с ПНБ была выявлена прямая корреляционная связь средней силы (r=0,3901; p=0,0081). Корреляционная связь между уровнями IgM и IgG или IgA аПГ не найдена (p>0,05).

У пациенток с ПНБ на ранних сроках, серопозитивных на аПГ (n=50), были обнаружены IgG-антитела четырех подклассов с преобладанием IgG1 (таблица 3.14). Антитела подклассов IgG1 и IgG2 выявлялись значимо чаще, чем IgG3 и IgG4 (p<0,05), тогда как IgG1 обнаруживались чаще, чем IgG2 (p=0,0002).

Таблица 3.14 – Чатота выявления IgG-антител разных подклассов к ПГ в сыворотке крови у женщин с ПНБ на ранних сроках (n=50).

Подклассы IgG-антител	Частота выявления		p-значение
	абс. число	%	
IgG1	45	90	<0,0001$^{*\Delta}$
IgG2	27	54	0,0009*; 0,0434$^{\Delta}$
IgG3	10	20	0,2543$^{\Delta}$
IgG4	16	32	0,2543*

Примечание. * – значения p при сравнении с IgG3, Δ – при сравнении с IgG4

У женщин с ПНБ на ранних сроках преобладали одиночные IgG1 или комбинация IgG1+IgG2, которые выявлялись чаще, чем комбинация IgG1+IgG2+IgG3 (соответственно, p=0,01 и p=0,08) и другие комбинации IgG1, IgG2 с IgG3 или IgG4 (p<0,01) (рисунок 3.19).

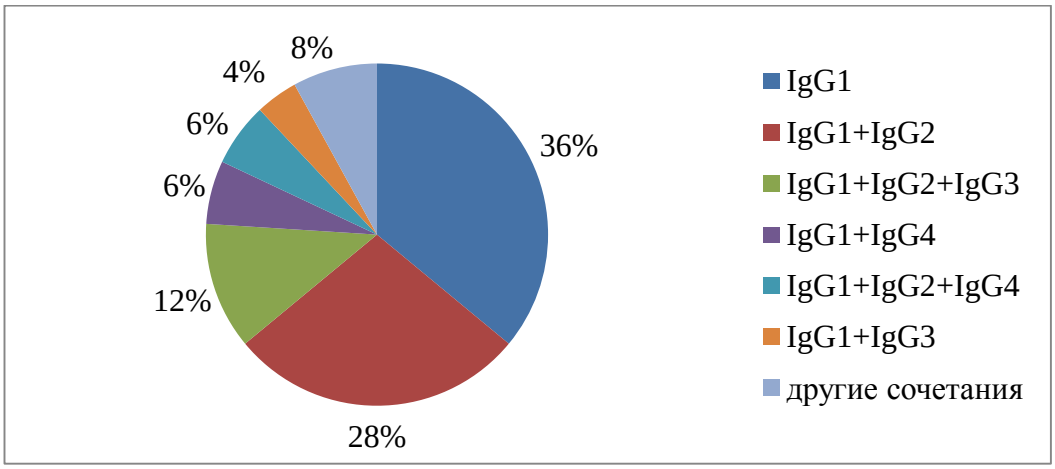
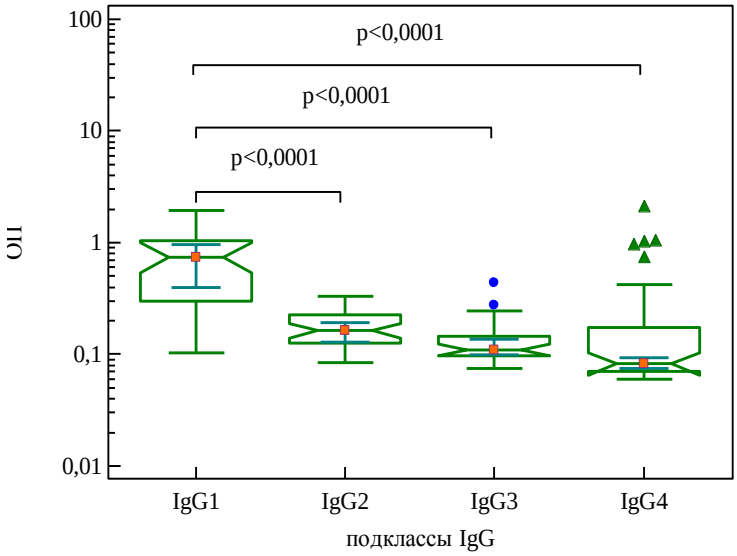


Рисунок 3.19 – Наиболее частые комбинации IgG-антител разных подклассов к ПГ у пациенток с ПНБ на ранних сроках.

На рисунке 3.20 представлены уровни IgG аПГ разных подклассов в сыворотке крови у пациенток с ПНБ. Медианный уровень аПГ подкласса IgG1 был статистически значимо выше, чем медианные уровни IgG других подклассов (p<0,0001). У 5 (10%) пациенток с ПНБ, позитивных на IgG аПГ, обнаруживались высокие уровни IgG4.

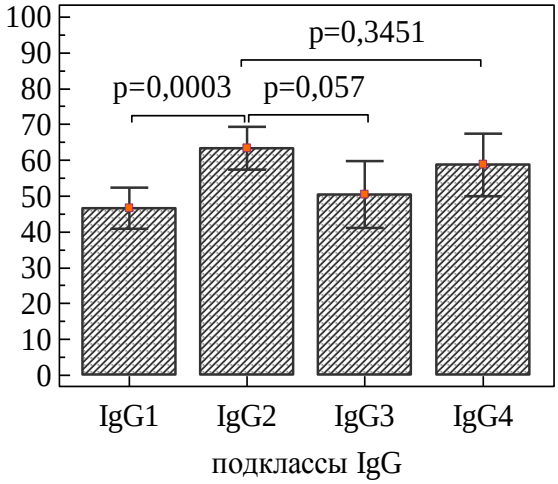


Представлены Me, 95% CI, 25-ый и 75-ый процентили,
минимальные и максимальные значения,
значения p при сравнении антител разных подклассов.

Рисунок 3.20 – Уровни IgG-антител четырех подклассов к ПГ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках.

Авидность аПГ определяли у пациенток с ПНБ на ранних сроках, серопозитивных на IgG аПГ (n=50), с применением белок-диссоциирующего агента. Среднее значение индекса авидности IgG аПГ составило 50,8±13,7%. Высокоавидные IgG аПГ с ИА более 70% выявлялись у пациенток с ПНБ в 12 (24%) случаях, значимо реже, чем высокоавидные IgG аХГЧ (p=0,0022). Средние значения ИА антител подклассов G2 (63,5±14,1%) и G4 (58,8±15,8%) были выше по сравнению с аналогичными показателями антител подклассов G3 (50,4±7,5%) и

G1 (46,7±18,2%). Средние показатели ИА антител подклассов IgG2 и IgG4 значимо превосходили средний ИА IgG1-антител (p<0,05) (рисунок 3.21), при этом высокоавидные антитела подкласса IgG2 были найдены в 10 (37%) случаях, подкласса IgG1 – в 7 (15,6%) случаях (p=0,075).



Представлены значения M и SD,

значения p при сравнении ИА IgG-антител разных подклассов

Рисунок 3.21 – Средние показатели индекса авидности IgG-антител четырех подклассов к ПГ у пациенток с ПНБ на ранних сроках.

Прогностическое значение антител к ПГ в развитии ПНБ на ранних сроках оценивалось с помощью логистического регрессионного анализа, при этом в качестве предикторов рассматривались уровни IgM-, IgG-, IgA-антител к ПГ, а зависимой переменной было наличие у женщин ПНБ. В таблице 3.15 приведены показатели, отражающие предиктивное значение антител к ПГ, коэффициенты регрессии, необходимые для составления уравнения логистической функции. Наиболее высокие значения процента верного предсказания были получены при использовании в качестве предикторов IgG (70%) и IgA (67,8%) аПГ.

Таблица 3.15 – Показатели логистического регрессионного анализа для прогнозирования риска ПНБ на ранних сроках по уровню антител к ПГ.

Класс антител	χ2	p-значение	Коэффициент регрессии	p-значение	% верной классифи-кации
IgM	8,5	0,0035	10,7	0,0122	58,9
IgG	23,7	<0,0001	12,6	0,0014	70
IgA	19,2	<0,0001	12,1	0,0006	67,8

Построение ROC-кривых и проведение ROC-анализа показало, что определение аПГ имеет высокую чувствительность, специфичность и диагностическую значимость при ПНБ на ранних сроках. Показатели чувствительности, специфичности и диагностической значимости при определении IgG- и IgA-антител были выше, чем при определении IgM, как и предсказательная способность модели (таблица 3.16). Диагностическая значимость IgG, IgA и IgM аПГ существенно не различалась (p>0,05).

Таблица 3.16 – Диагностическая значимость антител разных классов к ПГ для ПНБ на ранних сроках.

Класс антител	CV, ед. ОП	Se, %	Sp, %	PPV, %	NPV, %	AUC, 95% CI	p-значение
IgM	>0,19	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 к таблице 3.16. CV – критериальное значение, Se – чувствительность, Sp – специфичность, PPV – положительная прогностическая значимость, NPV – отрицательная прогностическая значимость, AUC – площадь под ROC-кривой

Построенные ROC-кривые позволяли эффективно дифференцировать пациенток с ПНБ и здоровых женщин по уровню аПГ классов G и A (рисунок 3.22). Предсказательная способность модели оценивалась как хорошая при определении IgG и IgA аПГ, и как средняя при определении IgM аПГ.

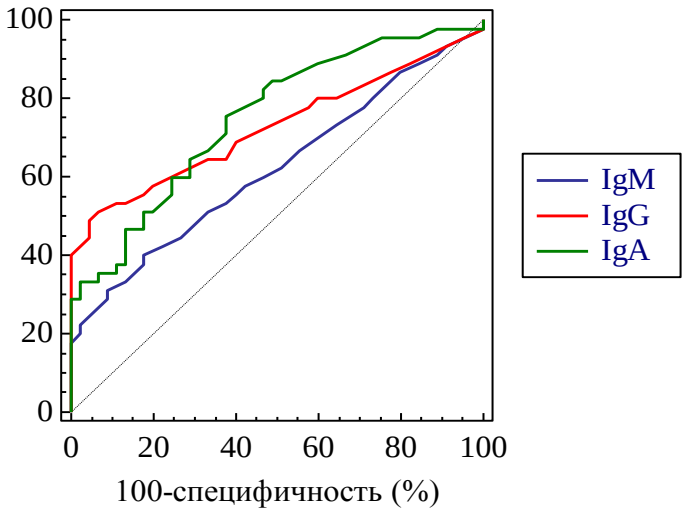


Рисунок 3.22 – ROC-кривые вероятности ПНБ на ранних сроках в зависимости от уровня аПГ классов M, G и A в сыворотке крови (значения AUC 0,621, 0,726 и 0,751, соответственно).

С помощью регрессионного анализа были определены оптимальные пороги отсечения для оценки результатов ИФА при определении аПГ у женщин с ПНБ. С применением данных пороговых значений показано, что при наличии аПГ наблюдается высокий риск развития ПНБ на ранних сроках, более высокий при

выявлении IgG аПГ (OR 9,1; 95% CI [3,30-25,29]; p<0,0001), чем IgA-антител (OR 4,8; 95% CI [2,45-9,55]; p<0,0001) и IgM-антител (OR 3,1; 95% CI [1,29-7,38]; p=0,0115).

По данным логистического регрессионного анализа, при определении комбинации аПГ разных классов (M, G, A) повышалась их диагностическая значимость для ПНБ (значение AUC до 0,859, процент верной классификации до 76,7%) (таблица 3.17). При этом показатели AUC и процента верной классификации, полученные для комбинации IgM+IgG+IgA, значимо превосходили аналогичные показатели IgG (p=0,0494; p=0,0272).

Таблица 3.17 – Диагностическая значимость комбинаций антител разных классов к ПГ для ПНБ на ранних сроках.

Комбинации антител	χ^2	AUC, 95% CI	% верной классификации	p-значение
IgM+IgG	34,87	0,812 [0,716-0,887]	74,4	<0,0001
IgG+IgA	31,3	0,801 [0,704-0,878]	72,2	<0,0001
IgM+IgG+IgA	43,63	0,859 [0,770-0,924]	76,7	<0,0001

Одновременное определение антител разных классов к ПГ может быть использовано для диагностики ПНБ на ранних сроках. При этом на основе вычисленных коэффициентов регрессии по составленному уравнению логистической функции можно рассчитать вероятность ПНБ на ранних сроках у женщин с антителами к ПГ:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-8{,}4 + 15{,}6\,IgM + 14{,}3\,IgG + 10{,}9\,IgA)}}$$

где IgM, IgG, IgA – уровни антител к ПГ, соответствующего класса.

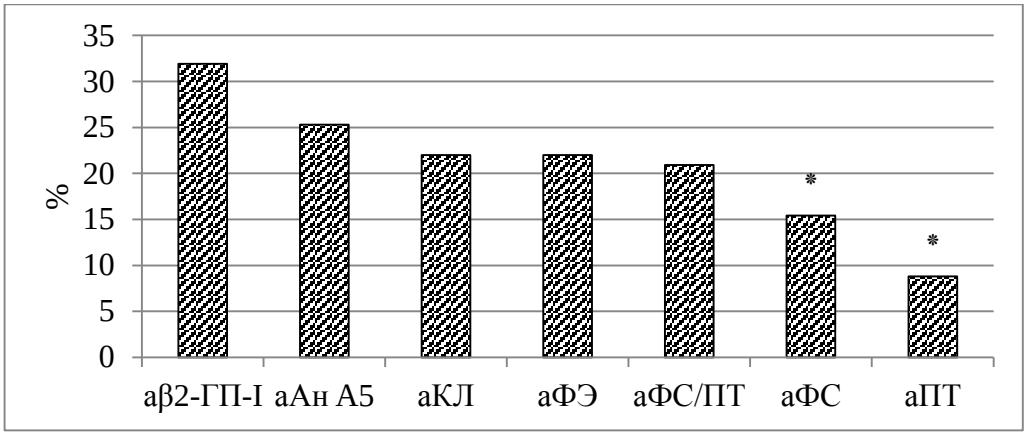
Таким образом, у женщин с ПНБ на ранних сроках наблюдается высокая частота выявления и уровень антител к ПГ классов M, G и A по сравнению со здоровыми женщинами без потери беременности. Антитела к ПГ являются независимым фактором риска ПНБ на ранних сроках. У пациенток с ПНБ высокоавидные IgG-антитела к ПГ определяются реже, чем высокоавидные IgG-антитела к ХГЧ. Среди IgG аПГ разных подклассов наиболее часто выявляются IgG1. Антитела подкласса IgG2 превосходят по авидности IgG1. Определение антител к ПГ, особенно классов G и A имеет высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках. Риск развития ПНБ при наличии IgG аПГ выше, чем при наличии IgA и IgM. Диагностическая значимость комбинации IgM+IgG+IgA аПГ выше, чем иммуноглобулинов отдельных классов. Антитела к ПГ в значительной степени ассоциируются с ПНБ на ранних сроках и могут служить диагностическим маркером данной патологии.

3.2.3 Профиль и диагностическое значение антифосфолипидных антител у женщин с привычным невынашиванием на ранних сроках

Так как антифосфолипидные антитела представляют большое гетерогенное семейство антител к фосфолипидам, фосфолипид-связывающим протеинам и их комплексам, в настоящее время продолжается изучение клинико-диагностического значения серологических маркеров, уже предложенных для диагностики АФС, и поиск новых высокоэффективных диагностических маркеров АФС. В связи с этим нами проводилось исследование широкого спектра антифосфолипидных антител, рассматриваемых в качестве наиболее перспективных лабораторных критериев АФС, изучалась распространенность и уровень аФЛ разных классов и подклассов IgG, их авидность и диагностическое значение при ПНБ на ранних сроках.

Исследовался широкий спектр аФЛ, включающий антитела к фосфолипидам (кардиолипину (КЛ), фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилэтаноламину (ФЭ)), фосфолипид-связывающим протеинам (β2-гликопротеину-I (β2-ГП-I), аннексину А5 (Ан А5), протромбину (ПТ)) и комплексу фосфатидилсерин/протромбин (ФС/ПТ), в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках (исследуемая группа, n=91) и у здоровых женщин (группа сравнения, n=104) вне беременности.

Повышенные уровни аФЛ были обнаружены у 56 (61,5%) пациенток с ПНБ: аКЛ – у 20 (22%), аβ2-ГП-I – у 29 (31,9%), аФС – у 14 (15,4%), аФЭ – у 20 (22%), аАн А5 – у 23 (25,3%), аПТ – у 8 (8,8%), аФС/ПТ – у 19 (20,9%) пациенток (рисунок 3.23). Антитела к β2-ГП-I выявлялись чаще, чем аФЛ другой специфичности, значимо чаще, чем аФС (p=0,0145) и аПТ (p=0,0002). Одиночные аФЛ выявлялись у 23 (25,3%) женщин, из них у 12 (13,2%) аАн А5 и у 9 (9,9%) аβ2-ГП-I, у остальных 33 (36,3%) женщин выявлялись комбинации разных аФЛ, антитела к КЛ и β2-ГП-I выявлялись одновременно у 12 (13,2%) женщин.



* – значимые различия при сравнении с аβ2-ГП-I.

Рисунок 3.23 – Частота выявления аФЛ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках методом ИФА.

Антитела к β2-ГП-I и Ан А5 классов М и G, а также IgG-антитела к КЛ, ФЭ и комплексу ФС/ПТ определялись значимо чаще у пациенток с ПНБ, в частности IgG-антитела к β2-ГП-I и Ан А5 выявлялись в 9,5 и 8,5 раза чаще, чем у здоровых женщин (p<0,01) (таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Частота выявления аФЛ (IgM, IgG) в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин при определении методом ИФА.

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

Примечание. * – значения p при сравнении показателей двух групп

В таблице 3.19 представлены результаты определения уровня аФЛ классов M и G в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин. Медианные уровни всех аФЛ были значимо выше висследуемой группе, чем в группе сравнения ($p<0,05$).

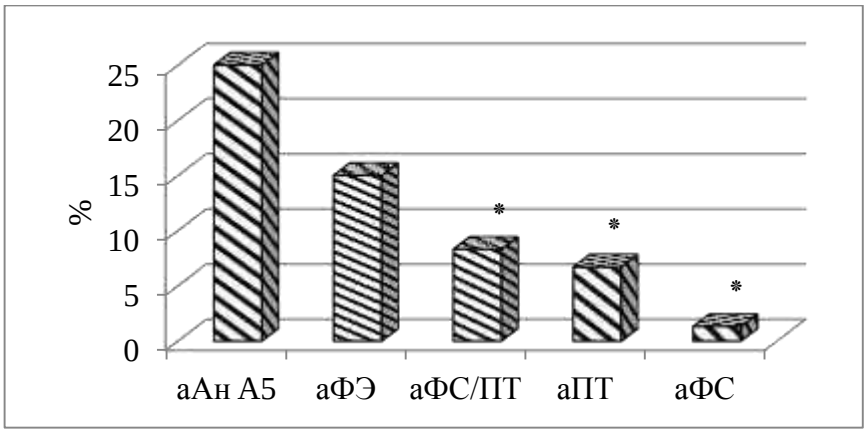
Таблица 3.19 – Уровни аФЛ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ на ранних сроках и здоровых женщин при определении методом ИФА.

Вид антител	Уровень аФЛ *		p-значение
	Исследуемая группа, n=91	Группа сравнения, n=104	
IgM аКЛ	1,8 [0,5-66,5]	1,25 [0,5-15,6]	0,0338
IgG аКЛ	2,4 [1,0-185]	1,9 [1,0-12,5]	0,0181
IgM аβ2-ГП-I	2,4 [0,5-68,7]	2,1 [0,5-8,3]	0,0037
IgG аβ2-ГП-I	2,9 [0,5-217,1]	1,85 [0,5-8,4]	0,0012
IgM аФС	2,0 [0,5-69,8]	1,8 [0,5-12,1]	0,0405
IgG аФС	2,4 [0,7-177]	2,1 [0,5-13,6]	0,0381
IgM аАн А5	2,8 [1,0-8,7]	2,55 [1,0-8,5]	0,0127
IgG аАн А5	3,4 [1,5-69,8]	2,85 [1,0-8,1]	0,0009
IgM аПТ	2,4 [1,0-25,0]	2,25 [1,0-12,3]	0,0148
IgG аПТ	4,6 [1,0-172]	3,2 [1,0-15,2]	0,0023
IgM аФС/ПТ	3,9 [1,0-92,1]	3,3 [1,0-24,1]	0,0232
IgG аФС/ПТ	7,7 [2,1-130,6]	6,1 [1,9-22,3]	0,004
IgM аФЭ	8,5 [2,7-195,3]	6,8 [2,5-27,9]	0,0103
IgG аФЭ	7,6 [2,8-215,4]	6,2 [2,2-20,9]	0,0099

Примечание. * – Me, минимальные и максимальные значения; единицы измерения аКЛ – MPL-Ед/мл, GPL-Ед/мл, других аФЛ – Ед/мл

У трех пациенток, позитивных на аФЛ, со случаями венозного тромбоза в анамнезе отмечалась тройная позитивность на антитела, отнесенные к критериям АФС, включая ВА, а уровень IgG-антител к КЛ и β2-ГП-I был значимо выше (соответственно, 103,2±30,7 GPL-Ед/мл; 120,3±85,7 Ед/мл), чем у пациенток без тромботических осложнений (соответственно, 19,2±8,1 GPL-Ед/мл; 17,9±17,6 Ед/мл; p=0,0357 и p=0,0071).

Антитела к КЛ и β2-ГП-I были выявлены всего у 31 (34,1%) пациентки с ПНБ. Из 60 пациенток, серонегативных на антитела к КЛ и β2-ГП-I, у 25 (41,7%) выявлялись аФЛ другой специфичности: аАн А5 – у 15 (25%), аФЭ – у 9 (15%), аФС/ПТ – у 5 (8,3%), аПТ – у 4 (6,7%), аФС – у 1 (1,3%) (рисунок 3.24). При этом антитела к Ан А5 выявлялись чаще других, значимо чаще, чем антитела к ФС/ПТ, ПТ и ФС (p<0,05).



* – значимые различия при сравнении с аАн А5.

Рисунок 3.24 – Частота выявления у пациенток, серонегативных на антитела к КЛ и β2-ГП-I, антифосфолипидных антител другой специфичности.

У пациенток, позитивных на антитела к КЛ и/или β2-ГП-I, часто обнаруживались аФЛ другой специфичности, за исключением IgG-антител к Ан

А5. При этом антитела к ФС, IgG-антитела к ФЭ и ФС/ПТ выявлялись значимо чаще, чем у пациенток, негативных на антитела к КЛ и β2-ГП-I ($p<0,05$) (таблица 3.20).

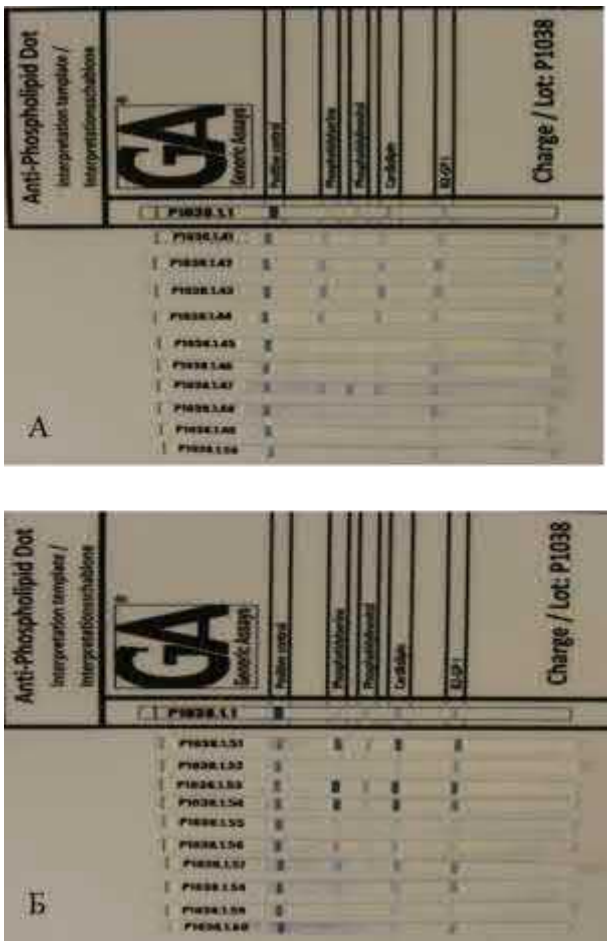
Таблица 3.20 – Частота выявления аФЛ, не относящихся к лабораторным критериям АФС, в сыворотке крови у пациенток с ПНБ, позитивных и негативных на антитела к КЛ и β2-ГП-I.

Вид антител	Частота выявления, абс.ч. (%)		p*	OR, 95% CI	p
	Позитивные пациентки, n=31	Негативные пациентки, n=60			
IgM аФС	6 (19,4)	1 (1,7)	0,0098	14,2 [1,6-123,8]	0,0166
IgG аФС	7 (22,6)	0 (0)	0,0006	37,0 [2,0-673,9]	0,0147
IgM аАн А5	7 (22,6)	7 (11,3)	0,2642	2,2 [0,7-7,0]	0,1782
IgG аАн А5	3 (9,7)	10 (16,7)	0,5566	0,5 [0,14-2,11]	0,3721
IgM аПТ	2 (6,5)	3 (5)	0,8513	1,3 [0,2-8,3]	0,7739
IgG аПТ	3 (9,7)	1 (1,7)	0,2221	6,3 [0,6-63,5]	0,1173
IgM аФЭ	7 (22,6)	5 (8,3)	0,113	3,2 [0,9-11,13]	0,0662
IgG аФЭ	9 (29)	5 (8,3)	0,0221	4,5 [1,4-14,9]	0,014
IgM аФС/ПТ	7 (22,6)	4 (6,7)	0,0623	4,1 [1,1-15,3]	0,0365
IgG аФС/ПТ	11 (35,5)	3 (5)	0,0004	10,5 [2,6-41,3]	0,0008

Примечание. *– значения p при сравнении пациенток, позитивных и негативных на антитела к β2-ГП-I и КЛ

Кроме непрямого твердофазного ИФА для определения аФЛ применяли мультиплексный анализ, представляющий собой иммуноблоттинг на тест-

полосках из мембраны PVDF, на которые нанесены контрольное поле (положительный контроль) и 4 тестовых поля, содержащих по одному очищенному антигену в каждом. С помощью иммуноблоттинга проводили качественное определение в одном исследовании четырех аФЛ классов M или G по интенсивности окрашивания, развивающегося в тестовом поле после взаимодействия аФЛ со специфическим антигеном.На рисунке 3.25 представлены результаты исследования 10 сывороток пациенток с ПНБ на антитела (IgM, IgG) к ФС, фосфатидилинозитолу (ФИ), КЛ и β2-ГП-I методом иммуноблоттинга.



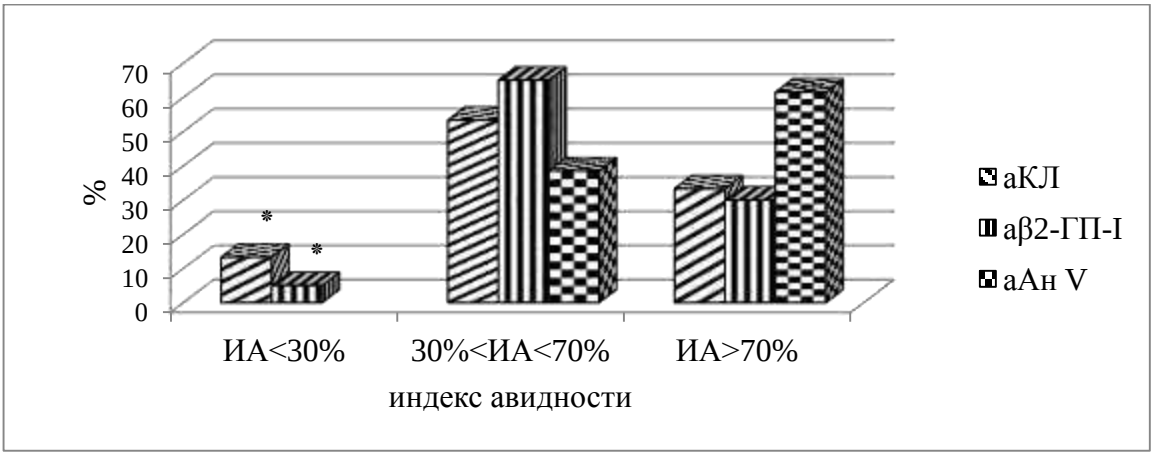
А – профиль IgM аФЛ; Б – профиль IgG аФЛ

Рисунок 3.25 – Результаты определения антител классов M и G к КЛ, ФС, ФИ и β2-ГП-I в сыворотке крови пациенток с ПНБ с использованием метода иммуноблоттинга.

По данным ИФА, среднее содержание аФЛ (IgM, IgG) в исследуемых сыворотках составляло: аКЛ 11,5 [1,0-37] MPL-Ед/мл и 6,0 [2,0-97,0] GPL-Ед/мл, соответственно; аФС 9,0 [2,0-24] Ед/мл и 4,5 [1,0-77,0] Ед/мл, соответственно; аβ2-ГП-I 11,5 [1,0-24] Ед/мл и 5,5 [1,0-97] Ед/мл, соответственно.

Между результатами исследования сывороток крови на аФЛ, полученными с помощью ИФА и иммуноблоттинга, отмечалась сильная прямая корреляционная связь: с r=0,71 (p=0,0223) для IgM и r=0,89 (p=0,0007) для IgG аКЛ; r=0,7 (p=0,0233) для IgM и r=0,82 (p=0,0035) для IgG аФС; r=0,73 (p=0,0157) для IgM и r=0,74 (p=0,0138) для IgG аβ2-ГП-I. Совпадение результатов наблюдалось в 8 (80%) случаях, в 2 (20%) случаях при исследовании сывороток с низким содержанием IgM аКЛ (11 MPL-Ед/мл и 12 MPL-Ед/мл) или IgM аβ2-ГП-I (16 Ед/мл и 17 Ед/мл) в иммуноблоттинге были получены отрицательные или слабоположительные результаты. Выраженная корреляция и хорошее совпадение результатов двух анализов в диапазоне средних и высоких титров аФЛ предполагают перспективность использования иммуноблоттинга в качестве мультиплексного анализа для исследования широкого спектра аФЛ.

Авидность аФЛ определяли с использованием в ИФА на этапе связывания антител с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе, реакционного буферного раствора, содержащего повышенную концентрацию NaCl (0,5 М) вместо физиологической (0,15 М), и последующим расчетом индекса авидности. При этом средние значения ИА антител к КЛ, β2-ГП-I и Ан А5 класса G у 32 пациенток с ПНБ значимо не различались и составляли: ИА аКЛ – 57,11±21,22%, ИА аβ2-ГП-I – 64,82±19,65%, ИА аАн А5 – 68,22±12,98% (p>0,05). IgG-антитела к КЛ и β2-ГП-I имели высокую авидность (ИА>70%) в 33,3% и 30% случаев, среднюю или гетерогенную авидность (30%<ИА<70%) – в 53,3% и 65% случаев, низкую авидность (ИА<30%) – в 13,3% и 5% случаев (рисунок 3.26). Антитела к КЛ и β2-ГП-I с низким ИА выявлялись значимо реже, чем со средним ИА (p=0,0428; p=0,0014). Высокая авидность IgG аАн А5 наблюдалась в 61,5% случаев, средняя авидность – в 38,5% случаев.

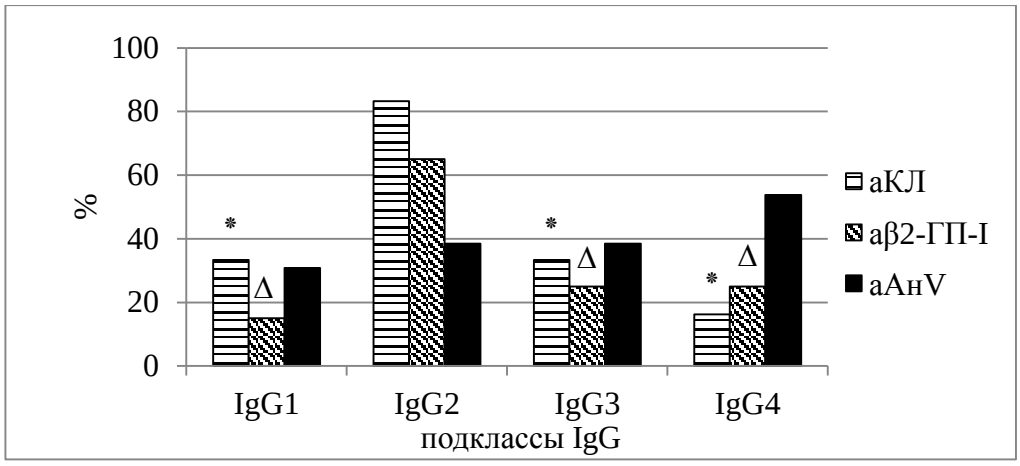


* - значимые различия при сравнении с аФЛ с высоким и средним ИА

Рисунок 3.26 – Частота выявления аФЛ класса G с разной авидностью у женщин с ПНБ на ранних сроках.

Таким образом, у пациенток с ПНБ наиболее часто выявлялись IgG-антитела к КЛ, β2-ГП-I и Ан А5 со средним и высоким индексом авидности. У 3 пациенток с тромботическими осложнениями в анамнезе наблюдался не только высокий уровень антител, но и высокая авидность IgG-антител к КЛ и β2-ГП-I с ИА>90%.

Результаты исследования распределения IgG-антител к КЛ, β2-ГП-I и Ан А5 по подклассам IgG1-IgG4 у пациенток с ПНБ представлены на рисунке 3.27. Повышенные уровни IgG2-антител к КЛ выявлялись чаще (в 83,3% случаев), чем IgG1, IgG3 (p=0,0385) и IgG4 аКЛ (p=0,0042). IgG2-антитела к β2-ГП-I также выявлялись чаще (в 65% случаев), чем IgG3, IgG4 (p=0,0261) и IgG1 (p=0,0037). Среди аАн А5 значимых различий в частоте выявления разных подклассов IgG не отмечалось, повышенные уровни функционально активных подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 выявлялись в 30,8-38,5% случаев, в то же время наблюдалась высокая частота выявления IgG4 аАн А5 (в 53,8% случаев) и их высокий уровень (среднее значение ОП 1,48±1,06).



*,Δ – значимые различия при сравнении антител к КЛ и β2-ГП-I разных подклассов с IgG2.

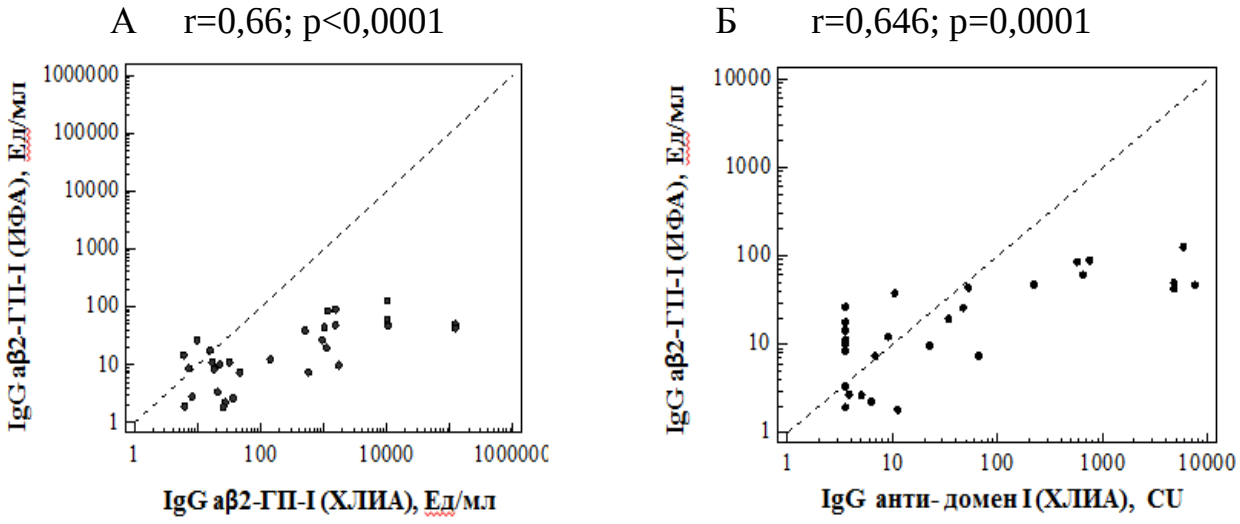
Рисунок 3.27 – Частота выявления IgG-антител разных подклассов к КЛ, β2-ГП-I, Ан А5 в сыворотке крови у пациенток с ПНБ при определении методом ИФА.

Хемилюминесцентный иммуноанализ применяли для исследования сыворотки крови у 30 женщин с ПНБ на наличие антител к β2-ГП-I и его домену I. При исследовании сывороток крови с помощью ИФА IgM-антитела к β2-ГП-I были выявлены в 15 (50%) образцах, IgG – в 22 (73,3%) образцах. При исследовании этих же сывороток с помощью ХЛИА IgM-антитела к β2-ГП-I были обнаружены в 9 (30%) образцах, IgG-антитела – в 22 (73,3%) образцах. В среднем и высоком диапазоне концентраций результаты анализов совпадали в 92% случаев, однако наблюдались несовпадения результатов при низких уровнях антител: при уровне IgM 5,8±4,3 Ед/мл, IgG 9,2±7,3 Ед/мл по данным ИФА.

Медианный уровень антител к β2-ГП-I класса М при определении методом ИФА составлял 7,9 [1,4-109,0] (95% CI [2,3-13,3]) Ед/мл, класса G – 13,2 [1,8-124,9] (95% CI [8,6-35,6]) Ед/мл, тогда как по данным ХЛИА аналогичные показатели IgM составляли 3,3 [1,1-462,8] (95% CI [2,3-13,3]) Ед/мл, IgG – 94,4 [6,1-122000] (95% CI 23,1-1103,8]) Ед/мл. Между уровнями IgM-антител к β2-ГП-I, полученными с помощью ИФА и ХЛИА, наблюдалась сильная прямая

корреляционная связь с r=0,737 [0,513-0,867] (p<0,0001), а между уровнями IgG-антител к β2-ГП-I отмечалась прямая корреляционная связь средней силы с r=0,66 [0,393-0,824] (p<0,0001).

IgG-антитела к домену I β2-ГП-I были обнаружены у 13 (43,3%) женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к β2-ГП-I по данным ИФА. Медианный уровень IgG антител к домену I составлял 9,85 [3,7-7664,3] (95% CI [3,74-51,7]) хемилюминесцентных единиц (CU). Между уровнями IgG-антител к β2-ГП-I и домену I при определении с помощью ХЛИА была выявлена сильная прямая корреляционная связь с r=0,923 [0,843-0,963] (p<0,0001), при этом у женщин, положительных на антитела к домену I, медианный уровень антител к β2-ГП-I составлял 1527 [567,5-122000] Ед/мл. Тогда как между уровнями IgG-антител к β2-ГП-I, полученными с помощью ИФА, и IgG-антител к домену I наблюдалась прямая корреляционная связь средней силы с r=0,646 [0,372-0,816] (p=0,0001). При обнаружении антител к домену I средний уровень IgG-антител к β2-ГП-I у женщин составлял 48,6±34,8 Ед/мл по данным ИФА.



А – корреляционная связь между результатами определения антител к β2-ГП-I;

Б – антител к β2-ГП-I и домену I с помощью ИФА и ХЛИА.

Рисунок 3.28 – Корреляционная связь между уровнями IgG-антител к β2-ГП-I и к домену I при определении с помощью ИФА и ХЛИА.

По данным ROC-анализа, при уровне IgG-антител к β2-ГП-I выше 17,6 Ед/мл при определении с помощью ИФА с высокой чувствительностью (84,6%), специфичностью (88,2%) и точностью (AUC 0,898) можно предсказать наличие антител к домену I β2-ГП-I (P<0,0001). Высокая вероятность наличия IgG-антител к домену I отмечается при концентрации IgG-антител к β2-ГП-I выше 17,6 Ед/мл по данным ИФА (OR 41,3; 95% CI [5,01-339,82]; p=0,0005) или выше 501,3 Ед/мл (OR 945; 95% CI [17,6-50764,9]; p=0,0007) по данным ХЛИА.

С целью определения наиболее значимых серологических маркеров ПНБ на ранних сроках проводился логистический регрессионный анализ, с помощью которого оценивалась диагностическая и прогностическая значимость аФЛ для данной патологии. По данным анализа для антител к β2-ГП-I и Ан А5 класса G были получены наиболее высокие значения отношения шансов (OR 1,67 и 2,32; p<0,0001) и значения площади под ROC-кривой, соответственно, 0,710 и 0,746 (p<0,0001) (таблица 3.21).

Таблица 3.21 – Параметры логистической регрессии при прогнозировании ПНБ на ранних сроках по уровню аФЛ.

Вид антител	OR, 95% CI	p-значение	AUC	p-значение
1	2	3	4	5
IgM aβ2-ГП-I	1,30 [1,08-1,55]	0,0001	0,621	0,0025
IgG aβ2-ГП-I	1,67 [1,33-2,09]	<0,0001	0,705	<0,0001
IgM aАн А5	1,51 [1,2-1,9]	0,0002	0,623	0,002
IgG aАн А5	2,32 [1,67-3,2]	<0,0001	0,743	<0,0001
IgM aКЛ	1,14 [1,01-1,27]	0,0059	0,588	0,0322
IgG aКЛ	1,15 [1,02-1,29]	0,0004	0,578	0,0569
IgM aФС/ПТ	1,06 [1,01-1,11]	0,0003	0,587	0,0344
IgG aФС/ПТ	1,11 [1,05-1,19]	<0,0001	0,645	0,0003

Продолжение таблицы 3.21

1	2	3	4	5
IgM аФЭ	1,14 [1,06-1,22]	<0,0001	0,658	0,0001
IgG аФЭ	1,08 [1,01-1,15]	0,0004	0,592	0,0261
IgM аФС	1,11 [0,99-1,25]	0,0105	0,593	0,0222
IgG аФС	1,11 [0,99-1,24]	0,0054	0,582	0,0435
IgM аПТ	1,11 [0,99-1,25]	0,0485	0,548	0,2488
IgG аПТ	1,12 [1,00-1,26]	0,0142	0,580	0,0996

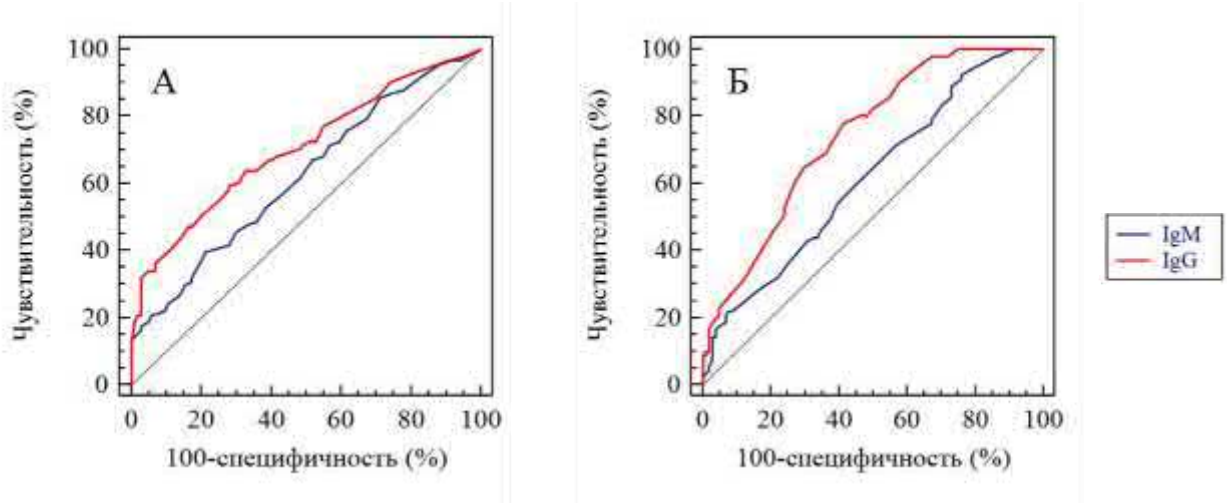
По данным ROC-анализа, IgG-антитела к β2-ГП-I и Ан А5 имели наиболее высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках по сравнению с другими аФЛ (таблицы 3.21 и 3.22). Диагностическая значимость IgG-антител к β2-ГП-I и Ан А5 была значимо выше, чем IgG-антител к КЛ (p=0,0133; p=0,002), ФЭ (p=0,0306; p=0,0044), ФС (p=0,0065; p=0,0014) и ПТ (p=0,0185; p=0,0007). Диагностическая значимость IgG аАн А5 для ПНБ была значимо выше, чем IgM аАн А5 (p=0,0089). Можно предположить, что из всех тестированных аФЛ именно IgG-антитела к β2-ГП-I и Ан А5 являются независимыми факторами риска развития ПНБ на ранних сроках.

Таблица 3.22 – Диагностическая значимость IgG-антител к β2-ГП-I и Ан А5 для ПНБ на ранних сроках.

Вид антител	CV, Ед/мл	Se, %	Sp, %	PPV, %	NPV, %	AUC, 95% CI	p-значение
IgG аβ2-ГП-I	>2,4	59,3	72,1	65,1	66,9	0,705 [0,636-0,768]	<0,0001
IgG аАн А5	>3,0	60,4	73,1	66,3	67,8	0,743 [0,675-0,802]	<0,0001

Примечание к таблице 3.22. CV – критериальное значение, Se – чувствительность, Sp – специфичность, PPV – положительная прогностическая значимость, NPV – отрицательная прогностическая значимость, AUC – площадь под ROC-кривой

На рисунке 3.28 приведены построенные ROC-кривые, которые позволяли эффективно дифференцировать пациенток с ПНБ и здоровых женщин по уровню IgG-антител к β2-ГП-I и Ан А5 и соответствовали хорошему качеству модели.



А – ROC-кривые диагностической значимости антител к β2-ГП-I;

Б – антител к Ан А5

Рисунок 3.28 – ROC-кривые вероятности ПНБ на ранних сроках в зависимости от уровня антител (IgM, IgG) к β2-ГП-I и Ан А5 в сыворотке крови (значения AUC, соответственно, 0,621; 0,710; 0,623; 0,746; p<0,001).

Комбинация антител к КЛ, β2-ГП-I и Ан А5 имела более высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках, было получено более высокое значение показателя AUC 0,806 (95% CI [0,744-0,859]; p<0,0001) по сравнению с аналогичными показателями для отдельных аФЛ, в частности, IgG

аβ2-ГП-I (p=0,0367), а также значение процента верного предсказания – 73,3% (p=0,1896).

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. Частота выявления и средний уровень антител (IgM, IgG) к β2-ГП-I и Ан А5, IgG-антител к КЛ, ФЭ и комплексу ФС/ПТ значимо выше у пациенток с ПНБ, чем у здоровых женщин. Привычное невынашивание беременности ассоциируется с IgG-антителами к КЛ и β2-ГП-I преимущественно подкласса IgG2 со средним и высоким уровнем авидности и высокоавидными IgG-антителами к Ан А5 четырех подклассов. У пациенток с тромботическими осложнениями в анамнезе отмечается наиболее высокий уровень и высокая авидность антител к КЛ и β2-ГП-I по сравнению с пациентками только с акушерской патологией. IgG-антитела к β2-ГП-I и Ан А5 являются независимыми факторами риска ПНБ и имеют высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках. При среднем и высоком уровне IgG-антител к β2-ГП-I отмечается высокая вероятность наличия антител к домену I β2-ГП-I. Антитела к Ан А5 представляют перспективный диагностический маркер акушерского АФС.

3.2.4 Спектр и диагностическое значение антител к гормонам и антифосфолипидных антител при угрожающем выкидыше на раннем сроке

У пациенток с угрозой прерывания беременности в I триместре (исследуемая группа, n=47) на сроке 8,5±2,3 недель с помощью ИФА была обнаружена повышенная продукция антител к ХГЧ и ПГ классов М и G по сравнению с женщинами с физиологическим течением беременности (группа сравнения, n=30). Медианные уровни антител к гормонам обоих классов иммуноглобулинов при

угрожающем выкидыше были статистически значимо выше, чем при физиологической беременности (p<0,001) (таблица 3.23).

Таблица 3.23 – Уровни антител к гормонам в сыворотке крови у пациенток с угрожающим выкидышем на раннем сроке и у женщин с физиологическим течением беременности по данным ИФА.

Вид антител	Уровень антител*		p-значение
	Исследуемая группа, n=47	Группа сравнения, n=30	
IgM аХГЧ	0,284 [0,135-0,727]	0,204 [0,134-0,288]	<0,0001
IgG аХГЧ	0,258 [0,136-0,838]	0,197 [0,145-0,277]	0,0006
IgM аПГ	0,368 [0,116-1,034]	0,249 [0,112-0,39]	0,0004
IgG аПГ	0,225 [0,122-0,873]	0,192 [0,143-0,298]	0,0028

Примечание. * – Me, минимальное и максимальное значение, ед. ОП

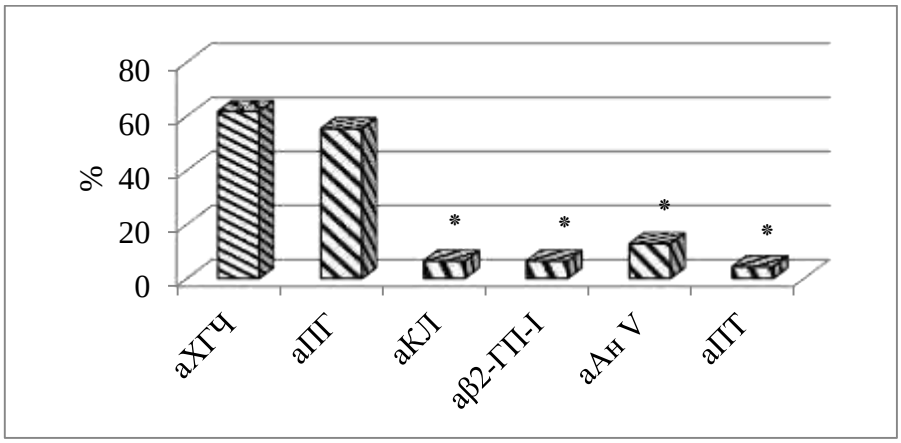
При угрозе прерывания беременности статистически значимо чаще выявлялись антитела к ХГЧ и ПГ классов М и G, чем при физиологическом течении беременности: аХГЧ, соответственно, в 8,8 и 8,6 раза чаще, а аПГ в 3,2 и 4,7 раза чаще (таблица 3.24).

Высокие уровни антител к гормонам, превышающие в 2 раза средний уровень в контрольных сыворотках, были выявлены у 38 (80,9%) пациенток с угрожающим выкидышем, в том числе аХГЧ – у 29 (61,7%), аПГ – у 26 (55,3%) пациенток (рисунок 3.29). Тогда как аФЛ с аналогичным уровнем были обнаружены значимо реже только у 10 (21,3%) пациенток (p<0,0001): аКЛ – у 3 (6,4%), аβ2-ГП-I – у 3 (6,4%), аАн А5 – у 6 (12,8%), аПТ – у 2 (4,3%) пациенток.

Таблица 3.24 – Частота выявления антител к ХГЧ и ПГ при угрожающем выкидыше на раннем сроке и физиологической беременности.

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

Примечание. *- значения p при сравнении двух групп

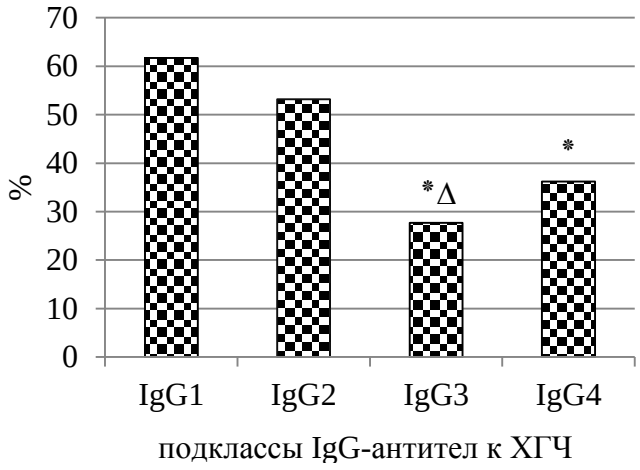


* - значимые различия при сравнении с аХГЧ и аПГ.

Рисунок 3.29 – Частота выявления антител к гормонам, фосфолипидам и фосфолипид-связывающим протеинам в сыворотке крови у пациенток с угрожающим выкидышем в I триместре.

Таким образом, антитела к гормонам выявлялись у пациенток с угрозой прерывания беременности значимо чаще, чем аФЛ. Между уровнями антител к ХГЧ и ПГ классов M и G наблюдалась прямая корреляционная связь средней силы с коэффициентами корреляции, соответственно, 0,48 ($p<0,0001$) и 0,37 ($p=0,0009$).

Изучение распределения антител к ХГЧ по подклассам IgG показало, что при угрозе выкидыша в I триместре повышались уровни IgG-антител всех четырех подклассов: IgG1 в 61,7%, IgG2 в 53,2%, IgG3 в 27,7% и IgG4 в 36,2% случаев (рисунок 3.31). Наиболее часто выявлялись IgG1 и IgG2, IgG1 выявлялись значимо чаще, чем IgG3 ($p=0,0019$) и IgG4 ($p=0,0234$), IgG2 - чаще, чем IgG3 ($p=0,0210$).



*, Δ – значимые различия показателей при сравнении с IgG1 и IgG2.

Рисунок 3.31 – Частота выявления IgG-антител к ХГЧ разных подклассов у женщин с угрожающим выкидышем на раннем сроке.

Для оценки прогностического значения антител к ХГЧ и ПГ в развитии угрожающего выкидыша на раннем сроке был проведен логистический регрессионный анализ, в котором в качестве предикторов рассматривались

уровни антител к ХГЧ и ПГ классов М и G, а зависимой переменной было развитие угрожающего выкидыша. В таблице 3.25 приведены показатели, отражающие предиктивное значение антител, рассчитанные коэффициенты регрессии, необходимые для составления уравнения логистической функции.

Таблица 3.25 – Показатели логистического регрессионного анализа для прогнозирования риска угрожающего выкидыша на раннем сроке по уровню антител к ХГЧ и ПГ.

Вид антител	$\chi 2$	p-значение	Коэффициент регрессии	p-значение	% верной классификации
IgM аХГЧ	23,7	<0,0001	17,5	0,0003	70,1
IgG аХГЧ	15,8	0,0001	14,7	0,0023	64,9
IgM аПГ	17,4	<0,0001	7,1	0,0019	64,9
IgG аПГ	10,7	0,0011	11,2	0,0172	63,6

При использовании в качестве независимой переменной IgM- и IgG-антител к ХГЧ и ПГ были получены высокие показатели процента корректно классифицированных случаев, которые составляли 63,6% и 70,1%. Наиболее высокий процент верной классификации отмечался при использовании в качестве предиктора IgM-антител к ХГЧ.

Для оценки качества полученной модели были построены ROC-кривые и проведен ROC-анализ, который показал, что определение антител к ХГЧ и ПГ как класса G, так и класса М имело высокую диагностическую значимость для угрожающего выкидыша на раннем сроке (таблица 3.26), при этом показатели AUC для антител обоих классов значимо не различались (p=0,4878; p=0,7029).Одновременное определение антител к ХГЧ или ПГ классов М и G характеризовалось более высоким процентом верного предсказания 76,6% и

67,5%, а также высокими значениями AUC, соответственно, 0,882 (95% CI [0,788-0,944]) и 0,782 (95% CI [0,674-0,868])(p<0,0001).

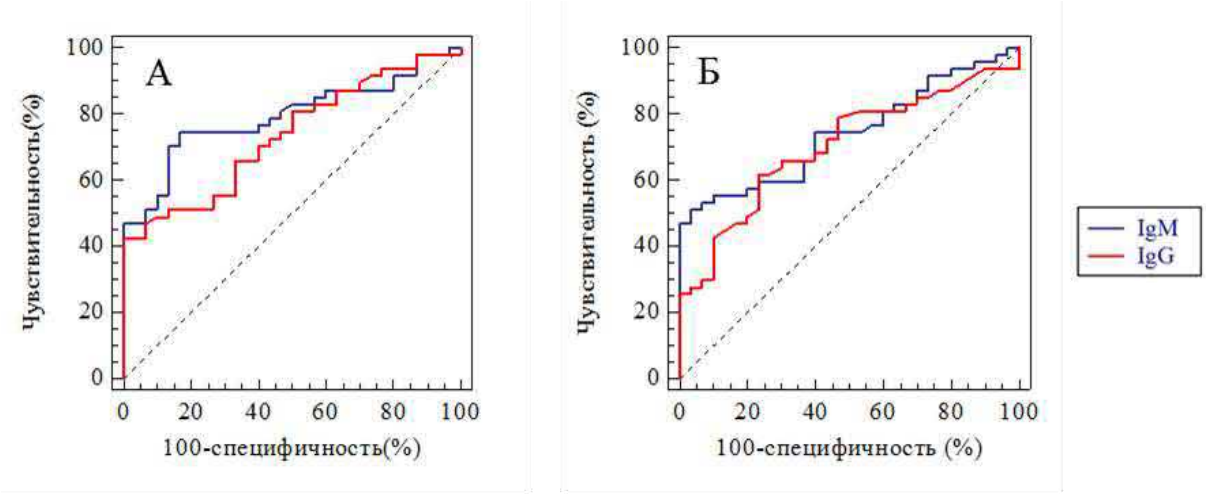
Таблица 3.26 – Диагностическая значимость антител к ХГЧ и ПГ для угрожающего выкидыша на раннем сроке.

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

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

Построенные ROC-кривые позволяли эффективно классифицировать пациенток с угрожающим выкидышем на раннем сроке и женщин с физиологическим течением беременности по уровням антител к ХГЧ и ПГ (рисунок 3.30), отмечалось хорошее качество модели.

С помощью регрессионного анализа были определены оптимальные пороги отсечения для оценки результатов ИФА при определении аХГЧ и аПГ у женщин с угрожающим выкидышем в I триместре. С использованием полученных порогов отсечения установлено, что шансы развития угрожающего выкидыша при наличии IgM или IgG аХГЧ повышались, соответственно, в 14,6 раза (OR 14,6; 95% CI [4,56-46,65]) и 3,4 раза (OR 3,4; 95% CI [1,26-9,19]) (p<0,0001), а при наличии IgM или IgG аПГ в 5,3 раза (OR 5,3; 95% CI [1,89-14,83]; p=0,0015).



А – ROC-кривые диагностической значимости антител (IgM, IgG) к ХГЧ;

Б – антител (IgM, IgG) к ПГ.

Рисунок 3.30 – ROC-кривые вероятности угрожающего выкидыша на раннем сроке в зависимости от уровня антител классов M и G к ХГЧ и ПГ в сыворотке крови (значения AUC, соответственно, 0,793; 0,734; 0,741; 0,703; $p<0,001$).

Одновременное определение антител классов M и G к ХГЧ и ПГ может быть использовано для диагностики угрожающего выкидыша на раннем сроке. С помощью составленного на основе вычисленных коэффициентов регрессии уравнения логистической функции может быть рассчитана вероятность угрожающего выкидыша на раннем сроке у женщин с антителами к ХГЧ и ПГ:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-12{,}89 + 16{,}7\ IgM\ aХГЧ + 20{,}9\ IgG\ aХГЧ + 6{,}9\ IgM\ aПГ + 11{,}1\ IgG\ aПГ)}}$$

где IgM аХГЧ, IgG аХГЧ, IgM аПГ, IgG аПГ – уровни антител к ХГЧ и ПГ, соответствующего класса.

Таким образом, при угрожающем выкидыше в I триместре беременности более часто обнаруживаются повышенные уровни антител к ХГЧ и ПГ по сравнению с физиологической беременностью. Антитела к ХГЧ и ПГ классов M и G выявляются при угрожающем выкидыше значимо чаще, чем аФЛ. Как IgG-, так

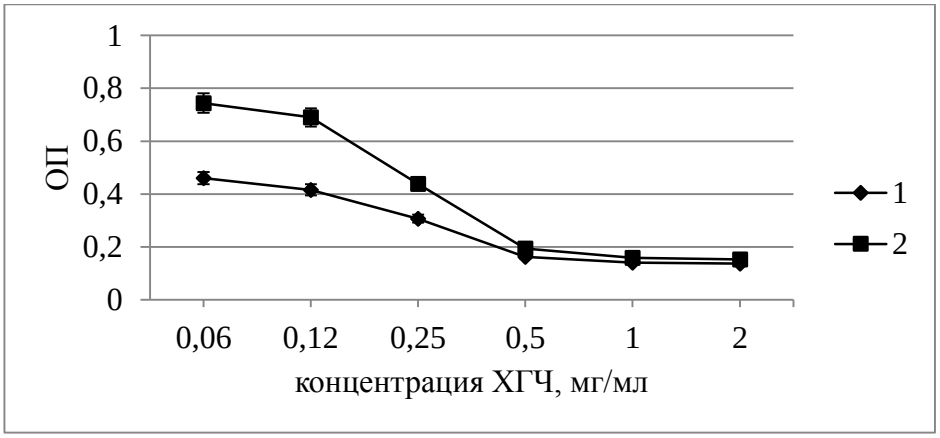
и IgM-антитела к ХГЧ и ПГ являются независимыми факторами риска угрожающего выкидыша на раннем сроке и имеют высокую диагностическую значимость для данной патологии.

3.3 Исследование специфичности антител к хорионическому гонадотропину и прогестерону у женщин с привычным невынашиванием беременности

Важной характеристикой антител является специфичность, то есть способность специфически связываться с определенным антигеном, и особенно их эпитопная специфичность, так как в популяции поликлональных антител может присутствовать множество паратопов, способных связываться с разными эпитопами. Молекула ХГЧ имеет сложную антигенную структуру, близкую с гипофизарными гонадотропными гормонами (ЛГ и ФСГ) и тиреотропным гормоном (ТТГ). Определенные пептидные последовательности ХГЧ являются ответственными за специфичность и биологическую активность гормона, однако при этом не исключается возможность перекрестной реактивности сывороточных антител к ХГЧ с общими антигенными детерминантами гликопротеиновых гормонов. Тогда как прогестерон имеет выраженное структурное сходство с другими стероидными гормонами. В данном исследовании проводилось изучение специфичности антител к ХГЧ и прогестерону, эпитопной специфичности аХГЧ, выделение препарата аффинно-очищенных антител к ХГЧ из пулированной сыворотки крови женщин с ПНБ.

3.3.1 Специфичность антител к хорионическому гонадотропину человека, свободным α- и β- субъединицам и эпитопам β-субъединицы гормона

Специфичность взаимодействия сывороточных антител с ХГЧ была подтверждена в ИФА с помощью метода конкурентного ингибирования связывания антител с иммобилизованным на твердой фазе гормоном в присутствии избытка ХГЧ в реакционном буферном растворе. Для проведения реакции конкурентного ингибирования использовали фракцию иммуноглобулинов G, выделенную из сыворотки крови пациенток с ПНБ, позитивных на антитела к ХГЧ, с помощью хроматографии на магнитных частицах EcomagTM Protein A/G, как описано в параграфе 2.3.6. Связывание антител с гормоном, иммобилизованным на твердой фазе, ингибировалось в 2 раза и более в присутствии в реакционном буферном растворе ХГЧ в концентрации 0,5 мг/мл и выше (рисунок 3.32).

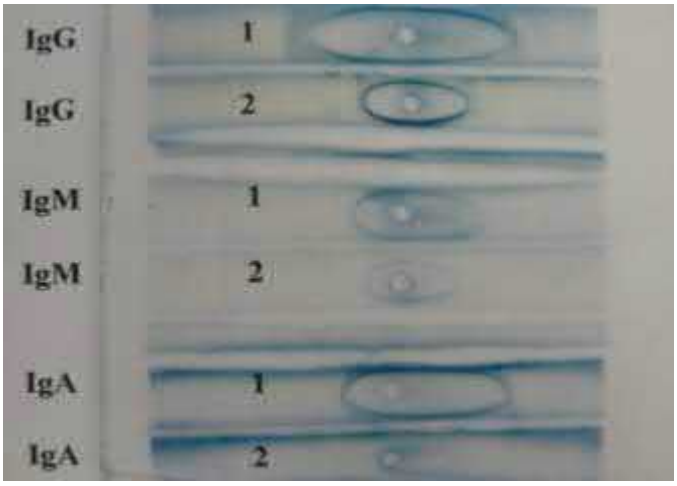


1 и 2 – образцы фракции IgG из двухсывороток крови

Рисунок 3.32 – Конкурентное ингибирование связывания фракции IgG, выделенной из двух образцов сыворотки крови пациенток с ПНБ, с иммобилизованным ХГЧ при избытке ХГЧ в реакционном буферном растворе.

Более того, из пулированной сыворотки крови пациенток с ПНБ, позитивных на антитела к ХГЧ по данным ИФА, был выделен очищенный препарат антител к ХГЧ с помощью аффинной хроматографии на колонке с сефарозой CL-4B, связанной с ХГЧ. Иммуноглобулиновая природа очищенного белкового препарата была подтверждена с помощью иммуноэлектрофореза в агарозе, выполненного с использованием моноспецифических антисывороток к IgM, IgG и IgA человека и контрольной сыворотки человека.

Полученная иммуноэлектрофореграмма показала, что в выделенном белковом препарате были представлены иммуноглобулины трех классов G, M и A, при этом самую большую фракцию составляли IgG, в меньшем количестве содержались IgM, в следовых количествах – IgA (рисунок 3.33).

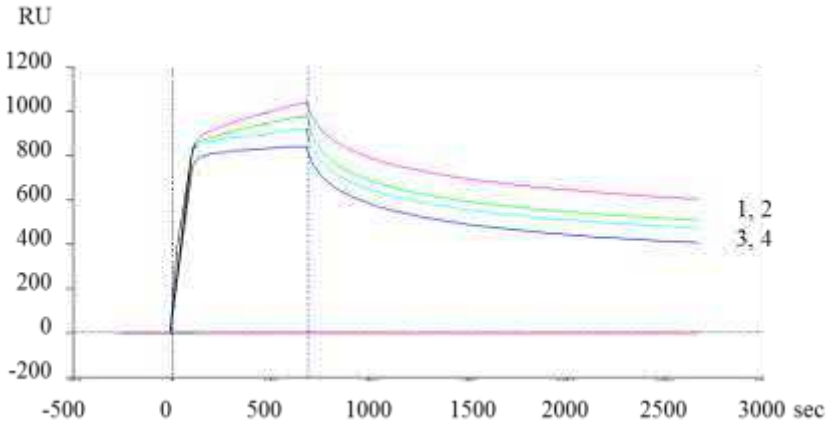


1 – контрольная сыворотка человека;

2 – аффинно очищенные антитела к ХГЧ

Рисунок 3.33 – Иммуноэлектрофореграмма контрольной сыворотки человека и аффинно очищенных антител к ХГЧ с моноспецифическими антисыворотками против IgG, IgM, IgA человека.

Кроме того, взаимодействие сывороточных антител с ХГЧ исследовали в режиме реального времени с помощью системы ProteOn™ XPR36, основанной на методе поверхностного плазмонного резонанса (SPR), с использованием микрофлюидального сенсорного многоканального чипа GLC. Разведенные сыворотки крови пациенток с привычным выкидышем наносили на соответствующие дорожки чипа и наблюдали связывание антител с иммобилизованным ХГЧ (рисунок 3.34). На представленных сенсограммах поверхностного плазмонного резонанса связывания сывороточных антител с ХГЧ показано, что сигналы образцов составляли от 840 RU до 1045 RU, между полученными сигналами и уровнем аХГЧ по данным ИФА наблюдалась сильная прямая корреляционная связь (r=0,97; p=0,0292).

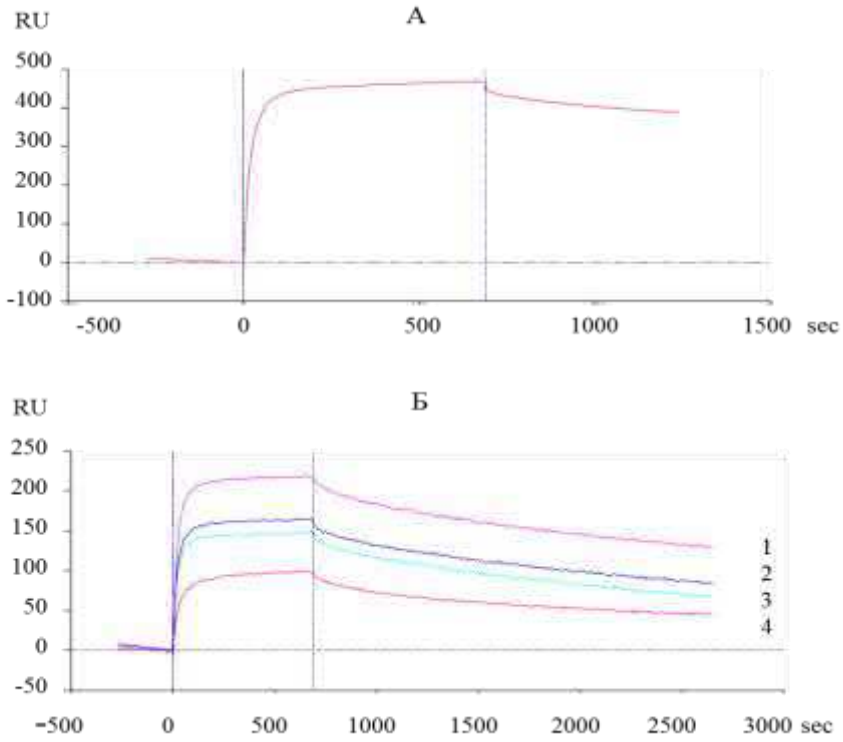


1, 2, 3, 4 – образцы сыворотки крови, позитивной на аХГЧ

Рисунок 3.34 – Сенсограммы поверхностного плазмонного резонанса связывания сывороточных антител пациенток с ПНБ (n=4) с ХГЧ, иммобилизованным на поверхности многоканального сенсорного чипа GLC (6x6), полученные на ProteOn™ XPR36.

После сывороток, содержащих антитела к ХГЧ, на эти же дорожки наносили МКАТ к β-ХГЧ и наблюдали снижение сигнала в 2-4 раза (до 104 RU,

222 RU) по сравнению с сигналом, полученным при связывании тех же МКАТ с ХГЧ на контрольной дорожке (440 RU) без нанесения положительных на аХГЧ сывороток (рисунок 3.35). Между сигналом, полученным при связывании МКАТ с гормоном на поверхности чипа, и уровнем аХГЧ в образцах сыворотки крови по данным ИФА наблюдалась сильная обратная корреляционная связь (r=-0,96 при p=0,0345).



А – связывание МКАТ к β-ХГЧ с ХГЧ на контрольной дорожке;

Б – после нанесения положительных на аХГЧ сывороток крови (1, 2, 3, 4).

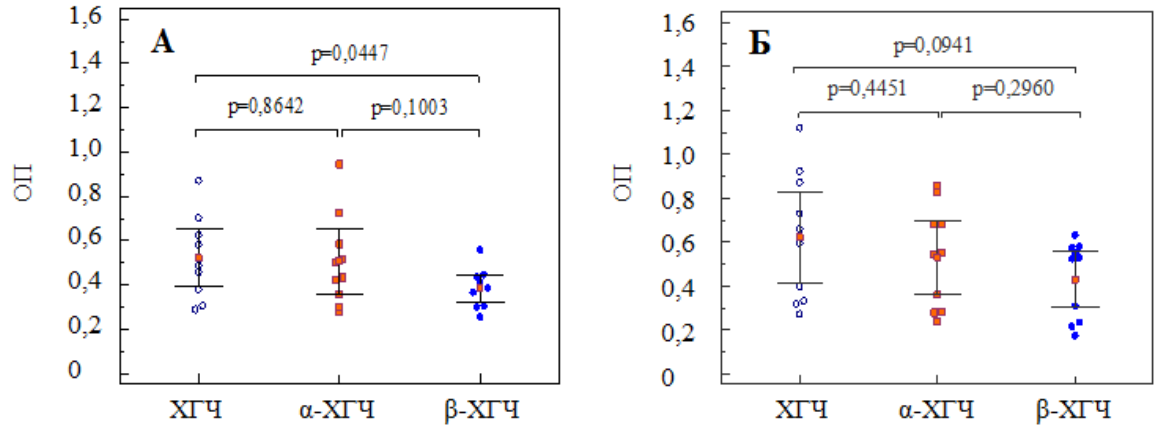
Рисунок 3.35. – Сенсограммы поверхностного плазмонного резонанса связывания МКАТ к β-ХГЧ с ХГЧ на поверхности многоканального чипа GLC (6x6) до и после нанесения сывороток крови (n=4), положительных на аХГЧ.

Таким образом, специфичность взаимодействия антител с ХГЧ была подтверждена в ИФА методом конкурентного ингибирования связывания антител

с иммобилизованным антигеном в присутствии избытка антигена в растворе, а также выделением аффинно очищенного препарата антител к ХГЧ из пулированной сыворотки крови пациенток с ПНБ, положительной на аХГЧ по данным ИФА. Кроме того, с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени показано, что сывороточные антитела у серопозитивных пациенток с привычным выкидышем взаимодействуют с ХГЧ, иммобилизованным на поверхности чипа, и ингибируют связывание МКАТ к β-ХГЧ с гормоном, что предполагает их специфичность к эпитопам β-субъединицы ХГЧ.

Исследование взаимодействия сывороточных антител пациенток с ПНБ со свободными α- и β-субъединицами ХГЧ показало, что сывороточные антитела взаимодействуют как с цельной молекулой ХГЧ, так и с α- и β- субъединицами гормона, иммобилизованными на твердой фазе путем пассивной адсорбции. На рисунке 3.36 представлены средние уровни антител при определении с помощью ИФА с использованием микропланшетов с иммобилизованным ХГЧ или свободными α- и β-субъединицами гормона.

Средние уровни антител к цельной молекуле ХГЧ и α-субъединице не различались, в то время как уровень IgM-антител к цельной молекуле ХГЧ был значимо выше уровня IgM-антител к β-ХГЧ. Между уровнями антител к цельной молекуле ХГЧ и α-субъединице наблюдалась сильная прямая корреляционная связь ($r \geq 0{,}97$), тогда как между антителами к цельной молекуле ХГЧ, α-ХГЧ и антителами к β-ХГЧ наблюдалась выраженная прямая корреляционная связь меньшей силы (таблица 3.27).



А – уровни антител класса М; Б – уровни антител класса G

Представлены значения M±SD, значения ОП,

значения p при сравнении антител к ХГЧ, свободным субъединицам гормона

Рисунок 3.36 – Взаимодействие сывороточных антител классов М и G с цельной молекулой ХГЧ, свободными α- и β- субъединицами ХГЧ, иммобилизованными на твердой фазе.

Таблица 3.27 – Корреляционная связь между уровнями антител к цельной молекуле ХГЧ и свободным α- и β-субъединицам гормона в сыворотке крови у женщин с ПНБ.

Пока-затели	Корреляционная зависимость между уровнями антител					
	к ХГЧ и α-ХГЧ		к ХГЧ и β-ХГЧ		к α-ХГЧ и β-ХГЧ	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
r	0,98	0,97	0,77	0,82	0,71	0,87
p	<0,0001	<0,0001	0,009	0,0036	0,0209	0,0011

При изучении специфичности антител к эпитопам β-ХГЧ показано, что сывороточные антитела пациенток с ПНБ (n=44) взаимодействовали с синтетическими пептидами β-субъединицы гормона С109-119 и С109-145. При этом с пептидом С109-119 реагировали 50% сывороток, с пептидом С109-145 – 29,5% сывороток (таблица 3.28). Антитела к цельной молекуле ХГЧ выявлялись значимо чаще, чем антитела к пептидам β-ХГЧ (p<0,0001), тогда как антитела к пептидам С109-119 и С109-145 по частоте выявления не различались (p=0,0806).

Таблица 3.28 – Частота выявления IgG-антител к ХГЧ и синтетическим пептидам β-ХГЧ С109-119 и С109-145 в сыворотке крови у пациенток с ПНБ (n=44).

Специфичность антител	Частота выявления антител		p
	абс. число	%	
к ХГЧ	44	100	–
к пептиду С109-119	22	50	<0,0001*
к пептиду С109-145	13	29,5	<0,0001* 0,0806**

Примечание. *,** – значения p при сравнении с антителами к ХГЧ и к С109-119

Медианный уровень IgG-антител к цельной молекуле ХГЧ 0,567 [0,296-1,737] был значимо выше, чем к пептидам С109-119 и С109-145, соответственно, 0,250 [0,101-1,095] и 0,137 [0,071-1,382] (p<0,0001). У пациенток, позитивных на антитела к данным пептидным последовательностям β-ХГЧ, средний уровень антител к ХГЧ (0,891±0,278) был значимо выше, чем у пациенток, негативных на антитела к пептидам (0,424±0,077) (p<0,0001).

По данным ROC-анализа, по уровню IgG-антител к цельной молекуле ХГЧ можно предположить наличие антител к пептидным последовательностям С109-

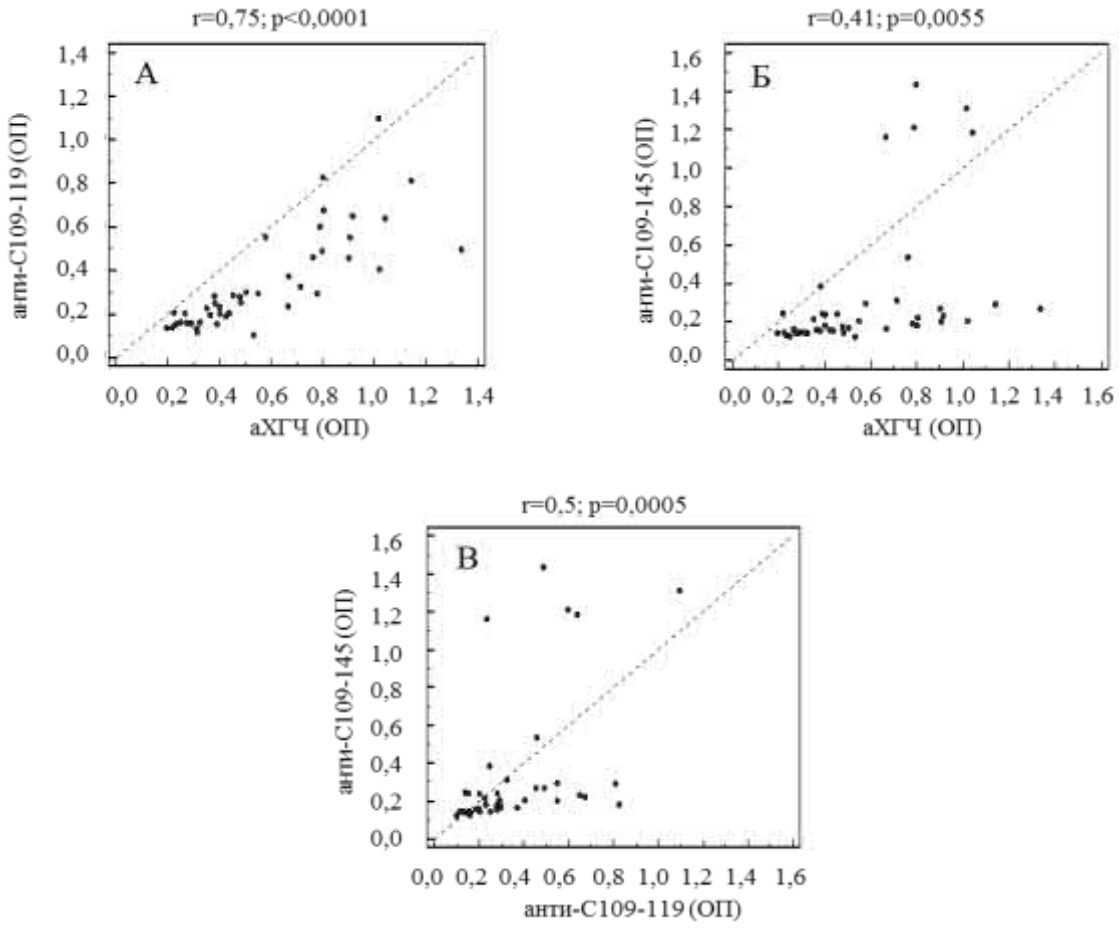
119 и С109-145 с высокой чувствительностью (соответственно, 95,5% и 84,6%), специфичностью (90,9% и 80,6%) и точностью (AUC 0,959 и 0,792, p<0,0001). При уровне IgG аХГЧ выше 0,537 ед. ОП имелась высокая вероятность наличия у женщин антител к пептиду С109-119 (OR 210 [17,6-2501,1]; p<0,0001]), а при уровне IgG аХГЧ выше 0,651 ед. ОП – антител к пептиду С109-145 (OR 10,1 [2,22-45,71]; p=0,0027), что соответствовало 40 Ед/мл и 48 Ед/мл.

Между уровнями IgG-антител к ХГЧ и пептиду С109-119 наблюдалась сильная прямая корреляционная связь (r=0,75; p<0,0001), между уровнями IgG-антител к ХГЧ и пептиду С109-145 отмечалась прямая корреляционная связь средней силы (r=0,41; p=0,0055), между уровнями антител к двум пептидам – прямая корреляционная связь средней силы (r=0,5; p=0,0005) (рисунок 3.37).

Таким образом, антитела к ХГЧ представляли собой гетерогенную популяцию антител с разной эпитопной специфичностью, реагирующих как с цельной молекулой ХГЧ, так и со свободными α- и β- субъединицами гормона. В составе антител к ХГЧ были антитела к пептидной последовательности С109-119, генерирующей продукцию специфических для ХГЧ антител, и антитела к пептидной последовательности С109-145, способные нейтрализовать биологическую активность гормона. При уровне IgG-антител к ХГЧ более 48 Ед/мл отмечалась высокая вероятность наличия антител к данным пептидным последовательностям.

Учитывая направленность антител к α-субъединице ХГЧ, которая является общей у гликопротеиновых гормонов, включая ЛГ и ФСГ, и близкую антигенную структуру β-субъединиц этих гормонов, особый интерес представляло исследование взаимодействия сывороток, положительных на антитела к ХГЧ, с гипофизарными гонадотропинами. Для этого в ИФА использовали микропланшеты, сенсибилизированные ЛГ и ФСГ посредством МКАТ к α-субъединице как описано для иммобилизации ХГЧ в параграфе 3.3. Сывороточные антитела (IgM, IgG) у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, взаимодействовали с ЛГ (в 70% и 75% случаев) и ФСГ (в 40 и 50% случаев), значимо реже чем с ХГЧ (p<0,05). Чаще наблюдалось взаимодействие

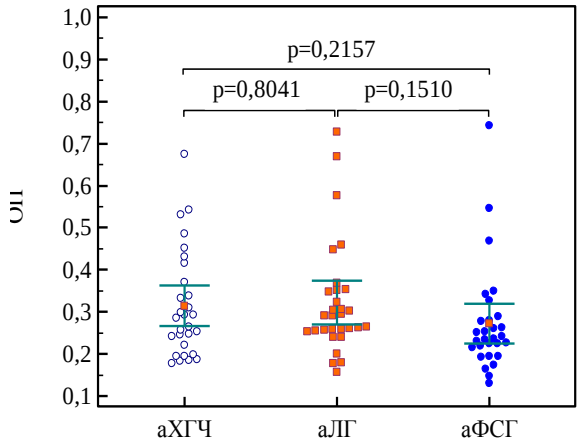
сывороточных антител с ЛГ, который имеет более близкую структуру с ХГЧ, чем ФСГ. В 25-30% случаев сыворотки реагировали только с ХГЧ.



А – корреляционная связь между уровнями антител к ХГЧ и пептиду С109-119;
Б – к ХГЧ и С109-145; В – к С109-119 и С 109-145.

Рисунок 3.37 – Корреляционная связь между уровнями IgG-антител к молекуле ХГЧ и синтетическим пептидам β-ХГЧ С109-119 и С109-145 в сыворотке крови у пациенток с ПНБ.

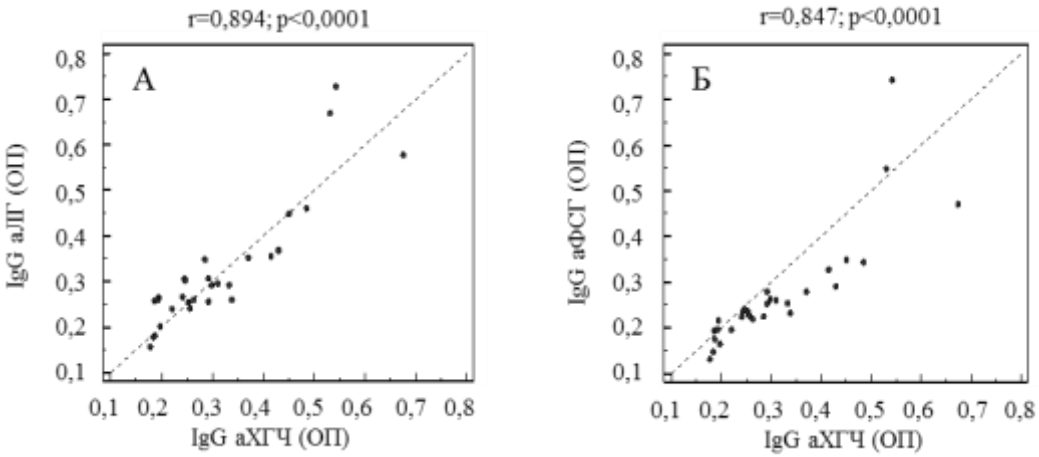
Средние уровни ОП при взаимодействии сывороточных антител с ХГЧ, ЛГ и ФСГ, иммобилизованными на твердой фазе, значимо не различались ($p>0,05$) (рисунок 3.38).



Представлены значения M±SD, значения ОП, значения p при сравнении уровня антител к гормонам

Рисунок 3.38 – Взаимодействие сывороточных антител класса G у пациенток с ПНБ с иммобилизованными на твердой фазе гормонами ХГЧ, ЛГ и ФСГ.

Между уровнями IgG-антител к ХГЧ и ЛГ, к ХГЧ и ФСГ в сыворотке крови у женщин с ПНБ наблюдалась сильная прямая корреляционная связь с коэффициентами корреляции, равными 0,894 и 0,847 (p<0,0001) (рисунок 3.39).



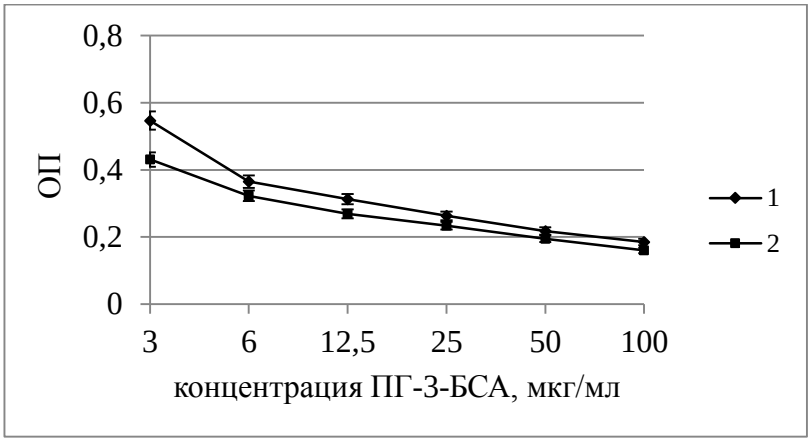
А – корреляционная связь между уровнями IgG-антител к ЛГ и ХГЧ; Б – к ФСГ и ХГЧ.Рисунок 3.39 – Корреляционная связь между уровнями IgG-антител к ХГЧ, ЛГ и ФСГ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ при определении методом ИФА.

Таким образом, сывороточные антитела у пациенток с ПНБ взаимодействовали не только с ХГЧ, но и с ЛГ и ФСГ, что позволяет предположить перекрестную реактивность данных антител с близкими по антигенной структуре гликопротеиновыми гормонами. Между уровнями IgG-антител к ХГЧ, ЛГ и ФСГ наблюдалась сильная прямая корреляционная связь.

3.3.2 Исследование специфичности антител к прогестерону и перекрестной реактивности с половыми стероидными гормонами

Специфичность взаимодействия сывороточных антител с ПГ исследовали в ИФА с помощью конкурентного ингибирования связывания антител с иммобилизованным на твердой фазе гормоном в присутствии избытка ПГ-3-БСА в реакционном буферном растворе. Для проведения конкурентного ингибирования реакции из сывороток крови пациенток с ПНБ, позитивных на аПГ, выделялась фракция иммуноглобулинов G с помощью хроматографии на магнитных частицах EcomagTM Protein A/G, как описано в параграфе 2.3.6. При добавлении в реакционный буферный раствор ПГ-3-БСА в концентрации 50 мкг/мл связывание IgG-антител с гормоном, иммобилизованным на твердой фазе, снижалось более чем в 2 раза (рисунок 3.40).

У пациенток с ПНБ сывороточные антитела класса М и G взаимодействовали не только с ПГ, но и с эстрадиолом (Э) и тестостероном (Т), иммобилизованными на полистирольной поверхности лунок микропланшетов в форме конъюгатов с БСА (Э-6-БСА и Т-3-БСА) как описано в параграфе 2.3.3 для ПГ-3-БСА. Медианные уровни антител при использовании в ИФА микропланшетов с иммобилизованными стероидными гормонами не различались ($p>0,05$) (таблица 3.29).



1 и 2 – фракции IgG-антител, выделенные из двух сывороток крови

Рисунок 3.40 – Конкурентное ингибирование связывания фракций IgG-антител, выделенных из двух сывороток крови женщин с ПНБ, с иммобилизованным конъюгатом ПГ-3-БСА в присутствии избытка антигена в реакционном буферном растворе.

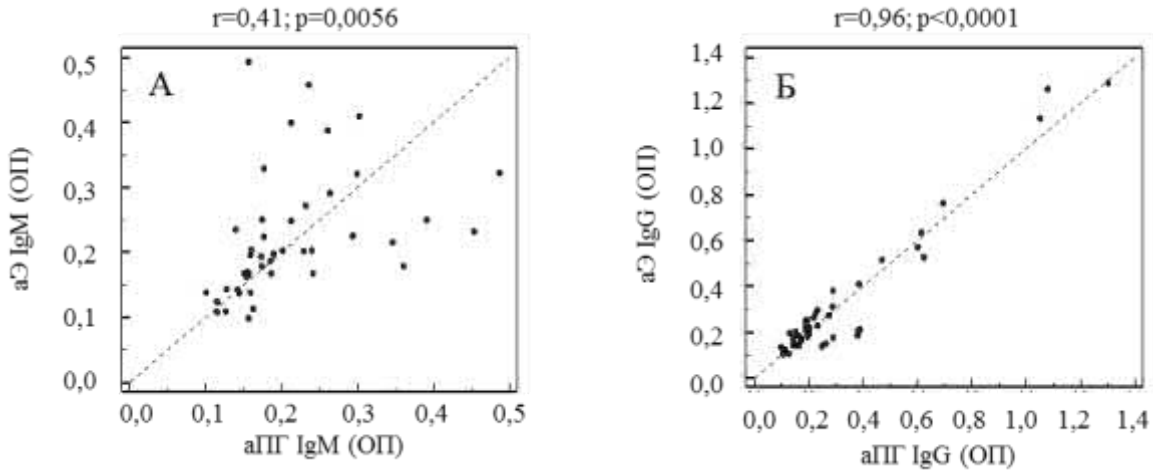
Таблица 3.29 – Взаимодействие сывороточных IgG-антител у пациенток с ПНБ с ПГ, эстрадиолом и тестостероном, иммобилизованными на твердой фазе.

Вид антител	Уровень антител*	p-значение**
IgM аПГ	0,177 [0,101-0,487]	–
IgG аПГ	0,205 [0,101-1,302]	–
IgM аЭ	0,197 [0,098-0,493]	0,5477
IgG аЭ	0,208 [0,101-1,287]	0,837
IgM аТ	0,185 [0,092-0,836]	0,4928
IgG аТ	0,286 [0,101-1,345]	0,214

Примечание. *– Me, минимальные и максимальные значения, ед. ОП;

** – значения p при сравнении с IgM или IgG аПГ

Частота выявления антител классов М и G к ПГ (15 (33,3%) и 18 (40%)), эстрадиолу (13 (28,9%) и 17 (37,8%)) и тестостерону (11 (24,4%) и 26 (57,8%)) значимо не различалась (p>0,05). Между уровнями антител класса М к ПГ и эстрадиолу или тестостерону наблюдалась прямая корреляционная взаимосвязь средней силы (r 0,41 и 0,47 при p<0,01), а класса G - сильная прямая корреляционная связь (r 0,96 и 0,94 при p<0,0001). На рисунке 3.41 представлена корреляционная связь между уровнями антител к ПГ и эстрадиолу.



А – корреляционная связь между уровнями IgM-антител к ПГ и Э;
Б – IgG-антител к ПГ и Э.

Рисунок 3.41 – Корреляционная связь между уровнями антител классов М и G к прогестерону и эстрадиолу у пациенток с ПНБ.

Перекрестную реактивность сывороточных антител со стероидными гормонами оценивали с помощью метода истощения сывороток, положительных на аПГ, путем инкубирования с иммобилизованными стероидными гормонами эстрадиолом и тестостероном. Сыворотки инкубировали в лунках с иммобилизованными на твердой фазе конъюгатами Э-6-БСА или Т-3-БСА в течение 1 часа при 20±2ºС. После этого связывание сывороточных IgG-антител с

иммобилизованным ПГ снижалось в 1,5-2 раза по сравнению с исходным уровнем, что подтверждало выраженную перекрестную реактивность аПГ с этими стероидными гормонами (рисунок 3.42).

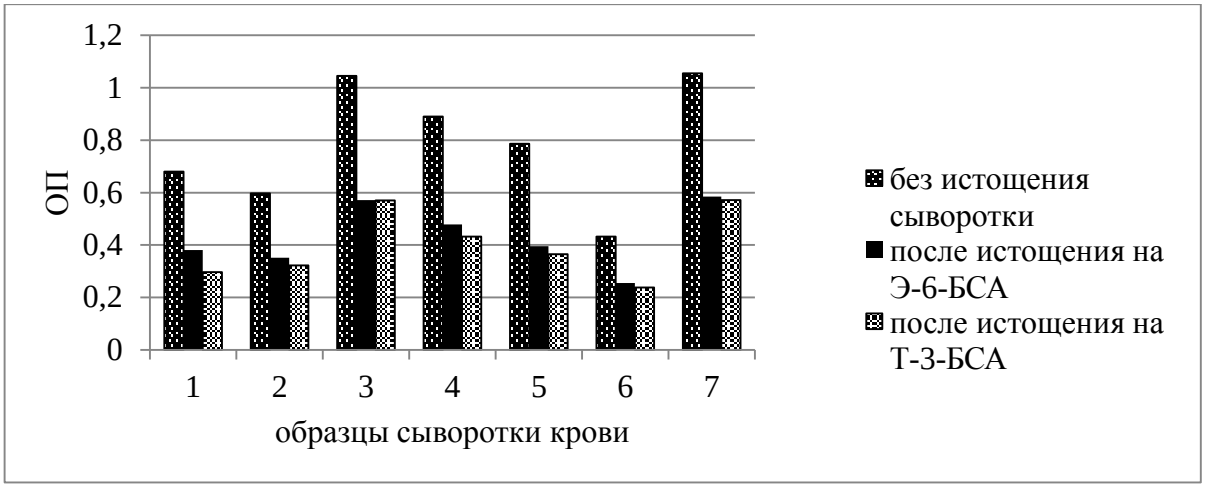


Рисунок 3.42 – Влияние на результаты определения уровня IgG-антител к ПГ истощения сыворотки крови путем инкубирования с иммобилизованными стероидными гормонами эстрадиолом и тестостероном.

Таким образом, специфичность взаимодействия антител с ПГ была подтверждена в ИФА методом конкурентного ингибирования связывания антител с иммобилизованным антигеном в присутствии избытка антигена в растворе. У пациенток с ПНБ сывороточные IgG-антитела взаимодействовали в ИФА не только с ПГ, но и с близкими по антигенному строению стероидными гормонами эстрадиолом и тестостероном, иммобилизованными на твердой фазе, при этом между уровнями антител к этим гормонам (IgG, IgM) наблюдалась прямая корреляционная связь сильная или средней силы. Возможная перекрестная реактивность аПГ с данными стероидными гормонами была подтверждена с помощью метода истощения сывороток.

3.4 Состояние системы комплемента у женщин с антителами к гормонам и антифосфолипидными антителами

Состояние системы комплемента у женщин с повышенной продукцией антител к гормонам и фосфолипидам оценивали по уровню циркулирующих иммунных комплексов, способных к связыванию с C1q (ЦИК-C1q) или связанных с C3d (ЦИК-C3d), компонентов комплемента C3 и C4, а также антител к компоненту комплемента C1q (анти-C1q антител) при определении с помощью ИФА.

Уровни циркулирующих иммунных комплексов, ЦИК-C1q и ЦИК-C3d, исследовали у 51 женщины с ПНБ, серопозитивных на антитела к ХГЧ, у 30 (58,8%) из них также отмечался повышенный уровень аПГ. Положительная реакция на ЦИК наблюдалась суммарно у 22 (43,1%) женщин: у 14 (27,5%) – на ЦИК-C1q (>5,0 мкг-экв/мл), у 11 (21,6%) – на ЦИК-C3d (>18 мкг-экв/мл), у 3 (5,9%) – на оба вида ЦИК. При этом медианный уровень ЦИК-C1q составлял 3,4 [1,5-27,5] мкг-экв/мл, ЦИК-C3d – 13,5 [8-33,0] мкг-экв/мл. Еще у 10 (19,6%) пациенток уровень ЦИК-C1q соответствовал «серой» зоне (от 3,2 мкг-экв/мл до 5,0 мкг-экв/мл), тогда как уровень ЦИК-C3d, соответствующий «серой» зоне (от 16 мкг-экв/мл до 18 мкг-экв/мл), наблюдался у 5 (9,8%) пациенток.

У женщин с повышенным уровнем ЦИК с высокой частотой выявлялись аХГЧ подклассов IgG1 и IgG2, соответственно, у 17 (77,3%) и 15 (68,2%), реже – IgG3 (у 4 (18,2%)) и IgG4 (у 7 (31,8%)) ($p<0,05$). Преобладали сочетания антител подклассов IgG1 и IgG2 или IgG1 и IgG4. IgG1- и IgG2-антитела имели высокие ИА (53,7±15,3% и 72,6±17,2%). При повышенном уровне ЦИК средний индекс авидности антител подкласса IgG1 был выше, чем при нормальном уровне ЦИК (43,5±12,7%; $p=0,0249$).

У женщин с повышенным уровнем ЦИК также с высокой частотой выявлялись антитела к ПГ подклассов IgG1 (у 13 (59,1%)) и IgG2 (у 11 (50%)), реже определялись аПГ подкласса IgG3 (у 3 (13,6%); $p=0,0047$; $p=0,0233$). При

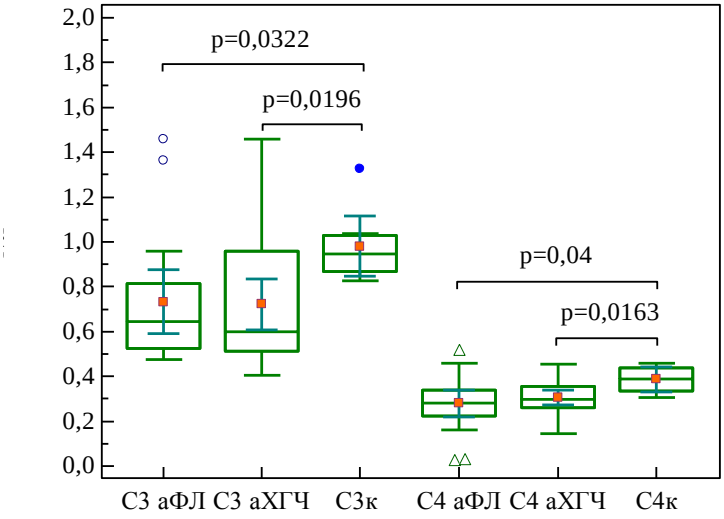
повышенном уровне ЦИК средний индекс авидности антител подкласса IgG1 (66±17,7%) был выше, чем при нормальном уровне ЦИК (54,2±18,4%; p=0,0382).

Таким образом, у женщин с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ и аПГ, часто наблюдался повышенный уровень ЦИК, что могло способствовать активации системы комплемента по классическому пути. При этом у женщин с повышенным уровнем ЦИК преобладали антитела к ХГЧ и ПГ функционально активного подкласса IgG1 с высоким индексом авидности.

Состояние системы комплемента также оценивалось по уровню компонентов комплемента С3 и С4 у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ (n=72) или аФЛ (n=45), и у здоровых женщин (n=38). При этом среди аФЛ преобладали антитела к КЛ у 27 (60%) женщин (IgM у 19 (42,2%); IgG у 16 (35,6%)), к ФС у 27 (60%) женщин (IgM у 18 (40%); IgG у 14 (31,1%)), к β2-ГП-I у 34 (75,6%) женщин (IgM у 23 (51,1%); IgG у 19 (42,2%)). Реже в сыворотке крови содержались антитела (IgM, IgG) к Ан А5 (в 8 (17,8%) случаях) и ПТ (в 5 (11,1%) случаях). Среди женщин с аХГЧ у 66 (91,7%) женщин были найдены антитела класса G, у 12 (16,7%) женщин – класса М.

У 84 (68,3%) пациенток уровень компонента комплемента С3 был ниже нормы (0,76-1,81 г/л), в том числе у 33 (73,3%) пациенток с аФЛ и у 51 (65,4%) пациентки с аХГЧ (рисунок 3.43). При этом средние уровни С3 у пациенток с аФЛ (0,732±0,287 г/л) и аХГЧ (0,722±0,281 г/л) не различались (p=0,9079), но были значимо ниже, чем в контрольной группе (0,980±0,161 г/л) (p<0,05).

У женщин, позитивных на аФЛ и аХГЧ, также отмечалась тенденция к снижению уровня С4. Понижение уровня компонента комплемента С4 ниже нормы (0,15-0,57 г/л) наблюдалось только у 10 (8,1%) пациенток, а именно у 6 (13,3%) с аФЛ и у 4 (5,1%) с аХГЧ. Средние уровни С4 у пациенток с аФЛ (0,279±0,124 г/л) и аХГЧ (0,307±0,076 г/л) не различались (p=0,3827), однако при этом были значимо ниже, чем у здоровых женщин (0,387±0,059 г/л) (p=0,04; p=0,0163).



Представлены значения M, 95% CI, 25-ый и 75-ый процентили, значения p при сравнении исследуемых групп с контрольной.

Рисунок 3.43 – Уровень компонентов комплемента С3 и С4 в сыворотке крови у женщин с ПНБ, позитивных на аФЛ и аХГЧ, и здоровых женщин.

Таким образом, у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ и аФЛ, часто наблюдалась гипокомплементемия, проявляющаяся снижением уровня компонентов комплемента С3 С4, что могло свидетельствовать об активации системы комплемента по классическому пути у данных пациенток.

Эти же сыворотки крови пациенток с ПНБ, позитивных на аФЛ и аХГЧ, и здоровых женщин исследовали на наличие анти-С1q антител. Повышенные уровни анти-С1q антител класса G (>10 Ед/мл) наблюдались у 22 (18,8%) пациенток с ПНБ, а именно у 20% женщин с аФЛ и у 18,1% с аХГЧ (таблица 3.30). Обращает на себя внимание, что анти-С1q антитела выявлялись у пациенток с аФЛ и аХГЧ как класса G, так и класса M, и обнаруживались у женщин с антителами к Ан А5 (у 4 из 8). У пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ и аФЛ, анти-С1q антитела были найдены чаще, чем у здоровых женщин (у 1 (2,6%); $p<0,05$), при этом риск образования анти-С1q аутоантител при наличии аФЛ был выше в 9,3 раза, а при наличии аХГЧ – в 8,2 раза выше, чем у здоровых женщин.

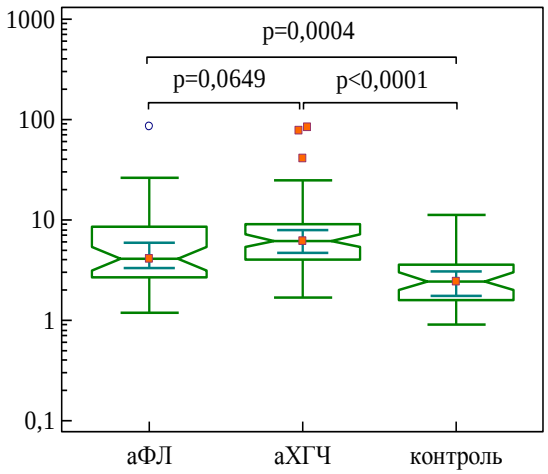
Таблица 3.30 – Распространенность анти-C1q антител класса G в сыворотке крови у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аФЛ или аХГЧ, и у здоровых женщин при определении с помощью ИФА.

Частота выявления, абс.число (%)			p-значение	OR, 95% CI	p-значение
Пациентки с аФЛ, n=45	Пациентки с аХГЧ, n=72	Здоровые женщины, n=38			
9 (20)	13 (18,1)	1 (2,6)	0,0367*	9,3 [1,11-76,78]*	0,0394*
			0,0437**	8,2 [1,02-64,94]**	0,0475**

Примечание. *, ** – значения p, OR при сравнении пациенток, серопозитивных на аФЛ или аХГЧ, и здоровых женщин

На рисунке 3.44 приведены уровни анти-C1q антител у пациенток с ПНБ и у здоровых женщин. Медианные уровни анти-C1q антител в группах женщин с аФЛ и аХГЧ были значимо выше, чем в контрольной группе ($p<0,001$). Уровни анти-C1q антител у пациенток, позитивных на аХГЧ или аФЛ, существенно не различались ($p=0,0649$). Между уровнями анти-C1q антител, аФЛ и аХГЧ корреляционной связи не наблюдалось.

Таким образом, у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аФЛ или аХГЧ, часто наблюдалось повышение уровня анти-C1q антител, при этом частота выявления и средний уровень анти-C1q антител были выше, чем у здоровых женщин. При повышенном уровне аФЛ или аХГЧ наблюдался высокий риск образования анти-C1q аутоантител.



Представлены Me, 95% CI, 25-ый и 75-ый процентили,
минимальные и максимальные значения,
значения p при сравнении исследуемых групп с контрольной.

Рисунок 3.44 – Уровни анти-C1q антител класса G в сыворотке крови у пациенток с ПНБ, позитивных на аФЛ или аХГЧ, и у здоровых женщин.

3.5 Особенности иммунного статуса у женщин с привычным невынашиванием беременности, серопозитивных на антитела к хорионическому гонадотропину человека

У 62 женщин с ПНБ в середине менструального цикла проводилось исследование иммунного статуса, включающее анализ субпопуляционного состава лимфоцитов и определение содержания общих иммуноглобулинов в периферической крови. На момент обследования у пациенток исключались наличие инфекционных заболеваний и прием лекарственных препаратов. По уровню антител к ХГЧ женщины с ПНБ были разделены на две подгруппы: подгруппа I включала 30 пациенток, серопозитивных на аХГЧ класса M и/или G, подгруппа II включала 32 пациентки, серонегативные на аХГЧ. В подгруппе I средние уровни аХГЧ (IgM, IgG) составляли 33,5±18,2 Ед/мл и 41,7±27,7 Ед/мл и

были значимо выше, чем в подгруппе II, соответственно, 11,2±5,6 Ед/мл и 13,7±4,3 Ед/мл (p<0,0001).

Абсолютное и относительное содержание клеток с фенотипом CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD56+ и соотношение CD3+CD4+/CD3+CD8+ у пациенток двух подгрупп значимо не различалось, средние показатели соответствовали нормальным за исключением показателя относительного содержания клеток CD56+ в подгруппе II, который составлял 18,1±3,9% и превышал нормальный диапазон (таблица 3.31). При этом часто отмечалось повышенное относительное содержание клеток CD56+ как в подгруппе I (у 9 (30%)), так и в подгруппе II (у 14 (43,8%)) (p=0,3893).

Обращают на себя внимание результаты определения фенотипической характеристики В-лимфоцитов. Среднее абсолютное и относительное содержание клеток CD19+ в периферической крови у женщин обеих подгрупп соответствовало нормальному диапазону, однако данные показатели клеток CD19+ у пациенток, серопозитивных на аХГЧ, были значимо выше, чем у пациенток, серонегативных на аХГЧ (p=0,0005). Среднее относительное содержание клеток CD19+CD5+ в подгруппе I было выше референсного диапазона. Кроме того, среднее абсолютное и относительное содержание клеток CD19+CD5+ в подгруппе I было значимо выше, чем в подгруппе II. При этом повышенные значения данных показателей выявлялись значимо чаще у серопозитивных женщин (у 20 (66,7%)), чем у серонегативных (у 4 (12,5%)) (p<0,0001). Вероятность повышения относительного содержания CD19+CD5+ у серопозитивных пациенток была в 14 раз выше, чем у серонегативных (OR 14 [3,84-51,05]; p=0,0001).

Исследование гуморального звена иммунитета показало, что среднее содержание общих иммуноглобулинов классов G и A в сыворотке крови у женщин в подгруппе I было значимо выше, чем в подгруппе II (p<0,0001) (таблица 3.32). Повышенное содержание общего IgA обнаруживалось в подгруппе I у 4 (13,3%) пациенток, а общего IgG – у 13 (43,3%) пациенток, и не наблюдалось в подгруппе II (p=0,1063; p=0,0001).

Таблица 3.31 – Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациенток с аХГЧ вне беременности (M±SD).

Кластер дифференцировки (CD)	Единицы измерения	Содержание лимфоцитов*		p-значение **	Референсный интервал
		Подгруппа I, n=30	Подгруппа II, n=32		
Общее содержание лимфоцитов	%	33,5±1,3	33,2±0,9	0,292	18-42
	$x10^9$ кл/л	2,05±0,05	2,02±0,07	0,0583	1-4
CD3+	%	71,6±4,7	72,3±5,0	0,5728	56-75
	$x10^9$ кл/л	1,49±0,09	1,46±0,06	0,1256	0,56-3
CD3+CD4+	%	43,8±5,5	45,5±5,9	0,5835	34-48
	$x10^9$ кл/л	0,91±0,08	0,92±0,03	0,5120	0,34-1,92
CD3+CD8+	%	27,4±6,3	28,1±5,5	0,6423	19-30
	$x10^9$ кл/л	0,56±0,01	0,55±0,07	0,6259	0,19-1,2
CD3+CD4+/ CD3+CD8+		1,6±0,5	1,6±0,7	1,0	1,5-2,6
CD56+	%	17,1±4,4	18,1±3,9	0,3467	8-18
	$x10^9$ кл/л	0,35±0,09	0,36±0,04	0,5698	0,08-0,72
CD3-CD16+CD56+	%	11,2±3,4	12,3±3,4	0,2079	8-19
	$x10^9$ кл/л	0,23±0,08	0,24±0,04	0,5321	0,08-0,76
CD3+CD16+CD56+	%	4,9±4,0	5,8±3,7	0,3611	0-10
	$x10^9$ кл/л	0,10±0,09	0,12±0,01	0,2163	0-0,4
CD19+CD5+	%	3,1±1,4	1,5±0,6	<0,0001	0-2
	$x10^9$ кл/л	0,06±0,01	0,04±0,01	<0,001	0-0,08
CD 19+	%	11,8±2,5	10,4±2,6	0,0349	5-16
	$x10^9$ кл/л	0,25±0,03	0,21±0,04	0,0001	0,05-0,64

Примечание. * – относительное и абсолютное содержание лимфоцитов;

** – значение p при сравнении подгрупп I и II.

Вероятность повышения содержания общего IgG у пациенток, серопозитивных на аХГЧ, была в 50 раз выше, чем у серонегативных пациенток

(OR 50,1 [2,8-894,98]; p=0,0078). Уровни IgG аХГЧ и общего IgG не коррелировали между собой (r=0,183; p=0,2089).

Таблица 3.32 – Содержание общих иммуноглобулинов в сыворотке крови у женщин с ПНБ в зависимости от уровня антител к ХГЧ (M±SD).

Класс иммуно-глобулинов	Содержание иммуноглобулинов, г/л		p-значение*	Нормальный диапазон, г/л
	Подгруппа I, n=30	Подгруппа II, n=32		
IgA	2,4±0,7	1,6±0,6	<0,0001	0,7-3
IgG	15,7±2,7	12,5±2,4	<0,0001	8-16
IgM	2,5±0,8	1,5±0,3	<0,0001	0,5-2

Примечание. * – значения p при сравнении подгрупп I и II

Среднее содержание общего IgM в сыворотке крови у пациенток в подгруппе I было выше нормального диапазона и значимо превышало аналогичный показатель в подгруппе II (p<0,0001). Повышенное содержание общего IgM наблюдалось в подгруппе I значимо чаще (у 18 (60%) пациенток), чем в подгруппе II (у 2 (6,3%) пациенток) (p<0,0001). У пациенток, серопозитивных на аХГЧ, вероятность повышения содержания общего IgM была в 23 раза выше, чем у серонегативных пациенток (OR 22,5 [4,51-112,22]; p=0,0001). Между уровнями IgM аХГЧ и общего IgM наблюдалась сильная прямая корреляционная связь (r=0,7306; 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

серонегатиных пациенток, повышенным показателем относительного содержания клеток кластера CD19+CD5+, превышающим референсный диапазон, повышением уровней общих сывороточных IgM и IgG.

3.6 Взаимосвязь антител к гормонам с акушерской и гинекологической патологией у женщин с привычным невынашиванием беременности

В немногочисленных исследованиях антитела к ХГЧ рассматриваются как возможная причина невынашивания беременности, бесплодия и неудач в циклах ЭКО. Тогда как гиперчувствительность к ПГ, выявляемая с помощью кожного теста с гормональным препаратом, ассоциируется с предменструальным синдромом, ПНБ и неудачами в программах ЭКО. Однако эти исследования ограничиваются описанием отдельных случаев или исследованиями случай-контроль с малыми по численности группами, не проведены проспективные исследования, необходимые для определения клинического значения данных антител.

Для выявления ассоциации аХГЧ с акушерской и гинекологической патологией у женщин и возможных факторов риска, предрасполагающих к образованию антител к ХГЧ, проводился ретроспективный анализ клинико-анамнестических данных пациенток, серопозитивных на аХГЧ. Кроме того, оценивалось значение аХГЧ как возможного фактора риска развития осложнений и неблагоприятного исхода беременности. Совместно с Кирющенковым П.А. выполнялось проспективное когортное исследование, включающее динамическое наблюдение за течением беременности у женщин с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, оценивалась динамика изменения уровня аХГЧ во время беременности и особенности течения и исхода беременности.

3.6.1 Особенности клинико-анамнестических данных, течения и исхода беременности у женщин с антителами к хорионическому гонадотропину человека и их прогностическое значение

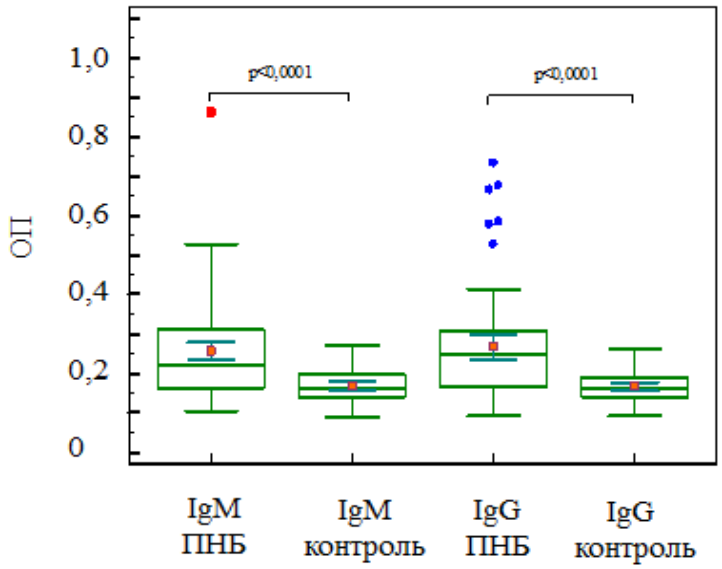
Нами проводился анализ клинико-анамнестических данных у 105 женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к ХГЧ классов М и/или G. Средний уровень IgM соответствовал 0,448±0,130 ед. ОП, IgG – 0,458±0,151 ед. ОП. Средний возраст женщин составлял 31,1±5,4 лет. У большинства женщин потери беременности наблюдались в I триместре (у 90 (85,7%)) на сроке 7,4±2,3 недель гестации, реже отмечались потери плода во II триместре (у 31 (29,5%) и преждевременные роды (у 8 (7,6%)) ($p<0,0001$). Часто невынашиванию предшествовали медицинские аборты (у 18 (17,1%)) или своевременные роды (у 20 (19,1%)). В анамнезе у 5 (4,8%) женщин отмечались случаи внутриутробной гибели плода.

В структуре гинекологической заболеваемости преобладали воспалительные заболевания органов малого таза, такие как хронический сальпингоофорит, эндометрит и цервицит (у 40 (38,1%) женщин), реже отмечались генитальный герпес (у 11 (10,5%)), наружный генитальный эндометриоз (у 11 (10,5%)), кисты яичников (у 11 (10,5%)), синдром поликистозных яичников (у 6 (5,7%)). Часто у женщин вне беременности диагностировалась недостаточность лютеиновой фазы (НЛФ) (у 27 (25,7%)). Значительная часть женщин ранее применяли гормональные контрацептивы (36 (34,3%)), в том числе 26 (24,8%) женщин – более 1 года.

Из соматических заболеваний наиболее часто наблюдались хронический тонзиллит (у 15 (14,3%)), хронические воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта (у 15 (14,3%)) и мочевыделительной системы (у 14 (13,3%)). Обращает на себя внимание, что значительная часть женщин страдали аллергическими заболеваниями (27 (25,7%)). У двух женщин был диагностирован аутоиммунный тиреоидит, у одной - болезнь Грейвса, у трех – АФС.

Таким образом, у женщин с ПНБ, позитивных на антитела к ХГЧ, отмечалось преобладание ранних самопроизвольных потерь беременности, реже наблюдались потери плода во II триместре беременности и преждевременные роды. Женщины часто страдали воспалительными заболеваниями органов малого таза, хроническими вирусными инфекциями, хроническим тонзиллитом, имели отягощенный аллергологический анамнез. В ряде случаев отмечалось сочетание наличия антител к ХГЧ с другой аутоиммунной патологией (АФС, АИТ и болезнью Грейвса). Обращает на себя внимание высокая частота применения женщинами гормональных контрацептивов.

Во время беременности у пациенток с ПНБ в анамнезе наблюдалась повышенная продукция антител к ХГЧ, как класса М, так и класса G. Средние уровни аХГЧ в I триместре беременности у пациенток с ПНБ значимо превышали средние уровни аХГЧ у здоровых женщин с физиологическим течением беременности (p<0,0001) (рисунок 3.45).

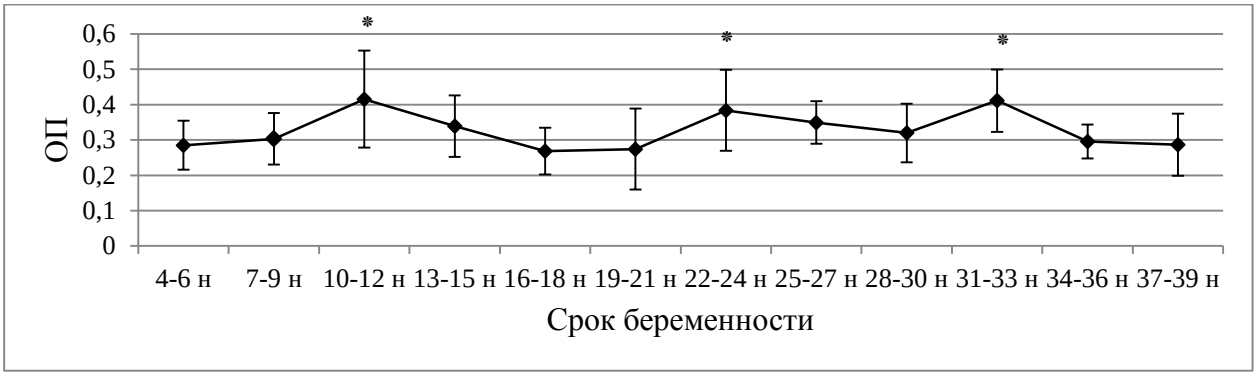


Представлены M, 95% CI, 25-ый и 75-ый процентили, минимальные и максимальные значения, значения p при сравнении двух групп

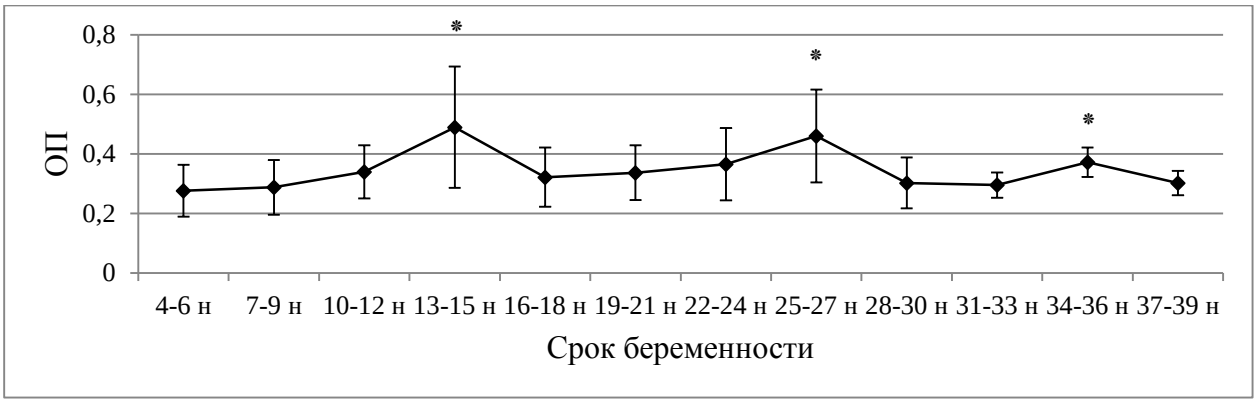
Рисунок 3.45 – Уровень антител к ХГЧ в I триместре беременности у пациенток с ПНБ и здоровых женщин с физиологическим течением беременности.

В течение беременности у пациенток с ПНБ уровень аХГЧ изменялся волнообразно в соответствии с колебаниями уровня самого гормона (рисунок 3.46). На 7-10 неделях гестации уровень IgM повышался в 1,5 раза и достигал максимума в 10-12 недель (p=0,0335). В период с 22 по 24 неделю уровень IgM был в 1,4 раза выше, чем в 16-18 недель (p=0,0122) и в начале беременности (p=0,0304).

А



Б



А – изменение уровня IgM аХГЧ; Б – изменение уровня IgG аХГЧ.
Представлены M±m. *– значимые различия при сравнении
с уровнем в 4-6 недель гестации.

Рисунок 3.46 – Динамика изменения уровня антител к ХГЧ класса М и G в течение беременности у женщин с ПНБ (n=10).

После незначительного снижения в 25-30 недель гестации уровень IgM снова повышался к 31-33 неделе в 1,3 раза (p=0,0286). Таким образом, повышения уровня IgM аХГЧ наблюдались в периоды с 7 по 12 неделю, с 22 по 24 неделю и с 31 по 33 неделю гестации.

Уровень аХГЧ класса G повышался в 1,7 раза с 10 по 12 неделю гестации и достигал максимальных значений в 13-15 недель (p=0,0105). На 24-26 неделях гестации уровень IgG был значимо выше, чем в начале беременности (p= 0,0042). После 30-ой недели уровень IgG вновь повышался к 33-35 неделям в 1,3 раза (p=0,0017). Таким образом, значимое повышение уровня IgG аХГЧ отмечалось в периоды с 10 по 15 неделю, с 24 по 26 неделю и с 33 по 35 неделю гестации. Динамика изменения уровня IgG аХГЧ во время беременности была сходной с таковой IgM, но отличалась запаздыванием на 2-3 недели.

У 33 пациенток, позитивных на аХГЧ, дважды в течение беременности определяли уровень самого гормона в сыворотке крови: на сроке его максимального подъема в 8-9 недель и в 22-24 недели, когда уровень антител к ХГЧ также значимо повышался. Средние уровни ХГЧ составляли в сроке 8-9 недель 81025±8137 мЕд/мл, в сроке 22-24 недели 22714±3862 мЕд/мл и соответствовали нормальному диапазону концентрации гормона в указанные сроки, соответственно, 20000-100000 мЕд/мл и 10000-35000 мЕд/мл.

Таким образом, у пациенток с ПНБ в анамнезе во время беременности наблюдалась повышенная продукция антител к ХГЧ, их средние уровни в I триместре были значимо выше, чем у здоровых беременных женщин. Уровень антител к ХГЧ во время беременности изменялся волнообразно в соответствии с колебаниями уровня самого гормона. Повышения уровня IgM аХГЧ наблюдались в периоды с 7 по 12 неделю, с 22 по 24 неделю и с 31 по 33 неделю гестации. Уровень IgG аХГЧ изменялся аналогично IgM, но с запаздыванием на 2-3 недели. У пациенток, серопозитивных на аХГЧ, концентрация самого гормона в сыворотке крови во время беременности оставалась в пределах нормального диапазона.

Для выявления особенностей течения и исходов беременности у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, проводилось проспективное исследование. При этом женщины были стратифицированы по уровню аХГЧ на две подгруппы: подгруппа I состояла из 56 женщин с высоким уровнем аХГЧ класса M (n=36) и/или G (n=38), превышающим средний уровень аХГЧ у здоровых женщин более чем в 2 раза (выше 30 Ед/мл); подгруппа II – из 32 женщин с низким уровнем аХГЧ, соответсвующим нормальному диапазону или превышающим средний уровень аХГЧ у здоровых женщин не более чем в 2 раза (до 30 Ед/мл). В I триместре средний уровень IgM аХГЧ в подгруппе I составлял 0,314±0,137 ед. ОП и был значимо выше среднего уровня IgM в подгруппе II 0,183±0,055 ед. ОП ($p<0,0001$). Средний уровень IgG в подгруппе I был 0,336±0,148 ед. ОП и значимо превышал средний уровень IgG в подгруппе II 0,183±0,052 ед. ОП ($p<0,0001$).

У восемнадцати женщин с ПНБ и аХГЧ проводилась предгестационная подготовка, которая предусматривала коррекцию НЛФ, курсы системной энзимотерапии и метаболической терапии, противотромботическую терапию, включающую гепарин и антиагреганты, глюкокортикоидную терапию, начиная со II фазы фертильного цикла, с индивидуальным подбором дозы препаратов с учетом уровня аХГЧ, отягощенности анамнеза и индивидуальной переносимости. Суточные дозы глюкокортикоидов в пересчете на преднизолон составляли от 2,5 до 20 мг.

Во время беременности у женщин с высоким уровнем аХГЧ часто наблюдались осложнения, такие как угроза прерывания беременности, плацентарная недостаточность и угрожающие преждевременные роды (таблица 3.33). При этом в подгруппе I диагностировали угрожающий выкидыш в I триместре (у 53,6%), а в дальнейшем плацентарную недостаточность (у 57,1%) чаще, чем в подгруппе II (соответственно, у 25% и 28,1%; $p<0,05$). У женщин с высоким уровнем аХГЧ отмечался повышенный риск развития осложнений беременности, так риск угрожающего выкидыша в I триместре был в 3,5 раза выше, плацентарной недостаточности – в 2,9 раза выше, хронического синдрома

диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) – в 3,0 раза выше, чем у женщин с низким уровнем аХГЧ (p<0,05).

При анализе показателей системы гемостаза было установлено, что у 48 (54,5%) пациенток во время беременности, начиная с ранних сроков (3-8 недель), развивалась хроническая форма ДВС-синдрома, при этом у пациенток с высоким уровнем аХГЧ это осложнение развиалось чаще (у 64,3%), чем у пациенток с низким уровнем аХГЧ (у 37,1%; p=0,023). Во время беременности частота выявления ДВС-синдрома была значимо выше, чем вне беременности (у 8 (9,1%); p<0,0001).

Таблица 3.33 – Частота осложнений беременности у женщин с ПНБ в зависимости от уровня аХГЧ.

Осложнение беременности	Частота осложнения, абс. число (%)		p*	OR, 95% CI	p
	Подгруппа I, n=56	Подгруппа II, n=32			
Угроза прерывания в I триместре	30 (53,6)	8 (25)	0,0172	3,5 [1,33-9,01]	0,0110
Угроза прерывания во II триместре	23 (41,1)	7 (21,9)	0,111	2,5 [0,92-6,72]	0,0718
Плацентарная недостаточность	32 (57,1)	9 (28,1)	0,0163	2,9 [1,17-7,33]	0,0213
Угрожающие преждевременные роды	11 (19,6)	4(12,5)	0,577	1,7 [0,49-5,9]	0,395
Хронический ДВС-синдром	36 (64,3)	12 (37,5)	0,0274	3,0 [1,22-7,38]	0,0168

Примечание. *– значения p при сравнении подгруппы I и подгруппы II

У пациенток подгруппы I уже в I триместре выявлялись нарушения как плазменного (у 46,5%), так и тромбоцитарного звена (у 25%) гемостаза, сочетанная активация гемостаза отмечалась у 17,9% пациенток (таблица 3.34). У женщин в подгруппе I гиперкоагуляция наблюдалась чаще (у 46,5%), чем в подгруппе II (у 21,8%; p=0,0381), а также чаще, чем гиперфункция тромбоцитов (у 25%; p=0,0295). У пациенток подгруппы II параметры гемостаза чаще соответствовали норме (у 62,5%), чем в подгруппе I (у 35,7%; p=0,0274). У 17,9% пациенток подгруппы I гиперкоагуляция и гиперфункция тромбоцитов сочетались с активацией внутрисосудистого свертывания крови, а именно с положительной (у 4) или слабоположительной (у 6) пробой на растворимые комплексы мономеров фибрина (РКМФ). Пациенткам с высоким уровнем аХГЧ и нарушениями гемостаза уже в I триместре назначалась противотромботическая терапия с дифференцированным подбором препаратов.

Таблица 3.34 – Состояние системы гемостаза в I триместре беременности у женщин с ПНБ в зависимости от уровня аХГЧ.

Особенности гемостаза	Частота выявления, абс. число (%)		p-значение
	Подгруппа I, n=56	Подгруппа II, n=32	
Гиперфункция тромбоцитов (АДФ 10^{-3} М)	4 (7,1)	3 (9,4)	0,9793
Гиперкоагуляция (ИТП >12 у.е.)	16 (28,6)	2 (6,3)	0,0265
Гиперкоагуляция+гиперфункция тромбоцитов+ РКМФ	10 (17,9)	5 (15,6)	0,9851
Изокоагуляция + РКМФ	6 (10,7)	2 (6,3)	0,7727

Примечание. *- значения p при сравнении подгруппы I и подгруппы II

С учетом изложенных выше особенностей течения беременности женщины с ПНБ, серопозитивные на аХГЧ, во время беременности получали по показаниям спазмолитическую терапию, гормональные препараты гестагенного ряда (дюфастон, утрожестан), курсы метаболической и системной энзимотерапии в сроки, соответствующие подъемам уровня аХГЧ; препараты глюкокортикоидов (метипред, преднизолон) с увеличением дозы при повышении уровня аХГЧ; препараты иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения; противотромботическую терапию, включающую антиагреганты (курантил, аспирин, реополиглюкин) и антикоагулянты (нефракционированный гепарин, низкомолекулярный гепарин (фраксипарин)); гемостатическую терапию (аскорутин, дицинон, викасол, трансамин), противоанемическую терапию. В сроках 21-25 н и 30-33 н проводилась профилактика плацентарной недостаточности (эссенциале, троксевазин, актовегин).

Ранняя диагностика на этапе планирования беременности, предгестационная подготовка и комплексная терапия во время беременности у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, способствовали рождению жизнеспособного потомства в 94,3% случаев. Своевременные роды наблюдались у 83% женщин, значительно реже отмечались преждевременные роды (у 11,4%) и неблагоприятные исходы, такие как неразвивающаяся беременность (у 4,5%) и антенатальная гибель плода (у 1,1%) (таблица 3.35). Благодаря своевременно проведенным лечебно-профилактическим мероприятиям, частота неблагоприятных исходов в обеих подгруппах не различалась.

Таким образом, как показало проспективное исследование у пациенток с ПНБ при высоком уровне аХГЧ течение беременности часто осложняется угрожающим выкидышем в I триместре, плацентарной недостаточностью и ранним развитием хронического ДВС-синдрома, при этом риск данных осложнений беременности выше, соответственно, в 3,5, 2,9 и 3 раза, чем у женщин с низким уровнем аХГЧ. У пациенток с высоким уровнем аХГЧ уже в I триместре выявляются нарушения как плазменного, так и тромбоцитарного звена гемостаза, гиперкоагуляция наблюдается значимо чаще, чем у пациенток с низким

уровнем аХГЧ. Ранняя диагностика, проведение предгестационной подготовки, комплексной терапии во время беременности и профилактики плацентарной недостаточности способствуют достижению высокой частоты рождения жизнеспособного потомства у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ.

Таблица 3.35 – Исход беременности у пациенток с ПНБ в зависимости от уровня антител к ХГЧ.

Исход беременности	Частота наблюдения, абс. число (%)		p-значение
	Подгруппа I, n=56	Подгруппа II, n=32	
Неразвивающаяся беременность	3 (5,4)	1 (3,1)	<0,0001*,**
Антенатальная гибель плода	1 (1,9)	0 (0)	<0,0001*,**
Преждевременные роды	7 (12,5)	3 (9,4)	<0,0001*,**
Своевременные роды	45 (80,4)	28 (87,5)	–

Примечание. *,** – значения p при сравнении с частотой своевременных родов в подгруппе I и в подгруппе II

3.6.2 Ассоциация антител к прогестерону с гинекологическими и экстрагенитальными заболеваниями, осложнениями и исходами беременности

Совместно с Гладковой К.А. проводилось проспективное когортное исследование, которое включало клинико-лабораторное обследование женщин с

ПНБ (n=89) до беременности, подготовку к беременности и динамическое наблюдение в течение беременности до родоразрешения. Для выявления ассоциации аПГ с акушерской и гинекологической патологией и возможных факторов риска образования антител к ПГ проводили ретроспективный анализ клинико-анамнестических данных пациенток, серопозитивных на аПГ. Кроме того, в проспективном исследовании оценивали предиктивное значение аПГ для развития осложнений и неблагоприятного исхода беременности. Пациентки с ПНБ по уровню антител к ПГ были разделены на две подгруппы: подгруппа I состояла из 52 женщин с высоким уровнем антител к ПГ класса M (n=27) и/или G (n=28), превышающим средний уровень аПГ у здоровых женщин более чем в 2 раза (более 30 Ед/мл); подгруппа II – из 37 женщин с низким уровнем аПГ, соответсвующим нормальному диапазону или превышающим средний уровень аПГ здоровых женщин менее, чем в 2 раза (до 30 Ед/мл).

Проведен анализ клинико-анамнестических данных у пациенток с высоким уровнем аПГ. Средний возраст пациенток составлял 31,1±4,3 лет. При анализе соматической заболеваемости у 9 (17,3%) пациенток были выявлены сердечно-сосудистые заболевания, включающие нейроциркуляторную дистонию (у 4), пролапс митрального клапана (у 1), варикозное расширение вен нижних конечностей (у 3), тромбоз глубоких вен голени в анамнезе (у 1). У женщин наблюдалась высокая частота перенесенных инфекционных заболеваний (ОРВИ, гриппа), часто отмечались ангины (у 19 (36,5%)), хронический тонзиллит (у 6 (11,5%)) и пневмония (у 9 (17,3%)). Часто наблюдалось носительство возбудителей вирусных инфекций, а именно ВПГ и ЦМВ, и токсоплазмоза, соответственно, у 35 (67,3%), 48 (92,3%) и 7 (13,5%) пациенток.

У женщин отмечалась высокая частота эндокринной патологии (у 29 (55,7%)) в анамнезе: гиперандрогения была диагностирована у 19 (36,5%), аутоиммунный тиреоидит – у 9 (17,3%), гиперпролактинемия – у 1 (1,9%). Обращала на себя внимание высокая частота аутоиммунных заболеваний (у 11 (21,2%)), включающих АИТ (у 9 (17,3%)) и АФС (у 2 (3,8%)).

В структуре гинекологической заболеваемости у женщин преобладали воспалительные заболевания органов малого таза, такие как хронический сальпингоофорит (у 27 (52%)), эндометрит (у 20 (38,5%)) и кольпит (у 18 (34,6)), реже отмечались эндометриоз (у 5 (9,6%)) и СПКЯ (у 2 (3,8%)). У женщин с аПГ в анамнезе преобладали самопроизвольные выкидыши (у 31 (59,6%)) и неразвивающиеся беременности (у 36 (69,2%)) в сроке от 5 до 8 недель гестации, часто наблюдались преждевременные роды (в 6 (37,5%) случаях). У 8 (15,4%) женщин были случаи анэмбрионии. Часто наблюдалась внутриутробная гибель плода (у 13 (25%) женщин). Кроме того, в анамнезе у женщин отмечалась высокая частота искусственного прерывания беременности (у 21 (40,4%) женщины), в том числе первой беременности (у 14 (26,9%)). Важно подчеркнуть, что большинство пациенток (40 (76,9%)) в прошлом получали препараты прогестеронового ряда, утрожестан или дюфастон.

Таким образом, у женщин с ПНБ, серопозитивных на аПГ, наблюдалась высокая частота перенесенных инфекционных заболеваний, носительства возбудителей вирусных инфекций, воспалительных заболеваний женских половых органов и аутоиммунных заболеваний. У пациенток отмечалась высокая частота самопроизвольных репродуктивных потерь в I триместре беременности, преждевременных родов и искусственного прерывания беременности в анамнезе, а также частое применение препаратов прогестеронового ряда.

Оценивали возможное влияние аПГ на уровень гормонов в периферической крови путем анализа результатов исследования гормонов у женщин, включающего определение уровня ЛГ, ФСГ, ТТГ, Т3, Т4, эстрадиола, пролактина, тестостерона и кортизола в I фазу менструального цикла и уровня ПГ во II фазу.

Содержание данных гормонов в крови у обследованных пациенток в I фазе цикла соответствовало диапазону нормальных концентраций у здоровых женщин. Уровни эстрадиола в I фазе цикла и ПГ во II фазе у женщин в обеих подгруппах соответствовали нормальным показателям, однако средний уровень эстрадиола в подгруппе I был ниже, чем в подгруппе II ($p<0,0001$) (таблица 3.36).

Таблица 3.36 – Содержание в крови эстрадиола в I фазе и прогестерона во II фазе менструального цикла у женщин с ПНБ с разным уровнем антител к ПГ (M±SD).

Показатель, единицы измерения	Содержание гормонов		Референсные значения,	p-значение*
	Подгруппа I, n=52	Подгруппа II, n=37		
Эстрадиол, пмоль/л	238,87±7,6	269,6±6,4	150-450	<0,0001
Прогестерон, нмоль/л	47,67±1,2	47,05±2,4	9-83	0,1122

Примечание. * – значения p при сравнении подгруппы I и подгруппы II

Анализ менструальной функции женщин показал, что у большинства пациенток (у 84 (94,4%)) установился регулярный менструальный цикл. Умеренные менструальные выделения отмечались, соответственно, у 40 (76,9%) женщин в подгруппе I и у 29 (78,4%) женщин в подгруппе II, обильные - у 10 (19,3%) и 6 (16,2%), скудные – у 2 (3,8%) и 2 (5,4%) женщин. Дисменорея, проявляющаяся болевым синдромом во время менструации, наблюдалась значимо чаще в подгруппе I (у 61,5% женщин), чем в подгруппе II (у 35,1%) (таблица 3.37).

По данным УЗИ, выполненного во II фазе менструального цикла, у пациенток в подгруппе I вне беременности значимо чаще диагностировалась гипоплазия эндометрия, чем в подгруппе II (таблица 3.37). У женщин с высоким уровнем аПГ вероятность развития гипоплазии эндометрия была в 14,3 раза выше, а дисменореи в 3 раза выше, чем у женщин с низким уровнем аПГ. В то же время в подгруппе I вероятность развития гипоплазии эндометрия была выше, чем дисменореи.

Таблица 3.37 – Частота гинекологической патологии у пациенток с ПНБ вне беременности в зависимости от уровня аПГ.

Наименование патологии	Частота выявления, абс. число (%)		p-значение*	OR, 95% CI	p-значение
	Подгруппа I, n=52	Подгруппа II, n=37			
Дисменорея	32 (61,5)	13 (35,1)	0,0251	3,0 [1,23-7,09]	0,0154
Гипоплазия эндометрия	29 (55,8)	3 (8,1)	<0,0001	14,3 [3,89-52,49]	0,0001

Примечание. * – значения p при сравнении подгруппы I и подгруппы II

Таким образом, у пациенток с ПНБ и высоким уровнем аПГ вне беременности на фоне нормального гормонального статуса отмечались более низкий уровень эстрадиола в I фазе менструального цикла, более высокая частота дисменореи и гипоплазии эндометрия вне беременности по сравнению с пациентками с низким уровнем аПГ.

У пациенток с ПНБ антитела к ПГ часто выявлялись в комбинации с антителами другой специфичности, а именно с аХГЧ и аФЛ (таблица 3.38). Антитела к ХГЧ определялись в подгруппе I значимо чаще, чем в подгруппе II, и значимо чаще, чем антитела к β2-ГП-I (p=0,0001), КЛ (p=0,0002) и Ан А5 (p<0,0001). Тогда как суммарная частота выявления аФЛ в подгруппе I (у 13 (25%) женщин) существенно не отличалась от таковой в подгруппе II (у 4 (10,8%) женщин) (p=0,1597). Антитела к ХГЧ выявлялись в подгруппе I значимо чаще, чем аФЛ (p=0,005).

Под влиянием проводимой предгестационной подготовки в цикле зачатия и комплексной терапии во время беременности, включающей применение дидрогестерона (дюфастона), глюкокортикоидных препаратов (метилпреднизолона), препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения (интрагама или октагама), наблюдалось снижение частоты выявления

аПГ в сроке 8-9 недель гестации. При этом частота выявления антител (IgM, IgG) к ПГ у женщин в подгруппе I стала ниже (22 (42,3%)), чем до беременности (p<0,0001) (таблица 3.39).

Таблица 3.38 – Частота выявления антител (IgM+IgG) к ХГЧ, β2-ГП-I, КЛ и Ан А5 у пациенток с ПНБ в исследуемых подгруппах.

Вид антител	Частота выявления, абс. число (%)		p*	OR, 95% CI	p
	Подгруппа I, n=52	Подгруппа II, n=37			
аХГЧ	28 (53,8)	8 (21,6)	0,0046	4,23 [1,63-10,98]	0,003
аβ2-ГП-I	8 (15,4)	3(8,1)	0,4812	2,06 [0,51-8,36]	0,312
аКЛ	9 (17,3)	3 (8,1)	0,3484	2,37 [0,59-9,45]	0,221
аАн А5	5 (9,6)	1 (2,7)	0,3947	3,83 [0,43-34,24]	0,229

Примечание к таблице 3.38. * – значения p при сравнении подгрупп I и II

Таблица 3.39 – Влияние предгестационной подготовки и терапии во время беременности на частоту выявления антител к ПГ у пациенток с ПНБ в сроке 8-9 недель гестации.

Класс антител	Частота выявления, абс. число (%)		p-значение*
	До лечения	После лечения	
IgM	28 (53,8)	11 (21,2)	0,0012
IgG	33 (63,5)	14 (26,9)	0,0004

Примечание. *– значения p при сравнении частоты до и после лечения

По результатам проспективного исследования течение беременности у пациенток с высоким уровнем аПГ часто осложнялось гипоплазией хориона в I триместре, угрозой прерывания беременности в I и II триместрах, плацентарной недостаточностью во II и III триместрах (таблица 3.40). Гипоплазия хориона у пациенток в подгруппе I выявлялась значимо чаще (у 32,7%), чем у пациенток в подгруппе II (у 2,7%). У пациенток с высоким уровнем аПГ вероятность развития гипоплазии хориона в I триместре беременности была в 17,5 раза выше, чем у пациенток с низким уровнем аПГ (p=0,0067).

Таблица 3.40 – Частота осложнений беременности у пациенток с ПНБ в зависимости от уровня антител к ПГ.

Патология беременности	Частота выявления, абс. число (%)		p*	OR	p
	Подгруппа I, n=52	Подгруппа II, n=37			
Гипоплазия хориона	17 (32,7)	1 (2,7)	0,0014	17,5 [2,21-138,54]	0,0067
Угрожающий выкидыш в I триместре	25 (48,1)	11 (29,7)	0,1275	2,0 [0,84-4,94]	0,1149
Угрожающий выкидыш во II триместре	21 (40,4)	10 (27)	0,2793	1,8 [0,73-4,56]	0,1948
Плацентарная недостаточность во II триместре	7 (13,5)	1 (2,7)	0,1681	5,6 [0,66-47,63]	0,1147
Плацентарная недостаточность в III триместре	10 (19,2)	4 (10,8)	0,4367	1,9 [0,57-6,83]	0,2882
Угрожающие преждевременные роды	11 (21,2)	5 (13,5)	0,5144	1,7 [0,54-5,44]	0,3584

Примечание к таблице 3.40. * – значения р при сравнении показателей подгруппы I и подгруппы II

Ранняя диагностика, предгестационная подготовка и лечение во время беременности, а также профилактика плацентарной недостаточности обеспечили благоприятный исход беременности у 82 (92,1%) пациенток с ПНБ. Беременность завершилась рождением жизнеспособных новорожденных у 92,3% пациенток в подгруппе I и у 91,9% в подгруппе II (таблица 3.41). У пациенток подгруппы I значимо чаще наблюдались своевременные роды (у 86,5%), чем преждевременные роды (у 5,8%), неудачные исходы отмечались только в 7,7% случаев.

Таблица 3.41 – Исход беременности у пациенток с ПНБ после проведения предгестационной подготовки и лечения во время беременности.

Исход беременности	Частота наблюдения, абс. число (%)		р-значение
	Подгруппа I, n=52	Подгруппа II, n=37	
Неразвивающаяся беременность	2 (3,8)	2 (5,4)	<0,0001*,**
Анэмбриония	1 (1,9)	1 (2,7)	<0,0001*,**
Антенатальная гибель плода	1 (1,9)	0 (0)	<0,0001*,**
Преждевременные роды	3 (5,8)	1 (2,7)	<0,0001*,**
Своевременные роды	45 (86,5)	33 (89,2)	–

Примечание. *,**– значения р при сравнении с частотой своевременных родов в подгруппе I и в подгруппе II

Таким образом, у пациенток с ПНБ при высоком уровне аПГ часто выявлялись аХГЧ и аФЛ, при этом антитела к ХГЧ определялись чаще, чем у пациенток с низким уровнем аПГ, и чаще, чем антитела к β2-ГП-I, КЛ и Ан А5. Течение беременности у пациенток с ПНБ при высоком уровне аПГ часто осложнялось гипоплазией хориона, угрозой прерывания беременности, плацентарной недостаточностью и угрозой преждевременных родов. Вероятность развития гипоплазии хориона у пациенток с высоким уровнем аПГ была в 17,5 раза выше, чем у пациенток с низким уровнем аПГ. Ранняя диагностика, проведение предгестационной подготовки и комплексного лечения во время беременности снижали частоту выявления аПГ и обеспечивали высокую частоту благоприятного исхода беременности у женщин с ПНБ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие аутоиммунных процессов происходит с вовлечением иммунологических и генетических механизмов под воздействием факторов окружающей среды и образа жизни. Наиболее значимыми генами предрасположенности к АИЗ являются гены ГКГ, кодирующие большинство протеинов, ассоциированных с функционированием иммунной системой, а также гены, находящиеся за пределами ГКГ, регулирующие иммунный ответ. Развитию АИЗ способствуют нарушения механизмов эпигенетического регулирования экспрессии генов, а именно метилирования и деметилирования ДНК, ацетилирования и метилирования гистонов, экспрессии микроРНК, а также сдвиг инактивации Х-хромосомы, на которой расположены гены, ассоциированные с иммунным ответом и кодирующие большое число микроРНК.

В генерации аутоантигенов и запуске аутоиммунитета кроме внутриклеточного протеолиза важное значение имеют внеклеточный протеолиз и внеклеточные ПТМ, которые осуществляются с участием как ферментов хозяина, так и ферментов микроорганизмов, входящих в состав микробиоты. Патогенные микроорганизмы являются доказанными триггерами АИЗ, однако часто за индукцию аутоиммунитета является ответственной не одна инфекция, а инфекционная нагрузка, накопленная с детства. Адъюванты, применяемые в вакцинах, предназначенных для профилактики инфекций, могут стимулировать гуморальный иммунный ответ Th2-типа и вызывать АИЗ или ASIA у генетически предрасположенных людей. Женские половые гормоны, особенно эстрогены, и ПРЛ оказывают стимулирующее воздействие на иммунную систему и способствуют развитию аутоиммунитета, выживанию и накоплению аутореактивных клеток, усилению образования аутоантител.

Аутоиммунитет может влиять на функционирование репродуктивной системы и течение беременности [149]. Аутоантитела к нормальным антигенам человека часто ассоциируются с ПНЯ, эндометриозом, СПКЯ, необъяснимым

бесплодием и неудачами в циклах ЭКО, невынашиванием беременности и преэклампсией. Показана ассоциация аутоантител к гонадотропинам с овариальным аутоиммунитетом, заболеваниями яичников, вызывающими бесплодие, а также с неудачами в программах ЭКО [288].

Описаны случаи повышенного образования антител к ХГЧ, индуцированного введением гомо- и гетерологичных препаратов гормона [215, 280], иммунизацией контрацептивной вакциной созданной на основе β-субъединицы ХГЧ [543], а также спонтанная продукция антител у женщины с невынашиванием беременности [329]. Показана способность высокоаффинных антител к ХГЧ нейтрализовать биологическую активность гормона в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [329, 346]. Антитела к ХГЧ рассматриваются как возможная причина невынашивания беременности, бесплодия и неудач в циклах ЭКО и ПЭ [23, 346].

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования для изучения распространенности, иммунохимических свойств и диагностической значимости антител к гормонам при ПНБ нами разработаны варианты ИФА для определения антител к ХГЧ и ПГ разных классов (M, G, A, E) и подклассов IgG.

С учетом функциональной важности β-субъединицы ХГЧ, содержащей пептидные последовательности, определяющие специфичность и биологическую активность гормона, для определения антител к ХГЧ применяли вариант непрямого твердофазного ИФА с иммобилизацией ХГЧ на твердую фазу посредством МКАТ к α-субъединице ХГЧ, обеспечивающий ориентированное расположение молекул гормона на поверхности полистирола с преимущественным экспонированием β-субъединицы (параграф 3.1.1). Специфичность взаимодействия сывороточных антител с гормоном на твердой фазе подтверждалась конкурентным ингибированием связывания антител с ХГЧ в присутствии избытка антигена в растворе (параграф 3.3.1). Прочная иммобилизация малых по размеру синтетических пептидов β-ХГЧ, соответствующих последовательностям аминокислот С109-145 и С109-119, обеспечивалась за счет ковалентного связывания амино-, гидрокси-, тиольных

групп пептидов с электрофильными группами на поверхности микропланшета NUNC IMMOBILIZER AMINO (параграф 3.1.1).

Кроме ИФА, взаимодействие сывороточных антител с ХГЧ у пациенток, страдающих ПНБ, наблюдали с использованием автоматизированного оптического биосенсора ProteOn™ XPR36 в режиме «реального времени» на поверхности микрофлюидного сенсорного чипа, при этом специфичность взаимодействия была подтверждена ингибированием связывания мышиных МКАТ к β-ХГЧ с гормоном после нанесения образцов, положительных на антитела к ХГЧ по данным ИФА (параграф 3.3.1).

Также для подтверждения специфичности взаимодействия сывороточных антител с ХГЧ из пулированной сыворотки крови, полученной от пациенток с ПНБ, положительных на антитела к ХГЧ по данным ИФА, с использованием аффинной хроматографии были выделены очищенные антитела к ХГЧ, принадлежащие к разным классам (G, M, A), что было показано с помощью иммуноэлектрофореза с моноспецифическими антисыворотками к IgM, IgG и IgA человека (параграф 3.3.1).

Важно отметить, что модификации ИФА для определения антител (IgM, IgG) к ХГЧ, которые в дальнейшем использовались для проведения исследовании, характеризовались высокой чувствительностью, точностью определения и воспроизводимостью результатов в повторных исследованиях, а также широким диапазоном концентраций с линейной зависимостью сигнала (ОП) от содержания антител к ХГЧ в сыворотке крови (параграф 3.1.1). Построены калибровочные кривые и получены уравнения для линейных участков, что позволяет количественно оценивать содержание антител к ХГЧ в условных Ед/мл. Количественная оценка результата анализа имеет важное клиническое значение при динамическом наблюдении за женщинами во время беременности и оценке эффективности лечения.

С применением разработанных вариантов ИФА выявлена высокая распространенность антител к ХГЧ у пациенток с ПНБ на ранних сроках по сравнению со здоровыми женщинами вне беременности (параграф 3.2.1).

Показано, что у данных пациенток кроме IgM- и IgG-антител к ХГЧ с высокой частотой обнаруживаются IgA, при этом IgG и IgA определяются значимо чаще, чем IgE. В большинстве случаев IgA и IgE выявляются в комбинации с иммуноглобулинами других классов. Следует подчеркнуть, что уровень аХГЧ в сыворотке крови у пациенток с ПНБ значимо выше, чем у здоровых женщин. Между уровнями IgM и IgG аХГЧ отмечается умеренная обратная корреляционная связь, а между уровнями IgG и IgA - слабая прямая корреляционная связь, IgE не коррелируют по уровню с иммуноглобулинами других классов.

Известно, что сывороточные IgA-антитела имеют слабо выраженную способность к активации комплемента по классическому пути по сравнению с IgM- и IgG-антителами. Однако IgA специфически связываются с антигеном, что при ограниченном количестве антигена может приводить к снижению связывания с ним IgM и IgG и способствовать ингибированию активации комплемента [597].

Обращает на себя внимание тот факт, что у части пациенток с ПНБ выявляются высокие уровни IgE-антител к ХГЧ. По данным литературы, при хроническом аллергическом воспалении и особенно при АИЗ часто наблюдается продукция IgE-антител против множества белков человека (аутоантигенов), экспрессированных в разных клетках и типах тканей, а уровень IgE-антител ассоциируется с активностью и тяжестью заболевания [376]. При этом у одного пациента могут иметь место как аллергия, так и аутоиммунный процесс. Недавно при АИЗ были описаны повышенные уровни IgE-антител к аутоантигенам без специфических клинических симптомов, например, IgE-антител к ядерным антигенам при СКВ, к тиреоидной пероксидазе и тиреоглобулину при болезни Хашимото [132]. По результатам данного исследования выявление высокого уровня IgE-антител к ХГЧ ассоциируется с более тяжелой формой привычного выкидыша (более 3 случаев в анамнезе).

По результатам исследования, определение антител к ХГЧ, особенно классов G и A, имеет высокую чувствительность (65,6%; 64,5%), специфичность (89%; 90,2%) и диагностическую значимость (AUC 0,801; 0,774) для ПНБ на

ранних сроках (параграф 3.2.1). Построенные ROC-кривые позволяют эффективно классифицировать пациенток с ПНБ и здоровых женщин по уровням IgG и IgA аХГЧ и соответствуют хорошему качеству модели. У женщин при уровне IgG и IgA аХГЧ, превышающем установленную пороговую величину, риск ПНБ на ранних сроках в 15,7 и 12,1 раза выше, чем у здоровых женщин без антител. Определение комбинации аХГЧ разных классов повышает их диагностическую значимость для ПНБ. Антитела к ХГЧ в значительной степени ассоциируются с ПНБ на ранних сроках и могут служить диагностическим маркером данной патологии.

В результате проведенного логистического регрессионного анализа рассчитаны коэффициенты регрессии и составлено уравнение логит-функции, которое позволяет определить вероятность ПНБ на ранних сроках у женщин, серопозитивных на антитела к ХГЧ, в зависимости от уровня данных антител классов M,G и A, что имеет важное клиническое значение.

Следует подчеркнуть, что, хотя IgA аХГЧ ассоциируются с ПНБ и имеют высокую диагностическую значимость для ПНБ, в большинстве случаев IgA выявляются в комбинации с IgG и коррелируют с уровнем IgG, тогда как самостоятельное диагностическое значение IgA аХГЧ не доказано. Ранее Haller K. и соавторы показали ассоциацию IgA аФСГ с гинекологическими заболеваниями, такими как эндометриоз и СПКЯ [326]. Аналогичным образом, в случае АФС рядом авторов продемонстрировано, что IgA аФЛ имеют диагностическую значимость для АФС и ассоциируются с тромбозом и потерей беременности, однако ассоциация IgA с клиническими проявлениями АФС часто теряется при отсутствии других аФЛ. В то же время имеется экспериментальное подтверждение патогенетического значения IgA аФЛ в развитии тромбоза на мышиной модели [171, 582].

Особый интерес представляло исследование подклассов IgG-антител к ХГЧ, так как распределение антител по подклассам IgG позволяет оценить их патогенетическое значение и возможные патогенетические механизмы в развитии акушерской патологии. Показано, что у пациенток с ПНБ на ранних сроках

определяются повышенные уровни IgG аХГЧ четырех подклассов в разных сочетаниях с преобладанием по частоте выявления комбинации IgG1+IgG2+IgG4 (параграф 3.2.1). По-видимому, образование антител запускается как белковым, так и углеводным компонентами молекулы ХГЧ и может быть направлено против гипергликозилированной формы ХГЧ. У женщин с аХГЧ часто наблюдается повышение только IgG1, которые как антитела быстрого реагирования синтезируются первыми. С высокой частотой выявляются IgG4, что может быть связано с предрасполагающей к их продукции длительной антигенной стимуляцией самим ХГЧ во время беременности, а также близкими по антигенному строению гликопротеиновыми гормонами (ЛГ, ФСГ) вне беременности.

Среди IgG-антител четырех подклассов к ХГЧ более часто отмечается повышение уровня IgG1 и IgG2, различающихся по своим эффекторным функциям. Как известно, IgG1-антитела с высокой эффективностью взаимодействуют с компонентом комплемента C1q и активируют систему комплемента по классическому пути, а также с высокой аффинностью связываются с поверхностными клеточными Fcγ-рецепторами, присутствующими на многих клетках человека (гемопоэтических клетках, клетках трофобласта и др.) [289, 487, 495]. Тогда как IgG2 в меньшей степени активируют классический путь комплемента, но с высокой аффинностью связываются с Fcγ-рецепторами, которые экспрессируются на тромбоцитах, мононуклеарных фагоцитах, нейтрофилах и трофобластах, что может привести к активации или нарушению функции этих клеток. Учитывая наличие у женщин повышенного уровня аХГЧ подклассов IgG1 и IgG2, различающихся по их эффекторным функциям, можно предположить, что в патогенезе потери беременности могут участвовать разные механизмы, включающие активацию системы комплемента, а также активацию тромбоцитов, моноцитов и нейтрофилов, которые повышают риск развития тромботических и воспалительных осложнений. Высокая авидность способствует реализации эффекторных функций антител.

Наши предположения о возможных механизмах действия аХГЧ при потере беременности подтверждаются данными гистологического исследования абортного материала, которые демонстрируют у женщин с аХГЧ повышение количества лимфоцитарных клеток в децидуальной оболочке на уровне decidua basalis, активацию внутрисосудистого свертывания крови в спиральных артериях, атрофические изменения в синцитиотрофобласте ворсин и недостаточную инвазию трофобласта [14].

Обращает на себя внимание высокая частота встречаемости аХГЧ подкласса IgG4, которые практически не активируют комплемент и не связываются с Fcγ-рецепторами клеток, однако обладают блокирующей активностью, конкурируют за связывание с антигеном и образуют мелкие непреципитирующие иммунные комплексы, способствуя уменьшению проявлений комплемент-опосредованной патологии [289, 330, 495]. Продукция IgG4 зависит от Т-хелперов II типа и сопровождается повышенным синтезом IL-10 и других противовоспалительных цитокинов. Считается, что наличие специфических IgG4 указывает на активацию противовоспалительных механизмов, индуцирующих толерантность. Действительно, у нескольких женщин с изолированной повышенной продукцией аХГЧ подкласса IgG4 наблюдалось физиологическое течение беременности на ранних сроках.

Однако IgG4 могут ассоциироваться с патологией в случае выраженных склеротических изменений, отражая избыточную продукцию противовоспалительных цитокинов и экспансию плазматических клеток, продуцирующих IgG4 [330]. Как показали данные макро- и микроскопических исследований плацент, проведенных после своевременных родов, у женщин с аХГЧ в 80% случаев наряду с патологической незрелостью и отсутствием дифференцировки ворсин имелись выраженные склеротические изменения в строме плацент [14]. Одной из возможных причин этих нарушений могло быть повышенное образование IgG4 аХГЧ.

Важно подчеркнуть, что полученные результаты согласуются с данными Deshmukh U.S. и соавторов, которые показали у женщин, иммунизированных

контрацептивной вакциной, созданной на основе β-субъединицы ХГЧ, образование IgG-антител четырех подклассов к ХГЧ с преобладанием IgG1 [207]. При этом способность сывороток нейтрализовать биологическую активность гормона хорошо коррелировала именно с уровнем IgG1, а присутствие IgG4 не оказывало на нее существенного влияния.

Определение авидности антител двумя способами с использованием хаотропных агентов показало, что с ПНБ ассоциируются высокоавидные IgG-антитела к ХГЧ (параграф 3.2.1). При этом более половины пациенток, серопозитивных на аХГЧ, имеют высокую авидность IgG-антител с ИА более 70%. Антитела к ХГЧ подкласса IgG2 отличаются более высокой авидностью по сравнению с IgG1 и IgG4. Следует подчеркнуть, что именно высокоавидные антитела имеют наибольшее патогенетическое значение. Так, по данным Čučnik S. и соавторов (2012), при АФС высокоавидные антитела к β2-ГП-I ассоциируются с клиническими проявлениями синдрома, такими как венозный тромбоз и акушерские осложнения [128]. В связи с этим определение авидности аутоантител имеет важное клиническое значение.

Антитела к ХГЧ у женщин с ПНБ представляют собой гетерогенную группу антител, реагирующих как с цельной молекулой ХГЧ, так и со свободными α- и β-субъединицами гормона, и имеют разную эпитопную специфичность (параграф 3.3.1). Уровень антител к цельной молекуле ХГЧ в значительной степени коррелирует с уровнем антител к свободным α- и β- субъединицам гормона. Важно подчеркнуть, что антитела к α-субъединице, которая является общей у гликопротеиновых гормонов, включая ФСГ и ЛГ, составляют большую часть антител к ХГЧ.

Сывороточные антитела у пациенток с ПНБ взаимодействуют в ИФА не только с ХГЧ, но и с ЛГ и ФСГ, иммобилизованными на твердой фазе, с ЛГ в большей степени, чем с ФСГ. Между уровнями IgG-антител к ХГЧ, ЛГ и ФСГ наблюдается сильная прямая корреляционная связь. Полученные данные позволяют предположить выраженную перекрестную реактивность сывороточных антител к ХГЧ с другими гликопротеиновыми гормонами вследствие близкой

антигенной структуры этих гормонов, общей α-субъединицы и высокой гомологии β-субъединиц при совпадении последовательности первых 114 из 145 аминокислотных остатков β-ХГЧ с β-ЛГ на 85%, с β-ФСГ - на 36% [26].

Сывороточные антитела у пациенток с ПНБ взаимодействуют с синтетическими пептидами, соответствующими аминокислотным последовательностям С109-119 и С109-145 уникального С-терминального хвоста β-субъединицы ХГЧ, определяющим специфичность и биологическую активность гормона [497, 510]. Показано, что антитела к цельной молекуле ХГЧ выявляются чаще, чем антитела к данным пептидам β-ХГЧ, а между уровнями IgG-антител к ХГЧ и пептидам С109-119 и С109-145 наблюдается прямая корреляционная связь сильная или средней силы (параграф 3.3.1). Следует отметить, что IgG-антитела к пептидной последовательности С109-145, ответственной за биологическую активность гормона, определяются только у 29,5% пациенток, серопозитивных на аХГЧ. Важное клиническое значение имеют полученные данные о том, что у женщин с уровнем IgG-антител к цельной молекуле ХГЧ выше 48 Ед/мл имеется высокая вероятность наличия антител к пептидной последовательности С109-145 β-ХГЧ, определяющей биологическую активность гормона, в 10,1 раза выше, чем у женщин с низким уровнем аХГЧ.

Недавно было получено подтверждение, что антитела к пептидным последовательностям 116-125, 126-135 и 131-140 С-терминального хвоста ХГЧ могут нейтрализовать биологическую активность гормона [241]. Антисыворотки, полученные против соответствующих пептидов, эффективно ингибировали активность ХГЧ при определении в биоанализе по приросту веса матки у незрелых мышей. Однако механизм нейтрализации активности гормона еще не установлен и, по-видимому, не ограничивается прямым ингибированием связывания гормона с рецептором.

При исследовании особенностей иммунного статуса у пациенток с ПНБ, серопозитивных аХГЧ, не были найдены значимые различия в абсолютном и относительном содержании лимфоцитов с фенотипами CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD56+ и в соотношении клеток CD3+CD4+/CD3+CD8+ при сравнении с

серонегативными пациентками, средние показатели соответствовали нормальному диапазону (параграф 3.5). При этом часто отмечалось повышенное относительное содержание клеток CD56+ у пациенток с ПНБ в обеих подгруппах, что согласуется с данными мета-анализа (2014), демонстрирующими более высокие уровни (количество и процентное содержание) периферических NK-клеток у женщин с ПВ по сравнению со здоровыми женщинами [499]. Считается, что относительное содержание NK-клеток в периферической крови более 18% всех лимфоцитов является высоко специфическим для ПВ [208].

Результаты исследования фенотипической характеристики В-лимфоцитов у женщин с ПНБ показали, что у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, иммунный статус характеризуется более высокими средними показателями абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов CD19+ и кластера CD19+CD5+, чем у серонегатиных пациенток, при соответствии данных показателей в обеих подгруппах нормальному диапазону. У серопозитивных женщин часто отмечаются повышенные показатели относительного содержания клеток кластера CD19+CD5+, превышающие референсный диапазон, при этом вероятность повышения относительного содержания клеток CD19+CD5+ в 14 раз выше, чем у серонегативных женщин. Аналогичные изменения иммунного статуса наблюдаются у женщин с ПВ и АФС, показано, что повышенное количество циркулирующих В-лимфоцитов CD5+ коррелирует с уровнем аФЛ [599].

По результатам данного исследования, у женщин с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, часто отмечается общая активация гуморального иммунитета, которая проявляется повышением уровня суммарных IgM, IgG, реже IgA (параграф 3.5). Вероятность повышения общего содержания IgM и IgG у серопозитивных пациенток, соответственно, в 23 и 50 раз выше, чем усеронегативных пациенток, при этом между уровнями IgM аХГЧ и общего IgM отмечается сильная прямая корреляционная связь.

Анализ клинико-анамнестических данных у женщин с ПНБ, серопозитивных на аХГЧ, показал, что у большинства пациенток в анамнезе отмечаются потери беременности в I триместре в сроке 7,4±2,3 недель (параграф

3.6.1). Часто потере беременности предшествуют медицинские аборты. Уровень аХГЧ не зависит от числа потерь, продолжительности невынашивания и времени, прошедшего после последнего выкидыша. Предполагается, что предшествующие искусственные и самопроизвольные репродуктивные потери, сопровождающиеся резкими изменениями иммунного и гормонального статуса, могут способствовать образованию антител к ХГЧ.

В структуре гинекологической заболеваемости у пациенток, серопозитивных на аХГЧ, наиболее часто отмечаются эндометриоз и СПКЯ. По данным литературы, эти заболевания часто ассоциируются с продукцией множества аутоантител разной специфичности, включая органоспецифические антиэндометриальные и антиовариальные аутоантитела, а также антитела к ФСГ, которые могут служить маркером овариальных нарушений, приводящих к бесплодию [44, 247, 293]. При этом эндометриоз полностью отвечает классификационным критериям АИЗ, включающим поликлональную активацию В-лимфоцитов, нарушения функции Т- и В-лимфоцитов, повышенный апоптоз, тканевое повреждение и вовлечение нескольких органов [237]. Кроме того, у женщин с эндометриозом отмечается повышенная вероятность развития других аутоиммунных состояний.

Обращает на себя внимание высокая частота встречаемости у женщин с аХГЧ инфекционно-воспалительных заболеваний органов малого таза, а также рецидивирующего герпеса и хронического тонзиллита. Инфекционные агенты окружающей среды являются главными предполагаемыми триггерами аутоиммунитета и играют важную роль в развитии АИЗ. Аутоиммунные процессы могут запускаться воспалением, индуцированным тканевым повреждением, обусловленным инфекцией или действием других факторов [342]. При этом во многих случаях аутоиммунитет индуцируется не одной инфекцией, а инфекционной нагрузкой, накопленной организмом с детства. Поэтому частые инфекционно-воспалительные заболевания у женщин могут предрасполагать к индукции аутоиммунитета и образованию аутоантител путем вовлечения разных механизмов, включая поликлональную активацию лимфоцитов, потерю

периферической толерантности, структурные изменения собственных антигенов с образованием новых антигенных детерминант и другие. Бактериальные и вирусные суперантигены способны вызывать широкую поликлональную активацию Т- и В-лимфоцитов, среди которых потенциально могут быть субпопуляции, специфичные к собственным антигенам.

У пациенток с аХГЧ часто диагностируется недостаточность лютеиновой фазы, которая характеризуется неадекватной секреторной трансформацией эндометрия и обычно связана со снижением функции желтого тела яичников. Одной из причин НЛФ является пониженная секреция ФСГ при эндокринной патологии, включая стертые формы гипотиреоза и гиперпролактинемии. При этом в эндометрии наблюдается недоразвитие желез, стромы, сосудов, недостаточное накопление гликогена, белков, факторов роста, избыточное количество провоспалительных цитокинов, что ведет к неадекватному развитию плодного яйца и выкидышу [22]. Учитывая возможность перекрестного взаимодействия антител к ХГЧ с близким по антигенной структуре ФСГ, предполагается, что аХГЧ могут способствовать развитию НЛФ, связываясь с ФСГ и снижая его функциональную активность. Часто НЛФ у пациенток с ПНБ приводит в дальнейшем к вторичному бесплодию.

Обращает на себя внимание тот факт, что значительная часть женщин с антителами к ХГЧ ранее применяли гормональные контрацептивы, нередко в течение длительного периода времени (до 1 года). При использовании комбинированных оральных контрацептивов (КОК) в течение 3 месяцев подряд и более выработка собственных половых гормонов снижается, а чувствительность рецепторов к ним, напротив, повышается. После прекращения приема КОК работа системы гипоталамус-гипофиз-яичники возобновляется, происходит мощный выброс собственных гормонов, прежде всего гонадотропинов, что приводит к повышению вероятности наступления беременности. Однако наступившая в этом цикле беременность часто не развивается или заканчивается выкидышем на раннем сроке. Наблюдающийся эффект отмены КОК или так

называемый «ребаунд-эффект», по-видимому, способствует запуску продукции аутоантител к гонадотропинам.

Некоторые женщины с ПНБ, серопозитивные на аХГЧ, получали лечение по поводу бесплодия с применением программ ВРТ и имели неудачные попытки ЭКО в прошлом. Amato F. и соавторы (2002) описали у женщины с бесплодием и неэффективными попытками применения ВРТ антитела к ХГЧ, которые нейтрализовали биологическую активность гормона в экспериментах *in vitro* и могли служить причиной самопроизвольного прерывания беременности после ЭКО [346]. Запуску продукции антител к гормонам у женщин в программах ВРТ, по-видимому, способствует применение высоких доз гонадотропинов для стимуляции яичников и индукции овуляции, а также высокие нефизиологические концентрации эстрадиола и ПГ в лютеиновую фазу индуцированного цикла. Так продукция эстрадиола в индуцированном цикле возрастает в 5-10 раз по сравнению с его уровнем в спонтанном менструальном цикле [190]. Превышение физиологических уровней гормонов выше критического порога может привести к стимуляции соответствующих аутоиммунных реакций [563]. Кроме того, сами эстрогены оказывают стимулирующее действие на иммунную систему и усиливают гуморальный иммунный ответ [433].

Наличие аХГЧ может сочетаться с присутствием антифосфолипидных и антитиреоидных антител. У нескольких женщин с ПНБ и аХГЧ был диагностирован АФС, аутоиммунный тиреоидит или болезнь Грейвса, что, по-видимому, свидетельствует о наличии у них общей генетической предрасположенности к развитию АИЗ. В исследовании, выполненном совместно с Перминовой С.Г., было показано, что антитела к ХГЧ выявляются при болезни Грейвса в 2,5 раза чаще, чем при аутоиммунном тиреоидите [8]. У пациенток, страдающих болезнью Грейвса, вырабатываются антитела не только к рецептору ТТГ, но и к ХГЧ, а, возможно, и к другим близким по строению гликопротеиновым гормонам и их рецепторам, следствием чего может быть нарушение функции яичников и повреждение их фолликулярного аппарата,

приводящее к бесплодию, последнее часто наблюдается при болезни Грейвса (в 37,5% случаев).

У значительной части женщин, серопозитивных на аХГЧ, отмечается наличие отягощенного аллергологического анамнеза. Такое сочетание можно объяснить тем, что как аллергические, так и аутоиммунные заболевания относятся к иммунопатологическим состояниям, которые характеризуются гиперреакцией иммунной системы на внешние аллергены (аллергия) или собственные антигены (аутоиммунитет), вызывающей повреждение тканей, органов или нарушение их функции [1, 132]. Аллергические и аутоиммунные заболевания имеют полигенную наследственность, при этом наследуется только предрасположенность к заболеванию. Развитие этих иммунопатологических состояний зависит от общих генетических факторов (гаплотипа HLA, полиморфизма цитокинов, их рецепторов и других), а также от многочисленных внешних пусковых факторов, таких как инфекционные агенты, медицинские лекарства, химические вещества, пища и ультрафиолетовая радиация.

У пациенток с ПНБ в анамнезе во время беременности наблюдается повышенная продукция аХГЧ по сравнению со здоровыми беременными женщинами. Как показало проведенное проспективное исследование, уровень аХГЧ в течение беременности изменяется волнообразно в соответствии с колебаниями уровня самого гормона. Повышения уровня IgM аХГЧ наблюдаются в периоды с 7 по 12 неделю, с 22 по 24 неделю и с 31 по 33 неделю гестации, изменения уровня IgG-антител запаздывают на 2-3 недели. Концентрация гормона ХГЧ в крови, измеренная в эти сроки, остается в пределах нормального диапазона. Важно подчеркнуть, что у данных пациенток наиболее часто потери беременности отмечались именно в период подъема уровня аХГЧ в сроке 7,4±2,3 недель гестации.

По полученным данным, при высоком уровне аХГЧ (IgM, IgG), превышающем более чем в 2 раза уровень данных антител у здоровых женщин (более 30 Ед/мл), течение беременности часто осложняется угрожающим выкидышем в I триместре и плацентарной недостаточностью на более поздних

сроках гестации, риск этих осложнений выше, соответственно, в 3,5 и 2,9 раза, чем при низком уровне аХГЧ. У пациенток с высоким уровнем антител к ХГЧ уже в I триместре беременности выявляются патологические изменения как в плазменном, так и в тромбоцитарном звене гемостаза, при этом гиперкоагуляция наблюдается значимо чаще, чем у пациенток с низким уровнем аХГЧ. Часто гиперкоагуляция и гиперфункция тромбоцитов сочетаются с активацией внутрисосудистого свертывания. При осложненном течении беременности наиболее распространенной является хроническая форма ДВС-синдрома.

К триггерам ДВС-синдрома наряду с традиционными, такими как попадание в кровоток тканевого тромбопластина, околоплодных вод, продуктов распада тканей, относят повреждение эндотелия сосудов в результате циркуляции иммунных комплексов, бактериальных и вирусных инфекций, генетически обусловленную или приобретенную тромбофилию (АФС), при которой прогноз намного ухудшается, а риск тромбогеморрагических осложнений приближается к 100% [16]. Назначение антикоагулянтной и/или антиагрегантной терапии женщинам с генетическими формами тромбофилии или АФС уже в фертильном цикле улучшает прогноз течения беременности.

Принимая во внимание важные физиологические функции ХГЧ во время беременности, особенно на ее ранних сроках в процессе имплантации эмбриона, формирования и развития плаценты, ангиогенеза спиральных артерий в миометрии и его центральную роль в индуцировании толерантности иммунной системы матери к полуаллогенному плоду, предполагается существенный вклад антител к ХГЧ в патогенез потери беременности у женщин. Среди возможных патогенетических механизмов потери беременности, опосредованных аХГЧ, рассматриваются:

– нейтрализация биологической активности гормона, блокирование связывания гормона со специфическим рецептором, повреждающее воздействие на клетки, продуцирующие ХГЧ или несущие специфические рецепторы;

– взаимодействие с поверхностными клеточными Fcγ-рецепторами, присутствующими на тромбоцитах, мононуклеарных фагоцитах, нейтрофилах,

клетках трофобласта и др., с последующей активацией клеток или нарушением их функции;

– активация системы комплемента;

– протромботические и воспалительные эффекты;

– нарушение инвазии трофобласта и дифференцировки синцитиотрофобласта, формирования и развития плаценты в целом;

– нарушение ангиогенеза спиральных артерий;

– нарушение формирования иммунологической толерантности матери к антигенам плода.

Патогенетические механизмы развития плацентарной недостаточности у женщин с аХГЧ включают снижение инвазивных свойств цитотрофобласта, нарушение гестационной перестройки спиральных артерий, преимущественное повреждение ворсин синцитиотрофобласта и развитие дистрофических и некротических изменений в децидуальной ткани [22].

Как известно, в норме образовавшиеся иммунные комплексы фагоцитируются и разрушаются фагоцитами крови и печенью. Во время беременности избыток ХГЧ, особенно выраженный на уровне трофобласта, и активный синтез IgM аХГЧ могут приводить к увеличению размеров образующихся иммунных комплексов и отложению их в периваскулярном пространстве с последующей активацией комплемента, повреждением клеток и воспалительным процессом.

Наличие активации системы комплемента по классическому пути у женщин с ПНБ, позитивных на аХГЧ, подтверждается выявлением гипокомплементемии, обусловленной снижением уровня компонентов комплемента C3 и C4, повышением уровня циркулирующих иммунных комплексов, связывающихся с C1q и C3d. Это позволяет предположить, что антитела к ХГЧ могут вызывать осложнения течения беременности путем вовлечения классического пути активации системы комплемента, с последующим повреждением плаценты продуктами расщепления компонентов комплемента, генерированными активацией. Кроме того, не исключается возможность прямого повреждающего

воздействия антител на клетки, продуцирующие ХГЧ и несущие специфические рецепторы. Последние широко распространены во всех тканях репродуктивных органов, а также в эндотелии спиральных артерий миометрия [311].

Раннее выявление антител к ХГЧ на этапе планирования беременности позволило провести женщинам с ПНБ предгестационную подготовку, включающую коррекцию НЛФ, курс системной энзимотерапии и метаболической терапии, противотромботическую терапию, глюкокортикоидную терапию, начиная со II фазы фертильного цикла, с индивидуальным подбором дозы препаратов с учетом уровня аХГЧ, анамнеза и индивидуальной переносимости.

К назначению терапии женщинам с ПНБ, серопозитивным на аХГЧ, во время беременности применялся диффенренцированный подход с учетом динамики изменения уровня антител к ХГЧ и показателей гемостазиограммы. По показаниям женщины получали спазмолитическую терапию, препараты гестагенного ряда, курсы метаболической и системной энзимотерапии в сроки, соответствующие подъемам уровня аХГЧ, препараты глюкокортикоидов с увеличением дозы при повышении уровня аХГЧ, препараты иммуноглобулинов для внутривенного введения, антиагрегантную и антикоагулянтную терапию, проводилась профилактика плацентарной недостаточности. Ранняя диагностика на этапе планирования беременности, предгестационная подготовка, комплексная терапия и профилактика осложнений во время беременности у пациенток с ПНБ, позитивных на аХГЧ, способствовали благоприятному исходу беременности и рождению жизнеспособного потомства в 94,3% случаев.

Наряду с гонадотропинами важным гормоном репродуктивной системы у женщин является прогестерон, контролирующий функциональное состояние матки и способствующий осуществлению репродуктивной функции. Прогестерон обеспечивает рецептивность эндометрия в период окна имплантации, децидуализацию эндометрия, содействует инвазии вневорсинчатого трофобласта в децидуа, имеет критическое значение в сохранении и развитии беременности, модулирует материнский иммунный ответ, подавляя воспалительный ответ, и поддерживает лютеиновую фазу [455]. Гестагены находят применение для

поддержания лютеиновой фазы и предупреждения осложнений беременности, таких как угрожающий выкидыш и угрожающие преждевременные роды [20].

В настоящее время большой научный интерес представляют исследования гиперчувствительности к ПГ и образования антипрогестероновых антител при нарушениях репродуктивной функции. Гиперчувствительность к ПГ выявляется с помощью внутрикожного теста с гормональным препаратом у женщин с предменструальным синдромом и ПНБ. При этом десенсибилизирующая терапия эффективно облегчает симптомы ПМС и повышает шансы наступления успешной беременности после ЭКО и у пациенток с ПНБ [123, 349]. С использованием ИФА показано образование поликлональных антител к стероидным гормонам, включая ПГ [483].

В данном исследовании распространенность антител к ПГ у женщин с ПНБ, их иммунохимические свойства и диагностическое значение изучались с применением разработанных модификаций ИФА для определения аПГ разных классов и подклассов IgG в сыворотке (плазме) крови человека. Для обеспечения надежной иммобилизации малой по размеру и молекулярному весу молекулы ПГ и высокого содержания молекул ПГ на поверхности твердой фазы на полистирол иммобилизовали конъюгаты ПГ с БСА, ПГ-3-БСА или ПГ-11-БСА (параграф 3.1.2). Показано, что различия в расположении ковалентной связи в молекуле ПГ не оказывали существенного влияния на его взаимодействие с сывороточными антителами. Экспонирование ПГ на поверхности твердой фазы было продемонстрировано с использованием поликлональных антител к ПГ и антивидового конъюгата с пероксидазой хрена. Специфичность взаимодействия сывороточных антител с ПГ подтверждена конкурентным ингибированием связывания антител с ПГ на твердой фазе в присутствии избытка антигена в растворе.

Важно отметить, что разработанные варианты ИФА для определения антител (IgM, IgG) к ПГ характеризовались высокой чувствительностью, точностью определения в одном исследовании и высокой воспроизводимостью результатов в повторных исследованиях, а также широким диапазоном

концентраций с линейной зависимостью сигнала от содержания аПГ в сыворотке крови (параграф 3.1.2). Для количественного определения содержания антител к ПГ в условных Ед/мл построены калибровочные кривые и получены уравнения для линейных участков, что имеет важное клиническое значение при динамическом наблюдении за уровнем антител во время беременности и для оценки эффективности проводимого лечения.

В проведенном исследовании показана возможность повышения чувствительности и специфичности определения антител к ПГ за счет использования в ИФА конъюгатов производной ПГ с гемоцианином с высоким содержанием молекул ПГ от 120 до 150 на одну молекулу Гем в отличие от конъюгатов ПГ с БСА, содержащих только 10-16 молекул ПГ на молекулу БСА. Использование конъюгата ПГ-11-Гем для сенсибилизации микропланшетов обеспечивает высокое содержание ПГ на поверхности твердой фазы и более высокую чувствительность определения аПГ в ИФА по сравнению с конъюгатами ПГ с БСА при хорошей корреляции результатов в обоих вариантах анализа. Более того, замена БСА в конъюгате с ПГ гемоцианином может способствовать повышению специфичности определения антител за счет исключения редкого, но возможного взаимодействия сывороточных антител с БСА у женщин с нарушениями репродуктивной функции, показанного ранее [555].

Сывороточные антитела у пациенток с ПНБ с высокой частотой взаимодействуют не только с ПГ, но и с другими близкими по структуре стероидными гормонами, а именно с эстрадиолом и тестостероном, при этом между уровнями антител отмечается выраженная прямая корреляционная связь (параграф 3.3.2). Полученные результаты согласуются с данными Roby R.R. и соавторов (2006), которые обнаружили высокие уровни антител к 17-гидроксипрогестерону, ПГ, гидрокортизону и эстрогену у женщин с ПМС [483]. При этом антитела к холестеролу, исходному соединению для синтеза всех стероидов, не были найдены, что указывает на специфичность антител только к определенным химическим структурам стероидов.

С помощью модифицированного ИФА для определения антител к ПГ в сыворотке (плазме) крови человека установлена высокая распространенность и уровень аПГ классов M, G и A у пациенток с ПНБ на ранних сроках по сравнению со здоровыми женщинами вне беременности. Обращает на себя внимание наличие прямой корреляционной связи средней силы между уровнями IgG и IgA аПГ.

Ранее использование метода ИФА для определения антител к стероидным гормонам было описано только у женщин с ПМС [483]. Предполагается, что ПГ, эстрогены и их метаболиты, являясь гаптенами вследствие малого размера молекул, после связывания с тканевыми белками или белками плазмы человека, например, альбумином или глобулином, могут действовать как полноценные антигены, вызывая развитие Th2-лимфоцитов, регулирующих синтез антител и развитие аллергических реакций.

В настоящее время для диагностики гормональной гиперчувствительности к половым стероидным гормонам у женщин с ПНБ используется кожное тестирование [471]. С помощью внутрикожных тестов с препаратами стероидных гормонов, выполненных в лютеиновую фазу цикла, гиперчувствительность к ПГ выявляется у 69% женщин с необъяснимым ПНБ и не наблюдается у здоровых женщин. Предполагается, что кожная реакция, опосредованная иммуноглобулином E, указывает на скрытый поликлональный иммунный ответ, вовлекающий разлные изотипы иммуноглобулинов.

Установлено, что определение антител к ПГ классов G и A с помощью ИФА имеет высокую чувствительность (53,3%; 51,1%), специфичность (88,9%; 82,2%) и диагностическую значимость (AUC 0,726; 0,751) для ПНБ на ранних сроках (параграф 3.2.2). Антитела к ПГ в значительной степени ассоциируются с ПНБ и могут служить диагностическим маркером данной патологии. У женщин, серопозитивных на IgG аПГ, риск развития ПНБ на ранних сроках в 9,1 раза выше, чем у женщин без аПГ. При определении аПГ как комбинации иммуноглобулинов классов M, G и A диагностическая значимость и процент верного предсказания ПНБ на ранних сроках выше, чем при определении антител отдельных классов. Важно отметить, что в результате проведенного исследования

вычислены коэффициенты регрессии и составлено уравнение логит-функции, позволяющее определить вероятность ПНБ на ранних сроках у женщин, серопозитивных на антитела классов M,G и A к ПГ.

У пациенток с ПНБ определяются IgG аПГ четырех подклассов, однако по частоте выявления и уровню IgG1-антитела превосходят IgG других подклассов (параграф 3.2.2). Антитела подклассов IgG1 и IgG2 выявляются чаще, чем IgG3 и IgG4. Повышенные уровни антител функционально активного подкласса IgG1 обнаруживаются в 90% случаев, преобладают одиночные IgG1 или комбинация IgG1+IgG2. Следует отметить, что у пациенток с ПНБ высокоавидные аПГ класса G обнаруживаются реже (в 24% случаев), чем высокоавидные аХГЧ (в 56,3% случаев). Авидность аПГ подкласса IgG1 соответствует среднему уровню, антитела подкласса IgG2 превосходят по авидности IgG1.

Известно, что свойства антител зависят от многих факторов, в том числе от дозы антигена, его иммуногенности и длительности воздействия. Иммуногенность антигена в свою очередь определяется его молекулярными особенностями: природой антигена, химическим составом, молекулярной массой, структурой и некоторыми другими характеристиками. Сила иммунного ответа зависит от количества антигена и кинетики его воздействия: чем выше доза, тем более выраженная иммунная реакция макроорганизма. Кроме того, иммуногенность антигена зависит от состояния макроорганизма, его наследственности и функциональных характеристик иммунной системы.

Важно подчеркнуть, что ХГЧ является гликопротеином и обладает значительной иммуногенностью, тогда как стероидные гормоны, представляющие собой полициклические соединения липидной природы с низким молекулярным весом, являются неполноценными антигенами, или гаптенами. Однако гаптен при соединении с достаточно большой белковой молекулой может распознаваться иммунной системой и индуцировать специфический иммунный ответ. Следует отметить, что ПГ, образовавшийся в стероид-продуцирующих клетках из холестерина, циркулирует в крови преимущественно в связанном состоянии с транспортными белками. Большая часть его связана с альбумином, около 20% – с

кортикостероид-связывающим глобулином (транскортином), синтезируемым печенью.

Кроме того, существенно различается кинетика изменения уровня гормонов ХГЧ и ПГ в организме. Если концентрация ХГЧ во время беременности возрастает за короткий отрезок времени в десятки тысяч раз (от 0-5 мЕд/мл вне беременности до 20000-250000 мЕд/мл к 7-11 неделе беременности), а затем постепенно снижается, то уровень ПГ повышается во время беременности постепенно в 10-100 раз (от 0-60 нмоль/л в менструальном цикле до 550 нмоль/л в конце третьего триместра беременности). Повышение концентрации ПГ также может наблюдаться вне беременности при приеме гормональных контрацептивов (более 60 нмоль/л), нерегулярном менструальном цикле, кровотечениях, заболеваниях почек или надпочечников, кисте желтого тела, а также при лечении методами ВРТ.

Анализ клинико-анамнестических данных показал, что для женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к ПГ, характерны высокая частота перенесенных инфекционных заболеваний, носительства возбудителей вирусных инфекций (ВПГ, ЦМВ) и токсоплазмоза, ангин и хронического тонзиллита, эндокринной патологии, а именно гиперандрогении и АИТ (параграф 3.6.2). У женщин наблюдается высокая частота АИЗ, особенно АИТ.

В анамнезе у женщин с ПНБ, серопозитивных на аПГ, среди гинекологической патологии преобладают воспалительные заболевания органов малого таза, прежде всего, хронический сальпингоофорит и эндометрит, наблюдается высокая частота самопроизвольных репродуктивных потерь преимущественно в I триместре беременности в сроке от 5 до 8 недель гестации, внутриутробной гибели плода и преждевременных родов. Отмечается высокая частота искусственного прерывания беременности, в том числе первой беременности. По-видимому, предшествующие медицинские аборты и многократные самопроизвольные репродуктивные потери, сопровождающиеся резкими изменениями гормонального и иммунного статуса, могут способствовать запуску продукции аутоантител к ПГ. Кроме того, обращает на себя внимание тот

факт, что большинство женщин в прошлом принимали препараты прогестеронового ряда, что также могло содействовать образованию антител к ПГ.

Можно предположить, что нарушению иммунного ответа на половые стероидные гормоны способствуют самопроизвольные потери беременности, искусственные прерывания беременности и прием гормональных контрацептивов, что согласуется с данными Itsekson M.A. и соавторов [471]. Неадекватный повышенный иммунный ответ на ПГ может затруднять осуществление физиологической функции ПГ и приводить к дефекту лютеиновой фазы, нарушениям имплантации и физиологического течения беременности.

Полученные нами данные показали, что у пациенток с уровнем аПГ более 30 Ед/мл на фоне нормального гормонального статуса отмечается более высокая частота дисменореи и гипоплазии эндометрия по сравнению с пациентками с низким уровнем аПГ (параграф 3.6.2). При этом риск развития дисменореи и гипоплазии эндометрия при высоком уровне аПГ в 3 раза и 14,3 раза выше, чем при низком уровне аПГ. Эти данные поддерживают гипотезу о том, что антитела к ПГ могут препятствовать осуществлению биологической функции гормона.

Течение беременности у пациенток с ПНБ при высоком уровне аПГ часто осложняется гипоплазией хориона и плацентарной недостаточностью, вероятность развития гипоплазии хориона в 17,5 раза выше, чем у пациенток с низким уровнем аПГ (таблица 3.40). По мнению Сидельниковой В.М. (2010), механизм прерывания беременности при наличии антител к ПГ связан с формированием неполноценной первой волны инвазии трофобласта, что клинически проявляется гипоплазией хориона в сроках 5-6 недель беременности [22].

Среди возможных патогенетических механизмов развития нарушений репродуктивной функции и патологии беременности, опосредованных антителами к ПГ, предполагаются:

– нарушение рецептивности и децидуализации эндометрия, имплантации эмбриона;

– снижение инвазии трофобласта, нарушение ангиогенеза, как следствие нарушение формирования и развития плаценты;

– снижение иммуносупрессивного воздействия ПГ, нарушение формирования иммунологической толерантности организма матери к антигенам плода, усиление воспалительного ответа.

Проведение предгестационной подготовки в цикле зачатия и комплексной терапии во время беременности, включающей применение дидрогестерона, глюкокортикоидных препаратов и иммуноглобулинов для внутривенного введения, снижает частоту выявления аПГ в сроке 8-9 недель гестации, а в комбинации с профилактикой и лечением плацентарной недостаточности обеспечивает высокую частоту благоприятных исходов беременности у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аПГ, в 92,3% случаев.

Выбор препарата дидрогестерона определяется его более высоким сродством к рецепторам ПГ, уникальной молекулярной структурой, отличной от природного ПГ. Благодаря высокой биодоступности и прогестагенной активности основного метаболита, дидрогестерон обеспечивает необходимый эффект в дозе в 10-20 раз меньшей по сравнению с микронизированным ПГ [20, 423]. По данным мета-анализа 2017 года назначение ПГ может снизить частоту повторных выкидышей и, по-видимому, безопасно для плода [518]. Синтетические прогестагены ассоциируются с более низким риском повторных выкидышей. Однако требуются дальнейшие испытания разных типов прогестагенных препаратов, чтобы рекомендовать путь введения и дозу.

Глюкокортикоидные препараты в дозе 5-10 мг не оказывают неблагоприятного воздействия на организм матери и плода и являются высокоэффективными при аутоиммунных нарушениях за счет снижения антителообразования, ингибирования системы комплемента и образования фиксированных и циркулирующих иммунных комплексов, снижения уровня цитотоксических NK-клеток [22].

Применение препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения способствует поддержанию иммунологической толерантности и снижению

иммуноопосредованного воспаления путем воздействия на различные звенья иммунной системы: блокирования аутоиммунных антител присутствующими антиидиотипическими антителами, подавления продукции антител В-лимфоцитами, ингибирования их пролиферации и индукции апоптоза, модулирования дисбаланса Th17 и Treg лимфоцитов, усиления супрессорной активности Treg клеток, антителоопосредованной клеточной цитотоксичности NK-клеток в отношении ДК и индукции их апоптоза, ингибирования продукции провоспалительных цитокинов макрофагами и ДК и индукции продукции противовоспалительных цитокинов, блокирования молекул адгезии, рецепторов для них и хемокинов на ЭК, ингибирования активации ЭК и регуляции продукции хемокинов и цитокинов [21, 22, 351].

Ранняя диагностика, проведение предгестационной подготовки, комплексной терапии во время беременности и профилактики плацентарной недостаточности обеспечивают благоприятный исход беременности и рождение жизнеспособных детей у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аПГ.

Исследование спектра антител к гормонам и аФЛ у женщин с угрожающим выкидышем в I триместре беременности неясного генеза, у которых беременность удалось сохранить, показало, что у данных пациенток значимо чаще наблюдается повышенная продукция антител к ХГЧ и ПГ, чем аФЛ (параграф 3.2.4). Средние уровни и частота выявления антител к гормонам при угрожающем выкидыше выше, антител классов М и G к ХГЧ в 11,5 и 9,4 раза, антител к ПГ – в 7,4 и 8,1 раза выше, чем при физиологическом течении беременности. Тогда как ранее в группе женщин с вагинальным кровотечением и последующим самопроизвольным прерыванием беременности была продемонстрирована ассоциация антител к β2-ГП-I с угрожающим выкидышем на раннем сроке [538].

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют, что определение антител к ХГЧ и ПГ классов М и G имеет высокую диагностическую значимость для угрожающего выкидыша в I триместре беременности (AUC от 0,703 до 0,793). Риск развития угрозы прерывания беременности в I триместре у

пациенток с повышенным уровнем антител (IgM, IgG) к ХГЧ в 14,6 и 3,4 раза выше, антител к ПГ обоих классов в 5,3 раза выше по сравнению со здоровыми женщинами без антител к гормонам. При этом наиболее высокий риск наблюдается при наличии IgM-антител к ХГЧ. Антитела к ХГЧ и ПГ являются независимыми факторами риска угрожающего выкидыша на раннем сроке беременности.

При одновременном определении антител (IgM, IgG) к ХГЧ и ПГ их диагностическая значимость для угрожающего выкидыша возрастает. На основе проведенного логистического регрессионного анализа с использованием вычисленных коэффициентов регрессии составлено уравнение логит-функции, позволяющее определять вероятность угрожающего выкидыша на раннем сроке у женщин, серопозитивных на антитела к ХГЧ и ПГ, что имеет важное клиническое значение.

Одним из наиболее частых аутоиммунных этиологических факторов ПНБ считаются антифосфолипидные антитела, представляющие собой большое гетерогенное семейство антител, направленных к фосфолипидам, фосфолипид-связывающим протеинам плазмы и их комплексам. В настоящее время диагностика АФС не ограничивается определением только ВА, антител (IgM, IgG) к КЛ и β2-ГП-I, отнесенных к лабораторным классификационным критериям АФС, так как исследование более широкого спектра аФЛ повышает эффективность диагностики АФС у серонегативных пациентов [224]. Среди наиболее перспективных диагностических маркеров АФС рассматриваются антитела к домену I молекулы β2-ГП-I, IgA-антитела к КЛ и β2-ГП-I, антитела к Ан А5, ФЭ, ФС, ПТ и комплексу ФС/ПТ [414]. Патогенез АФС еще не полностью установлен, однако считается, что найденные аФЛ являются ответственными за клинические проявления АФС.

Положительный ВА и аКЛ у пациентов с первичным АФС значимо ассоциируются с повышенным риском тромбоза, особенно артериального [481]. Определение IgG-антител к β2-ГП-I позволяет идентифицировать пациентов с АФС и СКВ, имеющих более высокий риск венозного и артериального тромбоза

[198]. Двойная и тройная позитивность (ВА, аКЛ и/или аβ2-ГП-I) рассматриваются как фактор риска будущих тромботических событий, особенно у пациентов с АИЗ [435]. У серонегативных пациентов с идиопатическим артериальным и/или венозным тромбозом часто находят антитела к ФЭ. По мнению некоторых авторов, аФЭ могут служить независимым фактором риска тромбоза [74]. Антитела к ПТ и комплексу ФС/ПТ также рассматриваются как факторы риска тромботических событий [101]. При этом антитела к ФС/ПТ проявляют сильную прямую корреляционную связь с ВА и ассоциируются с более высоким риском тромбоза, чем аПТ.

Наличие ВА предрасполагает не только к венозному и артериальному тромбозу, но и к потере плода. ВА и аКЛ у женщин без АИЗ значимо ассоциируются с невынашиванием беременности на ранних и/или поздних сроках [112]. Определение аβ2-ГП-I позволяет дополнительно диагностировать АФС у беременных с плохим акушерским исходом, серонегативных на ВА и аКЛ [109]. Кроме того, повышенный уровень аβ2-ГП-I имеет предиктивное значение для потери беременности у женщин с положительным ВА [63]. У пациенток с ПАФС, позитивных более чем по одному типу аФЛ, отнесенных к лабораторным критериям АФС, часто наблюдаются неблагоприятные исходы беременности [480].

Результаты некоторых исследований показывают ассоциацию антител к Ан А5 с необъяснимым ПНБ или потерей плода при СКВ и предполагают, что антитела к Ан А5 могут служить независимым фактором риска акушерских осложнений [32, 100, 113]. Кроме того, у пациенток с ПНБ более часто по сравнению со здоровыми женщинами обнаруживаются антитела к ФЭ, которые рассматриваются как возможный фактор риска ПНБ на ранних сроках [77]. Продолжаются исследования диагностической значимости антител к комплексу ФС/ПТ для акушерского АФС [246]. Результаты немногочисленных исследований показывают ассоциацию аФС/ПТ с неблагоприятными исходами беременности. Предполагается, что аФС/ПТ могут быть фактором риска акушерских осложнений [81].

С учетом вышеизложенного, у женщин с ПНБ на ранних сроках исследовали спектр аФЛ, в который были включены антитела к КЛ, β2-ГП-I, Ан А5, ФЭ, ФС, ПТ и комплексу ФС/ПТ (параграф 3.2.3). Показано, что повышенные уровни аФЛ разной специфичности определяются у данных пациенток в 61,5% случаев, тогда как антитела, отнесенные к лабораторным критериям АФС, обнаруживаются только в 34,1% случаев. При этом антитела к β2-ГП-I выявляются чаще, чем антитела к ФС и ПТ.

У женщин с ПНБ часто определяются одиночные антитела к КЛ или β2-ГП-I и двойная позитивность на антитела к КЛ и β2-ГП-I, редко выявляется тройная позитивность, включающая также положительный тест на ВА. Положительная реакция на ВА отмечается при сочетании акушерской патологии с венозным тромбозом в анамнезе. Полученные нами результаты подтверждаются данными Alijotas-Reig J. и соавт. (2015) о более высокой частоте выявления у пациенток с акушерским АФС одиночных аФЛ, чем двойной и тройной позитивности на аФЛ [541], а также данными Clark C.A. и соавт. (2013) о низкой частоте выявления ВА (менее 1%) у женщин с ПВ на ранних сроках [548].

У большинства пациенток с ПНБ наблюдаются низкие (до 20 Ед/мл) или средние (от 20 до 60 Ед/мл) уровни антител к β2-ГП-I и/или КЛ. Тогда как у пациенток с венозным тромбозом в анамнезе отмечается позитивность по трем типам аФЛ, включенным в лабораторные критерии АФС, и значимо более высокие уровни IgG-антител к КЛ и β2-ГП-I. Эти результаты согласуются с данными Gardiner C. и соавт. (2013) о более высоком уровне антител к КЛ и β2-ГП-I у пациенток с тромбозом, преобладании низких титров аФЛ и отрицательном тесте на ВА у женщин с клиническими признаками акушерского АФС [217]. Показано, что традиционное лечение АФС значительно улучшает исходы беременности как у пациенток с подтвержденным АФС, так и у пациенток с низкими уровнями аФЛ [424].

Положительный ВА, тройная позитивность по аФЛ, включенным в лабораторные критерии АФС, и высокие титры аФЛ относятся к факторам риска акушерских осложнений [474]. Важно отметить, что пациентки с такими

факторами риска имеют низкие шансы рождения живых новорожденных (~30%). Кроме того, положительный тест на ВА и тройная позитивность на данные аФЛ могут служить признаками резистентной формы АФС, которая отличается плохим ответом на традиционную терапию.

Согласно результатам проведенного исследования, у женщин с ПНБ на ранних сроках кроме антител к КЛ и β2-ГП-I с высокой частотой определяются аФЛ другой специфичности, более часто антитела к Ан А5, ФС/ПТ и ФЭ. С ПНБ в значительной степени ассоциируются антитела к β2-ГП-I и Ан А5, а также IgG-антитела к КЛ, ФЭ и ФС/ПТ, которые выявляются чаще, чем у здоровых женщин без потерь беременности: антитела (IgM, IgG) к β2-ГП-I в 7,2 и 9,5 раза чаще, к Ан А5 - в 6 и 8,5 раза чаще, а IgG аФС/ПТ - в 6 раз чаще (таблицы 3.17 и 3.18).

Среди фосфолипид-связывающих протеинов именно β2-ГП-I считается главной мишенью аФЛ. Установлено, что β2-ГП-I-зависимые аФЛ обладают специфическим тропизмом к плацентарной ткани, по-видимому, обусловленным повышенной локальной экспрессией β2-ГП-I на трофобластических и децидуальных клетках [390], и оказывают влияние на многие функции этих клеток, приводя к нарушению формирования и развития плаценты. В частности, аФЛ вызывают индукцию апоптоза и повреждение эмбриональных и плацентарных клеток, ингибируют пролиферацию и дифференцировку клеток трофобласта, снижают инвазивность трофобласта, секрецию хорионического гонадотропина, нарушают дифференцировку клеток эндометрия и ангиогенез [417].

Антитела к β2-ГП-I индуцируют в молекуле β2-ГП-I конформационные изменения, которые повышают аффинность связывания β2-ГП-I с белковыми рецепторами клеточной поверхности. Комплексы β2-ГП-I с антителами могут связываться со многими рецепторами (например, TLR2 и TLR4, аннексином А2, гликопротеином 1bα и LRP8 в рецепторах LDL) на различных типах клеток, включая ЭК, тромбоциты, моноциты и трофобласты [200], и запускать внутриклеточный сигналинг и воспалительные ответы [62, 118, 409]. В то же время образование комплексов β2-ГП-I с антителами может индуцировать

активацию системы комплемента по классическому пути, местное воспаление и повреждение клеток [177, 178].

Несмотря на то, что во время дифференцировки клеток трофобласта и образования синцитиотрофобласта на поверхности клеток экспонируется ФС, по результатам данного исследования, именно антитела к β2-ГП-I, а не антитела к ФС ассоциируются с ПНБ на ранних сроках. У женщин с ПНБ антитела к β2-ГП-I преобладают среди аФЛ разной специфичности и выявляются значимо чаще, чем аФС, что согласуется с данными Alijotas-Reig J. и соавторов [59]. Полученные результаты подтверждаются данными недавнего систематического обзора литературы (2018), согласно которым независимая ассоциация между аФС и осложнениями беременности остается недоказанной [451]. В то же время, по мнению некоторых авторов, повышенные титры антител к ФС могут указывать на риск тромботических и акушерских проявлений АФС [434].

Согласно результатам данного исследования, у 42% пациенток, серонегативных на аФЛ, отнесенные к действующим лабораторным критериям АФС, выявляются аФЛ другой специфичности, часто обнаруживаются антитела к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ, реже к ПТ и ФС. Антитела к Ан А5 определяются чаще, чем антитела к ФС/ПТ, ПТ и ФС. По-видимому, определение антител к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ может способствовать более полному выявлению АФС у серонегативных пациенток с ПНБ на ранних сроках. Полученные результаты подтверждаются данными Mekinian A. и соавторов (2016), которые нашли антитела к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ у женщин с клиническими признаками акушерского АФС, серонегативных на традиционные критерии АФС [413].

В данном исследовании показано, что антитела к ФС, IgG-антитела к ФЭ и комплексу ФС/ПТ часто выявляются в сочетании с антителами к КЛ и β2-ГП-I. Между уровнями IgG-антител к КЛ, ФС и β2-ГП-I наблюдается сильная прямая корреляционная связь. Кроме того, слабая или средняя прямая корреляционная связь выявляется между IgG-антителами к ФС/ПТ и к КЛ, ФС и β2-ГП-I, а также между IgG-антителами к ФЭ и к КЛ, ФС. Это, по-видимому, объясняется методическими особенностями диагностических тестов, иммобилизацией на

твердую фазу комплексов фосфолипидов с фосфолипид-связывающими протеинами (β2-ГП-I или ПТ) и перекрестной реактивностью аФЛ с отрицательно заряженными фосфолипидами. Исключение составили антитела к Ан А5, так как эти антитела не коррелировали с аФЛ другой специфичности.

Анализ логистической регрессии показал, что из всех тестированных аФЛ именно IgG-антитела к β2-ГП-I и Ан А5 являются независимыми факторами риска ПНБ на ранних сроках. По результатам ROC-анализа, IgG-антитела к β2-ГП-I и Ан А5 имеют высокую диагностическую значимость для ПНБ на ранних сроках. Комбинация антител к КЛ и β2-ГП-I с антителами к Ан А5 обеспечивает повышение диагностической значимости для данной патологии (AUC 0,806, процент верного предсказания 73,3%). Так как антитела к Ан А5 часто выявляются у пациенток, серонегативных на антитела к КЛ и β2-ГП-I (в 25% случаев), их определение может способствовать повышению эффективности диагностики акушерского АФС, в связи с этим существует необходимость использования теста на аАн А5 в клинической практике для обследования женщин с ПНБ. Полученные результаты согласуются с данными Чепанова С.В. и соавторов (2014) [3] и подтверждаются результатами исследования Bećarević М. и соавторов (2016), демонстрирующими ассоциацию комбинаций IgM аАн А5+ВА и IgM аАн А5+ВА+IgM аβ2-ГП-I с ПНБ [133].

Следует подчеркнуть важное значение полученных результатов, так как в научной литературе приводятся противоречивые данные о диагностическом значении антител к Ан А5 при ПНБ. Некоторые авторы признают антитела к Ан А5 независимым фактором риска ПВ на ранних или поздних сроках [32, 69, 82, 484], другие показывают, что антитела к Ан А5 не имеют предиктивного значения для ПВ [51, 60]. В то же время установлено, что Ан А5 выполняет функцию естественного антикоагулянта и образует защитный щит над отрицательно заряженной фосфолипидной поверхностью трофобласта и эндотелия. Во время беременности Ан А5 локализуется на апикальной стороне плацентарного синцитиотрофобласта и по мере развития плаценты экспонируется в большом количестве [55]. По-видимому, огромное скопление эндогенного Ан А5 на

поверхности синцитиотрофобласта может вызвать образование антител, направленных против этого протеина. Нарушение сборки протективного щита из Ан А5 над фосфолипидной поверхностью трофобласта и эндотелия или его разрушение под воздействием аФЛ, распознающих ФЛ-связывающие протеины или непосредственно Ан А5, представляет важный механизм тромбоза и потери беременности при АФС [210]. Кроме того, антитела к Ан А5 могут индуцировать апоптоз в клетках трофобласта и эндотелия сосудов [558].

С помощью функционального анализа у пациенток с акушерским АФС часто выявляется резистентность к антикоагулянтной активности Ан А5 [472]. При этом у женщин с ПНБ отмечается низкий уровень Ан А5 в плазме и снижение способности Ан А5 к связыванию с фосфолипидами. Эти данные поддерживают концепцию о важном значении Ан А5 для сохранения беременности. Резистентность к антикоагулянтной активности Ан А5 рассматривается как возможный механизм потери беременности, ассоциированный с аФЛ [479].

По результатам данного исследования, у пациенток с ПНБ на ранних сроках, негативных на антитела к КЛ и β2-ГП-I, часто выявляются антитела к ФЭ (у 15%). Хотя аФЭ уступают по диагностической значимости антителам к β2-ГП-I и Ан А5, их определение может способствовать повышению эффективности диагностики АФС у серонегативных пациенток с ПНБ. В подтверждение полученных результатов, недавно показана высокая частота выявления аФЭ у пациентов с серонегативным АФС с помощью метода тонкослойной хроматографии [561]. Предполагается, что кининоген-зависимые аФЭ могут играть патогенетическую роль при ранних потерях беременности, вызывая нарушения в калликреин-кининовой системе, в частности, снижение антитромботической функции кининогенов [516].

В данном исследовании установлено, что антитела к комплексу ФС/ПТ ассоциируются с ПНБ на ранних сроках. Важно отметить, что несмотря на невысокую диагностическую значимость антител к ФС/ПТ для ПНБ на ранних сроках, эти антитела выявляются у женщин, серонегативных на ВА и антитела к

КЛ и β2-ГП-I, в 8,3% случаев. Идентификация аФС/ПТ может дополнительно диагностировать АФС в случаях, не выявленных рутинными методами диагностики АФС, что также отмечается в исследованиях Sanfelippo M.J. и соавт. (2013) [68] и Zigon P. и соавт. (2015) [81].

Согласно полученным результатам, антитела к комплексу ФС/ПТ выявляются у женщин с ПНБ на ранних сроках значимо чаще, чем антитела к ПТ (p=0,0369). Именно наличие аФС/ПТ (IgM, IgG), а не аПТ ассоциируется с ПНБ и представляет повышенный риск для развития патологии беременности. Определение аФС/ПТ может быть рекомендовано для обследования женщин с ПНБ. Полученные результаты подтверждаются данными недавнего международного мультицентрового исследования о высокой диагностической значимости IgG-антител к ФС/ПТ не только для сосудистого, но и для акушерского АФС [246]. Тест на аФС/ПТ признается пригодным для практического использования в обследовании женщин с ПНБ [212].

Предположение о том, что антипротромбиновые антитела могут содействовать потере беременности путем стимулирования тромбоза в микрососудах плаценты, подтверждается данными гистологического исследования [370]. Кроме того, антипротромбиновые антитела могут связываться с ПТ на поверхности клеток плацентарного трофобласта, экспонирующих ФС, приводя к активации комплемента, нарушению в системе передачи сигналов в клетках и апоптозу [420]. В свою очередь усиление апоптоза в гигантских клетках плаценты, экспонирующих ФС, может привести к нарушению развития плаценты, а в дальнейшем к задержке роста или потере плода [78]. В экспериментах на мышиной модели показана важная роль ПТ в развитии эмбриона, при дефиците ПТ наблюдается повреждение эмбрионов и повышенная неонатальная смертность [464].

Определение авидности аФЛ у пациенток с ПНБ с использованием хаотропного агента показало ее гетерогенность и частое выявление антител класса G со средним и высоким уровнем индекса авидности (параграф 3.2.3). Важно отметить высокую частоту выявления высокоавидных IgG-антител к КЛ,

β2-ГП-I и особенно Ан А5 (соответственно, 33,3%, 30% и 61,5%). У пациенток с тромботическими осложнениями в анамнезе наблюдается не только высокий уровень аФЛ, но и высокая авидность IgG-антител к КЛ и β2-ГП-I с ИА более 90%. Таким образом, с ПНБ на ранних сроках и тромбозом ассоциируются высокоавидные антитела к КЛ, β2-ГП-I и Ан А5. Эти результаты согласуются с данными Čučnik S. и соавт. (2012) об ассоциации высокоавидных аβ2-ГП-I с венозным тромбозом и акушерскими осложнениями при АФС [127, 291].

Анализ полученных данных показал, что ПНБ у женщин ассоциируется с повышенными уровнями антител к КЛ и β2-ГП-I подкласса IgG2, которые выявляются значимо чаще IgG-антител других подклассов (параграф 3.2.3). Тогда как у пациенток с аАн А5 значимых различий в частоте выявления IgG-антител функционально активных подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 не отмечается, в то же время наблюдается высокая частота выявления IgG-антител подкласса IgG4.

Результаты исследования согласуются с немногочисленными данными, демонстрирующими, что у пациентов с АФС и СКВ преобладают антитела к КЛ и β2-ГП-I подкласса IgG2 [325]. Показано, что аКЛ подкласса IgG2 ассоциируются с артериальным тромбозом и потерей плода, а их идентификация может быть полезным предиктором повышенного тромботического риска [73]. Антитела к β2-ГП-I подклассов IgG2 и IgG3 ассоциируются с венозным тромбозом и потерей плода. Так как антитела подклассов IgG2 и IgG3 различаются по своим эффекторным функциям, предполагается, что в патогенез тромбоза и потери плода вовлекаются разные механизмы, включающие активацию системы комплемента по классическому пути через связывание компонента комплемента C1q с иммунными комплексами и активацию тромбоцитов, мононуклеарных фагоцитов и нейтрофилов, а также нарушение функции клеток трофобласта, опосредованное Fcγ-рецепторами клеток.

Большой научный и практический интерес представляло исследование антител к иммунодоминантному домену I β2-ГП-I у женщин с ПНБ на ранних сроках. Для определения антител к β2-ГП-I и его домену I использовали автоматизированный хемилюминесцентный иммуноанализ. Среди преимуществ

метода ХЛИА следует отметить относительную простоту, экспрессность и производительность, возможность полной автоматизации, высокую чувствительность, специфичность и широкий диапазон определяемых концентраций с линейной зависимостью сигнала от содержания антител в крови. Сравнение результатов ИФА и ХЛИА при определении антител к β2-ГП-I показало хорошее совпадение в среднем и высоком диапазоне концентраций (92%), однако отмечались несовпадения при низких уровнях антител, что может быть следствием разной чувствительности и специфичности анализов, обусловленной различиями способов очистки и иммобилизации β2-ГП-I, свойств иммунореагентов и используемых стандартов. Важно отметить, что между уровнями IgM- и IgG-антител к β2-ГП-I, полученными с помощью ИФА и ХЛИА, наблюдалась сильная прямая корреляционная связь или средней силы.

Установлено, что IgG-антитела к домену I β2-ГП-I обнаруживаются у значительной части женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к β2-ГП-I. При этом между уровнями IgG-антител к β2-ГП-I и домену I, полученными с помощью ИФА и ХЛИА, отмечается выраженная прямая корреляционная связь. Следует отметить, что у женщин с ПНБ при уровне IgG-антител к β2-ГП-I выше 17,6 Ед/мл при определении методом ИФА имеется высокая вероятность наличия IgG-антител к домену I, в 41,3 раза выше, чем у женщин с низким уровнем антител.

Полученные данные о высокой частоте выявления антител к домену I у женщин с ПНБ, серопозитивных на антитела к β2-ГП-I, и высокой вероятности наличия антител к домену I при среднем и высоком уровне антител к β2-ГП-I имеют важное клиническое значение для стратификации пациенток с ПНБ по риску тромбоза и акушерской патологии. Показано, что ассоциация антител к домену I с тромбозом и осложнениями беременности является более выраженной, чем aβ2-ГП-I, определяемых с помощью традиционного анализа [66, 227].

Особый практический интерес представляло сравнение ИФА и иммуноблоттинга для определения аФЛ, преимуществом которого является мультиплексный подход, позволяющий выявлять до 10 разных аФЛ одновременно, а также плотное ориентированное расположение ФЛ на мембране

PVDF, обеспечивающее высокую чувствительность теста и широкий диапазон определения. При сравнении результатов исследования сывороток крови пациенток с ПНБ на антитела классов М и G к КЛ, ФС и β2-ГП-I с помощью ИФА и иммуноблоттинга показано хорошее совпадение результатов в диапазоне средних и высоких концентраций и сильная прямая корреляционная связь между выявленными уровнями антител. Выраженная корреляция и хорошее совпадение результатов двух анализов в диапазоне средних и высоких титров аФЛ предполагают перспективность использования иммуноблоттинга в качестве мультиплексного анализа для исследования профиля аФЛ у пациентов с множественной серологической позитивностью. Полученные нами результаты подтверждаются данными Ткаченко О.Ю. и соавторов (2017) о том, что метод иммуноблоттинга может быть использован в сочетании с классическими методами для серологической диагностики АФС [24].

Однако использование новых лабораторных тестов для диагностики АФС затрудняется из-за их недостаточной стандартизации. Источник и способ очистки антигена, тип сорбционной поверхности, состав буферных растворов для разведения, промывания и блокировки поверхности твердой фазы, условия проведения инкубации (температура, время) различаются у разных производителей. Кроме методических различий большое влияние на вариацию результатов оказывает отсутствие международных стандартов. Показано, что сходимость результатов определения аФЛ с помощью методов ИФА и иммуноблоттинга с использованием коммерческих тест-систем немецких фирм Euroimmun, Orgentec Diagnostica и Medipan варьировала от 20% до 88% [24]. Вопрос стандартизации иммуноферментных тест-систем различных производителей остается нерешенным.

Важную роль в патофизиологии АФС играет система комплемента. Активация системы комплемента ассоциируется с воспалением, повышенным отложением компонентов комплемента в поврежденных тканях и снижением их содержания в сыворотке крови. Гипокомплементемия часто выявляется у пациентов с ПАФС по снижению уровней компонентов комплемента С3, С4 и

CH50 активности, отражая активацию и потребление комплемента [179]. Образующиеся при расщеплении компонентов комплемента анафилотоксины C3a и C5a повышают сосудистую проницаемость, активируют тромбоциты и нейтрофилы, индуцируют экспрессию TF в нейтрофилах и способствуют высвобождению TNF-α из моноцитов с одновременной индукцией системного воспаления и гиперкоагуляции крови [183]. Так как повышенные уровни иммунных комплексов часто находят у пациентов с ПАФС, предполагается, что ЦИК, включающие комплексы ФЛ/аФЛ, потенциируют запуск активации комплемента по классическому пути, приводя к тромботическим событиям. При этом у пациентов с ПАФС отмечаются нормальные уровни регуляторных факторов комплемента, указывающие, что активация комплемента не вызвана их дефицитом [179]. У пациентов с АФС система комплемента активируется по классическому пути, который инициируется компонентом комплемента C1q. Этот субкомпонент является главным в защите от болезней иммунных комплексов.

В данном исследовании состояние системы комплемента оценивалось у пациенток с ПНБ по уровню компонентов комплемента C3 и C4 в сыворотке крови. Как известно, компонент комплемента C3 играет центральную роль в трех путях активации комплемента, включая классический, альтернативный и лектиновый, тогда как компонент комплемента C4 играет ключевую роль в активации классического пути комплемента. C4 является вторым компонентом комплемента после C1, принимающим участие в начальном этапе активации системы комплемента по классическому пути.

Установлено, что у пациенток, серопозитивных как на аФЛ, так и на аХГЧ, часто наблюдается гипокомплементемия, проявляющаяся снижением содержания компонентов комплемента C3 и C4 в крови ниже нормы и низким средним уровнем этих компонентов по сравнению со здоровыми женщинами, что может быть следствием их потребления в результате активации системы комплемента. Полученные результаты согласуются с данными Oku K. и соавторов (2009) о частом выявлении гипокомплементемии у пациентов с ПАФС [179], а также с данными Европейского регистра женщин с акушерским АФС об активации

системы комплемента по классическому пути и снижении уровня компонентов комплемента С3 и С4 почти у половины пациенток [541]. Все эти данные подтверждают важную роль системы комплемента в патогенезе акушерского АФС.

Особый научный интерес представляло исследование распространенности анти-С1q аутоантител у женщин с ПНБ и повышенной продукцией аФЛ и аХГЧ. Субкомпонент С1q, связываясь с иммунными комплексами, запускает активацию системы комплемента по классическому пути, участвует в клиренсе иммунных комплексов и апоптотических телец [359, 446], нарушение этих функций С1q способствует развитию аутоиммунитета.

В проведенном исследовании установлено, что у пациенток с ПНБ, серопозитивных на аФЛ или аХГЧ, с высокой частотой обнаруживаются анти-С1q антитела класса G, при этом уровни анти-С1q антител, аФЛ и аХГЧ не коррелируют между собой. Анти-С1q антитела выявляются чаще, а их средний уровень выше, чем у здоровых женщин. Риск повышенной продукции анти-С1q антител при наличии аФЛ в 9,3 раза выше, а при наличии аХГЧ – в 8,2 раза выше, чем у здоровых женщин. Полученные результаты согласуются с данными Oku K. и соавторов (2009) о высокой распространенности анти-С1q антител у пациентов с ПАФС [179].

Пока не сложилось единое мнение о патогенетическом значении анти-С1q антител. Предполагается, что при наличии в тканях иммунных комплексов, содержащих С1q, анти-С1q антитела могут усиливать местную активацию комплемента и повреждение тканей, а также активацию комплемента на апоптотических клетках [142, 300]. При этом увеличение количества связанного IgG и дополнительное генерирование С3 способствуют усилению активации комплемента по классическому пути. В то же время в экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что анти-С1q антитела пациентов с волчаночным нефритом могут ингибировать клиренс апоптотических клеток и активацию комплемента по классическому пути [71].

Хотя связывание антител с C1q в жидкой фазе является очень слабым, аффинность связывания повышается после взаимодействия C1q с иммунными комплексами вследствие изменения его конформации и экспонирования новых антигенных детерминант [278]. Кроме того, установлено, что молекулы C1q могут непосредственно взаимодействовать с фосфолипидами или фосфолипид-связывающими протеинами и активировать систему комплемента без участия иммунных комплексов [352, 386]. В связи с этим, учитывая высокую экспрессию анионных ФЛ на поверхности ткани/клеток у больных АФС, предполагается, что активация комплемента при АФС может происходить независимо от наличия иммунных комплексов, а аутоантитела к связанной форме C1q могут ее усиливать.

Последние публикации показывают важность серологических факторов риска акушерских осложнений, таких как профиль аФЛ с тройной позитивностью и высокие титры аФЛ. Несмотря на терапию низкими дозами аспирина и профилактику низкомолекулярными гепаринами, шанс живорождения у женщин с тройной позитивностью составляет только 30% **[**95]. Высокая частота ВА и тройная позитивность на аФЛ являются главными признаками резистентной формы АФС, при которой потеря беременности отмечается у 71% женщин на среднем сроке гестации 11[8-21] недель [474]. Предиктивная способность серологических показателей, полученных при выполнении тестов на аФЛ во время беременности, выше (91,8%), чем до беременности (82,5%). Проведение тестов в первом триместре считается оптимальным для выявления факторов риска акушерского АФС, ассоциированных с исходами беременности [594].

По данным Европейского регистра, у женщин с акушерским АФС в анамнезе преобладают ПВ на ранних сроках (у 54%) и потери плода на поздних сроках (у 31%) [541]. Наблюдается строгая корреляционная зависимость между наличием тройной позитивности на аФЛ или ВА и акушерскими осложнениями (ПВ, потерей плода, ранней преэклампсией/HELLP-синдромом, преждевременными родами и задержкой роста плода). Наиболее частыми фатальными осложнениями являются потеря плода на позднем сроке (17,8%) и

самопроизвольный выкидыш на раннем сроке (16,27%), а среди нефатальных - преждевременные роды (47,28%). У женщин с акушерским АФС случаи венозного тромбоза во время беременности являются редкими (1,21%), в послеродовом периоде тромбозы возникают в 8,5% случаев [541].

Важно отметить, что у женщин, серонегативных на действующие лабораторные критерии АФС, с нетрадиционными аФЛ (к аннексину А5, ФЭ, комплексу ФС/ПТ) проведение лечения АФС во время беременности приводит к значительному снижению потерь беременности и повышению частоты живорождения до 72% против 26% у нелеченных, что подтверждает необходимость включения данных тестов в обследование серонегативных женщин с ПНБ [413].

Современные стандарты лечения женщин с ПНБ и АФС базируются, главным образом, на антитромботической терапии, включающей антикоагулянтные и антиагрегантные препараты [22, 216, 383, 474]. При использовании комбинации низкой дозы аспирина и низкомолекулярного гепарина частота живорождения достигает 70-80% [22, 494]. У женщин с верифицированным диагнозом АФС эффективным методом является терапия НМГ в непрерывном режиме, начиная со II фазы предполагаемого фертильного цикла в течение всего I триместра [25].

Хотя патогенез АФС остается недостаточно изученным, установлена важная роль нарушений функции иммунной системы в развитии данной патологии и показана необходимость применения иммунотерапии для лечения АФС. В программе предгестационной подготовки при аутоиммунных процессах проводится эфферентная, иммуномодулирующая и антитромботическая терапия, при этом используется дифференцированный подход к подбору иммуномодулирующей терапии. Критериями эффективности проводимой предгестационной подготовки являются снижение уровня аФЛ, нормализация показателей иммунограммы и гемостазиограммы.

Выявление высоких титров аФЛ, активации системы комплемента и тромбофилии вне беременности свидетельствует о высокой активности

аутоиммунного процесса. В этом случае проводят эфферентную терапию (плазмаферез) с последующим применением препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения [7, 22]. Терапия иммуноглобулинами является одним из наиболее перспективных методов лечения АФС во время беременности [15]. Ее применение приводит к существенному улучшению течения беременности и родов у женщин с АФС, а также перинатальных исходов. При этом у пациенток отмечается значительное снижение уровней аФЛ и нормализация показателей гемостаза, восстановление баланса иммунокомпетентных клеток в периферической крови. По мнению Сидельниковой В.М. (2005), показаниями к назначению иммуноглобулинов для внутривенного введения служат высокий уровень лейкоцитоза со сдвигом формулы крови влево, повышенный уровень NK-клеток в периферической крови и провоспалительных цитокинов в крови или слизи цервикального канала [23]. Таким образом, выявление отклонений иммунного статуса служит основанием для выбора тактики лечения и иммуномодулирующей терапии.

Однако пациентки с показателями высокого риска часто имеют плохой ответ на традиционную терапию. При резистентных формах АФС комплексная терапия, включающая применение низких доз глюкокортикоидов, оказывающих иммуносупрессивное действие, является успешной у 90-95% беременных [22, 474]. Имеются доказательства важности дополнительной терапии у пациенток высокого риска с применением иммуномодулятора гидроксихлорохина, однако требуется проведение проспективных исследований для подтверждения ее эффективности и безопасности во время беременности [494, 594]. Создаются новые лекарства, оказывающие влияние на коагуляционные пути или обладающие иммуномодулирующим действием. Рассматриваются новые стратегии лечения АФС с использованием прямых оральных ингибиторов тромбина или фактора Ха, статинов, ингибиторов В-клеток и комплемента, прежде всего компонентов С3 и С5, пептидов, являющихся структурными аналогами доменов I и V β2-ГП-I [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования демонстрируют повышенное образование поликлональных антител к гормонам ХГЧ и ПГ у женщин с привычным невынашиванием беременности на ранних сроках. При этом группу риска составляют женщины с самопроизвольными репродуктивными потерями в I триместре беременности, с искусственными прерываниями беременности, инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза, частыми инфекционными заболеваниями и носительством возбудителей вирусных инфекций, аллергическими и аутоиммунными заболеваниями, применявшие ранее гормональные препараты или гормональные контрацептивы.

Высокая авидность IgG-антител к гормонам, преобладание IgG-антител функционально активных подклассов, прежде всего IgG1, взаимодействие антител с пептидной последовательностью β-ХГЧ, ответственной за биологическую активность гормона, ассоциация антител с повышенной активностью системы комплемента, образованием анти-C1q антител, нарушениями в системе гемостаза и акушерской патологией предполагают участие данных антител в патогенезе ПНБ. Эта гипотеза подтверждается также высокой распространенностью антител к ХГЧ и ПГ при угрожающем выкидыше на раннем сроке и их высокой диагностической значимостью для данной патологии. Наличие антител к ХГЧ во время беременности представляет высокий риск не только для угрожающего выкидыша в I триместре, но также для плацентарной недостаточности и раннего развития хронического ДВС-синдрома. При повышенном уровне аПГ имеется высокая вероятность развития гипоплазии хориона во время беременности и гипоплазии эндометрия и дисменореи вне беременности.

У женщин с привычным невынашиванием беременности определяется широкий спектр аФЛ, включающий кроме антител к КЛ, β2-ГП-I и ВА антитела к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ, которые часто выявляются у пациенток, серонегативных на антитела, отнесенные к лабораторным критериям АФС, их определение способствует повышению эффективности диагностики АФС. С ПНБ

ассоциируются IgG-антитела подкласса G2 к КЛ и β2-ГП-I со средним и высоким уровнем авидности и высокоавидные IgG-антитела к Ан А5 четырех подклассов. IgG-антитела к β2-ГП-I и Ан А5 являются независимыми факторами риска ПНБ на ранних сроках и имеют высокую диагностическую значимость для ПНБ. Антитела к Ан А5 представляют перспективный диагностический маркер акушерского АФС. Определение антител к Ан А5, ФЭ и ФС/ПТ рекомендуется использовать в рутинной лабораторной практике для обследования женщин с ПНБ.

Антитела к ХГЧ и аФЛ у женщин с ПНБ ассоциируются с активацией системы комплемента по классическому пути и высоким риском образования анти-C1q антител, способствующих усилению активации комплемента.

Совершенствование диагностики ПНБ обеспечивает возможность раннего выявления антител к гормонам и аФЛ на этапе планирования беременности у женщин групп риска и позволяет врачам проводить предгестационную подготовку женщин к беременности, осуществлять динамическое наблюдение за иммунологическими показателями, активностью системы комплемента и показателями гемостаза во время беременности, прогнозировать осложнения течения беременности и своевременно проводить их профилактику, контролировать эффективность лечения, что способствует благоприятному исходу беременности и повышению частоты живорождения.

Проведенное исследование демонстрирует патогенетическую взаимосвязь повышенного образования антител к гормонам и аФЛ с активацией системы комплемента, нарушениями гемостаза и акушерской патологией, что способствует развитию представлений об иммунопатологических процессах, содействующих потере беременности при привычном невынашивании, открывает перспективное направление для дальнейших исследований в области иммунологии репродукции, связанное с изучением иммунных патогенетических механизмов нарушения функции репродуктивной системы и патологии беременности, в частности, образования аутоантител к гормонам и их рецепторам,

а также поиска перспективных серологических маркеров АФС и создания новых диагностических тест-систем.

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 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 А5, фосфатидилэтаноламину и комплексу фосфатидилсерин/протромбин, которые выявляются у 42% пациенток, серонегативных на антитела к кардиолипину и β2-гликопротеину-I. При этом повышенные уровни антифосфолипидных антител обнаруживаются в 4,6-9,5 раза чаще, чем у здоровых женщин. Антитела к β2-гликопротеину-I и аннексину А5 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 А5 в комбинацию антител к кардиолипину и β2-гликопротеину-I повышает ее диагностическую значимость для привычного невынашивания (AUC 0,806).

5. Привычное невынашивание беременности на ранних сроках ассоциируется с высокоавидными 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 С109-119 и С109-145, 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 β2-гликопротеину-I с высоким и средним уровнем авидности и высокоавидные IgG-антитела к аннексину А5 четырех подклассов. У женщин, серопозитивных на антитела к β2-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 β2-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 С3 и С4 (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 и 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 β2-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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение антител к ХГЧ и ПГ в сыворотке (плазме) крови показано женщинам с ПНБ на ранних сроках и данными анамнеза об инфекционно-воспалительных заболеваний 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 ХГЧ и ПГ рекомендуется исследовать у женщин с ПНБ на этапе планирования беременности, что позволяет провести предгестационную подготовку женщин в соответствии с клиническим протоколом [22]. Из-за высокого риска развития осложнений беременности серопозитивным женщинам во время беременности рекомендуется мониторинг уровня антител (1 раз в месяц). Патогенетическое значение антител оценивается по уровню IgM- и IgG-антител (>30 Ед/мл), авидности IgG-антител (ИА>70%), преобладанию антител функционально активных подклассов IgG1 и IgG2, специфичности антител к эпитопу С109-145, ответственному за биологическую активность ХГЧ.

3. Для диагностики АФС женщинам с привычным невынашиванием рекомендуется в период планирования или на ранних сроках беременности проводить определение волчаночного антикоагулянта, антител к кардиолипину и β2-гликопротеину-I классов M и G 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 аФЛ проводится предгестационная подготовка женщин в соответствии с клиническим протоколом [22]. Патогенетическое значение аФЛ оценивается по уровню IgM- и IgG-антител, авидности IgG-антител (ИА>70%), преобладанию антител подкласса IgG2 к КЛ и β2-ГП-I, специфичности антител к домену I β2-ГП-I. Во время беременности проводятся повторные исследования аФЛ для контроля эффективности проводимой терапии.

4. Для дополнительной оценки активности аутоиммунного процесса у женщин с антителами к ХГЧ, ПГ и аФЛ рекомендуется проводить исследование состояния системы комплемента по уровню компонентов комплемента С3 и С4, циркулирующих иммунных комплексов и анти-С1q антител, способных усиливать активацию комплемента. Комплексная диагностика позволяет уточнить патогенез привычного невынашивания беременности и активность аутоиммунного процесса, прогнозировать течение и исход беременности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АИЗ – аутоиммунные заболевания

АИТ – аутоиммунный тиреоидит

АНА – антинуклеарные антитела

Ан А5 – аннексин А5

анти-дсДНК – антитела к двуспиральной ДНК

АОА – антиовариальные антитела

аПГ – антитела к прогестерону

АПК – антигенпрезентирующие клетки

аФЛ – антифосфолипидные антитела

АФС – антифосфолипидный синдром

аХГЧ – антитела к хорионическому гонадотропину человека

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

БДА – белок-диссоциирующий агент

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВА – волчаночный антикоагулянт

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВПГ – вирус простого герпеса

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр

Гем – гемоцианин

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости

ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свёртывание

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИА – индекс авидности

ИФА – иммуноферментный анализ

КВ – коэффициент вариации

КЛ – кардиолипин

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ЛПС – липополисахарид

МКАТ – моноклональные антитела

МНО – международное нормализованное отношение

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НЛФ – недостаточность лютеиновой фазы

ОНП – однонуклеотидный полиморфизм

ОП – оптическая плотность

ПАФС – первичный антифосфолипидный синдром

ПВ – привычный выкидыш

ПГ – прогестерон

ПМС – предменструальный синдром

ПНБ – привычное невынашивание беременности

ПНЯ – преждевременная недостаточность яичников

ПРЛ – пролактин

ПТ – протромбин

ПТМ – посттрансляционные модификации

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

РКМФ – растворимые комплексы мономеров фибрина

РНК – рибонуклеиновая кислота

САГ – суперантиген

СКВ – системная красная волчанка

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

ТМБ – тетраметилбензидин

ТТГ – тиреотропный гормон

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФС – фосфатидилсерин

ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ФС/ПТ – комплекс фосфатидилсерина с протромбином

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ХГ – хорионический гонадотропин

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ХГЧ-Г – гипергликозилированный ХГЧ

ЦМВ – цитомегаловирус

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

APC – активированный протеин С (англ. activated protein C)

ApoER2 – аполипопротеин-Е рецептор 2 (англ. Apolipoprotein E receptor 2)

ASIA – аутоиммунный/воспалительный синдром, индуцированный адъювантами (англ. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants)

AUC – площадь под кривой (англ. Area Under Curve)

Bcl-6 – белок 6 В-клеточной лимфомы (англ. B-cell lymphoma protein 6)

BCR – В-клеточный рецептор (англ. B Cell Receptor)

CCL – хемокин СС-семейства (англ. CC chemokine ligands)

CCR – рецепторы хемокинов СС-семейства (англ. CC chemokine receptors)

CD – кластер дифференцировки (англ. cluster of differentiation)

CR – рецепторы комплемента (англ. Complement receptors)

CI – доверительный интервал (англ. confidential interval)

CpG – участки ДНК, содержащие цитозин и гуанин, разделенные фосфатом

cut off – порог отсечки положительного результата

CV – критериальное значение (англ. criterion value)

DAF – фактор ускорения распада (англ. decay-accelerating factor)

DNMT – ДНК-метилтрансфераза (англ. DNA methyltransferase)

dRVVT – время разведенного яда гадюки Рассела (англ. dilute Russell's viper venom time)

EGF – эпидермальный фактор роста (англ. epidermal growth factor)

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (англ. epidermal growth factor receptor)

FcγR – рецепторы к константной области иммуноглобулинов класса G

FITC – флуоресцеина изотиоцианат (англ. fluorescein isothiocyanate)

FOXP3 – транскрипционный фактор регуляторных Т-лимфоцитов (англ. forkhead box P3)

HLA – человеческие лейкоцитарные антигены (англ. human leukocyte antigens)

ICAM-1 –молекула межклеточной адгезии 1 (англ. Inter-Cellular Adhesion Molecule 1)

IFN – интерферон (англ. Interferon)

Ig – иммуноглобулин (англ. Immunoglobulin)

IGF – инсулиноподобный фактор роста (англ. Insulin like growth factor)

IGF-BP-1 – протеин-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста (англ. Insulin like growth factor binding protein 1)

IL – интерлейкин (англ. Interleukin)

LIF – лейкемия-ингибирующий фактор (англ. leukemia inhibitory factor)

M – средняя (англ. mean)

m – стандартная ошибка средней

MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы (англ. mitogenic-activated protein kinase)

M-CSF – колониестимулирующий фактор макрофагов (англ. macrophage colony-stimulating factor)

MCP – мембранный кофакторный протеин (англ. membrane cofactor protein)

MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1 (англ. monocytic chemotactic protein 1)

Me – медиана (англ. median value)

MMP – матриксные металлопротеиназы (англ. Matrix metalloproteinase)

MTHFR – метилентетрагидрофолат редуктаза (англ. methylene tetra hydro folate reductase)

MyD88 –белок-88 миелоидной дифференцировки первичного генного ответа (англ. Myeloid differentiation primary response protein 88)

NF-κB – нуклеарный фактор транскрипции κB (англ. nuclear transcription factor κB)

NK-клетки – натуральные (естественные) киллерные клетки (англ. natural killer cells)

NPV – отрицательная прогностическая значимость (англ. negative predictive value)

OR – отношение шансов (англ. odds ratio)

PAD – пептидиларгинин деиминаза (англ. peptidylarginine deiminase)

PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена типа I (англ. plasminogen activator inhibitor 1)

PE – фикоэритрин (англ. Phycoerythrin)

PIBF – прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (англ. Progesterone-induced-blocking factor)

PKC – протеинкиназа C (англ. Protein kinase C)

PPV – положительная прогностическая значимость (англ. positive predictive value)

ROC – рабочая характеристика приёмника (англ. Receiver Operator Characteristic)

SD – стандартное отклонение (англ. standard deviation)

Se – чувствительность (англ. sensitivity)

Sp – специфичность (англ. specificity)

STAT – трансдуктор сигнала и активатор транскрипции (англ. Signal transducer and activator of transcription)

TCR – Т-клеточный рецептор (англ. T cell receptor)

TF – тканевой фактор (англ. Tissue factor)

TIMP – тканевые ингибиторы металлопротеиназ (англ. tissue inhibitor of metalloproteinase)

TGF – трансформирующий фактор роста (англ. transforming growth factor)

Th – Т-хелперы (англ. T-helper)

TLR – толл-подобные рецепторы (англ. Toll-like receptors)

TNF – фактор некроза опухоли (англ. tumor necrosis factor)

tPA – тканевой активатор плазминогена (англ. tissue-type plasminogen activator)

Treg – регуляторные Т-клетки (англ. regulatory T-cells)

VCAM-1 – молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (англ. Vascular cell adhesion molecule 1)

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста (англ. vascular endothelial growth factor)

VEGFR – рецепторы сосудистого эндотелиального фактора роста (англ. vascular endothelial growth factor receptors)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллергия и аутоиммунитет: молекулярная диагностика, терапия и возможные механизмы развития / А.С. Арефьева [и др.] // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51, № 2. – С. 227–239.

2. Антитела к Clq при системной красной волчанке биологический маркер активности, предиктор развития нефрита и неблагоприятного жизненного прогноза / М.Э. Цанян, Е.Н. Александрова, С.К. Соловьев, Е.Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, № 1. – С.71-75.

3. Антитела к аннексину V у женщин с привычным невынашиванием беременности / С.В. Чепанов [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2014. - № 7. – С. 29-32.

4. Антитела к гормонам репродуктивной системы как возможный фактор риска неблагоприятного исхода в циклах экстракорпорального оплодотворения / И.В. Менжинская [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2012. - № 2. - С. 41-45.

5. Антифосфолипидный синдром – иммунная тромбофилия в акушерстве и гинекологии / А.Д. Макацария [и др.]. - М.: Триада-Х, 2007. – 456 с.

6. Антифосфолипидный синдром и беременность / Ж.-К. Гри [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. - № 10. – С. 5-11.

7. Антифосфолипидный синдром при невынашивании беременности / Т.Н. Шляхтенко [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т. LXIV, Вып. 5. – С. 69-76.

8. Аутоантитела (антиовариальные, антифосфолипидные, антинуклеарные, антитела к ДНК и к половым гормонам) у женщин с болезнью Грейвса и аутоиммунным тиреоидитом / С.Г. Перминова [и др.] // Материалы XIII международного конгресса по реабилитации в медицине и иммунореабилитации, Дубай, ОАЭ, 2008. - Аллергология и иммунология. - 2008. - Т. 9. - № 1. - С. 86.

9. Диагностическое и прогностическое значение антител к кардиолипину, β2-гликопротеину I и протромбину при антифосфолипидном

синдроме / Е.Н. Александрова [и др.] // Клинико-лабораторный консилиум. - 2009. - № 2. - С. 47-58.

10. Долгушина, Н.В. Роль вирусной инфекции в генезе антифосфолипидного синдрома у беременных женщин / Н.В. Долгушина, А.Д. Макацария // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 26-30.

11. Заморина, С.А. Хорионический гонадотропин – фактор индукции иммунной толерантности при беременности / С.А. Заморина, С.В. Ширшев // Иммунология. – 2013. - № 2. - С.105-107.

12. Иммунологические маркеры антифосфолипидного синдрома. Часть I – антифосфолипидные антитела / Е.Н. Александрова [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2009. - № 5. – С. 30-37.

13. Иммунологические маркеры антифосфолипидного синдрома. Часть II – маркеры повреждения эндотелия, воспаления и активации клеточного иммунитета / Е.Н. Александрова [и др.] // Научно-практическая ревматология. - 2010. - № 5. – С. 67-74.

14. Кирющенков, П.А. Особенности ведения женщин с аутосенсибилизацией к хорионическому гонадотропину человека / П.А. Кирющенков // Гинекология. – 2003. - Том 5, № 5. – Р. 222-224.

15. Клинико-иммунологическое обоснование использования иммуноглобулинов для внутривенного введения в лечении антифосфолипидного синдрома при беременности / С.А. Сельков [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. LXI, Вып. 2. – С. 5-11.

16. Макацария, А.Д. К вопросу о ДВС-синдроме в акушерстве: новое о старом / А.Д. Макацария // Практическая медицина. – 2010. – Т. 4, № 43. – С. 25-37.

17. Острякова, Е.В. Антифосфолипидный синдром и система фибринолиза / Е.В. Острякова, Л.И. Патрушев, Т.М. Решетняк // Научно-практическая ревматология. – 2011. - № 6. – С. 57-64.

18. Патогенетическое значение антифосфолипидных антител / А.Д. Макацария [и др.] // Практическая медицина. – 2012. – Т. 5, № 60. – С. 9-21.

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

20. Роль гестагенов в лечении бесплодия и невынашивания беременности / К.В. Краснопольская [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2011. - № 2. – С. 21-23.

21. Сельков, С.А. Иммунорегуляторные эффекты иммуноглобулинов для внутривенного введения / С.А. Сельков, Д.И. Соколов, С.В. Чепанов // Медицинская иммунология. – 2013. - Т. 15, № 1. – С. 5-12.

22. Сидельникова, В.М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием: методическое пособие и клинические протоколы / В.М. Сидельникова. - М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 224 с.

23. Сидельникова, В.М. Привычная потеря беременности / В.М. Сидельникова // М.: Триада-Х. – 2005. – 304 с.

24. Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител / О.Ю. Ткаченко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика – 2017. – Т. 62, № 1. – С. 40-44.

25. Тетруашвили, Н.К. Ведение беременности у женщин с привычным выкидышем, обусловленным иммунологическими нарушениями / Н.К. Тетруашвили, А.А. Агаджанова, Т.Б. Ионанидзе // Consilium Medicum. – 2010. –Т. 12, № 6. – С. 34-38.

26. Цырлина, Е.В. Хорионический гонадотропин как маркер трофобластической болезни / Е.В. Цырлина, Т.Е. Порошина // Практическая онкология. – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 150-159.

27. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force report on obstetric antiphospholipid syndrome / G.R. de Jesus [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2014. – Vol. 13, № 8. – P. 795–813.

28. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends / M.L. Bertolaccini [et al.] // Autoimmun Rev. – 2014. – Vol.13, № 9. – P. 917-930.

29. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells / M. Vega-Ostertag [et al.] // Br. J. Haematol. – 2006. – Vol. 135, № 2. – P. 214–219. 33

30. A map of the hCG beta-LH beta gene cluster / P.F. Policastro [et al.] // J. Biol. Chem. - 1986. – Vol. 261, № 13. – P. 5907–5916.

31. A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-β2 glycoprotein I antibodies / K.L. Allen [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 119, № 3. – P. 884–893.

32. A prospective study of 1038 pregnancies on the predictive value of anti-annexin V antibodies for foetal loss / N. Bizzaro [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2005. - Vol. 1050. – P. 348–356.

33. A prospective study of antibodies to beta2-glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis / R. Forastiero [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 3, № 6. – P. 1231–1238.

34. A role for uric acid and the Nalp3 inflammasome in antiphospholipid antibody-induced IL-1beta production by human first trimester trophoblast [Electronic resource] / M.J. Mulla [et al.] // PLoS One. - 2013. – Vol. 8, № 6. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3675211/

35. A thrombin-cross-reactive anticardiolipin antibody binds to and inhibits the anticoagulant function of activated protein C / K.K. Hwang [et al.] // Arthritis Rheum. – 2003. – Vol. 48, № 6. – P.1622–1630.

36. A unique preliminary study on placental apoptosis in mice with passive immunization of anti-phosphatidylethanolamine antibodies and anti-Factor XII antibodies / S. Velayuthaprabhu [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 66, № 5. – P. 373–384.

37. Absence of autoantibodies to human chorionic gonadotropin in women with a history of habitual abortion / M. Tulppala [et al.] // Fertil. Steril. – 1992. – Vol. 58, № 5. – P. 946-949.

38. Abu-Shakra, M. Natural hidden autoantibodies / M. Abu-Shakra, Y. Shoenfeld // Isr. Med. Assoc. J. – 2007. – Vol. 9, № 10. – P. 748-749.

39. Action of anticardiolipin and antibodies to beta2-glycoprotein-I on trophoblast proliferation as a mechanism for fetal death / L.W. Chamley [et al.] // Lancet. – 1998. – Vol. 352, № 9133. – P. 1037–1038.

40. Adjuvants and autoimmunity / E. Israeli, N. Agmon-Levin, M. Blank, Y. Shoenfeld // Lupus. – 2009. – Vol. 18, № 13. – P. 1217-1225.

41. Adler, R.R. Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR / R.R. Adler, A.K. Ng, N.S. Rote // Biol. Reprod. – 1995. – Vol. 53, № 4. – P. 905–910.

42. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells / M. Kool [et al.] // J. Exp. Med. – 2008. – Vol. 205, № 4. – P. 869-882.

43. Amyloid-DNA composites of bacterial biofilms stimulate autoimmunity / P.M. Gallo [et al.] // Immunity. – 2015. – Vol. 42, № 6. – P.1171–1184.

44. An immunoreactive peptide of the FSH involved in autoimmune infertility / B. Gobert [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. - Vol. 289, № 4. – P. 819–824.

45. An international multicentre-laboratory evaluation of a new assay to detect specifically lupus anticoagulants dependent on the presence of anti-beta2-glycoprotein autoantibodies / B. de Laat [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2011. – Vol. 9, № 1. – P.149-153.

46. Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium / S. Berndt [et al.] // FASEB J. – 2006. – Vol. 20, № 14. – P. 2630–2632.

47. Annexin A5 as a potential marker in tumors / B. Peng [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2014. – Vol. 427. – P. 42–48.

48. Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity / X. Wang [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1999. – Vol. 180, № 4. – P. 1008–1016.

49. Annexinopathies / M.J. Hayes, R.E. Longbottom, M.A. Evans, S.E. Moss // Subcell. Biochem. – 2007. – Vol. 45. – P. 1-28.

50. Anti-annexin A5 antibodies in women with spontaneous pregnancy loss / J. Alijotas-Reig [et al.] // Med. Clin. (Barc.) – 2010. – Vol. 134, № 10. – P. 433–438.

51. Antiannexin as a marker in patients with recurrent miscarriages / A. Rezk [et al.] // Middle East Fertil. Soc. J. - 2010. – Vol. 15. – P. 47–50.

52. Anti-annexin II antibody is associated with thrombosis and/or pregnancy morbidity in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus with thrombosis / W. Ao [et al.] // Rheumatol. Int. – 2011. – Vol. 31, № 7. – P. 865-869.

53. Anti-annexin V antibodies in patients with early pregnancy loss of implantation failure / H. Matsubayashi [et al.] // Fertil. Steril. – 2001. – Vol. 76, № 4. – P. 694–699.

54. Anti-annexin V antibodies sera of patients with habitual foetal loss or preeclampsia / J. Matsuda [et al.] // Thromb. Res. – 1994. – Vol. 75, № 1. – P. 105–106.

55. Anti-annexin V antibodies: are they prothrombotic? / G. Esposito [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2005. – Vol. 4, № 1. – P. 55–60.

56. Anti-annexin V IgM and IgG autoantibodies and the risk of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage / M.S. Sater [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 89, № 1. – P. 78–83.

57. Anti beta 2glycoprotein I antibodies and lupus anticoagulant in patients with recurrent pregnancy loss: prevalence and clinical significance / M. Ogasawara [et al.] // Lupus. – 1996. – Vol. 5, № 6. – P. 587-592.

58. Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome / M. Galli, D. Luciani, G. Bertolini, T. Barbui // Blood. – 2003. – Vol. 102, № 8. – P. 2717–2723.

59. Anti-beta(2)-glycoprotein-I and anti-phosphatidylserine antibodies in women with spontaneous pregnancy loss / J. Alijotas-Reig [et al.] // Fertil. Steril. – 2010. – Vol. 93, № 7. – P. 2330–2336.

60. Anti-beta2 glicoprotein I and of anti-annexin V antibodies in women with recurrent miscarriages / J. Arnold [et al.] // Br. J. Haematol. – 2001. – Vol. 113, № 4. – P. 911–914.

61. Anti-beta-2 glycoprotein I antibodies affect Bcl-2 and Bax trophoblast expression without evidence of apoptosis / N. Di Simone [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1069. – P. 364–76.

62. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid antibodies: association with increased excretion of platelet-derived thromboxane urinary metabolites / R. Forastiero [et al.] // Thromb. Haemost. – 1998. – Vol. 79, № 1. – P. 42–45.

63. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies are associated with pregnancy loss in women with the lupus anticoagulant / T. Sailer [et al.] // Thromb. Haemost. – 2006. – Vol. 95, № 5. – P. 796-801.

64. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts / M. Sorice [et al.] // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56, № 8. – P. 2687-2697.

65. Antibodies against the activated coagulation factor X (FXa) in the antiphospholipid syndrome that interfere with the FXa inactivation by antithrombin / Y.H. Yang [et al.] // J. Immunol. – 2006. – Vol. 177, № 11. – P. 8219–8225.

66. Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS) / A. Banzato [et al.] // Thromb. Res. – 2011. – Vol. 128, № 6. – P. 583–586.

67. Antibodies to phosphatidylethanolamine as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thromboses / M. Sanmarco [et al.] // Thromb. Haemost. – 2001. – Vol. 85, № 5. – P. 800-805.

68. Antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex in suspected antiphospholipid syndrome in the absence of antibodies to cardiolipin or Beta-2-glycoprotein I / M.J. Sanfelippo [et al.] // Lupus. – 2013. – Vol. 22, № 13. – P. 1349-1352.

69. Antibodies to β2- glycoprotein I and annexin V in women with early and late idiopathic recurrent spontaneous abortions / W. Zammiti [et al.] // Arch. Gynecol. Obstet. – 2006. – Vol. 274, № 5. – P. 261–265.

70. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity / A. Ruffatti [et al.] // Thromb. Haemost. – 2006. – Vol. 96, № 3. – P. 337-341.

71. Anti-C1q autoantibodies from active lupus nephritis patients could inhibit the clearance of apoptotic cells and complement classical pathway activation mediated by C1q in vitro / Y. Pang, [et al.] // Immunobiol. – 2014. – Vol. 219, № 12. – P. 980-989.

72. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity / A.E. Gharavi [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 1987. – Vol. 46, № 1. – P. 1–6.

73. Anticardiolipin IgG subclasses: association of IgG2 with arterial and/or venous thrombosis / L.R. Sammaritano [et al.] // Arthritis Rheum. - 1997. – Vol. 40, № 11. – P. 1998-2006.

74. Antigenic profile, prevalence, and clinical significance of antiphospholipid antibodies in women referred for in vitro fertilization / M. Sanmarco [et al.] // Ann. N Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1108. – P. 457–465.

75. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies / M. Sanmarco [et al.] // Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 97, № 6. – P. 949–954.

76. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies detected by ELISA. II. Kininogen reactivity / M.C. Boffa [et al.] // J. Rheumatol. – 1996. – Vol. 23, № 8. – P. 1375–1379.

77. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss / T. Sugi [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2004. – Vol. 30, № 4. – P. 326–332.

78. Antiphosphatidylserine antibodies affect rat yolk sacs in culture: a mechanism for fetal loss in antiphospholipid syndrome / S.T. Matalon [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2004. – Vol. 51, № 2. – P.144-151.

79. Anti-phosphatidylserine, anti-cardiolipin, anti-β2 glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in recurrent miscarriage at 8–12 gestational weeks / M.S. Sater [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2012. – Vol. 163, № 2. – P. 170–174.

80. Antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies (aPS/PT) as potential markers of antiphospholipid syndrome / A. Vlagea [et al.] // Clin. Appl. Thromb./ Hemost. – 2013. - Vol. 19, № 3. – P. 289–296.

81. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin antibodies are associated with adverse pregnancy outcomes [Electronic resource] / P. Žigon [et al.] // J. Immunol. Res. – 2015. – Vol. 2015. - Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452858/

82. Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nimes Obstetricians and Haematologists Study–NOHA / J.C. Gris [et al.] // Thromb. Haemost. – 2000. – Vol. 84, № 2. – P. 228–236.

83. Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a "lupus procoagulant" phenomenon / J.H. Rand [et al.] // Blood. – 1998. – Vol. 92, № 5. – P. 1652-1660.

84. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered beta2-glycoprotein I / N. Di Simone [et al.] // Arthritis Rheum. – 2000. – Vol. 43, № 1. – P.140–150.

85. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only / Z. Ulcova-Gallova [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2005. – Vol. 54, № 2. – P. 112–117.

86. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms / S.S. Pierangeli [et al.] // Semin. Thromb. Hemost. – 2008. – Vol. 34, № 3. – P. 236–250.

87. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo / S.S. Pierangeli [et al.] // Circulation. – 1999. – Vol. 99, № 15. – P. 1997–2002.

88. Anti-phospholipid antibodies increase non-apoptotic trophoblast shedding: a contribution to the pathogenesis of pre-eclampsia in affected women? / Q. Chen [et al.] // Placenta. – 2009. – Vol. 30, № 9. – P. 767–773.

89. Antiphospholipid antibodies induce a pro-inflammatory response in first trimester trophoblast via the TLR4/MyD88 pathway / M.J. Mulla [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2009. – Vol. 62, № 2. – P. 96–111.

90. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells / N. Prinz [et al.] // Blood. – 2011. – Vol.118, № 8. – P. 2322–2332.

91. Antiphospholipid antibodies internalised by human syncytiotrophoblast cause aberrant cell death and the release of necrotic trophoblast debris / C.A. Viall [et al.] // J. Autoimmun. – 2013. – Vol. 47. – P. 45–57.

92. Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity / M.J. Mulla [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2010. – Vol. 63, № 5. - 339–348.

93. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β2GPI and apoER2 / S. Ramesh [et al.] // J. Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121, № 1. – P.120-131.

94. Antiphospholid antibodies regulate the expression of trophoblast cell adhesion molecules / N. Di Simone, R. Castellani, D. Caliandro, A. Caruso // Fertil. Steril. – 2002. – Vol. 77, № 4. – P. 805–811.

95. Antiphospholipid antibody profile based obstetric outcomes of primary antiphospholipid syndrome: the pregnants study/ G. Saccone [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2017. – Vol. 216, № 5. – P. 525.e1-525.e12.

96. Antiphospholipid antibody profiling: time for a new technical approach? / D. Roggenbuck [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 11. – P. 821–826.

97. Antiphospholipid immunoglobulin G antibodies reduce annexin-V levels on syncytiotrophoblast apical membranes and in culture media of placental villi / J.H. Rand [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1997. –Vol. 177, № 4. – P. 918–923.

98. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis / T.D.S. Santos [et al.] // J. Reprod. Immunol. - 2017. – Vol. 123. – P. 78-87.

99. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics of 100 patients / R. Cervera [et al.] // Ann Rheum Dis. – 2004. – Vol. 63, № 10. – P. 1312–1317.

100. Antiphospholipid/antiprotein antibodies, haemostasis related autoantibodies, and plasma homocystein as risk factor for first pregnancy loss: a matched case control study / J.C. Gris, T.V. Perneger, I. Quéré et al. // Blood. - 2003. – Vol. 102, № 10. – P. 3504–3513.

101. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review / S. Sciascia [et al.] // Thromb. Haemost. – 2014. – Vol. 111, № 2. – P. 354-364.

102. Anti-prothrombin antibodies are associated with adverse pregnancy outcome / L. Marozio [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2011. - Vol. 66, № 5. - P. 404–409.

103. Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems. Prevalence and clinical significance in systemic lupus erythematosus / M.L. Bertolaccini [et al.] // Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 93, № 2. – P. 289-297.

104. Antiprothrombin autoantibodies in severe preeclampsia and abortion / T. Akimoto [et al.] // The Am. J. Med. – 2001. - Vol. 110, № 3. – P. 188–191.

105. Anti-β2-glycoprotein I IgG antibodies from 1-year old healthy children born to mothers with systemic autoimmune diseases preferentially target domain 4/5: might it be the reason of their innocent profile? / L. Andreoli [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2011. – Vol. 70, № 2. – P. 380–383.

106. Anti-β2GPI-DI antibodies are a marker of APS severity / N. Agmon-Levin [et al.] // Arthritis Rheum. - 2013. – Vol. 65. – P. S1.

107. ApoE Receptor 2 mediates trophoblast dysfunction and pregnancy complications induced by antiphospholipid antibodies in mice / V. Ulrich [et al.] // Arthritis Rheumatol. – 2016. – Vol. 68, № 3. – P. 730–739.

108. Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus / J.W. Dieker [et al.] // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 1921–1933.

109. Are anti-beta-glycoprotein-I antibodies markers for recurrent pregnancy loss in lupus anticoagulant/anticardiolipin seronegative women? / J. Alijotas-Reig [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2008. – Vol. 60, № 3. – P. 229-237.

110. Asherson, R.A. Antiphospholipid antibodies and infections / R.A. Asherson, R. Cervera // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – Vol. 62, № 5. – P. 388-393.

111. Aspirin-triggered lipoxin prevents antiphospholipid antibody effects on human trophoblast migration and endothelial cell interactions / A.M. Alvarez [et al.] // Arthritis Rheum. – 2015. – Vol. 67, № 2. – P. 488–497.

112. Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis / L. Opatrny [et al.] // J. Rheumatol. – 2006. – Vol. 33, № 11. – P. 2214-2221.

113. Association between the prevalence of antibodies to beta(2)-glycoprotein I, prothrombin, protein C, protein S, and annexin V in patients with systemic lupus erythematosus and thrombotic and thrombocytopenic complications / J. Nojima [et al.] // Clin. Chem. – 2001. – Vol. 47, № 6. – P.1008–1015.

114. Association between the valine/leucine247 polymorphism of β2-glycoprotein I and susceptibility to anti-phospholipid syndrome: a meta-analysis / Y.H. Lee [et al.] // Lupus. – 2012. – Vol. 21, № 8. – P. 865–871.

115. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant / T. Atsumi [et al.] // Arthritis Rheum. – 2000. – Vol. 43, № 9. – P. 1982–1993.

116. Autoantibodies against complement component 1 q subcomponent (C1q) contribute to complement activation and recurrent thrombosis/pregnancy morbidity in

antiphospholipid syndrome / K. Oku [et al.] // Rheumatol. (Oxford). – 2016. – Vol. 55, № 8. – P. 1403–1411.

117. Autoantibodies against domain I of beta2-glycoprotein indicate an increased risk for thrombosis in antiphospholipid patients. A prospective cohort study / S. Zuily [et al.] // Arthritis Rheum. – 2013. – Vol. 65. – P. S1130.

118. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome / G. Cesarman-Maus [et al.] // Blood. – 2006. – Vol. 107, № 11. – P. 4375–4382.

119. Autoantibodies specific to a peptide of β2-glycoprotein I cross-react with TLR4, inducing a proinflammatory phenotype in endothelial cells and monocytes / T. Colasanti [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 120, № 16. – P. 3360-3370.

120. Autoantibodies targeting Domain 1 of beta 2 glycoprotein I as promising marker in the diagnosis and risk stratification of the antiphospholipid syndrome / N. Zohoury [et al.] // Arthritis Rheum. – 2013. – Vol. 65. – P. S4.

121. Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein 1: a promising candidate biomarker for risk management in antiphospholipid syndrome / M. Mahler [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 313–317.

122. Autoimmune disorders affect the in vitro fertilization outcome in infertile women / S.H. Zou [et al.] // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2008. – Vol. 14, № 4. – P. 343-346.

123. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (Shoenfeld's syndrome) - An update. / A. Watad [et al.] // Lupus. – 2017. – Vol. 26, № 7. – P. 675-681.

124. Autoimmune progesterone dermatitis: clinical presentation and management with progesterone desensitization for successful in vitro fertilization / A. Prieto-Garcia [et al.] // Fertil. Steril. – 2011. - Vol. 95, № 3. – P. 1121.e9-1121.e13.

125. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology / T. Forges, P. Monnier-Barbarino, G.C. Faure, M.C. Béné // Hum. Reprod. Update. – 2004. – Vol.10, № 2. – P.163-175.

126. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis / N. Wegner [et al.] // Immunol. Rev. – 2010. – Vol. 233, № 1. – P. 34–54.

127. Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies / C. Bozic [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2005. – Vol. 4, № 5. – P. 303-308.

128. Avidity of anti-β2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome / S. Čučnik [et al.] // Lupus. – 2012. – Vol. 21, № 7. – P. 764-765.

129. Avrameas, S. Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system / S. Avrameas, C. Selmi // J. Autoimmun. – 2013. – Vol. 41. – P. 46-49.

130. Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome / Blank M. [et al.] // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol.109, № 6. – P. 797-804.

131. Baenziger, J.U. A major step on the road to understanding a unique posttranslational modification and its role in a genetic disease / J.U. Baenziger // Cell. – 2003. – Vol. 113, № 4. – P. 421–422.

132. Bartunkova, J. Allergy and autoimmunity: parallels and dissimilarity the Yin and Yang of immunopathology / J. Bartunkova, J. Kayserova, Y. Shoenfeld // Autoimmun. Rev. – 2009. – Vol. 8, № 4. – P. 302-308.

133. Bećarević, M. The IgG and IgM isotypes of anti-annexin A5 antibodies: relevance for primary antiphospholipid syndrome / M. Bećarević // J. Thromb Thrombolysis. – 2016. – Vol. 42, № 4. – P. 552-557.

134. Berger, P. The molecular relationship between antigenic domains and epitopes on hCG / P. Berger, A.J. Lapthorn // Mol. Immunol. – 2016. – Vol. 76. – P. 134-145.

135. Beta2-Glycoprotein I can exist in two conformations: implications for ourunderstanding of the antiphospholipid syndrome / C. Agar [et al.] // Blood. – 2010. – Vol. 116, № 8. – P. 1336–1343.

136. Beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome / H.B. de Laat [et al.] // Blood. – 2004. – Vol.104, № 12. – P. 3598-3602.

137. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I:mutation studies including residues R39 to R43 / Y. Ioannou [et al.] // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56, № 1. – P. 280–290.

138. Bizzaro, N. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? / N. Bizzaro, R. Tozzoli, Y. Shoenfeld // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 1736–1744.

139. Blank, M. Antiphospholipid antibody-mediated reproductive failure in antiphospholipid syndrome / M. Blank, Y. Shoenfeld // Clin. Rev. Allerg. Immunol. – 2010. – Vol. 38, № 2-3. - P.141–147.

140. Blank, M. Beta-2-glycoprotein-I, infections, antiphospholipid syndrome and therapeutic considerations / M. Blank, Y. Shoenfeld // Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 112, № 2. – P. 190-199.

141. Borba, V.V. Prolactin and Autoimmunity [Electronic resource] / V.V. Borba, Ge Zandman-Goddard, Y. Shoenfeld // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9. - Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816039/

142. Botto, M. C1q, autoimmunity and apoptosis / M. Botto, M.J. Walport // Immunobiol. – 2002. – Vol. 205, № 4-5. – P. 395–406.

143. Breaking barriers – attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens / J. Haiko [et al.] // Innate Immun. – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 67–80.

144. Burton, G.J. Oxidative stress / G.J. Burton, E. Jauniaux // Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2011. – Vol. 25, № 3. – P. 287–299.

145. Candidate epitopes for measurement of hCG and related molecules: the second ISOBM TD-7 workshop / P. Berger [et al.] // Tumor Biol. – 2013. – Vol. 34, № 6. – P. 4033–4057.

146. Carp, H. Cytokines in recurrent miscarriage / H. Carp // Lupus. – 2004. – Vol.13, № 9. – P. 630-634.

147. Carp, H.J. Autoantibodies as predictors of pregnancy complications / H.J. Carp, P.L. Meroni, Y. Shoenfeld // Rheumatology (Oxford). – 2008. – Vol. 47, Suppl. 3. – P. iii6-iii8.

148. Carp, H.J.A. Recurrent spontaneous abortions in antiphospholipid syndrome: natural killer cells – an additional mechanism in a multi factorial process / H.J.A. Carp, Y. Shoenfeld // Rheumatol. – 2007. – Vol. 46, № 10. – P. 1517–1519.

149. Carp, H.J.A. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss / H.J.A. Carp, C. Selmi, Y. Shoenfeld // J. Autoimmunity. – 2012. – Vol. 38, № 2-3. – P. J266-J274.

150. CD40- CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells / G. Iezzi [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – Vol. 106, № 3. – P. 876–881.

151. Cederholm, A. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population / A. Cederholm, J. Frostegard // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1108. – P. 96–103.

152. Cervera R. Antiphospholipid syndrome // Thromb. Res. – 2017. – Vol. 151, Suppl. 1. – P. S43-S47.

153. Cervera, R. Autoimmunity and recurrent pregnancy losses / R. Cervera, J. Balasch // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 2010. – Vol. 39, № 3. – P. 148-152.

154. Cervera, R. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction / R. Cervera, J. Balasch // Hum. Reprod. Update. – 2008. – Vol.14, № 4. – P. 359-366.

155. Chamley L.W. Inhibition of heparin/antithrombin III cofactor activity by anticardiolipin antibodies: a mechanism for thrombosis / L.W. Chamley, E.J. McKay, N.S. Pattison // Thromb. Res. – 1993. – Vol. 71, № 2. –P. 103–111.

156. Characterization of antihuman chorionic gonadotropin serum antibody appearing after ovulation induction / G.D. Braunstein [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1983. – Vol. 57, № 6. – P. 1164-1172.

157. Characterization of antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortions / W. Matzner [et al.] // J. Reprod. Med. – 1994. – Vol. 39, № 1. – P. 27–30.

158. Cheesman, K.L. Effects of antiprogesterone antiserum on serum and ovarian progesterone, gonadotropin secretion, and pregnancy in the rat / K.L. Cheesman, R.T.Jr. Chatterton // Endocrinology. – 1982. – Vol. 111, № 2. - P. 564-71.

159. Chen, P.P. Antibodies to serine proteases in the antiphospholipid syndrome / P.P. Chen, I. Giles // Curr. Rheumatol. Rep. – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 45-52.

160. Chinnaraj, M. Structure of Coagulation Factor II: Molecular Mechanism of Thrombin Generation and Development of Next-Generation Anticoagulants / M. Chinnaraj, W. Planer, N. Pozzi // Front. Med. (Lausanne). – 2018. – Vol. 5. – https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6176116/

161. Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes / M.L. Bonduelle [et al.] // Hum. Reprod. – 1988. – Vol. 3, № 7. – P. 909–914.

162. Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype / H. Wan [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2008. – Vol. 83, № 4. – P. 894–901.

163. Chung, H.R. Adrenal and thyroid function in the fetus and preterm infant / H.R. Chung // Korean J. Pediatr. – 2014. – Vol. 57, № 10. – P. 425–433.

164. Ciampaglia, W. Clinical use of progesterone in infertility and assisted reproduction / W. Ciampaglia, G.E. Cognigni // Acta Obstet. Gynecol. Scand. – 2015. – Vol. 94, Suppl. 161. – P. 17-27.

165. Circulating anti-follicle-stimulating hormone immunoglobulin A in women: a sperm-prone reaction of mucosal tolerance? / K. Haller [et al.] // Fertil. Steril. – 2008. - Vol. 90, № 4. – P. 1253–1255.

166. Circulating levels of beta2-glycoprotein I in thrombotic disorders and in inflammation / F. Lin [et al.] // Lupus. – 2006. – Vol. 15, № 2. – P. 87–93.

167. Citrullinated glucose-regulated protein 78 is an autoantigen in type 1 diabetes / D. Rondas [et al.] // Diabetes. – 2015. – Vol. 64, № 2. – P. 573–586.

168. Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis / P.E. Van den Steen [et al.] // FASEB J. – 2002. – Vol. 16, № 3. – P. 379–389.

169. Clinical accuracy for diagnosis of antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: evaluation of 23 possible combinations of antiphospholipid antibody specificities / S. Sciascia [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2012. – Vol. 10, № 12. – P. 2512-2518.

170. Clinical characterization of antiphospholipid syndrome by detection of IgG antibodies against β2 -glycoprotein I domain 1 and domain 4/5: ratio of anti-domain 1 to anti-domain 4/5 as a useful new biomarker for antiphospholipid syndrome / L. Andreoli [et al.] // Arthritis Rheumatol. – 2015. – Vol. 67, № 8. – P. 2196-2204.

171. Clinical significance of IgA anti-cardiolipin and IgA anti-β2glycoprotein I antibodies [Electronic resource] / L. Andreoli [et al.] // Curr. Rheumatol. Rep. – 2013. – Vol. 15, № 7. – Mode of access: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11926-013-0343-1

172. Cohen, I.R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus / I.R. Cohen // J. Autoimmun. – 2007. – Vol. 29, № 4. – P. 246-249.

173. Cole, L. Detection of hCG in Trophoblastic disease. The USA hCG reference Service Experience / L. Cole, S. Butler // J. Reprod Med. – 2002. – Vol. 47, № 6. – P. 433-444.

174. Cole, L.A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules [Electronic resource] / L.A. Cole // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2010. – Vol. 8. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2936313/

175. Cole, L.A. Hyperglycosylated hCG, a review / L.A. Cole // Placenta. – 2010. – Vol. 31, № 8. – P. 653-664. Cole, L.A. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin [Electronic resource] / L.A. Cole // Reprod. Biol. Endocrinol. - 2009. – Vol. 7. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649930/

176. Comparative incidence of a first thrombotic event in purely obstetric antiphospholipid syndrome with pregnancy loss: the NOH-APS observational study / J.C. Gris [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 119, № 11. – P. 2624–2632.

177. Comparative incidence of pregnancy outcomes in treated obstetric antiphospholipid syndrome: the NOH-APS observational study / S. Bouvier [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 123, № 3. – P. 404-413.

178. Comparison of the effects of anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome and with syphilis on platelet activation and aggregation / A.L. Campbell [et al.] // Thromb. Haemost. – 1995. – Vol. 73, № 3. – P. 529–534.

179. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome / K. Oku [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2009. – Vol. 68, № 6. – P. 1030-1035.

180. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction / G. Girardi [et al.] // J. Exp. Med. – 2006. – Vol. 203, № 9. – P. 2165–2175.

181. Complement activation: a novel pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome / S.S. Pierangeli, M. Vega-Ostertag, X. Liu, G. Girardi // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 1051. – P. 413-420.

182. Complement and platelets: mutual interference in the immune network / C. Speth [et al.] // Mol. Immunol. – 2015. – Vol. 67, № 1. – P.108–118.

183. Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome / K. Oku [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2016. – Vol. 15, № 10. – P. 1001-1004.

184. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss / V.M. Holers [et al.] // J. Exp. Med. – 2002. – Vol. 195, № 2. – P. 211–220.

185. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome / G. Girardi [et al.] // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112, № 11. – P. 1644–1654.

186. Complement inhibitory proteins expression in placentas of thrombophilic women / P. Wirstlein [et al.] // Folia Histochem. Cytobiol. – 2012. – Vol. 50, № 3. – P. 460–467.

187. Concentration of annexin V in gestational tissues: placenta, fetal membranes, myometrium and amniotic fluid / W. Uszyński, E. Zekanowska, M. Uszyński, D. Rystok // Ginekol. Pol. – 2006. – Vol. 77, № 8. – P. 603-609.

188. Concentration of human chorionic gonadotropin, its b-subunit and the core fragment of the β-subunit in serum and urine of men and nonpregnant women / H. Alfthan [et al.] // Clin. Chem. – 1992. – Vol. 38, № 10. – P.1981–1987.

189. Contribution of sex steroids and prolactin to the modulation of T and B cells during autoimmunity / G. Recalde [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2018. – Vol. 17, № 5. – P. 504–512.

190. Controlled Ovarian Hyperstimulation Changes the prevalence of serum autoantibodies in in vitro fertilization patients / K. Haller [et al.] //Am. J. Reprod. Immunol. – 2006. – Vol. 56, № 5-6. – P. 364–370.

191. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5 / B. de Laat [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 109, № 4. – P. 1490–1494.

192. 'Criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010 / S.S. Pierangeli [et al.] // Lupus. – 2011. – Vol. 20, № 2. – P. 182-190.

193. Cunningham, M. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity / M. Cunningham, G. Gilkeson // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 2011. – Vol. 40, № 1. – P. 66-73.

194. Cusick, M.F. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease / M.F. Cusick, J.E. Libbey, R.S. Fujinami // Clin. Rev. Allerg. Immunol. – 2012. – Vol. 42, № 1. – P. 102–111.

195. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome / M. Kool [et al.] // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181, № 6. – P. 3755–3759.

196. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy / Rolle L. [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2013. – Vol. 70, № 6. – P. 448-453.

197. Dai, R. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases / R. Dai, S.A. Ahmed // Transl. Res. – 2011. – Vol. 157, № 4. – P.163-179.

198. Danowski, A. Anti-beta2-glycoprotein I: prevalence, clinical correlations, and importance of persistent positivity in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus / A. Danowski, T.S. Kickler, M. Petri // J. Rheumatol. – 2006. – Vol. 33, № 9. – P. 1775–1779.

199. De Craemer, A.S. Role of anti-domain 1-β2 glycoprotein I antibodies in the diagnosis and risk stratification of antiphospholipid syndrome / A.S. De Craemer, J. Musial, K.M. Devreese // J. Thromb. Haemost. - 2016. – Vol. 14, № 9. – P. 1779-1787.

200. de Groot, P.G. β2-glycoprotein I: evolution, structure and function / P.G. de Groot, J. C. M. Meijers // J. Thromb. Haemost. – 2011. – Vol. 9, № 7 – P. 1275–1284.

201. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases / Y. Sasaki [et al.] // Mol. Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 10, № 5. – P. 347–353.

202. Decreased expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a newly identified pathogenic mechanism of antiphospholipid-mediated defective placentation / N. Di Simone [et al.] // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62, № 5. – P. 1504–1512.

203. Decreased levels of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome / E.R. Dal Ben [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 33, № 4. – P. 876-879.

204. Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure / N.J. Sebire [et al.] // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, № 4. – P.1067–1071.

205. Deng, Y. Advances in lupus genetics and epigenetics / Y. Deng, B.P. Tsao // Curr. Opin. Rheumatol. – 2014. – Vol. 26, № 5. – P. 482-492.

206. Deng, Y. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era / Y. Deng, B.P. Tsao // Nat. Rev. Rheumatol. – 2010. – Vol. 6, № 12. – P. 683-692.

207. Deshmukh, U.S. IgG subclass distribution of anti-hCG and antidiphtheria toxoid antibodies in women immunized with a β-hCG based immunocontraceptive

vaccine / U.S. Deshmukh, G.P. Talwar, S. K. Gupta // J. Reprod. Immunol. – 1994. – Vol. 26, № 1. – P. 65-72.

208. Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage / K. King [et al.] // Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 52-58.

209. Detanico, T. Predominant role for activation-induced cytidine deaminase in generating IgG anti-nucleosomal antibodies of murine SLE / T. Detanico, W. Guo, L.J. Wysocki // J. Autoimmun. – 2015. – Vol. 58. – P. 67-77.

210. Detection of antibody mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome / J.H. Rand [et al.] // Blood. – 2004. – Vol. 104, № 9. – P. 2783–2790.

211. Detection of antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies and their potential diagnostic value [Electronic resource] / P. Žigon [et al.] // Clin. Dev. Immunol. – 2013. – Vol. 2013. – Mode of access: https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3804042/.

212. Determination of clinically significant tests for antiphospholipid antibodies and cutoff levels for obstetric antiphospholipid syndrome / T. Kitaori [et al.] // Lupus. – 2015. – Vol. 24, № 14. – P.1505-1519.

213. Development of a simple, cost-effective, semi-correlative light and electron microscopy method to allow the immunoelectron localisation of non-uniformly distributed placental proteins / C.A. Viall [et al.] // Placenta. – 2014. – Vol. 35, № 3. – P. 223–227.

214. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants / J. Arvieux [et al.] // Thromb. Haemost. – 1995. – Vol. 74, № 4. – P. 1120–1125.

215. Development of anti-human chorionic gonadotropin antibodies in patients with hypogonadotropic hypogonadism. A study of four patients / B. Claustrat [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1983. – Vol. 57, № 5. – P. 1041-47.

216. Diagnosis and management of non-criteria obstetric antiphospholipid syndrome / D.R. Arachchillage [et al.] // Thromb. Haemost. – 2015. – Vol. 113, № 1. – P. 13-19.

217. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice / C. Gardiner [et al.] // Lupus. – 2013. – Vol. 22, №1. – P. 18-25.

218. Diagnostic performance of phospholipid-specific assays for the evaluation of antiphospholipid syndrome / A.E. Tebo [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2008. – Vol. 129, № 6. – P. 870–875.

219. Diagnostic value of serum anti-C1q antibodies in patients with lupus nephritis: a meta-analysis / Y. Yin [et al.] // Lupus. – 2012. – Vol. 21, № 10. – P. 1088-1097.

220. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies / M. Galli [et al.] // Thromb. Haemost. – 1997. – Vol. 77, № 3. – P. 486–491.

221. Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells / H. Fluhr [et al.] // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 90, Suppl 4. – P. 1384–1389.

222. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production [Electronic resource] / S.A. Chung [et al.] // PLoS Genet. – 2011. – Vol. 7, № 3. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048371/

223. Differential roles of estrogen receptors alpha and beta in control of B-cell maturation and selection / L. Hill [et al.] // Mol. Med. – 2011. – Vol.17, № 3-4. – P. 211-220.

224. Differential urinary gonadotropin profiles in early pregnancy and early pregnancy loss / J. O'Connor [et al.] // Prenat. Diagn. – 1999. – Vol. 18. – P.1232-1240.

225. DNA hypermethylation of the forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4+ T cells of patients with systemic sclerosis / Y.Y. Wang [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2014. – Vol. 171, № 1. – P. 39–47.

226. Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist? / R. Cervera [et al.] // Autoimmun. Rev. - 2012. – Vol. 11, № 8. – P. 581-584.

227. Domain I is the main specificity of anti-beta2 GPI in systemic autoimmune diseases / L. Andreoli [et al.] // Arthritis Rheum. – 2013. – Vol. 65. - S4.

228. Dosiou, C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives / C. Dosiou, L.C. Giudice // Endocr Rev. – 2005. – Vol. 26, № 1. – P. 44-62.

229. Doyle, H.A. Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease / H.A. Doyle, M.J. Mamula // Curr. Opin. Immunol. – 2011. – Vol. 24, № 1. – P.112–118.

230. Doyle, H.A. Autoimmunity to isomerized histone H2B in systemic lupus erythematosus / H.A. Doyle, D.W. Aswad, M.J. Mamula // Autoimmunity. – 2013. – Vol. 46, № 1. – P. 6–13.

231. Effect of hydroxychloroquine on antiphospholipid antibody-induced changes in first trimester trophoblast function / C.R. Albert [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2014. – Vol. 71, № 2. – P. 154-164.

232. Effect of low molecular weight heparins (LMWHs) on antiphospholipid antibodies (aPL) — mediated inhibition of endometrial angiogenesis [Electronic resource] / S. D'Ippolito [et al.] // PLoS One. - 2012. – Vol. 7, №1. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3250466/

233. Effects of a toll-like receptor antagonist and anti-annexin A2 antibodies on binding and activation of decidual cells by anti-β2glycoprotein I antibodies / M.O. Borghi [et al.] // Clin. Exp. Rheumatol. – 2007. – Vol. 2. – P. 35.

234. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes / J.C. Reverter [et al.] // Arthritis Rheum. – 1998. – Vol. 41, № 8. – P. 1420–1427.

235. Efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: an international and collaborative meta-analysis / L. Arnaud [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2014. – Vol. 13, № 3. – P. 281–291.

236. Ehrlich, M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression / M. Ehrlich, M. Lacey // Epigenomics. – 2013. – Vol. 5, № 5. – P. 553–568.

237. Eisenberg, V.H. Is there an association between autoimmunity and endometriosis? / V.H. Eisenberg, M. Zolti, D. Soriano // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol.11, № 11. – P. 806-814.

238. Epigenetic control of autoimmune diseases: From bench to bedside / A. Picascia [et al.] // Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 157, № 1. – P. 1–15.

239. Epitope analysis and detection of human chorionic gonadotropin (hCG) variants by monoclonal antibodies and mass spectrometry / H. Lund [et al.] // Tumour Biol. – 2014. – Vol. 35, № 2. – P. 1013–1022.

240. Epitope studies with anti-β2-glycoprotein I antibodies from autoantibody and immunized sources / S.W. Reddel [et al.] // J. Autoimmun. – 2000. – Vol. 15, № 2. – P. 91–96.

241. Epitope-Specific Anti-hCG Vaccines on a Virus Like Particle Platform [Electronic resource] / J. Caldeira [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 10. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4627648/

242. Espinosa, G. Current treatment of antiphospholipid syndrome: lights and shadows / G. Espinosa, R. Cervera // Nat. Rev. Reumatol. – 2015. – Vol. 11, № 10. – P. 586-596.

243. Estrogen directly activates AID transcription and function / S. Pauklin [et al.] // J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 206, № 1. – P. 99-111.

244. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets / N. Heldring [et al.] // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87, № 3. – P. 905-931.

245. European attempts for the standardisation of the antiphospholipid antibodies / A. Tincani [et al.] // Lupus. – 2009. – Vol. 18, № 10. – P. 913-919.

246. Evaluation of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody testing for the diagnosis of antiphospholipid syndrome: results of an international multicentre study / O. Amengual [et al.] // Lupus. – 2017. – Vol. 26, № 3. – P. 266-276.

247. Evidence of gonadal and gonadotropin antibodies in women with a suboptimal ovarian response to exogenous gonadotropin / W.R. Meyer [et al.] // Obstet. and Gynecol. – 1990. – Vol. 75, № 5. – P. 795–799.

248. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: a systematic review / V. Rodriguez-Garcia [et al.] // Rheumatol. – 2015. – Vol. 54, № 11. – P. 2042–2050.

249. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies [Electronic resource] / J.M. Shamonki [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2007. – Vol. 196, № 2. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2248299/

250. Faas, M.M. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy / M.M. Faas, P. de Vos // Placenta. – 2017. – Vol. 56. – P. 44-52.

251. Factor H autoantibodies in patients with antiphospholipid syndrome and thrombosis / A. Foltyn Zadura [et al.] // J. Rheumatol. – 2015. – Vol. 42, № 10. – P.1786–1793.

252. Farage, M.A. The possible relevance of sex hormones on irritant and allergic responses: their importance for skin testing / M.A. Farage, E. Berardesca, H. Maibach // Contact. Dermatitis. – 2010. – Vol. 62, № 2. – P. 67-74.

253. First-trimester low-dose prednisolone in refractory antiphospholipid antibody-related pregnancy loss / K. Bramham [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 117, № 25. – P. 6948–6951.

254. Floreani, A. Environmental Basis of Autoimmunity / A. Floreani, P.S.C. Leung, M.E. Gershwin // Clin. Rev. Allerg. Immunol. – 2016. – Vol. 50, № 3. – P. 287–300.

255. Forastiero, R. Multiple antiphospholipid antibodies positivity and antiphospholipid syndrome criteria re-evaluation / R. Forastiero // Lupus. – 2014. – Vol. 23, № 12. – P. 1252-1254.

256. Ford, H.B. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy / H.B. Ford, D.J. Schust // Rev. Obstet. Gynecol. – 2009. – Vol. 2, № 2. – P. 76-83.

257. Fox, K.M. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone / K.M. Fox, J.A. Dias, P. van Roey // Molecular Endocrinol. – 2001. – Vol. 15, № 3. – P. 378–389.

258. FOXP3þ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua / J. Mjosberg [et al.] // Biol. Reprod. – 2010. – Vol. 82, № 4. – P. 698-705.

259. Franklin, R.D. Antiphospholipid antibodies (APA) and recurrent pregnancy loss: treating a unique APA positive population / R.D. Franklin, W.H. Kutteh // Hum. Reprod. – 2002. – Vol.17, № 11. – P. 2981–2985.

260. Franklin, R.D. Effects of unfractionated and low molecular weight heparin on antiphospholipid antibody binding in vitro / R.D. Franklin, W.H. Kutteh // Obstet. Gynecol. – 2003. – Vol. 101, № 3. – P. 455–462.

261. Fritz, E.L. Cytidine deaminases: AIDing DNA demethylation? / E.L. Fritz, F.N. Papavasiliou // Genes Dev. – 2010. – Vol. 24, № 19. – P. 2107–2114.

262. Fritzler, M.J. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes / M.J. Fritzler // Autoimmun. Rev. – 2008. – Vol. 7, Issue 8. – P. 616–620.

263. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses / L.F. Lu [et al.] // Cell. – 2010. – Vol. 142, № 6. – P. 914–929.

264. Furst Infection and Lupus: Which Causes Which? [Electronic recource] / S. Doaty [et al.] // Curr. Rheumatol. Rep. – 2016. – Vol. 18. – Mode of access: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11926-016-0561-4

265. García, A. An overview of adjuvant formulations and delivery systems / A. García, J.B. De Sanctis // APMIS. – 2014. – Vol. 122, № 4. – P. 257-267.

266. Gellersen, B. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure / B. Gellersen, J. Brosens // Endocrinol. Rev. – 2014. – Vol. 35, № 6. – P. 851–905.

267. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? / K.H. Costenbader [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 8. – P. 604–609.

268. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity / A.V. Rubtsov [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2010. – Vol. 9, № 7. – P. 494-498.

269. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: An update / G.D. Sebastiani [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2016. – Vol. 15, № 5. – P. 433–439.

270. Genetics and autoantibodies / C. Perricone [et al.] // Immunol. Res. – 2013. – Vol. 56, № 2-3. – P. 206–219.

271. Genomewide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poising of interferon-regulated genes in naive CD4+ T cells from lupus patients / P. Coit [et al.] // J. Autoimmun. – 2013. – Vol. 43. – P. 78–84.

272. Gerke, V. Annexins: from structure to function / V. Gerke, S.E. Moss // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82, № 2. – P. 331–371.

273. Gharavi, A.E. Origin of antiphospholipid antibodies: Induction of aPL by viral peptides / A.E. Gharavi, S.S. Pierangeli // Lupus. – 1998. – Vol. 7, Suppl. 2. – P. S52–S54.

274. Gharavi, A.E. Viral origin of antiphospholipid antibodies: endothelial cell activation and thrombus enhancement by CMV peptide-induced APL antibodies / A.E. Gharavi, S.S. Pierangeli, E.N. Harris // Immunobiology. – 2003. – Vol. 207, № 1. – P. 37-42.

275. Giannakopoulos, B. New insights into the biology and pathobiology of beta2-glycoprotein I / B. Giannakopoulos, P. Mirarabshahi, S.A. Krilis // Curr. Rheumatol. Rep. – 2011. – Vol. 13, № 1. – P. 90–95.

276. Gleicher, N. Autoantibodies in infertility: current opinion / N. Gleicher // Hum. Reprod. Update. – 1998. – Vol. 4, № 2. – P. 169–176.

277. Glycopeptide profiling of beta-2-glycoprotein I by mass spectrometry reveals attenuated sialylation in patients with antiphospholipid syndrome / A. Kondo [et al.] // J. Proteomics. – 2009. – Vol. 73. № 1. – P. 123–133.

278. Golan, M.D. Conformational changes in C1q after binding of immune complexes: detection of neoantigens with monoclonal antibodies / M.D. Golan, R. Burger, M. Loos // J. Immunol. – 1982. – Vol. 129, № 2. – P. 445–447.

279. Gómez-Puerta, J.A. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome / J.A. Gómez-Puerta, R. Cervera // J. Autoimmun. – 2014. – Vol. 48–49. – P. 20–25.

280. Gonadotropin therapy failure secondary to human chorionic gonadotropin-induced antibodies / R.Z. Sokol [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1981. – Vol. 52, № 5. – P. 929-33.

281. Graham, J.D. Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells / J.D. Graham, C.L. Clarke // Breast. Cancer Res. – 2002. – Vol. 4, № 5. – P.187-190.

282. Gregersen, P.K. HLA class II polymorphism: implications for genetic susceptibility to autoimmune disease / P.K. Gregersen // Lab. Invest. – 1989. – Vol. 61, № 1. – P. 5-19.

283. Griffin, J.H. Activated protein C / J.H. Griffin [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 73–80.

284. Guzman-Genuino, R.M. Regulatory B Cells in Pregnancy: Lessons from Autoimmunity, Graft Tolerance, and Cancer [Electronic recource] / R.M. Guzman-Genuino, K.R. Diener // Front. Immunol. – 2017. – Vol. 8. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5313489/

285. Haas, D.M. Progestogen for preventing miscarriage [Electronic recource] / D.M. Haas, P.S. Ramsey // Cochrane Database Syst Rev. – 2013. – Vol. 31, № 10. – Mode of access: https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD003511.pub3/full

286. Halasz, M. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion / M. Halasz, J. Szekeres-Bartho // J. Reprod. Immunol. – 2013. – Vol. 97, № 1. – P. 43-50.

287. Haller, K. Anti-FSH antibodies associate with poor outcome of ovarian stimulation in IVF / K. Haller, A. Salumets, R. Uibo // Reprod. BioMed. Online. – 2008. – Vol. 16, № 3. – P. 350–355.

288. Haller-Kikkatalo, K. Review on autoimmune reactions in female infertility: antibodies to follicle stimulating hormone [Electronic resource] / K. Haller-Kikkatalo,

A. Salumets, R. Uibo // Clin. Dev. Immunol. – 2012. – Vol. 2012. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189473/

289. Hamilton, R.G. Human IgG subclass measurement in the clinical laboratory / R.G. Hamilton // Clin. Chem. – 1987. – Vol. 33, № 10. – P. 1707-1725.

290. Harley, J.B. Epstein–Barr virus infection induces lupus autoimmunity / J.B. Harley, J.A. James // Bull. NYU Hosp. Jt. Dis. – 2006. – Vol. 64, № 1-2. – P. 45–50.

291. High avidity anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome / S. Cucnik [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2004. – Vol. 63, № 110. – P. 1478-1482.

292. High frequency of abnormal levels of IgA anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with antiphospholipid syndrome / D. Fanopoulos [et al.] // J. Rheumatol. – 1998. – Vol. 25, № 4. – P. 675-680.

293. High frequency of IgG antagonizing follicle-stimulating hormone-stimulated steroidogenesis in infertile women with a good response to exogenous gonadotropins / Y. Reznik [et al.] // Fertil. Steril. – 1998. – Vol. 69, № 1. – P. 46– 52.

294. Histone modifications and methyl- CpG-binding domain protein levels at the TNFSF7 (CD70) promoter in SLE CD4+T cells / Y. Zhou [et al.] // Lupus. – 2011. – Vol. 20, № 13. – P. 1365–1371.

295. HLA class II associations of anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus / M. Galeazzi [et al.] // Lupus. – 2000. – Vol. 9, № 1. – P. 47–55.

296. HLA-DPB1 alleles association of anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with SLE / G.D. Sebastiani [et al.] // Lupus. – 2003. – Vol. 12, № 7. – P. 560–563.

297. HLA-DR class II associations with rubella vaccine-induced joint manifestations / L.A. Mitchell [et al.] // J. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 177, № 1. – P. 5–12.

298. HLA-DRB1 the notorious gene in the mosaic of autoimmunity / M.-T. Arango [et al.] // Immunol. Res. – 2017. – Vol. 65, № 1. – P. 82–98.

299. Holers, V.M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis / V.M. Holers // Curr. Opin. Immunol. – 2013. – Vol. 25, № 6. – P. 728–735.

300. Hollers, V.M. Anti-C1q autoantibodies amplify pathogenic complement activation in systemic lupus erythematosus / V.M. Hollers // J. Clin. Invest. – 2004. - Vol. 114, № 5. – P. 616-619.

301. Hollers, V.M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis / V.M. Hollers // Curr. Opin. Immunol. – 2013. – Vol. 25, № 6. – P. 728–735.

302. Hooper, L.V. Interactions between the microbiota and the immune system / L.V. Hooper, D.R. Littman, A.J. Macpherson // Science. – 2012. – Vol. 336, № 6086. – P. 1268–1273.

303. Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL) / N. Pluchino [et al.] // Hormones. – 2014. – Vol. 13, № 3. – P. 314-322.

304. Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection / C.M. Grimaldi [et al.] // Mol. Immunol. – 2005. – Vol. 42, № 7. – P. 811-820.

305. Hughes, G.C. Progesterone and autoimmune disease / G.C. Hughes // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 6-7. – P. A502–A514.

306. Human antiphospholipid antibodies induce TNF alpha in monocytes via toll-like receptor 8 / Y. Döring [et al.] // Immunobiol. – 2010. – Vol. 215, № 3. – P. 230–241.

307. Human Chorionic Gonadotropin as a Central Regulator of Pregnancy Immune Tolerance / A. Schumacher [et al.] // J. Immunol. - 2013. – Vol. 190, № 6. – P. 2650-2658.

308. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal–maternal interface during early human pregnancy / A. Schumacher [et al.] // J. Immunol. – 2009. – Vol.182, № 9. – P. 5488–5497.

309. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system / U.A. Kayisli [et al.] // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171, № 5. – P. 2305–2313.

310. Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells / H. Fluhr [et al.] // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 90, Suppl. 4. – P. 1390–1395.

311. Human chorionic gonadotropin: A hormone with immunological and angiogenic properties / M. Tsampalas [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2010. – Vol. 85, № 1. – P. 93–98.

312. Human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus / A. Hrycek [et al.] // Autoimmun. – 2005. – Vol. 38, № 7. – P. 487–491.

313. Human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein: a humoral immunogen for systemic lupus erythematosus patients and autoantibody accelerator for NZB/WF1mice / M. Chang [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2006. –Vol. 143, № 1. – P. 167–179.

314. Hunt, J.S. Hormonal regulation of uterine macrophages / J.S. Hunt, L. Miller, J.S. Platt // Dev. Immunol. – 1998. – Vol. 6, № 1-2. – P. 105–110.

315. Hydroxychloroquine restores trophoblast fusion affected by antiphospholipid antibodies / T. Marchetti [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2014. – Vol. 12, № 6. – P. 910-920.

316. Hyperglycosylated hCG (Invasive trophoblast antigen, ITA) - a Key antigen for early pregnancy detection / L.A. Cole [et al.] // Clin. Biochem. – 2003. – Vol. 36, № 8. – P. 647-655.

317. Identification of a 17-hydroxyprogesterone-binding immunoglobulin in the serum of a woman with periodic rashes / K.L. Cheesman [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1982. – Vol. 55, № 3. – P. 597-599.

318. Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin / C.D.Yang [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172, № 9. – P. 5765–5773.

319. Identification of anti-thrombin antibodies in the antiphospholipid syndrome that interfere with the inactivation of thrombin by antithrombin / K.K. Hwang [et al.] // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167, № 12. – P. 7192-7198.

320. Identification of polyclonal and monoclonal antibodies against tissue plasminogen activator in the antiphospholipid syndrome / C.S. Lu [et al.] // Arthritis Rheum. – 2005. – Vol. 52, № 12. – P. 4018–4027

321. IgA anti-beta 2 glycoprotein I antibodies are pathogenic in a mouse model of antiphospholipid syndrome / R. Willis [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2013. – Vol. 11, Suppl. 2. – P. 179.

322. IgA anti-beta2 glycoprotein-I autoantibodies are associated with an increased risk of thromboembolic events in patients with systemic lupus erythematosus [Electronic resource] / N.J. Sweiss [et al.] // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 8. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2924386/

323. IgA-class antibeta2-glycoprotein I in women with unexplained recurrent spontaneous abortion / H. Yamada [et al.] // Arthritis Rheum. – 1999. – Vol. 42, № 12. – P. 2727–2728.

324. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis / B. de Laat [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 105, № 4. – P. 1540–1545.

325. IgG subclass distribution of antibodies against beta(2)-GP1 and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, and their clinical associations / M. Samarkos [et al.] // Rheumatol. (Oxford). – 2001. – Vol. 40, № 9. – P.1026-1032.

326. IgG, IgA and IgM antibodies against FSH: serological markers of pathogenic autoimmunity or of normal immunoregulation? / K. Haller [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2005. – Vol. 54, № 5. – P. 262–269.

327. IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation / S. Garaud [et al.] // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182, № 9. – P. 5623–5632.

328. Immune responses against domain I of β2-glycoprotein I are driven by conformational changes / B. de Laat [et al.] // Arthritis Rheum. – 2011. – Vol. 63. № 12. – P. 3960–3968.

329. Immunochemical and biological characteristics of a human autoantibody to human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone / A. Pala [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1988. – Vol. 67, № 6. – P. 1317-1321.

330. Immunoglobulin G4: an odd antibody / R.C. Aalberse [et al.] // Exp. Allergy. – 2009. – Vol. 39, № 4. – P. 469-477.

331. Immunological approaches against human chorionic gonadotropin for control of fertility and therapy of advanced-stage cancers expressing hCG⁄subunits / G.P. Talwar, J.C. Gupta, N.V. Shankar // Am. J. Reprod.Immunol. – 2011. – Vol. 66, № 1. – P. 26–39.

332. Immunopathology of the implantation site utilizing monoclonal antibodies to natural killer cells in women with recurrent pregnancy losses / J.Y. Kwak [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 1999. – Vol. 41, № 1. – P. 91–98.

333. Immunosuppressive effect of progesterone on dendritic cells in mice / Y. Xu [et al.] // J. Reprod. Immunol. - 2011. – Vol. 91. № 1-2. – P. 17–23.

334. Impaired expression of endometrial differentiation markers and complement regulatory proteins in patients with recurrent pregnancy loss associated with antiphospholipid syndrome / J. Francis [et al.] // Mol. Hum. Reprod. – 2006. – Vol. 12, № 7. – P. 435–442.

335. Increased 5-hydroxymethylcytosine in CD4(+) T cells in systemic lupus erythematosus / M. Zhao [et al.] // J. Autoimmun. – 2016. – Vol. 69. – P. 64-73.

336. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / W.J. Wang [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2010. – Vol. 84, № 2. – P. 164–170.

337. Induction of APS after TTd hyper-immunization has a different outcome in BALB/c and C57BL/6 mice / I. Zivkovic [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 65, № 5. – P. 492-502.

338. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons / W.H. Reeves [et al.] // Trends Immunol. – 2009. –Vol. 30, № 9. – P. 455-464.

339. Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome / S.S. Pierangeli [et al.] // Thromb. Haemost. – 1995. – Vol. 74, № 5. – P. 1361–1367.

340. Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGbeta and IL-1beta / K. Sugihara [et al.] // FEBS Lett. – 2008. – Vol. 582, № 2. – P. 197–202.

341. Infection and autoimmunity in Sjogren's syndrome: a clinical study and comprehensive review / S. Kivity [et al.] // J. Autoimmun. – 2014. – Vol. 51. – P. 17–22.

342. Infections and autoimmunity— friends or foes? / S. Kivity [et al.] // Trends Immunol. – 2009. – Vol. 30, № 8. – P. 409–414.

343. Infections as risk factor for autoimmune diseases: A nationwide study / P.R. Nielsen [et al.] // J. Autoimmun. – 2016. – Vol. 74. - P. 176-181.

344. Infections in infancy and the presence of antinuclear antibodies in adult life / C.J. Edwards [et al.] // Lupus. – 2006. – Vol. 15, № 4. – P. 213–217.

345. Infectious diseases and autoimmunity / L.G. Delogu [et al.] // J. Infect. Dev. Ctries. – 2011. – Vol. 5, № 10. – P. 679-687.

346. Infertility caused by hCG autoantibody / F. Amato [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 87, № 3. – P. 993-97.

347. Inhibition of trophoblast-induced spiral artery remodeling reduces placental perfusion in rat pregnancy / S. Verlohren [et al.] // Hypertension. – 2010. – Vol. 56, № 2. – P. 304–310.

348. International classification consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / S. Miyakis [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2006. – Vol. 4, № 2. – P. 295–306.

349. Intradermal sex hormone desensitization for relief of premenstrual symptoms may improve the obstetric outcome of women with recurrent pregnancy loss / A.M. Itsekson [et al.] // Gynecol. Endocrinol. – 2013. – Vol. 29, № 2. – P. 169-172.

350. Intravenous immunoglobulin G improves pregnancy outcome in women with recurrent pregnancy losses with cellular immune abnormalities / S.K. Lee [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2016. – Vol. 75, № 1. – P. 59-68.

351. Intravenous immunoglobulin G modulates peripheral blood Th17 and Foxp3(+) regulatory T cells in pregnant women with recurrent pregnancy loss / D.J. Kim [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2014. – Vol. 71, № 5. – P. 441-450.

352. Investigations on the C1qcalreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition / H. Paidassi [et al.] // J. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 408, № 2. – P. 277–290.

353. Ionic properties of membrane association by vitamin K-dependent proteins: the case for univalency / J.F. McDonald [et al.] // Biochemistry. -1997. – Vol. 36, № 50. – P. 15589-15598.

354. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? / P. Licht [et al.] // Mol. Cell. Endocrinol. – 2007. – Vol. 269, № 1-2. – P. 85–92.

355. Isotype distribution and clinical relevance of anti-beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) antibodies: importance of IgA isotype / G. Lakos [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 1999. – Vol. 117, № 3. – P. 574–579.

356. Iverson, G.M. Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI / G.M. Iverson, E.J. Victoria, D.M. Marquis // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1998. – Vol. 95, № 26. – P. 15542–15546.

357. Josefowicz, S.Z. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function / S.Z. Josefowicz, L.F. Lu, A.Y. Rudensky // Annu Rev. Immunol. – 2012. - Vol. 30. – P. 531-564.

358. Jung, J.-Y. Infection in systemic lupus erythematosus, similarities, and differences with lupus flare / J.-Y. Jung, C.-H. Suh // Korean J. Intern. Med. – 2017. – Vol. 32, № 3. – P. 429-438.

359. Kallenberg, C.G. Anti-C1q autoantibodies / C.G. Kallenberg // Autoimmun. Rev. – 2008. – Vol. 7, № 8. – P. 612–615.

360. Kim, D.D. Membrane complement regulatory proteins / D.D. Kim, W.C. Song // Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 118, № 2–3. – P. 127–136.

361. Kininogen domain 3 contains regions recognized by antiphosphatidylethanolamine antibodies / J. Katsunuma [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1, № 1. – P. 132–138.

362. Knight, P.G. TGF-β superfamily members and ovarian follicle development / P.G. Knight, C. Glister // Reprod. – 2006. – Vol. 132, № 2. – P. 191–206.

363. Koike, T. Antiphospholipid syndrome: 30 years and our contribution / T. Koike // Int. J. Rheum. Dis. – 2015. – Vol. 18, № 2. – P. 233–241.

364. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function / T. Kouzarides // Cell. – 2007. – Vol. 128, № 4. – P. 693–705.

365. Koziel, J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review [Electronic resource] / J. Koziel, P. Mydel, J. Potempa // Curr. Rheumatol. Rep. – 2014. – Vol. 16, № 3. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930831/

366. Krakauer, T. Staphylococcal Superantigens Spark Host-Mediated Danger Signals [Electronic resource] / T. Krakauer, K. Pradhan, B.G. Stiles // Front. Immunol. – 2016. – Vol. 7 – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735405/

367. Krone, K.A. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome / K.A. Krone, K.L. Allen, K.R. McCrae // Curr. Rheumatol. Rep. – 2010. – Vol.12, № 1. – P. 53-57.

368. Kuang, H. Hormonal regulation of uterine natural killer cells in mouse preimplantation uterus / H. Kuang, H. Peng, H. Xu et al. // J. Mol. Histol. – 2010. – Vol. 41, № 1. – P. 1–7.

369. Kujovich, J.L. Thrombophilia and pregnancy complications / J.L. Kujovich // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2004. – Vol. 191, № 2. – P. 412–424.

370. Kumar, P. Hormones in pregnancy / P. Kumar, N. Magon // Niger Med. J. – 2012. – Vol. 53, № 4. – P. 179–183.

371. Laboratory and clinical features of pregnant women with antiphospholipid syndrome and neonatal outcome / A. Ruffatti [et al.] // Arthritis Care Res. – 2010. – Vol. 62, № 3. – P. 302–307.

372. Laboratory classification categories and pregnancy outcome in patients with primary antiphospholipid syndrome prescribed antithrombotic therapy. /A. Ruffatti [et al.] // Thromb. Res. – 2009. – Vol.123, № 3. – P. 482-487.

373. Lash, G.E. Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? / G.E. Lash, J.N. Bulmer // J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 88, № 2. – P. 156-164.

374. Lee, R.M. Immunoglobulin A anti-beta2-glycoprotein antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death / R.M. Lee, D.W. Branch, R.M. Silver // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2001. – Vol. 185, № 3. – P.748–753.

375. Lei, Z.M. The expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels / Z.M. Lei, E. Reshef, V. Rao // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1992. – Vol. 75, № 2. – P. 651–659. 401

376. Linking allergy to autoimmune disease / R. Valenta [et al.] // Trends Immunol. – 2008. – Vol. 30, № 3. – P. 109-116.

377. Lockshin, M.D. Nonhormonal explanations for sex discrepancy in human illness / M.D. Lockshin // Ann. N Y Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1193. – P. 22-24.

378. Lopata, A. The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture / A. Lopata, D.L. Hay // Hum. Reprod. – 1989. – Vol. 4, Suppl. 8. – P. 87–94.

379. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature / M. Galli [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 101, № 5. – P. 1827-1832.

380. Lupus nephritis after Hepatitis B vaccination: an uncommon complication / D. Santoro [et al.] // Clin. Nephrol. – 2007. – Vol. 67, № 1. – P. 61-63.

381. Lutz, H.U. Natural antibodies in health and disease: an overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease / H.U. Lutz, S. Miescher // Autoimmun. Rev. – 2008. – Vol. 7, № 6. – P. 405-409.

382. Mahler, M. Anti-C1q autoantibodies, novel tests, and clinical consequences [Electronic resource] /M. Mahler, R.A. van Schaarenburg, L.A. Trouw // Front.

Immunol. – 2013. – Vol. 4. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3653116/

383. Management of women with recurrent pregnancy losses and antiphospholipid antibody syndrome / J. Kwak-Kim [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2013. – Vol. 69, № 6. – P. 596-607.

384. Marchetti, T. Obstetrical antiphospholipid syndrome: from the pathogenesis to the clinical and therapeutic implications [Electronic resource] / T. Marchetti, M. Cohen, P. de Moerloose // Clin. Devel. Immunol. – 2013. – Vol. 2013. - Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745904/

385. Marrack, P. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium / P. Marrack, A.S. McKee, M.W. Munks // Nat. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 9, № 4. – P. 287-293.

386. Martin, M. Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells / M. Martin, J. Leffler, A.M. Blom // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287, № 40. – P. 33733–33744.

387. Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency [Electronic resource] / K. Woidacki [et al.] // Cell Death Dis. – 2013. – Vol. 4, №1. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564001/

388. Maternal and fetal mechanisms of B cell regulation during pregnancy: human chorionic gonadotropin stimulates B cells to produce IL-10 while alpha-fetoprotein drives them into apoptosis [Electronic resource] / F. Fettke [et al.] // Front. Immunol. – 2016. – Vol. 7. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5144100/

389. Mehrani, T. Association of IgA Anti-beta2 glycoprotein I with clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus / T. Mehrani, M. Petri // J. Rheumatol. – 2011. – Vol. 38, № 1. – P. 64–68.

390. Meroni, P.L. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: an additional example of the mosaic of autoimmunity / P.L. Meroni // J. Autoimmun. – 2008. – Vol. 30, № 1-2. – P. 99-103.

391. Meroni, P.L. Predictive, protective, orphan autoantibodies: The example of anti-phospholipid antibodies / P.L. Meroni, Y. Shoenfeld // Autoimmun. Rev. – 2008. – Vol. 7, № 8. – P. 585–587.

392. Mesen, T.B. Progesterone and the Luteal Phase: A Requisite to Reproduction / T.B. Mesen, S.L. Young // Obstet. Gynecol. Clin. North Am. – 2015. – Vol. 42, № 1. – P. 135–151.

393. MicroRNA-21 and microRNA- 148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1 / W. Pan [et al.] // J. Immunol. – 2010. – Vol. 184. № 12. – P. 6773–6781.

394. MicroRNA-29b contributes to DNA hypomethylation of CD4+ T cells in systemic lupus erythematosus by indirectly targeting DNA methyltransferase 1 / H. Qin [et al.] // J. Dermatol. Sci. – 2013. – Vol. 69, № 1. – P. 61–67.

395. Mirarabshahi, P. Post-translational oxidative modification of beta2-glycoprotein I and its role in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome / P. Mirarabshahi, M. Abdelatti, S. Krilis // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 11. – P. 779-780.

396. Miyakis, S. Beta-2 glycoprotein I and its role in antiphospholipid syndrome-lessons from knockout mice / S. Miyakis, S.A. Robertson, S.A. Krilis // Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 112, № 2. – P.136–143.

397. Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors / S. Hao [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2007. – Vol. 7, № 13. – P. 1765–1775.

398. Molecular pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: the role of oxidative post-translational modification of beta 2 glycoprotein I / F.H. Passam [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2011. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 275–282.

399. Monoclonal antibody 26 cross-reactive with beta2-glycoprotein I affects human trophoblast invasion in vitro / T.M. Kovacevic [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2013. – Vol. 171, № 1. – P. 23–29.

400. Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits in vitro human trophoblastic hormone production and invasion / H. Katsuragawa [et al.] // Biol. Reprod. – 1997. – Vol. 56, № 1. – P. 50–58.

401. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicenter prospective study of 1000 patients / R. Cervera [et al.] // Ann. Rheum. Dis. - 2015. – Vol. 74, № 6. – P. 1011-1018.

402. Moscarello, M.A. The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis / M.A. Moscarello, F.G. Mastronardi, D.D. Wood // Neurochem. Res. – 2007. – Vol. 32, № 2. – P. 251–256.

403. Moulton, V.R. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease [Electronic resource] / V.R. Moulton // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9. - Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6180207/

404. Murine monoclonal antibody 26 raised against tetanus toxoid cross-reacts with beta2-glycoprotein I: its characteristics and role in molecular mimicry / A. Inic-Kanada [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 39-51.

405. Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: a genetic analysis of the PROMISSE cohort [Electronic resource] / J.E. Salmon [et al.] // PLoS Medicine. – 2011. – Vol. 8, № 3. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062534/

406. Nagata, S. Autoimmunity and the clearance of dead cells / S. Nagata, R. Hanayama, K. Kawane // Cell. – 2010. – Vol. 140, № 5. - P. 619–630.

407. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome / C. Alessandri [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2011. – Vol. 10, № 10. – P. 609–616.

408. New insight into the autoimmunogenicity of the complement protein C1q / V. Stoyanova [et al.] // Mol. Immunol. – 2011. – Vol. 48, № 4. – P. 678-682.

409. New" antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome [Electronic resource] / R. Misasi [et al.] // J. Immunol. Res. – 2015. – Vol. 2015. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383493/

410. Nielsen, H.S. Prognostic impact of anticardiolipin antibodies in women with recurrent miscarriage negative for the lupus anticoagulant / H.S. Nielsen, O.B. Christiansen // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, № 6. –P. 1720-1728.

411. Nieschlag, E. Antigenicity of human chorionic gonadotrophin preparations in men / E. Nieschlag, S. Bernitz, M. Töpert // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 1982. – Vol. 16, № 5. – P. 483-488.

412. Niu, Z. Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis / Z. Niu, P. Zhang, Y.Tong // Int. J. Rheum. Dis. – 2015. – Vol. 18, № 1. – P.17-28.

413. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: Prevalence and treatment efficacy in pregnancies / A. Mekinian [et al.] // Semin. Arthritis Rheum. – 2016. – Vol.46, № 2. – P. 232-237.

414. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010 / M.L. Bertolaccini [et al.] // Lupus. – 2011. – Vol. 20, № 2. – P. 191-205.

415. Notkins, A.L. New predictors of disease. Molecules called predictive autoantibodies appear in the blood years before people show symptoms of various disorders. Tests that detected these molecules could warn of the need to take preventive action / A.L. Notkins // Sci. Am. – 2007. – Vol. 296, № 3. – P. 72-79.

416. Novel assays of thrombogenic pathogenicity in the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen beta2-glycoprotein I / Y. Ioannou [et al.] // Arthritis Rheum. – 2011. - Vol. 63, № 9. – P. 2774–2782.

417. Novel autoantibodies against the activated coagulation factor IX (FIXa) in the antiphospholipid syndrome that interpose the FIXa regulation by antithrombin / Y.H. Yang [et al.] // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182, № 3. – P. 1674–1680.

418. Obstetric antiphospholipid syndrome / C. Galarza-Maldonado [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 4. – P. 288–295.

419. Obstetric antiphospholipid syndrome: a recent classification for an old defined disorder / S. D'Ippolito [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2014. – Vol. 13, № 9. – P. 901-908.

420. Oku, K. Pathophysiology of thrombosis and pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome / K. Oku, O. Amengual, T. Atsumi // Eur. J. Clin. Invest. – 2012. – Vol. 42, № 10. – P. 1126–1135.

421. Opdenakker, G. Microbiomic and Posttranslational Modifications as Preludes to Autoimmune Diseases / G. Opdenakker, P. Proost, Jo Van Damme // Trends in Mol. Med. – 2016. – Vol. 22, № 9. – P. 746-757.

422. Opdenakker, G. Probing cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases towards better immunotherapies of multiple sclerosis / G. Opdenakker, J. Van Damme // Cytokine Growth Factor Rev. – 2011. – Vol. 22, № 5-6. – P. 359–365.

423. Oral dydrogesterone treatment during early pregnancy to prevent recurrent pregnancy loss and its role in modulation of cytokine production: a double-blind, randomized, parallel, placebo-controlled trial / A. Kumar [et al.] // Fertil. Steril. – 2014. – Vol.102, № 5. – P. 1357-1363.

424. Outcomes and treatment of obstetrical antiphospholipid syndrome in women with low antiphospholipid antibody levels / A. Mekinian [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2012. – Vol. 94, № 2. – P. 222–226.

425. Ovarian antibodies detected by immobilized antigen immunoassay in patients with premature ovarian failure / J.L. Luborsky [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1990. – Vol. 70, № 1. - P. 69–75.

426. Overexpression of X-linked genes in T cells from women with lupus / A. Hewagama [et al.] // J. Autoimmun. – 2013. – Vol. 41. – P. 60–71.

427. Pane, J.A. Rotavirus activates lymphocytes from non-obese diabetic mice by triggering tolllike receptor 7 signaling and interferon production in plasmacytoid dendritic cells [Electronic resource] / J.A. Pane, N.L. Webster, B.S. Coulson // PLoS Pathog. – 2014. – Vol. 10, № 3. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3968122/

428. Pantham, P. The role of anti-phospholipid antibodies in autoimmune reproductive failure [Electronic resource] / P. Pantham, V.M. Abrahams, L.W. Chamley // Reproduction. – 2016. – Vol. 151, № 5. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5178152/

429. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies / P.L. Meroni [et al.] // Nat. Rev. Rheumatol. – 2011. – Vol. 7, № 6. – P. 330–339. 469

430. Pathogenic antibeta2 glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta-2 glycoprotein I only after a conformational change / B. de Laat [et al.] // Blood. – 2006. – Vol. 107, № 5. – P.1916–1924.

431. Patterns of anti-phospholipid antibody specificities / A. Gilman-Sachs [et al.] // J. Clin. Lab. Immunol. – 1991. – Vol. 35, № 2. – P. 83–88.

432. Pellegrino, P. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives / P. Pellegrino, E. Clementi, S. Radice // Autoimmun. Rev. – 2015. – Vol. 14, № 10. – P. 880–888.

433. Pennell, L.M. Sex affects immunity / L.M. Pennell, C.L. Galligan, E.N. Fish // J. Autoimmun. – 2012. – Vol. 38, № 2-3. – P. J282-J291.

434. Performance evaluation and clinical associations of immunoassays that detect antibodies to negatively charged phospholipid other than cardiolipin / A. Castanon [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2018. – Vol. 149, № 5. – P. 401-411.

435. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: a nationwide prospective study / P. Mustonen, K.V. Lehtonen, K. Javela, M. Puurunen // Lupus. – 2014. – Vol. 23, № 14. – P. 1468-1476.

436. Persistent triple antiphospholipid antibody positivity as a strong risk factor of first thrombosis, in a long-term follow-up study of patients without history of thrombosis or obstetrical morbidity / C.M. Yelnik [et al.] // Lupus. – 2017. – Vol. 26, № 2. – P. 163-169.

437. Petersson, S.B. New insights: a role for OGlcNAcylation in diabetes complications / S.B. Petersson, G.W. Hart // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2016. – Vol. 51, № 3. – P. 150–161.

438. Phosphatidylethanolamine at the luminal endothelial surface — implications for hemostasis and thrombotic autoimmunity / L. Zhixin [et al.] // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2011. – Vol.17, № 2. – P.158–163.

439. Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P selectin / S.S. Pierangeli [et al.] // Circ. Res. – 2001. – Vol. 88, № 2. – P. 245–250.

440. Pinheiro, I. X-chromosome-located microRNAs in immunity: might they explain male/female differences? The X chromosome-genomic context may affect X-located miRNAs and downstream signaling, thereby contributing to the enhanced immune response of females / I. Pinheiro, L. Dejager, C. Libert // Bioessays. – 2011. – Vol. 33, № 11. – P. 791-802.

441. Pituitary gonadotropins and autoimmunity / C. Cocco [et al.] // Mol. Cell. Endocrinol. - 2014. – Vol. 385, № 1-2. – P. 97-104.

442. Plasma annexin A5 level relates inversely to the severity of coronary stenosis / L.J.H. van Tits [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 2007. – Vol. 356, № 3. – P.674–680.

443. Plasma annexin A5, anti-annexin A5 antibodies and annexin A5 polymorphism in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome / A. Nasef [et al.] // Clin. Lab. – 2014. – Vol. 60, № 1. – P. 133-137.

444. Plasma levels of annexins IV and V in relation to antiphospholipid antibody status in women with a history of recurrent miscarriage / V.M. Ulander [et al.] // J. Thromb. Res. – 2007. – Vol. 120, № 6. – P. 865–870.

445. Porphyromonas gingivalis facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD) [Electronic resource] / K.J. Maresz [et al.] // PLoS Pathog. – 2013. – Vol. 9, № 9. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771902/

446. Potlukova, T. Complement Component C1q and Anti-C1q Antibodies in Theory and in Clinical Practice / T. Potlukova, P. Kralikova // Scand. J. Immunol. – 2008. – Vol. 67, № 5. – P. 423-430.

447. Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies / M.D. Lockshin [et al.] // Arthritis Rheum. – 2012. – Vol. 64, № 7. – P. 2311–2318.

448. Premenstrual syndrome and associated skin diseases related to hypersensitivity to female sex hormones / A. Itsekson [et al.] // J. Reprod. Med. – 2004. –Vol. 49, № 3. – P. 195-199.

449. Prevalence and clinical correlation of anti-phospholipid-binding protein antibodies in anticardiolipinnegative patients with systemic lupus erythematosus and women with unexplained recurrent miscarriages / N. Bizzaro [et al.] // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2005. – Vol. 129, № 1. – P. 61–68.

450. Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses / T. Sugi [et al.] // Fertil. Steril. – 1999. – Vol. 71, № 6. – P. 1060–1065.

451. Prevalence and significance of anti-phosphatidylserine antibodies: a pooled analysis in 5992 / M. Radin [et al.] // Thromb. Res. – 2018. – Vol. 170. – P. 28-31.

452. Prevalence and significance of anti-prothrombin (aPT) antibodies in patients with Lupus Anticoagulant (LA) / V. Pengo [et al.] // Thromb. Res. – 2010. – Vol. 126, № 2. – P. 150-153.

453. Primary dysmenorrhea and risk of preterm delivery / C.M. Juang [et al.] // Am. J. Perinatol. – 2007. – Vol. 24, №1. – P. 11-16.

454. Proft, T. Streptococcal Superantigens: Biological properties and potential role in disease / T. Proft, J.D. Fraser // Source Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations // Ed. J.J. Ferretti, D.L. Stevens, V.A. Fischetti. - Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016. – P. 1-41.

455. Progesterone in normal and pathological pregnancy / G.C. Di Renzo [et al.] // Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. – 2016. – Vol. 27, № 1. – P. 35-48.

456. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity / G. Laskarin [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 48, № 4. – P. 201–209.

457. Progestogen hypersensitivity in 24 cases: diagnosis, management, and proposed renaming and classification / D. Foer [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. Pract. – 2016. – Vol. 4, № 4. – P. 723-729.

458. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts / Z.M. Wu [et al.] // Placenta. – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 188–194.

459. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction / S. Saha [et al.] // Arthritis Rheum. – 2009. – Vol. 60, № 6. – P.1743–1752.

460. Prolactin and Autoimmunity / L.J. Jara [et al.] // Clin. Rev. Allerg. Immunol. – 2011. – Vol. 40, № 1. – P. 50–59.

461. Prolactin, systemic lupus erythematosus, and autoreactive B cells: lessons learnt from murine models / S. Saha [et al.] // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 2011. – Vol. 40, № 1. – P. 8–15.

462. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor / N. Kane [et al.] // Endocrinol. – 2009. – Vol. 150, № 6. – P. 2882–2888.

463. Protection against inflammation- and autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6 / Y. Martinez de la Torre [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2007. – Vol. 104, № 7. – P. 2319–2324.

464. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice / W.Y. Sun [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1998. – Vol. 23. – Vol. 95, № 13. – P. 7597-7602.

465. Purified IgG from patients with obstetric but not IgG from non-obstetric antiphospholipid syndrome inhibit trophoblast invasion / K. Poulton [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2015. – Vol. 73, № 5. – P. 390–401.

466. Putative predictors of antibodies against follicle-stimulating hormone in female infertility: a study based on in vitro fertilization patients / K. Haller [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2007. – Vol. 57, № 3. – P. 193–200.

467. Quantitative abnormalities of peripheral blood distinct T, B, and natural killer cell subsets and clinical findings in obstetric antiphospholipid syndrome / J. Carbone [et al.] // J. Rheumatol. – 2009. – Vol. 36, № 6. – P. 1217-1225.

468. Rand, J.H. Antibody-mediated interference with annexins in the antiphospholipid syndrome / J.H. Rand, X.X. Wu // Thromb. Res. – 2004. – Vol. 114, № 5-6. – P. 383–389.

469. Rand, J.H. Antiphospholipid antibody syndrome: new insights on thrombogenic mechanisms / J.H. Rand // Am. J. Med. Sci. – 1998. – Vol. 316, № 2. – P.142-151.

470. Rao, C.V. The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine / C.V. Rao, Z.M. Lei // Mol. Cell. Endocrinol. – 2007. – Vol. 269, № 1-2. – P. 2-8.

471. Recurrent pregnancy loss and inappropriate local immune response to sex hormones / A.M. Itsekson [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2007. – Vol. 57, № 2. – P. 160-165.

472. Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses / J.H. Rand [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2006. – Vol. 194, № 1. –P. 182–188.

473. Reed, S.G. Key roles of adjuvants in modern vaccines / S.G. Reed, M.T. Orr, C.B. Fox // Nat Med. – 2013. – Vol. 19, № 12. – P. 1597-1608.

474. Refractory obstetrical antiphospholipid syndrome: Features, treatment and outcome in a European multicenter retrospective study / A. Mekinian [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2017. – Vol. 16, № 7. – P. 730-734.

475. Regulation of immune responses and tolerance: the microRNA perspective / C.Z. Chen [et al.] // Immunol. Rev. – 2013. – Vol. 253, № 1. – P. 112–128.

476. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia / S.S. Pierangeli [et al.] // Arthritis Rheum. – 2005. – Vol. 52, № 7. – P. 2120–2124.

477. Rescher, U. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions / U. Rescher, V. Gerke // J. Cell Sci. – 2004. – Vol. 117, Pt. 13. – P. 2631–2639.

478. Research around beta 2-glycoprotein I: a major target for antiphospholipid antibodies / T. Atsumi [et al.] // Autoimmun. – 2005. – Vol. 38, № 5. – P. 377–381.

479. Resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with histories for obstetric antiphospholipid syndrome [Electronic resource] / B.J. Hunt [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2011. – Vol. 205, № 5. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3205287/

480. Risk factors for pregnancy failure in patients with anti-phospholipid syndrome treated with conventional therapies: a multicentre, case-control study / A. Ruffatti [et al.] // Rheumatol (Oxford). – 2011. – Vol. 50, № 9. – P. 1684–1689.

481. Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and metaanalysis / Q. Reynaud [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2014. – Vol. 13, № 6. – P. 595–608.

482. Robinson, D.P. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis / D.P. Robinson, S.L. Klein // Horm. Behav. – 2012. – Vol. 62. – P. 263–271.

483. Roby, R.R. Hormone allergy / R.R. Roby, R.H. Richardson, A.Vojdani // Am. J. Reprod. Immunol. – 2006. – Vol. 55, № 4. – P. 307–313.

484. Role of anti-annexin A5 in pathogenesis of hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome / N.K. Singh [et al.] // Int. J. Rheum. Dis. – 2013. –Vol. 16, № 3. – P. 325-330.

485. Routsias, J.G. B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: tools to study the regulation of the autoimmune response / J.G. Routsias, A.G. Tzioufas // J. Autoimmun. – 2010. – Vol. 35, № 3. – P. 256–264.

486. Rubtsova, K. Sexual dimorphism in autoimmunity / K. Rubtsova, P. Marrack, A.V. Rubtsov // J. Clin.Invest. - 2015. – Vol. 125, № 6. - P. 2187-2193.

487. Salmon, J.E. Human receptors for immunoglobulin G / J.E. Salmon, L. Pricop // Arthritis Rheum. – 2001. – Vol. 44, № 4. – P. 739-750.

488. Salmon, J.E. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies / J.E. Salmon, P.G. de Groot // Lupus. – 2008. – Vol. 17, № 5. – P. 405-411.

489. Samarkos, M. The clinical significance of IgA antiphospholipid antibodies / M. Samarkos, R.A. Asherson, S. Loizou // J. Rheumatol. – 2001. – Vol. 28, № 4. – P. 694-697.

490. Samarkos, M. The role of complement in the antiphospholipid syndrome: a novel mechanism for pregnancy morbidity / M. Samarkos, E. Mylona, V. Kapsimali // Semin. Arthritis Rheum. – 2012. – Vol. 42, № 1. – P. 66-69.

491. Sanmarco, M. ELISA for antiphosphatidylethanolamine antibody detection: high impact of assay buffer on results / M. Sanmarco // J. Immunol. Methods. – 2010. – Vol. 358, № 1-2. – P. 9–16.

492. Sanmarco, M. Is Testing for Antiphosphatidylethanolamine Antibodies Clinically Useful? / M. Sanmarco // Curr. Rheumatol. Rep. – 2011. – Vol. 13, № 1. – P. 81–85.

493. Sato, Y. Autoantibodies to Factor XII and Kininogen-Dependent Antiphosphatidylethanolamine Antibodies in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Augment Platelet Aggregation / Y. Sato, T. Sugi, R. Sakai // Am. J. Reprod. Immunol. – 2015. – Vol. 74, № 3. – P. 279-289.

494. Schreiber, K. Current insights in obstetric antiphospholipid syndrome / K. Schreibera, M. Radinc, S. Sciascia // Women's health. – 2017. – Vol. 29, № 6. – P. 397-403.

495. Schroeder, H.W.Jr. Structure and function of immunoglobulins [Electronic resource] / H.W.Jr. Schroeder, L. Cavacini // J. Allergy Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 125, № 2, Suppl. 2. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670108/

496. Schumacher, A. Human Chorionic Gonadotropin as a Pivotal Endocrine Immune Regulator Initiating and Preserving Fetal Tolerance [Electronic resource] / A. Schumacher // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18, № 10. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666847/

497. Search for peptide immunogens of beta-subunit of human chorionic gonadotropin (hCG) capable of eliciting hormone specific and neutralizing antisera. Identification of an undecapeptide eliciting hCG-specific antisera / K.S. Iyer [et al.] // Int. J. Pept. Protein Res. – 1992. – Vol. 39, № 2. – P. 137-144.

498. Seo, J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches / J. Seo, K.J. Lee // J. Biochem. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 37, № 1. – P. 35–44.

499. Seshadri, S. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis / S. Seshadri, S.K. Sunkara // Hum. Reprod. Update. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 429-438.

500. Sex-based differences in autoimmune diseases / E. Ortona [et al.] // Ann. Ist Super Sanità. – 2016. – Vol. 52, № 2. – P. 205-212.

501. Shatavi, S.V. Association of unexplained infertility with gonadotropin and ovarian antibodies / S.V. Shatavi, B. Llanes, J.L. Luborsky // Am. J. Reprod. Immunol. – 2006. - Vol. 56, № 5-6. – P. 286–291.

502. Shelly, S. Prolactin and autoimmunity / S. Shelly, M. Boaz, H. Orbach // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 6-7. – P. A465-A470.

503. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay [Electronic resource] / K. Egerer [et al.] // Arthritis Res. Ther. – 2011. – Vol. 21, № 13(4). – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3239356/

504. Skin test reactivity to female sex hormones in women with primary unexplained recurrent pregnancy loss / M.I. Ellaithy [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2013. – Vol. 99, № 1-2. – P. 17-23.

505. Snyder, J.L. Autoimmune progesterone dermatitis and its manifestation as anaphylaxis: a case report and literature review / J.L. Snyder, G. Krishnaswamy // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2003. – Vol. 90, № 5. – P. 469-477.

506. Some antiphospholipid antibodies bind to hemostasis and fibrinolysis proteases and promote thrombosis / P.P. Chen [et al.] // Lupus. – 2008. – Vol. 17, № 10. – P. 916-921.

507. Sperm antibodies, immunoglobulins, and complement in human follicular fluid / G.N. Clarke, C. Hsieh, S.H. Koh, M.N. Cauchi // Am. J. Reprod. Immunol. – 1984. – Vol. 5, № 4. – P. 179–181.

508. Staub, H.L. Anti-phosphatidylethanolamine antibody, thromboembolic events and the antiphospholipid syndrome / H. L. Staub, M. L. Bertolaccini, A. K. Munther // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol.12, № 2. – P. 230-234.

509. Steroid hormone hypersensitivity: clinical presentation and management / A.M. Itsekson [et al.] // Fertil. Steril. – 2011. – Vol. 95, № 8. – P. 2571-2573.

510. Stevens, V.C. Use of synthetic peptides as immunogens for developing a vaccine against human chorionic gonadotropin / V.C. Stevens // Ciba Found Symp. – 1986. – Vol. 119. – P. 200-225.

511. Structural and molecular studies of human chorionic gonadotropin and its receptor / J.W. Lustbader [et al.] // Recent Prog. Horm. Res. – 1998. – Vol. 53. – P. 395-424.

512. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K dependent proteins / M. Huang [et al.] // Nat. Struct. Biol. – 2003. – Vol. 10, № 9. – P. 751–756.

513. Structure of prothrombin in the closed form reveals new details on the mechanism of activation [Electronic resource] / M. Chinnaraj [et al.] // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8, № 1. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5811608/

514. Sugi, T. Autoantibodies to kininogen-phosphatidylethanolamine complexes augment thrombin-induced platelet aggregation / T. Sugi, J.A. McIntyre // Thromb. Res. – 1996. – Vol. 84, № 2. – P. 97-109.

515. Sugi, T. Certain autoantibodies to phosphatidylethanolamine (aPE) recognize factor XI and prekallikrein independently or in addition to the kininogens / T. Sugi, J.A. McIntyre // J. Autoimmun. – 2001. – Vol. 17, № 3. – P. 207–214.

516. Sugi, T. Kininogen-dependent antiphosphatidylethanolamine antibodies and autoantibodies to factor XII in patients with recurrent pregnancy loss / T. Sugi // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2013. – Vol. 39, № 7. – P. 1223-1229.

517. Sugi, T. Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies / T. Sugi, J.A. Mclntyre // Thromb. Haemost. – 1996. – Vol. 76, № 3. – P. 354–360.

518. Supplementation with progestogens in the first trimester of pregnancy to prevent miscarriage in women with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials / G. Saccone [et al.] // Fertil. Steril. – 2017. – Vol.107, № 2. –P. 430-438.

519. SV40 Tag transformation of the normal invasive trophoblast results in a premalignant phenotype I Mechanisms responsible for hyperinvasiveness and resistance to anti-invasive action of TGFb / N.K. Khoo [et al.] // Intl. J. Cancer. – 1998. – Vol. 77, № 3. – P. 429-439.

520. Szekeres-Bartho, J. PIBF: The Double Edged Sword. Pregnancy and Tumor / J. Szekeres-Bartho, B. Polgar // Am. J. Reprod. Immunol. – 2010. – Vol. 64, № 2. – P. 77–86.

521. Talwar, G.P. Making of a vaccine preventing pregnancy without impairment of ovulation and derangement of menstrual regularity and bleeding profiles / G.P. Talwar // Contraception. – 2013. – Vol. 87, № 3. – P. 280–287.

522. Tan, I.J. Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens / I.J. Tan, E. Peeva, G. Zandman-Goddard // Autoimmun. Rev. – 2015. – Vol.14, № 6. – P. 536-542.

523. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH / K.M. Devreese [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2014. – Vol. 12, № 5. – P. 792-795.

524. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy /S. Saito [et al.] //Am. J. Reprod. Immunol. – 2010. – Vol. 63, № 6. – P. 601–610.

525. Th1/Th2/Th17/Treg expression in cultured PBMCs with antiphospholipid antibodies / J. Xiao [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2012. – Vol. 6, № 5. – P. 1035-1039.

526. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss / S.K. Lee [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2012. – Vol. 67, № 4. – P. 311–318.

527. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis / J.H. Rand [et al.] // Lupus. – 2010. – Vol. 19, № 4. – P. 460–469.

528. The association between antiphospholipid antibodies and placenta mediated complications: a systematic review and metaanalysis / K. Abou-Nassar, M. Carrier, T. Ramsay, M. A. Rodger // Thromb. Res. – 2011. – Vol. 128, № 1. – P. 77–85.

529. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study / B. de Laat [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2009. – Vol. 7, № 11. – P. 1767–1773.

530. The Autoimmune ecology [Electronic resource] / J.-M. Anaya [et al.] // Front. Immunol. – 2016. – Vol. 7. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844615/

531. The autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA)/Shoenfeld's syndrome: descriptive analysis of 300 patients from the international ASIA syndrome registry / A. Watad [et al.] // Clin. Rheumatol. – 2018. – Vol. 37, № 2. – P. 483-493.

532. The Balance of the Immune System between T Cells and NK Cells in Miscarriage / A. Nakashima [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2012. – Vol. 67, № 4. – P. 304–310.

533. The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity / J.H. Lu [et al.] // Cell. Mol. Immunol. – 2008. – Vol. 5, № 1. – P. 9–21.

534. The clinical relevance of IgA anticardiolipin and IgA anti-β2 glycoprotein I antiphospholipid antibodies: a systematic review / H. Meijide [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2013. – Vol. 12, № 3. – P. 421-425.

535. The clinical significance of posttranslational modification of autoantigens / M.G. Zavala-Cerna [et al.] // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 2014. – Vol. 47, № 1. – P. 73–90.

536. The crossroads of autoimmunity and immunodeficiency: Lessons from polygenic traits and monogenic defects / B. Grimbacher [et al.] // J. Allerg. Clin. Immunol. – 2016. – Vol. 137, № 1. – P. 3-17.

537. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage / W.J. Wang [et al.] // Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 25, № 10. – P. 2591–2596.

538. The detection of anti-beta2-glycoprotein I antibodies is associated with increased risk of pregnancy loss in women with threatened abortion in the first trimester / A. Mezzesimi [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2007. – Vol. 133, № 2. – P. 164-168.

539. The DNA methylation landscape of human early embryos / H. Guo [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 511, № 7511. – P. 606–610.

540. The effect of induced anti-follicle-stimulating hormone autoantibody on serum hormone level and apoptosis in rat testis / B. Yao [et al.] // Life Sciences. – 2012. – Vol. 91, № 3–4. – P. 83–88.

541. The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): A survey of 247 consecutive cases / J. Alijotas-Reig [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2015. – Vol. 14, № 5. – P. 387–395.

542. The glycoprotein hormones: recent studies of structure function relationships / R.J. Ryan [et al.] // FASEB J. – 1988. – Vol. 2, № 11. – P.2661-2669.

543. The HSD-hCG vaccine prevents pregnancy in women, feasibility study of a reversible safe contraceptive vaccine / G.P. Talwar [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 1997. – Vol. 37, № 2. – P.153–160.

544. The immunogenetics of smallpox vaccination / Jr.S.L. Stanley [et al.] // J. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 196, № 2. – P. 212–219.

545. The implications of autoimmunity and pregnancy / A.T. Borchers [et al.] // J. Autoimmun. – 2010. – Vol. 34, № 3. – P. J287-J299.

546. The isobm td-7 workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis:assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives / P. Berger [et al.] // Tumor Biol. – 2002. – Vol. 23, № 1. – P. 1–38.

547. The kaleidoscope of autoimmunity: multiple autoimmune syndromes and familial autoimmunity / J.M. Anaya [et al.] // Expert Rev. Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 3, № 4. – P. 623-635.

548. The lupus anticoagulant: results from 2257 patients attending a high-risk pregnancy clinic / C.A. Clark [et al.] // Blood. – 2013. – Vol. 122, № 3. – P. 341–347.

549. The molecular basis for epitopes on the free betasubunit of human chorionic gonadotrophin (hCG), its carboxylterminal peptide and the hCG beta-core fragment / S. Dirnhofer [et al.] // J. Endocrinol. – 1994. – Vol. 141, № 1. – P. 153–162.

550. The mosaic of autoimmunity: genetic factors involved in autoimmune diseases—2008 / Y. Shoenfeld [et al.] // Isr. Med. Assoc. J. – 2008. – Vol.10, № 1. – P. 3-7.

551. The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases – 2008 / Y. Shoenfeld [et al.] // Isr. Med. Assoc. J. – 2008. – Vol. 10, № 1. – P. 8-12.

552. The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases—2008 / Y. Shoenfeld [et al.] // Isr. Med. Assoc. J. – 2008. – Vol. 10, № 1. – P.13-19.

553. The outcome of ELISA for antiphosphatidylethanolamine antibodies is dependent on the composition of phosphatidylethanolamine / S. Hou, P.E. Harper, N. Bardin, M. Zhao // J. Immunol. Methods. – 2017. – Vol. 440. – P. 27-34.

554. The placental bed in pregnancies complicated by primary antiphospholipid syndrome / S. Stone [et al.] // Placenta. – 2006. – Vol. 27, № 4-5. – P. 457–467.

555. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients / J.R. Palacio [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2006. – Vol. 144, № 2. – P. 217-222.

556. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes and decidua / E. Reshef [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1990. – Vol. 70, № 2. – P. 421–430.

557. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome / O. Amengual, T. Atsumi, M.A. Khamashta, G.R. Hughes // Thromb. Haemost. – 1998. – Vol.79, № 2. – P. 276-281.

558. The use of atomic force microscopy to study the pathologic effects of anti-annexin autoantibodies / S. Irman [et al.] // J. Autoimmun. – 2011. – Vol. 36, № 2. – P. 98–105.

559. The X chromosome and the sex ratio of autoimmunity / C. Selmi [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 6-7. – P. A531–A537.

560. Themmen, A.P.N. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function / A.P.N. Themmen, I.T. Huhtaniemi // Endocrine Reviews. – 2000. – Vol. 21, №. 5. – P. 551–583.

561. Thin-layer chromatography immunostaining in detecting anti-phospholipid antibodies in seronegative anti-phospholipid syndrome / F. Conti [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2012. – Vol. 167, № 3. – P. 429-437.

562. Thomas, F.H. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth [Electronic resource] / F.H. Thomas, B.C. Vanderhyden // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2006. – Vol. 4. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1481519/

563. Thomas, J.W. Antigen-specific responses in autoimmunity and tolerance / J.W. Thomas // Immunol. Res. – 2001. – Vol. 23, № 2-3. – P. 235-244.

564. Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain / T. Arai [et al.] // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2006. – Vol. 65, № 1. – P. 19–25.

565. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster / M. Jankowski [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 101, № 1. – P. 157–162.

566. Thrombus formation induced by antibodies to β2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor / F. Fischetti [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 7. – P. 2340–2346.

567. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury / P. Redecha [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 110, № 7. – P. 2423–2431.

568. TLR4 is involved in the pathogenic effects observed in a murine model of antiphospholipid syndrome / H. Xie [et al.] // Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 160, № 2. – P. 198–210.

569. TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1beta and caspase-1 in monocytes and dendritic cells / J. Hurst [et al.] // Immunobiol. – 2009. – Vol. 214, № 8. – P. 683–691.

570. TNF alpha DNA vaccination prevents clinical manifestations of experimental antiphospholipid syndrome / M. Blank [et al.] // Lupus. – 2003. – Vol. 12, № 7. – P. 546-549.

571. Toll-like receptors: another player in the pathogenesis of the anti-phospholipid syndrome / E. Raschi [et al.] // Lupus. – 2008. – Vol. 17, № 10. – P. 937-942.

572. Tong, M. Antiphospholipid antibodies and the placenta: a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment / M. Tong, C.A. Viall, L.W. Chamley // Hum. Reprod. Update. – 2015. – Vol. 21, № 1. – P. 97–118.

573. Transcriptomic analysis of placenta affected by antiphospholipid antibodies: following the TRAIL of trophoblast death / P. Pantham [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2012. – Vol. 94, № 2. – P. 151–154.

574. Treatment of common gynecologic-endocrinologic symptoms by allergy management procedures / C.R. Mabray [et al.] // Obstet. and Gynecol. – 1982. – Vol. 59, №5. – P. 560-564.

575. Ulloa-Aguirre, A. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor / A. Ulloa-Aguirre, C. Timossi // Human Reproduction Update. – 1998. - Vol. 4, №. 3. – P. 260–283.

576. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection syndrome / V. Pengo [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2009. – Vol. 7, № 10. – P. 1737–1740.

577. Urbanus, R.T. Current insight into diagnostics and .pathophysiology of the antiphospholipid syndrome / R.T. Urbanus, R.H. Derksen, P.G. de Groot // Blood Rev. – 2008. – Vol. 22, № 2. – P. 93–105.

578. Us, D. Viral superantigens / D. Us // Mikrobiyol. Bul. – 2016. – Vol. 50, № 3. – P. 491-504.

579. Use of single point mutations in domain I of β2-glycoprotein I to determine fine antibody specificity of antiphospholipid autoantibodies / G.M. Iverson [et al.] // J. Immunol. – 2002. – Vol. 169, № 12. – P. 7097–7103.

580. Vaccines, adjuvants and autoimmunity / L.E. Guimarãesa [et al.] // Pharmacol. Res. – 2015. – Vol. 100. – P. 190–209.

581. Val247Leu beta2-glycoprotein-I allelic variant is associated with antiphospholipid syndrome: systematic review and meta-analysis / A.J. Chamorro [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2012. – Vol. 11, № 10. – P.705-712.

582. Value of isolated IgA anti-beta2-glycoprotein I positivity in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome / V. Murthy [et al.] // Arthritis Rheum. – 2013. – Vol. 65, № 12. – P. 3186–3193.

583. Vance, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids / J.E. Vance // J. Lipid Res. – 2008. – Vol. 49, № 7. – P. 1377–1387.

584. Variability in exposure of epitope G40-R43 of domain I in commercial anti-beta2-glycoprotein I IgG ELISAs [Electronic resource] / L. Pelkmans [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 8. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3741166/

585. Variability in the expression of trophectodermal markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1

glycoprotein by the human blastocyst / A. Jurisicova [et al.] // Hum. Reprod. – 1999. – Vol. 14, № 7. – P. 1852–1858.

586. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans / T. Vatanen [et al.] // Cell. – 2016. – Vol. 165, № 4. – P. 842–853.

587. Vascular endothelial growth factor expression in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome / M.J. Cuadrado [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2006. – Vol. 4, № 11. – P. 2461–2469.

588. Viall, C.A. Histopathology in the placentae of women with antiphospholipid antibodies: a systematic review of the literature / C.A. Viall, L.W. Chamley // Autoimmun. Rev. – 2015. – Vol. 14, № 5. – P. 446–471.

589. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity / D.R. Getts [et al.] // Immunol. Rev. – 2013. – Vol. 255, № 1. – P. 197–209.

590. Vojdani, A. A potential link between environmental triggers and autoimmunity [Electronic resource] / A. Vojdani // Autoimmun. Dis. – 2014. – Vol. 2014. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3945069/

591. Wang, M.W. Blocking of pregnancy in mice by immunization with anti-idiotype directed against monoclonal anti-progesterone antibody / M.W. Wang, R.B. Heap, M.J. Taussig // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1989. – Vol. 86, № 18. – P. 7098-7102.

592. Wass, M. Isolation of antibodies to HCG/LH from human sera / M. Wass, K. McCann, K.D. Bagshawe // Nature. – 1978. – Vol. 274, № 5669. – P. 369-370.

593. What is the best time to assess the antiphospholipid antibodies (aPL) profile to better predict the obstetric outcome in antiphospholipid syndrome (APS) patients? / J.O. Latino [et al.] // Immunol. Res. – 2018. – Vol. 66, № 5. – P. 577-583.

594. Willis, R. Anti-β2-glycoprotein I antibodies / R.Willis, S.S. Pierangeli // Ann N Y Acad Sci. – 2013. – Vol. 1285. – P. 44-58.

595. Willis, R. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome / R. Willis, E.N. Harris, S.S. Pierangeli // Semin. Thromb. Hemost. – 2012. – Vol. 38, № 4. – P. 305–321.

596. Woof, J.M. The function of immunoglobulin A in immunity / J.M. Woof, M.A. Kerr // J. Pathol. – 2006. – Vol. 208, № 2. – P. 270-282.

597. Wucherpfennig, K.W. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents / K.W. Wucherpfennig // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 108, № 8. – P. 1097-1104.

598. Yetman, D.L. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies / D.L. Yetman, W.H. Kutteh // Fertil. Steril. – 1996. – Vol. 66, № 4. – P. 540–546.

599. Youinou, P. The antiphospholipid syndrome as a model for B cell-induced autoimmune diseases / P. Youinou, Y. Renaudineau // Thromb. Res. – 2004. – Vol. 114, № 5-6. – P. 363-369.

600. Zenclussen, A.C. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal–maternal interface / A.C. Zenclussen [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2006. – Vol. 36, № 1. – P. 82–94.

601. Zhou, H. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilazep / H. Zhou, A.S. Wolberg, R.A. Roubey // Blood. – 2004. – Vol. 104, № 8. – P. 2353–2358.

602. Ziakas, P.D. Heparin treatment in antiphospholipid syndrome with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis / P.D. Ziakas, M. Pavlou, M. Voulgarelis // Obstet. Gynecol. – 2010. – Vol. 115, № 6. – P. 1256-1262.

603. Zieve, G.W. The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology / G.W. Zieve, P.R. Khusial // Autoimmun. Rev. – 2003. – Vol. 2, № 5. – P. 235–240.

604. Zimmermann, G. Epithelial Human Chorionic Gonadotropin Is Expressed and Produced in Human Secretory Endometrium During the Normal Menstrual Cycle / G. Zimmermann, W. Ackermann, H. Alexander // Biol. Reprod. – 2009. – Vol. 80, № 5. – P. 1053–1065.

605. β_2-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator / K. Gropp [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 118, № 10. – P. 2774-2783.

606. β2-glycoprotein I: a novel component of innate immunity / C. Agar [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 117, № 25. – P. 6939–6947.