

Яременко О.Б.

ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В РЕВМАТОЛОГИИ

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца (г. Киев)

Резюме. В статье освещена роль лабораторных иммунологических исследований в диагностике и мониторинге течения системных воспалительных ревматических заболеваний и антифосфолипидного синдрома. Приведены характеристика основных методов выявления аутоантител, клиническое значение наличия той или иной их разновидности, рациональный алгоритм назначения иммунологических исследований, рассмотрены вопросы серонегативности.

Ключевые слова: системные воспалительные ревматические заболевания, антифосфолипидный синдром, иммунологические исследования.

Клиническая диагностика системных воспалительных ревматических заболеваний (СВРЗ) нередко сопряжена со значительными трудностями, особенно при атипичном или моно-олигосиндромном варианте дебюта, при течении заболевания по типу «айсберга». Такое постепенное, «пошаговое» развертывание клинической симптоматики наблюдается не менее, чем в половине случаев системной красной волчанки (СКВ), системной склеродермии (ССД), болезни Шегрена, смешанного заболевания соединительной ткани (СЗСТ), системных васкулитов, ревматоидного артрита (РА), антифосфолипидного синдрома (АФЛС). При таких обстоятельствах особенно большое значение в диагностическом процессе имеют лабораторные исследования. Среди них условно можно выделить 3 группы тестов: 1) обычные клиничко-биохимические исследования, позволяющие выявить воспалительный процесс (повышение СОЭ, С-реактивного белка, альфа-2- и гамма-глобулинов, фибриногена, лейкоцитоз или лейкопения, вторичная анемия) и поражение отдельных органов и систем; 2) иммунологические исследования для обнаружения специфических аутоиммунных/иммуногенетических маркеров; 3) исследования, направленные на выявление и идентификацию инфекционного агента (антигены (например, HbsAg), антитела (АТ), обнаружение ДНК или РНК возбудителя методом полимеразной цепной реакции, культуральные методы).

Изменения лабораторных показателей воспаления, безусловно, играют важную роль в диагностическом процессе, однако у значительной части больных в дебюте СВРЗ (иногда – доволь-

но продолжительное время) они могут оставаться в пределах коридора нормальных величин. Кроме того, эти изменения совершенно неспецифичны и могут наблюдаться при инфекциях, опухолях, аутоиммунных неревматических заболеваниях. Стоит, однако, заметить, что очень высокие уровни С-реактивного белка всегда должны вызывать подозрение на наличие СВРЗ. При соответствующей клинической симптоматике и исключении инфекции некоторое значение может иметь изменение уровня лейкоцитов в крови: лейкоцитоз характерен для синдрома Стилла, системных некротизирующих васкулитов, лейкопения – для синдрома Фелти и СКВ, в меньшей степени – для СЗСТ (болезни Шарпа) и болезни Шегрена. Касательно уровня тромбоцитов, то он может повышаться соответственно степени активности воспаления (но практически никогда не выше $800 \times 10^9/\text{л}$), тромбоцитопения встречается при СКВ и АФЛС.

Иммунологические исследования для выявления специфических неинфекционных аутоиммунных/иммуногенетических маркеров СВРЗ включают:

- а) определение аутоантител к внеклеточным антигенам и патологических титров субклассов иммуноглобулинов (Ig). Классическими представителями этой группы иммунологических тестов являются ревматоидный фактор (АТ, в первую очередь IgM-АТ, к Fc-фрагменту собственного IgG), АТ к циклическому цитруллинированному пептиду (ЦЦП) и модифицированному цитруллинированному виментину (МЦВ), имеющие ключевое

значение в диагностике РА. В последние годы выделена новая нозологическая форма СВРЗ - IgG4-зависимое заболевание, одним из основных диагностических критериев которого является повышение уровня IgG4 в сыворотке крови более, чем 1,35 г/л [7];

- б) определение аутоантител к клеточным антигенам (подробнее см. далее);
- в) определение иммуногенетических маркеров - антигенов системы HLA. Выявление HLA-B27 тесно ассоциируется с анкилозирующим спондилоартритом и другими серонегативными спондилоартритами и включено в современный диагностический алгоритм этой группы заболеваний. Носителями HLA-DR4 или HLA-DR1 являются около 80% больных РА, однако из-за низкой специфичности определение этих антигенов не рекомендовано в качестве диагностического теста.

Среди иммунологических тестов, направленных на выявление инфекционных агентов, наиболее часто в ревматологической практике используется определение АТ к антигенам -гемолитического стрептококка группы А (АСЛ-О) - для диагностики острой ревматической лихорадки; определение IgM- и IgG-АТ к Chlamidia trachomatis, Yersinia enterocolitica, Borrelia burgdorferi и другим инфекционным агентам - для диагностики реактивных артритов и Лаймской болезни.

При СВРЗ на разных стадиях процесса могут выявляться разнообразные отклонения (как правило, количественно небольшие) со стороны традиционных показателей клеточного и гуморального иммунитета (субпопуляции лимфоцитов, Ig, фагоцитарная активность и т.п.), однако в подавляющем большинстве случаев они не имеют никакого клинического (диагностического, прогностического, для выбора лечебной тактики) значения. Тем более эти параметры нет смысла исследовать на фоне проводимой патогенетически обоснованной, в ряде случаев - по жизненным показаниям терапии мощными иммуносупрессантами - глюкокортикоидами и цитостатиками. Уровень циркулирующих иммунных комплексов повышен при большинстве СВРЗ (равно как и при многих неревматических заболеваниях), в некоторых случаях коррелирует с активностью патологического процесса, однако он не может быть ни диагностическим, ни надежным лечебно-тактическим ориентиром. Поэтому в рутинной клинической практике определение

показателей «общей иммунограммы» у больных с СВРЗ нецелесообразно и не входит в алгоритмы диагностики или мониторинга ни одного распространенного ревматического заболевания. Из этой общей позиции есть несколько исключений: 1) для диагностики и мониторинга течения СКВ и болезни Шарпа с чертами СКВ используется определение активности С3 и С4 компонентов комплемента (приемлемо - оценка его общей гемолитической активности по СН50); 2) для диагностики эссенциального криоглобулинемического васкулита определяют криоглобулины в плазме крови; 3) в последние годы для контроля эффективности и безопасности анти-В-клеточно-деплеционной терапии (на Украине - препарат ритуксимаб) считают целесообразным контролировать уровень В-лимфоцитов (CD19+) и Ig; 4) при подозрении на СПИД, в т.ч. для уточнения стадии процесса, может быть полезным определение количества CD4+-Т-лимфоцитов; 5) при подозрении на наличие у больного с СВРЗ общевариабельного (первичного) иммунодефицита (гипо- или агаммаглобулинемия, рецидивирующие инфекции - в первую очередь органов дыхания, недостаточный ответ на вакцинации и т.п.) необходимо исследовать сывороточную концентрацию основных классов иммуноглобулинов (диагностическое значение имеет стойкое снижение суммарной концентрации IgG, IgA, IgM менее 4 г/л) [3]. Как указывалось выше, для диагностики IgG4-зависимого заболевания имеет важное значение сывороточный уровень IgG4, однако субклассы IgG не определяются в рамках традиционной иммунограммы, это исследование выполняют отдельные специализированные лаборатории. То есть во всех случаях речь идет о целенаправленном, «точечном» исследовании отдельных параметров иммунного статуса, а не об оценке показателей так называемой «общей иммунограммы».

Диагностический алгоритм многих СВРЗ, в первую очередь таких, как системные заболевания соединительной ткани, системные васкулиты, включает определение специфических иммунологических маркеров - АТ к определенным клеточным антигенам, основной перечень и локализация которых представлены в таблице I.

Как видно из таблицы, в ядерном материале идентифицировано более 20 антигенов, АТ к которым продуцируются главным образом при системных заболеваниях соединительной ткани (всего описано более 100 разновидностей антиядерных АТ). Однако практическое значение

Табл
Локи

Н
d
s
Г
П
Я
Я
S
PI

Пр
на
од
риб
La(
АН

имее
нам (
хотя
быть
пока
связь
ассоци
ния а
имму
Клас
закл
на к
печес
преп
эпите
фиче
ными

Таблиця 1

Локалізація основних клітинних антигенів, визначення АТ к которым використовується в діагностиці СРВЗ

Ядро клітки		Цитоплазма клітки	Мембрана клітки
Нуклеопротеїн (DNP)	ds-RNA (синтетич.)	Jo-1	Кардіоліпін, другі фосфоліпіди
ds-DNA	ss-RNA (натур.)	Ro(SS-A)	
ss-DNA	пRNP (U1 RNP)	Серинова протеїназа-3 (в нейтрофілах)	Фосфоліпіди ПТАК
Гістони	rRNP		
Центромера	Sm	Миєлопероксидаза (еластаза, лактоферрин) (в нейтрофілах)	
Ядерний матрикс	Ro(SS-A)		
Ядрышка	La(SS-B)	Мітохондрії	
Scl-70	RANA, Mi, MA, Su, PCNA, Ki, Ku, HMG-17		
PM-1			

АНА (АНФ)

Примечание. Жирным шрифтом выделены антигены, выявление АТ к которым имеет наибольшее диагностическое значение. ds-DNA – двухспиральная (нативная) ДНК, ss-DNA – односпиральная (денатурированная) ДНК, Scl-70 – склеродерма-70 (топоизомераза-1), RNP – рибонуклеопротеин, Sm – антиген Смита (Smith), Ro(SS-A) – антиген Рональда (Ronald), La(SS-B) – антиген Лейна (Lane), АНА – антинуклеарные антитела (антинуклеарный фактор – АНФ), Jo-1 – синтетаза тРНК, ПТАК – протромбинактивирующий комплекс.

имеет определение АТ лишь к некоторым антигенам (выделены жирным шрифтом). При наличии хотя бы одной разновидности этих АТ должен быть позитивным тест на АНФ – обобщающий показатель, свидетельствующий о выработке АТ, связывающихся с нуклеиновыми кислотами и ассоциированными с ними белками. Для выявления антинуклеарных АТ используются 2 метода – иммунофлюоресцентный и иммуноферментный. Классический иммунофлюоресцентный метод заключается в нанесении исследуемой сыворотки на клеточные субстраты (криостатные срезы печени крыс или мышей, в последнее время – препараты перевиваемой линии человеческих эпителиоидных клеток HEp-2) и, в случае специфического связывания сывороточных АТ с ядерными антигенами, выявлении под люминесцен-

тным микроскопом характерного свечения, обусловленного добавлением меченой флюоресцеинизотиоцианатом антигаммаглобулиновой сыворотки. Наличие и характер желто-зеленого свечения, указывающего на расположение антигена, с которым специфически связались АТ, оценивается визуально. Строго говоря, именно иммунофлюоресцентным методом определяется то, что принято называть АНФ. Тест на наличие АНФ – мало стандартизованное, трудоемкое исследование, в оценке результатов которого всегда присутствует субъективный фактор. Позднее появился автоматизированный, быстрый в исполнении и более стандартизованный метод исследования антинуклеарных АТ – метод иммуноферментного анализа (ИФА). В ходе ИФА антиядерные АТ выявляют с использованием конкретных реком-

Таблиця 2

Типи флюоресценції і їх значення при визначенні АНФ іммунофлюоресцентним методом

Тип свечення	Антигени	Заболевание
Периферический (краевой)	dsDNA, ламинин	СКВ, ХАГ
Гомогенный (диффузный)	DNP, гистон	СКВ, лекарственная красная волчанка, дерматозы, опухоли
Крапчатый (пятнистый)	Sm, RNP, Scl-70, Ro(SS-A), La(SS-B)	СКВ, СЗСТ, ССД, синдром Шегрена
Нуклеолярный (ядрышковый)	7S-RNA	ССД
Центромерный	центромера	CREST-синдром

Примечание. ХАГ – хронический активный гепатит.

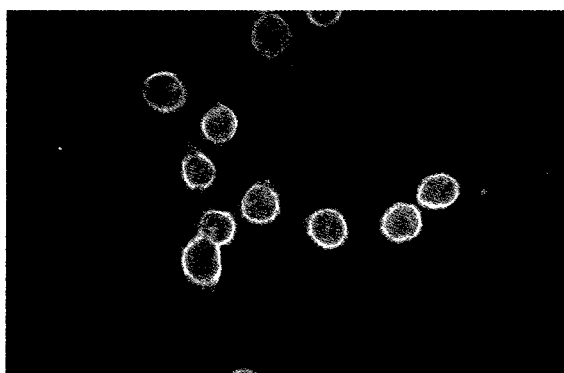
бинантных ядерных антигенов и/или очищенных экстрактов ядер Нер-2, фиксированных на различных твердых носителях, с применением усовершенствованных автоматических методов регистрации присутствия АТ. Считается, что иммунофлюоресцентный метод выявления АНФ – более чувствительный и информативный, чем определение антинулеарных АТ методом ИФА. Последний рассматривается как скрининговый при подозрении на системное заболевание соединительной ткани, в то время как иммунофлюоресцентный метод не только подтверждает факт наличия антиядерных АТ, но и указывает на их конечный титр, а также по характеру свечения дает информацию о ядерных антигенах, против которых эти АТ направлены. Тем не менее метод ИФА постоянно совершенствуется, в т.ч. в плане количественной оценки уровня АТ, и почти вытеснил иммунофлюоресцентную методику из арсенала клинических лабораторий.

Результаты исследования антинулеарных АТ методами иммунофлюоресценции и ИФА в большинстве случаев сопоставимы, но в некоторых клинических ситуациях между ними могут быть расхождения вследствие определенных различий используемых ядерных антигенных детерминант, разной чувствительности и специфичности. Встречаются как случаи отрицательного результата по данным ИФА при положительном АНФ, так и случаи положительного результата в тесте ИФА при отрицательном АНФ. Поэтому при выявлении методом ИФА диагностически значимого уровня антиядерных АТ у пациента с соответствующей клинической симптоматикой можно удовлетвориться данными только этого

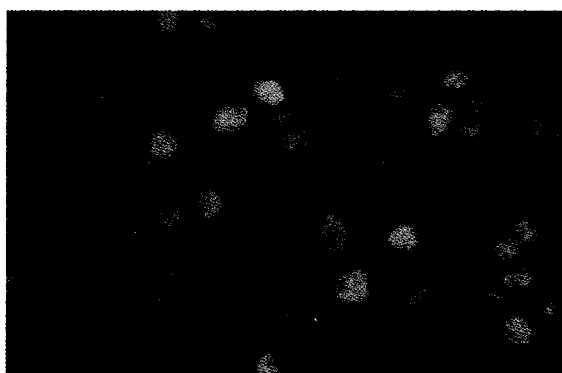
исследования. Если же имеются клинические основания подозревать системное заболевание соединительной ткани, а в тесте ИФА получены отрицательные или сомнительные результаты, то следует провести анализ с использованием иммунофлюоресцентного метода. При отсутствии финансовых ограничений на этапе первичного установления диагноза лучше иметь результаты обеих методик.

В процессе определения АНФ иммунофлюоресцентным методом может быть выявлен какой-либо один из пяти типов флюоресценции. При этом характер свечения зависит от того, с какими ядерными антигенами связались АТ, и, соответственно, свидетельствует в пользу того или иного заболевания (табл. 2, рис. 1). Следовательно, уже по типу свечения можно предварительно определиться с наиболее вероятным диагнозом из группы системных заболеваний соединительной ткани, причем наиболее однозначно – в отношении ССД и ее классической разновидности – CREST-синдрома.

Вместе с тем, при определении АНФ иммунофлюоресцентным методом имеются определенные ограничения. Во-первых, во многих случаях не удастся определить тип флюоресценции. Во-вторых, АНФ недостаточно высоко специфичен для системных заболеваний соединительной ткани: он выявляется у 95-100% больных СКВ, СЗСТ, 75-90% больных с болезнью Шегрена, 50-90% больных ССД, 25-50% больных с дерматомиозитом или полимиозитом, но нередко обнаруживается у больных РА (до 30%), системными некротизирующими васкулитами (до 15%), при 15-20 ревматических заболеваниях, включая



а. периферический (краевой)



б. гомогенный (диффузный)



в. крапчатый (пятнистый)



г. нуклеолярный (ядрышковый)

Рисунок 1. Основные типы флуоресцентного свечения АНФ

опухоли и лимфопролиферативные заболевания; более того, позитивность по АНФ встречается у 3-5% здоровых людей в возрасте до 70 лет и у 5-20% - старше 70 лет. Дополнительным методологическим неудобством является необходимость содержания Нер-2 клеток. Именно поэтому, как уже упоминалось, в последние годы повсеместное распространение получил более доступный и простой в исполнении, исключающий субъективный фактор метод ИФА - ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Основной недостаток метода ИФА - он не позволяет определить некоторые из антинуклеарных АТ (например, анти-нуклеолярные АТ), полный их спектр выявляется только иммунофлуоресцентной методикой.

Следует отметить, что при неревматических, в т.ч. онкологических, заболеваниях титры АНФ обычно невысокие и нестойкие. Представляет теоретический интерес факт повышенной частоты обнаружения АНФ у родственников больных СКВ - в 15-25% случаев. Более того, у этой категории лиц с повышенной частотой выявляются и АТ к dsDNA - более специфичное по сравнению

с АНФ иммунологическое отклонение у больных СКВ. Так, если у больных СКВ АТ к dsDNA обнаруживаются примерно в 70% случаев, то у контактирующих с ними родственников - в 7% случаев, у контактирующих с ними не-родственников (например, медицинский персонал) - в 5%; в то же время у родственников больных СКВ, проживающих отдельно, эти АТ находят с частотой, близкой к 0%, в контрольной группе - в 1% случаев [2]. Эти данные используют в качестве аргумента в пользу вирусной теории этиопатогенеза СКВ, а в некоторых странах принимают во внимание работодатели как основание для дополнительных выплат медицинскому персоналу (как за работу с инфекционными больными). Впрочем, носительство АНФ и АТ к dsDNA, а также лимфцитотоксических АТ у близко контактирующих с больными СКВ людей не ассоциируется с повышенной заболеваемостью этим или другими системными аутоиммунными ревматическими заболеваниями. Это еще раз подчеркивает ведущую роль генетических факторов в развитии СКВ.

Таблица 3
Разновидности аутоАТ у больных СКВ и их клиническое значение

Тип аутоАТ	Частота	Клиническое значение
АНА (АНФ)	95%	Скрининговый диагностический тест
АТ к dsDNA	70%	Относительно специфичны; критерий активности; часто нефрит
АТ к ssDNA	>90%	Мало специфичны; критерий активности; часто нефрит
АТ к Sm	15-30%	Высоко специфичны; часто при отсутствии АТ к DNA; тяжелое течение, поражение почек, центральной нервной системы
АТ к RNP	40%	Нефрит редко (если отсутствуют АТ к DNA); часто СЗСТ
АТ к Ro(SS-A)	30%	В >60% случаев при отрицательных АНА; подострая кожная волчанка, дефицит С3 и С4, дебют в возрасте >60 лет, врожденная АВБ, послеродовая СКВ; критерий активности, возможен нефрит
АТ к La(SS-B)	15%	При наличии одновременно АТ к Ro(SS-A) нефрит редко; благоприятное течение
АТ к гистонам	30-40%	Чаще при медикаментозно индуцированной СКВ (95%); светочувствительность
Антикардиолипиновые АТ	40%	Артериальные и венозные тромбозы, выкидыши; часто в сочетании с положительными RW и волчаночным антикоагулянтом

Примечание. АВБ – атриовентрикулярная блокада; RW – реакция Вассермана.

С наибольшей частотой и в наиболее широком спектре АТ против клеточных, в первую очередь – ядерных антигенов обнаруживаются у больных СКВ. При этом наличие определенных разновидностей аутоАТ связано с некоторыми особенностями клинической картины и течением заболевания (табл. 3). Чрезвычайно важное диагностическое значение имеют АТ к антигену Sm, которые обладают наибольшей специфичностью для СКВ (до 100%). Их находят примерно у 15% больных кавказоидной расы и у 30% больных – негроидной, причем зачастую в отсутствие АТ к dsDNA. Особый интерес представляют АТ к Ro(SSA) – они могут обнаруживаться у больных СКВ с отрицательным тестом на АНА (АНФ). Это связано с тем, что хотя Ronald-антиген имеет ядерное происхождение, однако может присутствовать в значительном количестве в цитоплазме клетки (относится к экстрагируемым ядерным антигенам), в то время как в самом ядре – в минимальных, не определяемых лабораторными тестами концентрациях. Отсюда вытекает целесообразность на этапе скринингового обследования пациентов с подозрением на СКВ определять не только АНА (АНФ), но сразу и АТ к Ro(SSA).

Высоко чувствительным лабораторным тестом для диагностики лекарственно индуцированной волчанки являются антигистоновые АТ. Следует помнить, что лекарственными препаратами, способными относительно часто индуцировать СКВ-

подобный синдром и положительные тесты на АНА и АТ к гистонам, являются гидралазин, новокаинамид, изониазид, аминазин, этаперазин и оральные контрацептивы. Реже такое осложнение фармакотерапии наблюдается при приеме леводопы, D-пенициллина, фенилбутазона, резерпина, хинидина, бисептола, пенициллина, других препаратов. При этом оральные контрацептивы, бисептол и пенициллин могут также вызывать обострение существующей СКВ.

У небольшого количества больных СКВ тесты на АНА (АНФ) и другие антиядерные АТ могут быть отрицательными – так называемая серонегативная СКВ (синдром Provost). Вопрос о существовании истинно серонегативной СКВ продолжает дискутироваться (предлагается использовать весь спектр методов идентификации АТ, включая методы преципитации, РПГА, иммуноблоттинга и т.п.), однако в обычной клинической практике и при использовании традиционных лабораторных исследований наличие такого сегмента больных СКВ не вызывает сомнений. В части случаев больные, отрицательные по АНА (АНФ), имеют АТ к цитоплазматическому антигену Ro(SSA), в 10-15% случаев серонегативности все тесты становятся отрицательными при снижении активности СКВ в процессе лечения, до 40-50% таких больных – это пациенты с нефритом, почечной недостаточностью, а также находящиеся на лечении гемодиализом [1].

Таблиця 4

Частота выявления аутоАТ к Ro(SS-A) и La(SS-B) при различных СБПЗ [2]

Заболевание/синдром	АТ к Ro(SS-A)	АТ к La(SS-B)
Болезнь Шегрена	50-96%	54-87%
Синдром Шегрена	44%	16%
РА с синдромом Шегрена	38%	6%
СКВ с синдромом Шегрена	58%	73-85%
ССД с синдромом Шегрена	20%	0,2%
СКВ без синдрома Шегрена	24-38%	3-8%

Таблиця 5

Частота обнаружения ANCA при системных васкулитах (усредненные литературные и собственные данные)

Заболевание	Тип АТ	
	<i>p-ANCA</i> (АТ к миелопероксидазе)	<i>c-ANCA</i> (АТ к протеиназе-3)
Узелковый полиартериит	20%	10%
МПА	50-70%	50%
ЭГПА (синдром Чарджа-Стросса)	60%	10%
ГПА (гранулематоз Вегенера)	20%	80%
Другие васкулиты	<20%	<10%

Кроме СКВ, АТ к Ro(SSA) и La(SS-B) закономерно обнаруживаются у больных с болезнью и синдромом Шегрена. Частота выявления этих АТ при СБПЗ приведена в таблице 4 [2]. Для практических целей важно иметь в виду, что наличие АТ к La(SS-B) в отсутствие АТ к Ro(SS-A) встречается исключительно при болезни Шегрена, а позитивный результат одновременно на АТ к Ro(SS-A) и АТ к La(SS-B) наблюдается только при болезни Шегрена и СКВ.

Важное место в диагностике системных некротизирующих васкулитов занимают АТ, реагирующие с цитоплазматическими ферментами нейтрофилов – антинейтрофильные цитоплазматические АТ (ANCA). Основными их разновидностями являются АТ к сериновой протеиназе-3 (c-ANCA) и АТ к миелопероксидазе (p-ANCA). p-ANCA имеют наибольшее значение для диагностики эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (ЭГПА) – синдрома Чарджа-Стросса, c-ANCA – для диагностики гранулематоза с полиангиитом (ГПА) – гранулематоза Вегенера (табл. 5). При микроскопическом полиангиите (МПА) достаточно часто выявляются обе разновидности

этих АТ. В отличие от других васкулитов, при ГПА наличие и титр c-ANCA хорошо коррелируют с тяжестью и активностью заболевания. Так, при генерализованной форме гранулематоза Вегенера в активной стадии c-ANCA обнаруживают у 84-99% больных, при ограниченной активной форме – у 70-80%, при генерализованной или ограниченной в стадии ремиссии – у 30-40% [6]. Для иллюстрации зависимости между активностью ГПА (индекс активности BVAS) и титром c-ANCA приводим собственные данные о динамике этих показателей у больной с тяжелым течением ГПА, в лечении которой был использован ритуксимаб – анти-В-клеточный агент, вызывающий деплецию CD19+-клеток и, соответственно, снижение/прекращение синтеза аутоАТ (рис. 2). Для установления диагноза еще одного системного некротизирующего васкулита – синдрома Гудпасчера имеет значение определение аутоАТ к базальным мембранам клубочковых капилляров почек.

BVAS

c-ANCA, ME/мл

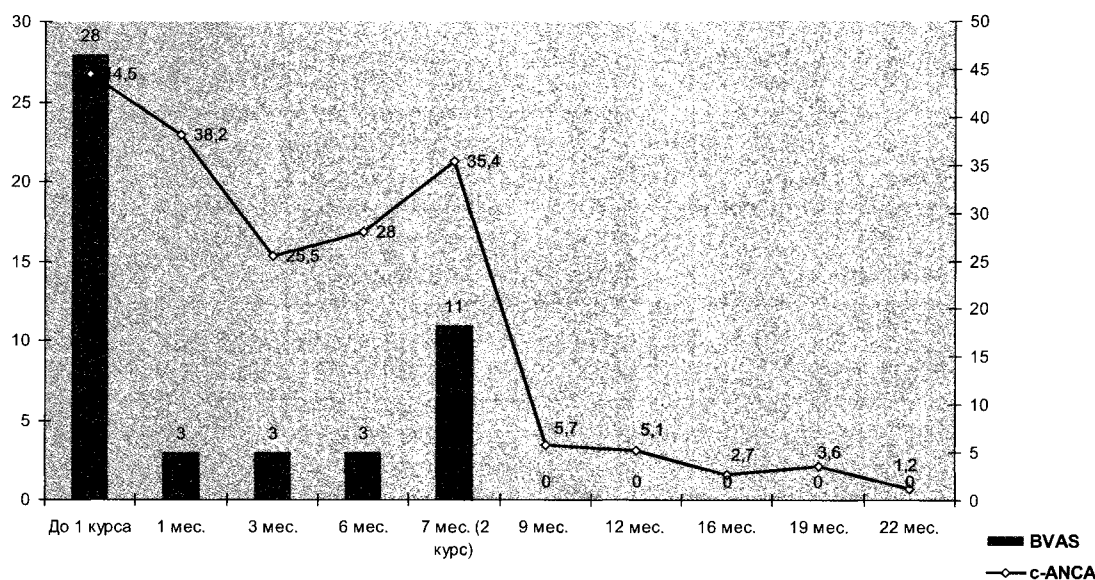


Рисунок 2. Динамика величин BVAS и титра c-ANCA в процессе лечения ритуксимабом больной Т. (диагноз — ГПА)

Следующей группой АТ к клеточным антигенам являются АТ к фосфолипидам (табл. 1), играющие ключевую роль в развитии антифосфолипидного синдрома (АФЛС) — клинко-лабораторного симптомокомплекса, в основе которого лежит аутоиммунная патология, связанная с наличием повышенного количества АТ к фосфолипидным детерминантам.

Антифосфолипидные АТ (АФЛ-АТ) представляют собой гетерогенную группу антител к отрицательно заряженным фосфолипидам, включая кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерол, а также к 2-гликопротеину-1 — кофактору, взаимодействующему с фосфолипидами и являющемуся естественным плазменным антикоагулянтом и ингибитором агрегации тромбоцитов. Считается, что 2-гликопротеин-1 является фактором, в наибольшей мере определяющим патогенность АФЛ-АТ: к клиническим (тромботическим) последствиям может приводить реакция антител (так называемые «аутоиммунные» антитела) с 2-гликопротеином-1 или комплексом 2-гликопротеин-1 + фосфолипид. Сами по себе АФЛ-АТ, даже взаимодействуя с фосфолипидными детерминантами, вероятно, не вызывают патологии (так называемые «инфекционные» антитела).

В клинической практике для определения АФЛ-АТ используют три метода: 1) выявление АТ к кардиолипину (по последним рекомендациям —

и к 2-гликопротеину-1) методом ИФА, 2) тесты на волчаночный антикоагулянт и 3) ложноположительная реакция Вассермана (RW). В процессе диагностики АФЛС необходимо применять все эти методы, поскольку каждый из них выявляет лишь определенную разновидность антител. Только некоторые типы АФЛ-АТ обнаруживаются всеми тремя методами.

Методом ИФА определяют IgM- и IgG-АТ к кардиолипину — фосфолипиду, выделенному из сердца крупного рогатого скота. Кардиолипиновый антиген (дифосфатидилглицерол) встречается в организме повсеместно, являясь составной частью митохондрий клеток млекопитающих. Эти АТ являются 2-гликопротеин-1 — зависимыми, то есть относятся к группе патогенных. IgA-АТ к кардиолипину встречаются значительно реже, и их дополнительное определение не имеет диагностической ценности. Дополнительное определение АТ к 2-гликопротеину-1 позволяет выявить небольшой сегмент больных, отрицательных по другим диагностическим тестам (3-10%), однако практическое значение этого невелико. Вместе с тем, сочетание позитивности по АТ к 2-гликопротеину-1 с положительными результатами любого другого лабораторного теста на АФЛ-АТ клинически значимо, поскольку при этом повышается риск тромбозов.

Под волчаночным антикоагулянтом понимают АТ к фосфолипидам протромбинактивирую-

шего комплекса (ПТАК). Они выявляются с помощью методов, оценивающих свертываемость крови. Обычно для этой цели определяют активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). В процессе измерения АЧТВ активируется внутренний путь свертывания крови. Его основными этапами являются активация фактора Хагемана (XII), приводящая к образованию активного X фактора, который вместе с проакцелерином (фактор V) и протромбином (фактор II) с участием ионов кальция взаимодействуют на отрицательно заряженной поверхности фосфолипидов. Результатом этого взаимодействия является образование тромбина, индуцирующего превращение фибриногена в фибрин и формирование сгустка крови. При наличии АФЛ-АТ последние присоединяются к фосфолипидам и препятствуют образованию ПТАК, тем самым блокируя внутренний путь свертывания и удлиняя АЧТВ. Следовательно, удлинение АЧТВ, если оно не вызвано другими причинами, свидетельствует в пользу наличия волчаночного антикоагулянта. Следует помнить, что удлинение АЧТВ может быть связано с дефицитом факторов свертывания или наличием ингибиторов отдельных факторов свертывания. При смешивании плазмы больного с нативной (донорской) плазмой в соотношении 1:1 в этих случаях АЧТВ нормализуется, а при наличии волчаночного антикоагулянта остается удлиненным. Таким образом, тест на волчаночный антикоагулянт будет считаться положительным, если обнаруживается увеличение АЧТВ, сохраняющееся при смешивании плазмы больного и нативной плазмы в соотношении 1:1. Как известно, удлинение АЧТВ наблюдается при лечении прямыми антикоагулянтами (нефракционированный гепарин или низкомолекулярные гепарины) и является основным лабораторным критерием контроля такой терапии. Естественно, у таких пациентов перед определением АЧТВ с целью выявления волчаночного антикоагулянта необходимо произвести нейтрализацию гепарина в отобранной плазме.

Иногда (при сомнительном удлинении АЧТВ) для подтверждения наличия волчаночного антикоагулянта в плазму больного добавляют замороженные тромбоциты – богатый источник фосфолипидов. При этом АФЛ-АТ связываются с поверхностью тромбоцитов, прекращают участие в процессе свертывания, что сопровождается нормализацией АЧТВ.

Другой популярный показатель плазменного гемостаза – протромбиновое время (производ-

ные от него – ПТИ или МНО) – оценивает внешний путь свертывания крови, который, как и внутренний путь, включает этап образования ПТАК. Однако для выявления волчаночного антикоагулянта этот тест менее пригоден. Дело в том, что при определении протромбинового времени процесс свертывания инициируется добавлением тканевого тромбопластина, содержащего большое количество фосфолипидов. Эти фосфолипиды абсорбируют АФЛ-АТ и таким образом препятствуют их ингибирующему влиянию на процесс свертывания. Следовательно, у больных с наличием волчаночного антикоагулянта протромбиновое время не изменяется или удлиняется незначительно, по крайней мере эти изменения выражены в меньшей степени по сравнению с АЧТВ. Существенное увеличение этого показателя (снижение ПТИ, рост МНО) может иногда наблюдаться при очень высокой концентрации волчаночного антикоагулянта, однако в большинстве случаев такие изменения связаны с другими причинами, а именно – с дефицитом протромбина вследствие приема непрямых антикоагулянтов или болезней печени.

Суть ложноположительной RW заключается в следующем. АутоАТ, выявляемые в этой реакции, направлены не против возбудителей сифилиса, а против сходных с кардиолипином субстанций, образование которых в организме индуцируется бледной трепонемой. В ходе RW эти АТ дают перекрестную реакцию с холестерол-лецитин-кардиолипиновым реагентом. В результате либо определяют агглютинацию липидных частиц, либо после образования комплекса антиген+АТ абсорбируется комплемент, и реакция оценивается по степени торможения гемолиза эритроцитов (разновидность реакции связывания комплемента). При АФЛС АТ к фосфолипидам точно так же вступают в реакцию с кардиолипиновой составляющей реагентного комплекса. В отличие от сифилиса, RW при АФЛС выявляет обычно низкий титр АФЛ-АТ (слабоположительный результат). Ложноположительный характер RW должен быть доказан отрицательными результатами тестов, непосредственно выявляющих АТ к T.pallidum (РИБТ, РИФ). Из всех трех лабораторных методов выявления АФЛ-АТ RW является наименее специфичной, поскольку бывает положительной, кроме сифилиса, при ряде других состояний – болезнях печени, малярии, туберкулезе, инфекционном мононуклеозе, злокачественных опухолях, после употребления жирной пищи, у беременных женщин. Поэтому данный метод не

Таблица 6

Влияние типа и концентрации АФЛ-АТ на риск тромботических осложнений

Концентрация или тип АФЛ-АТ	Риск тромбозов
Концентрация АФЛ-АТ: выше ниже	Более высокий Более низкий
Любое сочетание ≥ 2 тестов (IgG-, IgM-АТ к кардиолипину; IgG-, IgM-АТ к β_2 -гликопротеину-1; волчаночный антикоагулянт) - волчаночный антикоагулянт + IgG-, IgM-АТ к кардиолипину	Более высокий Самый высокий
IgG-АТ к кардиолипину	+++
Концентрация IgG-АТ к кардиолипину: выше ниже	Более высокий Более низкий
IgA-, IgM-АТ к кардиолипину при отсутствии IgG-АТ	+
Волчаночный антикоагулянт	++++
IgG-, IgM-АТ к β_2 -гликопротеину-1	++
Ложноположительная RW при отсутствии АТ к кардиолипину, β_2 -гликопротеину-1 и волчаночного антикоагулянта	0

рекомендуется использовать в качестве самостоятельного диагностического теста. Тем не менее в некоторых случаях при достаточно убедительной клинической картине АФЛС ложноположительная RW может быть единственным лабораторным отклонением.

Вместе с тем необходимо отметить, что патогенетическая роль АФЛ-АТ в характерном для АФЛС тромбообразовании во многом остается неясной. В частности, непонятно, какие именно события служат толчком к образованию тромба, ведь само по себе наличие АФЛ-АТ не может индуцировать клинически значимые нарушения гемостаза. Предполагается, что АФЛ-АТ создают лишь гиперкоагуляционный фон, а формирование тромба происходит под влиянием других разрешающих прокоагуляционных факторов — курения, беременности, оперативных вмешательств, травм и др.

Серонегативным (по аналогии с серонегативным РА и серонегативной СКВ) называют АФЛС, имеющий типичные клинические проявления при отрицательных результатах всех трех (а в научных исследованиях — и других) методов определения АФЛ-АТ. Возможными причинами серонегативности АФЛС могут быть ошибочный диагноз (имеется другая, недиагностированная коагулопатия), «лабораторная» проблема, временное отсутствие или снижение уровня АТ (реверсия серо+ в серо-). Под «лабораторной» проблемой подразумевается невыявление традиционными тестами АТ против других фосфолипидов (фосфатидилэтаноламин и др.) или белковых кофакторов (протеинов С и S, аннексина V).

Временная серонегативность может быть связана с острым потреблением АТ в процессе тромботического эпизода, спонтанными колебаниями уровня АТ [4]. Известным, выдержавшим проверку временем представителем серонегативного АФЛС является синдром Снеддона, характеризующийся сочетанием рецидивирующих инсультов, сетчатого ливедо, лабильной артериальной гипертензии при стабильно отрицательных тестах на АТ к фосфолипидам.

В классификационных критериях АФЛС 1999 г. [8] лабораторные тесты занимают важное место. Для диагноза АФЛС необходим хотя бы один лабораторный критерий из следующих: 1. АТ к кардиолипину классов IgG или IgM в сыворотке крови в средних или высоких титрах, определенные по крайней мере дважды с интервалом не менее 6 недель стандартизованным иммуноферментным методом, позволяющим выявлять 2-гликопротеин-1-зависимые антитела; 2. Волчаночный антикоагулянт, выявляемый в плазме по крайней мере дважды с интервалом не менее 6 недель стандартизованным методом, включающим следующие этапы: а) удлинение времени свертывания крови в фосфолипидзависимых скрининговых коагуляционных тестах (АЧТВ, каолиновый тест или др.); б) отсутствие нормализации удлиненного времени свертывания крови по данным скрининговых тестов после смешивания с донорской бестромбоцитной плазмой; в) нормализация удлиненного времени свертывания крови при добавлении избытка фосфолипидов; г) исключение других коагулопатий.

Таблица 7

Целесообразность определения аутоАТ к различным антигенам при клиническом подозрении на ревматическое заболевание и некоторые неревматические заболевания

Ревматоидный артрит	РФ (IgM-РФ), АТ к ЦЦП, АТ к МЦВ
Системное заболевание соединительной ткани	АНА (АНФ)
СКВ	1-й этап: АНА (АНФ), АТ к dsDNA, Ro(SS-A)
	2-й этап: АТ к Sm, La(SS-B), гистону, ssDNA
СЗСТ (болезнь Шарпа)	АНА (АНФ), АТ к RNP
ССД	АНА (АНФ), АТ к Scl-70
CREST-синдром	АНА (АНФ), АТ к центромере
Полимиозит/дерматомиозит	АТ к Jo-1
Болезнь Шегрена	АНА (АНФ), АТ к Ro(SS-A), La(SS-B), РФ
Синдром Фелти	АТ к ssDNA, РФ
IgG4-зависимое заболевание	IgG4
Системный васкулит	p-ANCA (АТ к миелопероксидазе), c-ANCA (АТ к протеиназе-3)
МПА	p-ANCA (АТ к миелопероксидазе), c-ANCA (АТ к протеиназе-3)
ЗГПА (синдром Чарджа-Стросса)	p-ANCA (АТ к миелопероксидазе)
ЗГПА (гранулематоз Вегенера)	c-ANCA (АТ к протеиназе-3)
Эссенциальный криоглобулинемический васкулит	Криоглобулины
Синдром Гудпасчера	АТ к базальным мембранам клубочковых капилляров почек
Антифосфолипидный синдром	IgG- и IgM-АТ к кардиолипину, волчаночный антикоагулянт (удлинение АЧТВ), RW
Неревматические заболевания	
Первичный билиарный цирроз	АТ к митохондриям
ХАГ	АНФ (АНА)

В уточненных (2006 г.) классификационных критериях АФЛС [5] изменения коснулись именно серологических методов: 1) к числу лабораторных диагностических тестов АФЛС были добавлены IgG- и/или IgM-АТ к 2-гликопротеину-1; 2) для всех трех лабораторных критериев сроки, в течение которых повторно должна быть зафиксирована их позитивность, увеличены с 6 недель до 12 недель. Кроме того, предложено разделять больных на категории в зависимости от лабораторных маркеров риска тромбозов: I – позитивность по более, чем одному лабораторному маркеру (любая комбинация), IIa – позитивность только по волчаночному антикоагулянту, IIb – позитивность только по АТ к кардиолипину, IIc – позитивность только по АТ к 2-гликопротеину-1. Как можно заметить, хотя к рекомендуемым

лабораторным тестам добавлены АТ к 2-гликопротеину-1, однако по-прежнему признается, что клиническое значение (риск тромбозов) позитивности только по этим АФЛ-АТ наименьшее.

При обнаружении АФЛ-АТ сами по себе результаты лабораторного обследования (концентрация и тип АТ) дают важную информацию о риске тромбообразования (табл. 6). В целом, чем выше концентрация АФЛ-АТ, тем больший риск развития тромбозов. В первую очередь это относится к IgG-АТ к кардиолипину, хотя такая прямая зависимость прослеживается не всегда. Вероятность тромботических осложнений очень высока при выявлении волчаночного антикоагулянта. Вместе с тем прогноз более благоприятен, если обнаруживается изолированное повышение уровня IgG-, IgM-АТ к 2-гликопротеину-1, IgA-,

IgM-АТ к кардиолипину или только ложноположительная RW. Самый высокий риск тромбообразования - при одновременном обнаружении нескольких типов АФЛ-АТ. Следует, однако, отметить, что при наличии тромбозов вариации типов АФЛ-АТ на лечебную тактику не влияют.

Суммируя приведенную выше информацию, для решения практических диагностических задач при подозрении на системное ревматическое заболевание в условиях использования минимально необходимого лабораторного ресурса

может быть рекомендован следующий спектр иммунологических исследований, в частности — определения АТ (табл. 7).

В заключение следует отметить, что, осознавая всю необходимость и важность лабораторной поддержки, врач должен ориентироваться прежде всего на спектр клинической симптоматики, и лишь в небольшом количестве случаев результаты иммунологических исследований способны радикально изменить клинический диагностический вектор.

ЗАГАЛЬНІ ТА ОКРЕМІ ПИТАННЯ ІМУНОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ В РЕВМАТОЛОГІЇ

Яременко О.Б.

Резюме. В статті висвітлено роль лабораторних імунологічних досліджень в діагностиці та моніторингу перебігу системних запальних ревматичних захворювань та антифосфоліпідного синдрому. Наведено характеристику основних методів виявлення аутоантитіл, клінічне значення наявності того чи іншого їхнього різновиду, раціональний алгоритм призначення імунологічних досліджень, розглянуто питання серонегативності. **Ключові слова:** системні запальні ревматичні захворювання, антифосфоліпідний синдром, імунологічні дослідження.

COMMON AND PARTICULAR QUESTIONS OF IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTICS IN RHEUMATOLOGY

Iaremenko O.B.

Summary. In the article the role of laboratory immunological tests in systemic inflammatory rheumatic diseases' and antiphospholipid syndrome's diagnostic and monitoring is described. Characteristic of main diagnostic methods autoantibody identification, clinical value of it's variants, rational algorithm of immunological tests prescription are considered. Issues of seronegativity are discussed.

Key words: systemic inflammatory rheumatic diseases, antiphospholipid syndrome, immunological examination.

Список литературы

1. Вест, С.Дж. Секреты ревматологии /пер. с англ. / С.Дж. Вест. — М. — СПб.: «Издательство БИНОМ» — «Невский Диалект», 1999. — С. 76-77.
2. Клиническая иммунология и аллергология / под ред. Л. Йегера. — В 3 т. /пер. с нем. — М.: Медицина, 1990. — Т. 2. — С. 341-419.
3. Common Variable Immunodeficiency (CVID) — diagnosis and management. United Kingdom Primary Immunodeficiency Network (UKPIN) — Standards of care. ESID diagnostic criteria for PID, 2011 [Electronic resource].
4. Hughes, G.R.W. Seronegative antiphospholipid syndrome / G.R.W. Hughes, M.A. Khamashta // Ann. Rheum. Dis. — 2003. — Vol. 62. — P. 1127-1132.
5. Myakis, S. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / S. Myakis, M.D. Lockshin, T. Atsumi et al. // J. Thromb. Haemost. — 2006. — Vol. 4. — P. 295-306.
6. Rheumatology / Edited by J.H. Klippel, P.A. Dieppe. — London: Mosby- Year Book Europe Limited, 1996. — 1760 p.
7. Umehara, H. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease, 2011 / H. Umehara // Mod. Rheumatol. — 2012. — Vol.22. — P.21-30.
8. Wilson, W.A. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome / W.A. Wilson, A. Gharavi, T. Koike et al. // Arthritis Rheum. — 1999. — Vol. 42. — P. 1309-1311.