

Medicína a antifosfolipidové protilátky

Plzeň 23.6.-25.6.2011

Symposium s medzinárodnou účasťou usporiadané Lekárskou fakultou v Plzni, sekciou reprodukčnej imunologie ČIS, Českou spoločnosťou imunologie a alergologie a Gynekologicko-pôrodnickou klinikou LF UK FN Plzeň

Na sympóziu sa zúčastnili odborníci z Česka, Slovenska, Izraela, Španielska, Japonska, Slovinska, Bulharska, USA, Talianska, Dánska a Nemecka. Odznelo 24 prednášok z pracovísk imunologov, infektologov, reumatologov, gynekologov, pôrodníkov, neonatologov, internistov, hematologov a pracovníkov laboratórnych odborov. Svedčí to o tom, že problém antifosfolipidových protilátok a antifosfolipidového syndromu je multifaktoriálny a multiodborový.

Antifosfolipidový syndrom

ako nosologická jednotka existuje takmer 30 rokov. Popísal ho v roku 1983 britský lekár G.R.V. Hughes, ako synonymum sa niekedy používa názov Hughesov syndrom. Podľa Hughesa APS tvorí triáda klinických symptómov – opakované tehotenské straty, opakované tromboembolické príhody a trombocytopenia. V októbri 1998 na workshopu po 8. Medzinárodnom sympoziu o antifosfolipidových protilátkach v Sappore došlo ku konsenzu, ktorý prvýkrát formuloval diagnostické kritéria antifosfolipidového syndromu ([ARTHRITIS & RHEUMATISM, Vol. 42, No. 7, July 1999, pp 1309–1311](#)). Tieto kritéria boli v roku 2006 revidované a updatované na 11. Medzinárodnom sympoziu o antifosfolipidových protilátkach v Sydney s účasťou ISTH ([Journal of Thrombosis and Haemostasis, 4: 295–306](#)) a v tejto podobe sú platné doteraz.

Diagnózu APS môžeme stanoviť, keď pacient spĺňa jedno klinické a jedno laboratórne kritérium.

1 Klinické kritéria:

1.1 Vaskulárna trombóza

1.1.1 jedna alebo viacej epizód arteriálnej, venóznei alebo mikrovaskulárnej trombózy potvrdenej Doppler vyšetrením alebo histopatologicky. V histologickom obraze by nemali byť prítomné zápalové zmeny v cievnej stene.

1.2 Tehotenská patológia

1.2.1 jedna alebo viac nevysvetliteľných úmrtí zdravého plodu po 10. týždni gravidity

1.2.2 jeden alebo viac predčasných pôrodov pred 34. týždňom gravidity pre ťažkú preeklampsiu, eklampsiu alebo placentárnu insuficienciu

1.2.3 3 a viac spontánnych potratov pred 10. týždňom gravidity s výnimkou anomálií uteru, hormonálnych a chromozomálnych abnormalít..

2 Laboratórne kritéria:

2.1 Lupus antikoagulans prítomný v plasme 2 a viackrát s odstupom najmenej 6 týždňov.

Laboratórne stanovenie LA je založené na predĺžení testov založených na použití fosfolipidov (APTT, dRVVT, PT) bez korekcie testu po pridaní normálnej plasmy a so skrátením po pridaní nadbytku fosfolipidov. Vylúčené musia byť iné vplyvy, napr. FVIII inhibitor alebo heparín.

2.2 Stredne alebo silno zvýšené titre antikardiolipínových protilátok (ACLA) typu IgG alebo IgM zistené 2 a viackrát s odstupom najmenej 12 týždňov.

2.3 Stredne alebo silno zvýšené titre anti β 2-glykoprotein-I protilátok typu IgG alebo IgM zistené 2 a viackrát s odstupom najmenej 12 týždňov.

Diagnózu APS vylučuje pozitivita APA v trvaní menej ako 12 týždňov, alebo viac ako 5 rokov ale bez klinických prejavov.

Trombocytopenia nie je súčasťou klinických kritérií.

Povrchová žilová trombóza nie je súčasťou klinických kritérií.

Všeobecne prijaté kritéria insuficiencie placenty

- abnormálne správanie plodu (znížená reaktivita, známky hypoxémie),
- abnormity prietoku pri Doppler meraní (neprítomný prietok umbilikálnej arterie na konci diastoly)
- oligohydramnion
- hmotnosť pod 10. percentil gestačného veku

Ostatné klinické a laboratórne prejavy APS nezahrnuté do diagnostických kritérií

Kardiálne prejavy

- poškodenie srdcovej chlopne (vegetácie, zhrubnutie, dysfunkcia)
- koronárna choroba srdca (pacienti klasifikovaní z hľadiska rizika koronárnej trombózy)
- ventrikulárna dysfunkcia (mikrotrombotizácie myokradu)

Neurologické prejavy

- tranzitórna mozgová ischémia
- mozgový infarkt
- vaskulárna demencia
- porucha kognitívnych funkcií
- migréna
- epilepsia

Kožné prejavy

- livedo reticularis
- kožné ulcerácie
- pseudovaskulitída
- povrchová tromboflebitída
- gangréna prstov
- subunguálne krvácanie

Renálne prejavy

- APA asociovaná nefropatia (vaskulopatia malých ciev s chronickou renálnou ischémiou)

Krvné prejavy

- APA asociovaná trombocytopenia

Laboratórne prejavy

- izolovaná prítomnosť ACLA IgA je nediagnostická
- izolovaná prítomnosť anti b2-GP-I IgA je nediagnostická
- anti fosfatidyl-serin protilátky sú nediagnostické
- anti fosfatidyl-ethanolamin protilátky sú nediagnostické
- protilátky proti protrombínu sú nediagnostické
- protilátky proti komplexu protrombín/fosfatidyl-serin sú nediagnostické

Prítomnosť vrodených alebo získaných trombofilných faktorov neovplyvňuje diagnózu APS, pacienti by však mali byť klasifikovaní do dvoch rôznych podskupín.

a. Pacienti s rizikovými faktormi

t.j. vek viac ako 55 rokov u mužov a viac ako 65 rokov u žien a prítomnosť niektorého z rizikových faktorov stanovených pre kardiovaskulárne ochorenia:

vysoký krvný tlak, diabetes mellitus, zvýšené hladiny LDL a nízky HDL cholesterol, fajčenie, rodinná anamnéza predčasnej kardiovaskulárnej choroby, BMI >30 kg/m², mikroalbuminúria, GFR <1 ml/sec, dedičná trombofília, perorálna antikoncepcia, nefrotický syndróm, maligne ochorenie, imobilizácia, chirurgia, trombotické stavy v minulosti (možno považovať za klinické kritérium za predpokladu, že trombóza je preukázaná vhodným diagnostickým prostriedkom).

b. Pacienti bez rizikových faktorov

Podľa prítomnosti antifosfolipidovej protilátky sa odporúča zaradiť pacientov do nasledujúcich kategórií

I - prítomnosť viac ako jednej protilátky ev. lupus antikoagulans

IIa – lupus antikoagulans prítomný izolovane

IIb – anti-kardiolipínová protilátka prítomná izolovane

IIc – anti-β2 glykoproteín-I protilátka prítomná izolovane

Postrehy z prednášok

Najčastejšia je infekčná etiológia indukcie tvorby antifosfolipidových protilátok. Kardiolipínový antigén prezentujú napr. Borelie, Spirochety, Pneumokoky, parazitárni červi, β 2-GP-I je prezentovaný napr. kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*. Výskyt APA často nachádzame u vírusových infekcií CMV, EBV, HIV, HAV, HCV, Varicella

Bola preukázaná korelácia medzi bodovou mutáciou transkripčného proteínu SAT4 a antifosfolipidovým syndrómom.

Asi 1% pacientov s APS je ohrozených rozvojom katastrofického APS (CAPS) s potenciálne letálnym priebehom. Jedná sa o multiorgánové zlyhanie na podklade mikroangiopatie u pacientov s diagnostikovaným APS. European forum on Antiphospholipid antibodies v roku 2000 založilo register pacientov s CAPS, kde sa zbierajú dáta klinická, laboratórna a terapeutická. V súčasnosti registruje do 300 pacientov. Register je možné voľne prezerat' na adrese <http://www.med.ub.es/MIMMUN/FORUM/CAPS.HTM>. V liečbe CAPS sa uplatňuje predovšetkým antitrombotická liečba (LMWH, kumaríny), kortikoidy, IVIG, Cyklofosamid a terapeutická plazmaferéza.

Dr. Jílek prezentoval kazuistiku 30 ročnej ženy v 35. týždni gravidity. Bola hospitalizovaná pre rozvoj hepatopatie. Postupne došlo k rozvoju poruchy zraku s nálezom makulopatie a periflebitídy s podozrením na arteriálnu oklúziu. Pacientka porodila sekciou. Po pôrode MRI obraz zobrazuje centrálnu demyelinizáciu v oblasti ponsu, SM však bola vylúčená. Stav sprevádzala zvýšená hladina imunoglobulínov IgM s pozitivitou protilátok CMV, Borelie, ACLA a β 2-GPI typu IgM, ktoré po pôrode rýchlo vymizli. Neúplné diagnostické kritériá nedovolili pacientku zaradiť ako APS, stav sa klasifikoval ako **pre-APS**.

Dr. Ambrožič prezentoval novú modifikovanú metódu na identifikáciu antiprotrombínových protilátok. Test ELISA na stanovenie a-PT má veľmi nízku senzitivitu. Na pracovisku vyvinuli modifikáciu citlivejšej metódy záchytu protilátok proti **komplexu protrombínu s fosfatidyl-serínom**. Vykazuje vysokú senzitivitu, zachytáva aj protilátky s nízkou aviditou. Pri vyhodnotení sa zvýšené hladiny a-PT/PS javia ako rizikový faktor trombózy u APS. Autori odporúčajú vyšetrenie zaradiť ako diagnostický laboratórny marke APS.

Rovnaké poznatky prezentoval aj *W. Binder*. Špecificita testu a-PT/PS je až 98,3%, senzitivita 53%. Test bol pozitívny u všetkých pacientov s dokázaným LA. Autori odporúčajú zaradiť a-PT/PS protilátky do diagnostických kritérií APS.

Brabcová referovala sledovanie hladín antifosfolipidových protilátok u pacientov s RA na biologickej liečbe. Liečba neovplyvnila signifikantne hladiny APA u týchto pacientov.

J. Hirmerová referovala nálezy APA u pacientov s tromboembolizmom. Vyšetřili 140 pacientov s TECH bez dokázaného SLE alebo iného systémového ochorenia. Spektrum vyšetření zahrnovalo protilátky diagnostické anti-kardiolipín, anti- β 2-glykoprotein-I a nediagnostické anti-phosphatidic acid, anti-phosphatidyl-etanolamin (a-pE), anti-phosphatidyl-glycerol, anti-phosphatidyl-inositol, anti-phosphatidyl-serin. U pacientov sa potvrdil častý výskyt **ACLA, anti β 2-GP-I a a-pE**. Protilátky proti phosphatidyl-etanolaminu sa často vyskytovali izolovane bez prítomnosti ACLA alebo β 2-GP-I. Diskutuje sa o vhodnosti zaradenia a-pE do spektra diagnostických protilátok APS.

S. Cucnik referovala štúdiu, v ktorej sa zisťovala klinická významnosť protilátok a- β 2-GP-I typu IgG. Tieto protilátky identifikovali do dvoch skupín – s nízkou aviditou a s vysokou aviditou. Protilátky s vysokou aviditou majú vyššiu afinitu k solubilnému β 2-glykoproteínu-I, vytvárajú s ním väčšie množstvo komplexov a z tohto komplexu sa ťažšie disociujú. Bola dokázaná vysoká afinita a- β 2-GP-I protilátok namierených proti komplexu Annexinu A5, čo predisponuje jej protrombotickú aktivitu. Diagnostické testy by preto mali byť zamerané na detekciu a- β 2-GP-I protilátok s vysokou aviditou.

A. Bulíkova prezentovala sledovanie hladiny mikropartikul u pacientov s pozitivitou APA. Zistili, že hladina mikropartikul u týchto pacientov je signifikantne vyššia, avšak, napriek predpokladom, nekoreluje s vyšším výskytom klinickej tromboembolickej manifestácie

S. D'Ipólito prezentovala výsledky experimentálneho sledovania vplyvu LMWH na APA indukovanou inhibíciu endometriálnej angiogenezy. APA signifikantne inhibuje angiogenezu ľudských endometriálnych endoteliálnych buniek (HEEC). Testami in vitro a in vivo bol preukázaný pozitívny vplyv LMWH. Tinzaparín bol efektívnejší v porovnaní s enoxaparínom. Obidva LMWH blokujú APA sprostredkovanú inhibíciu produkcie VEGF a aktivitu metaloproteáz. Obidva LMWH rušia APA inhibovanú aktiváciu NF κ B proteínu. Tinzaparín zabraňuje APA inhibícii fosforylácie STAT-3 proteínu, u enoxaparínu táto vlastnosť nebola preukázaná. Z toho vyplýva, že obidva LMWH – tinzaparín a enoxaparín sú schopné zabrániť blokovaníu angiogenezy HEEC čím chránia pred včasnou stratou plodu a pacientiek s APS. Tinzaparín sa javí ako účinnejší.

Podobný efekt bol experimentálne dokázaný po pridaní syntetického peptidu TIFI, ktorý má identickú štruktúru ako Vth doména β 2-GP-I. Upravuje angiogenezu HEEC inhibovanú APA, upravuje produkciu VEGF a metaloproteázovú aktivitu.

I. Šubrt prezentoval štúdiu sledovania výskytu APA a vrodených trombofilných faktorov u pacientiek s rekurentnou stratou gravidity. Vyšetřované boli známe trombofilné mutácie – fV, FII, MTHFR, PAI-1, PZ a celé spektrum APA – phosphatidyl-serin, phosphatidyl-etanolamine, phosphatidyl-inositol, DL-glycerol, phosphatidic acid, Annexin V,

ACLA, β 2-GP-I. Signifikantne boli zvýšené hladina protilátok proti fosfatidyl-inositolu (18%) a fosfatidyl-serinu (22%). Pozitívna korelácia bola dokázaná u mutácií PAI-1(4G) a proteínu Z R255H. APA a trombofilné mutácie sú závažnými rizikovými faktormi v patogenéze tehotenských strát.

L.Hradecký predniesol podobné sledovania na súbore 55 pacientiek s preeklampsiou. Preeklampsia je prejavom mikroangiopatie spôsobenej poruchou endotelu a trombocytov, na ktorom sa môžu podieľať APA. V obličkách sa prejavuje proteinúriou, v štítnej žľaze endokrinnou poruchou, v placente poruchami a poškodením plodu a v CNS eklampsiou. Výskyt preeklampsie v období 26-34. týždňa je spojený s malígnym priebehom, po 34. týždni býva priebeh benígny. Bola dokázaná signifikantne vyššia hladina ACLA IgG a IgM, anti β 2-GP-I IgA, anti fosfatidyl-serin IgG a anti fosfatidyl-etanolamin IgM protilátok. Nebola dokázaná pozitívna korelácia medzi výskytom trombofilných mutácií a preeklampsie.

Z.Ulčová-Gallová prezentovala sledovania na súbore takmer 3000 pacientiek s tehotenskou patológiou. Súbor zahŕňoval pacientky s opakovanými pokusmi o IVF, s tromi a viac spontánnymi potratov alebo missed AB a pacientky po diagnostickej laparoskopii. Vyšetrované boli IgG, IgM aj IgA typy protilátok proti kardiolípinu, fosfatidyl-serinu, fosfatidyl-glycerolu, fosfatidyl-inositolu, fosfatidyl-etanolaminu, fosfatidyl-acid a β 2-GP-I. Signifikantne boli zvýšené hladiny anti fosfatidyl-inositol a anti fosfatidyl-serin. Štvrtina pacientiek mala pozitívne tri a viac protilátok. Z toho vyplýva, že diagnostické protilátky APS (ACLA a β 2-GP-I) nie sú postačujúce na diagnostiku tehotenskej patológie spojenej s APA.

Externá kontrola kvality vyšetřovania ACLA a anti β 2-GP-I typu IgG a IgM je zastrešovaná firmou SEKK.

Zhrnutie

- Diagnóza APS je podmienená pozitívou protilátok **ACLA** IgG a IgM, **anti β 2-GP-I** IgG a IgM (ELISA) a prítomnosťou lupus antikoagulans (koagulácia).
- Anti β 2-GP-I je protilátka zodpovedná za protrombotický efekt APA svojou afinitou k Annexinu V. Jej nález je vysoko špecifický pre APS.
- Je snaha rozšíriť spektrum diagnostických protilátok APS. Okrem ACLA a β 2-GP-I sa javia ako významné protilátky proti fosfatidyl-etanolaminu, fosfatidyl-inositolu, fosfatidyl-serinu a protilátky proti komplexu protrombín/fosfatidyl-serín. Ich prítomnosť je významná hlavne v diagnostike porúch gravidity a fertility.
- Klasický ELISA test na anti protrombínové protilátky má nízku senzitivitu a špecifitu. Väčší diagnostický význam má vyšetřovanie protilátok proti komplexu anti protrombín/fosfatidyl-serin.
- Pacienti s prítomným LA vykazovali pozitívnu protilátok a-PT/PS.
- Trombotické komplikácie zahŕňujú všetky trombotické príhody vo venóznom, arteriálnom ale i kapilárnom riečisku okrem zápalom podmienených príhod ako sú povrchová tromboflebitída alebo vaskulitída.
- Antifosfolipidový syndróm má jasne definované diagnostické kritéria, neúplné formy možno klasifikovať ako pre-APS. Per akútny priebeh ochorenia s multiorgánovým zlyhaním klasifikujeme ako CAPS – katastrofický APS.

Tehotenská patológia

- Preeklampsia je dôsledkom orgánovej mikroangiopatie s dokázanou významnou účasťou APA, ktoré sú zodpovedné za poškodenie endotelu, trombocytov a protrombotický stav spojený so vznikom mikrotrombov. Klinické a laboratórne prejavy závisia od postihnutia cieľového orgánu. Včasný rozvoj pred 34. týždňom gravidity významne ohrozuje matku i plod.
- Najčastejšou príčinou predčasnej straty plodu sú antifosfolipidové protilátky. Ich prítomnosť je zodpovedná za poruchu angiogenezy endometria, ktorá je zodpovedná za včasnú stratu plodu.
- Potlačenie angiogenezy pozitívne ovplyvňujú LMWH - tinzaparin a enoxaparin, experimentálne aj syntetický peptid TIFI.
- U pacientiek s poruchami fertility a s tehotenskou patológiou je dôležité vyšetřenie APA. Problémy s donosením plodu sú často spojené s výskytom antifosfolipidových protilátok. Okrem diagnostických protilátok ACLA a β 2-GP-I bola významne zvýšená prítomnosť protilátok anti fosfatidyl-etanolamin, anti fosfatidyl-serín, anti fosfatidyl-inositol. Preto sa pre objasnenie porúch gravidity a infertility javí nedostatočné len vyšetřovanie spektra diagnostických APA.

Použité skratky: **APA** – antifosfolipidové protilátky; **APS** – antifosfolipidový syndróm; **β 2-GP-I** – beta2-glykoprotein I; **ACLA** – anti kardiolípinové protilátky; **LMWH** – nízkomolekulový heparín; **CAPS** – katastrofický antifosfolipidový syndróm; **a-PT/PS** – anti komplex protrombín/fosfatidyl-serin; **LA** – lupus antikoagulans; **IVF** – in vitro fertilisácia; **VEGF** – vaskulárny endotelálny rastový faktor; **HEEC** - human endometrial endotelial cells;