

**Uniwersytet Jagielloński**  
**Collegium Medicum**  
**Wydział Lekarski**

**Aleksandra Matyja-Bednarczyk**

**Czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej**  
**w zespole antyfosfolipidowym**

*Praca doktorska*

**Promotor pracy: prof. dr hab. Jacek Musiał**

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Jacek Musiał

**Kraków, rok 2011**

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi- Panu Profesorowi Jackowi Musiałowi za życzliwość, inspirację i cenne rady w trakcie przygotowania niniejszej pracy*

*Pragnę również podziękować Panu Profesorowi Markowi Sanałowi, Pani Doktor Teresie Iwaniec, Panu Doktorowi Jakubowi Swadźbie i Pani Magister Sylwii Dzedzinie, bez pomocy których realizacja tego projektu nie byłaby możliwa*

# SPIS TREŚCI

<b>1</b>	<b>Wykaz używanych skrótów</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Wstęp</b>	<b>9</b>
2.1	Rys historyczny	10
2.2	Fosfolipidy i ich rola w procesach hemostazy	12
2.3	Rodzaje przeciwciał przeciwfosfolipidowych	14
2.4	Białkowe kofaktory przeciwciał przeciwfosfolipidowych	17
2.4.1	$\beta$ 2 glikoproteina I ( $\beta$ 2GPI, apolipoproteina H)	17
2.4.2	Protrombina	18
2.4.3	Aneksyna V (łożyskowy czynnik przeciwkrzepliwy-1)	19
2.4.4	Pozostałe kofaktory przeciwciał przeciwfosfolipidowych	20
2.5	Mechanizm prozakrzepowego działania przeciwciał przeciwfosfolipidowych	20
2.5.1	Hamowanie układu białka C	21
2.5.2	Hamowanie aktywności antytrombiny	22
2.5.3	Hamowanie przeciwwzakrzepowego działania aneksyny V	22
2.5.4	Hamowanie przeciwwzakrzepowej aktywności $\beta$ 2GPI	23
2.5.5	Wpływ na ekspresję czynnika tkankowego (TF) i inhibitor zewnątrzpo pochodnego układu krzepnięcia (TFPI)	23
2.5.6	Zaburzenia powstawania eikozanoidów	24
2.5.7	Upośledzenie fibrynolizy	24
2.5.8	Nasilanie aktywacji i agregacji płytek krwi	25
2.5.9	Aktywacja komórek śródbłonna i powstawanie mikrocząstek	26
2.6	Zespół antyfosfolipidowy	28
2.6.1	Kryteria rozpoznawania	28
2.6.2	Obraz kliniczny	31
2.6.2.1	Powikłania zakrzepowo-zatorowe	31
2.6.2.2	Niepowodzenia położnicze	32

	<b>2.6.2.3</b>	Kliniczne i laboratoryjne cechy związane z APS niewłączone do kryteriów diagnostycznych	33
<b>3</b>		<b>Polimorfizm glikoprotein płytek krwi (GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2) a występowanie epizodów zakrzepowozatorowych w APS</b>	34
<b>4</b>		<b>Polimorfizm <math>\beta 2</math> –glikoproteiny I a występowanie epizodów zakrzepowozatorowych w APS</b>	35
<b>5</b>		<b>Założenia i cele pracy</b>	35
<b>6</b>		<b>Badani</b>	36
	<b>6.1</b>	Kryteria włączenia do badania	36
	<b>6.2</b>	Grupa badana	37
	<b>6.3</b>	Grupa kontrolna	37
<b>7</b>		<b>Metody</b>	37
	<b>7.1</b>	Wywiad ankietowy	37
	<b>7.2</b>	Badania dodatkowe	38
	<b>7.3</b>	Rutynowe diagnostyczne oznaczenia laboratoryjne	38
	<b>7.4</b>	Szczegółowy opis metod oznaczania przeciwciał antyfosfolipidowych	39
	<b>7.4.1</b>	Oznaczanie antykoagulantu toczniowego (LA)	39
	<b>7.4.2</b>	Oznaczanie przeciwciał antykardiolipinowych	40
	<b>7.4.3</b>	Oznaczanie przeciwciał przeciwko $\beta 2$ -glikoproteinie I	41
	<b>7.5</b>	Oznaczanie polimorfizmu glikoprotein płytek krwi (GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2)	43
	<b>7.6</b>	Oznaczanie polimorfizmu Val/Leu247 $\beta 2$ -glikoproteiny I	44
<b>8</b>		<b>Statystyczna analiza wyników</b>	44
<b>9</b>		<b>Wyniki</b>	45
	<b>9.1</b>	Charakterystyka grup badanych	45
	<b>9.1.1</b>	Grupa osób zdrowych (grupa kontrolna)	45
	<b>9.1.2</b>	Ogólna charakterystyka grupy chorych	45
	<b>9.1.3</b>	Grupa pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym i przebytą zakrzepicą tętniczą	46
	<b>9.1.4</b>	Grupa pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym bez przebytej zakrzepicy tętniczej	48
	<b>9.2</b>	Zależność występowania objawów związanych z APS w grupie z zakrzepicą tętniczą	49

9.3	Zależność występowania różnych typów przeciwciał przeciwfosfolipidowych u pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym i zakrzepicą tętniczą	52
9.4	Polimorfizm glikoprotein płytek krwi (GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2) u pacjentów z zakrzepicą tętniczą	55
9.5	Polimorfizm Val/Leu247 $\beta$ 2 –glikoproteiny I u pacjentów z zakrzepicą tętniczą	57
9.6	Współwystępowanie polimorfizmów: Val/Leu247 $\beta$ 2 –glikoproteiny I, GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/A2 u pacjentów z zakrzepicą tętniczą	58
9.7	Klasyczne czynniki ryzyka występowania zakrzepicy tętniczej u pacjentów z APS	61
<b>10</b>	<b>Dyskusja</b>	69
10.1	Rozpoznanie zespołu antyfosfolipidowego	69
10.2	Manifestacje zakrzepicy tętniczej w APS	70
10.3	Udział przeciwciał przeciwfosfolipidowych w występowaniu zakrzepicy tętniczej w przebiegu APS	71
10.4	Występowanie klasycznych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z APS	74
10.5	Rola badań genetycznych w ocenie ryzyka wystąpienia zakrzepicy tętniczej u pacjentów z APS	77
10.6	Potencjalny wpływ otrzymanych wyników na standardy leczenia pacjentów z APS	79
10.7	Ograniczenia badania	80
<b>11</b>	<b>Wnioski</b>	81
<b>12</b>	<b>Streszczenie</b>	82
<b>13</b>	<b>Summary</b>	84
<b>14</b>	<b>Piśmiennictwo</b>	86
<b>15</b>	<b>Dodatek</b>	102

## 1. Wykaz używanych skrótów

Ab- przeciwciało (*ang. antibody*)

ACCP -*American College of Chest Physicians*

ACR- *American College of Rheumatology*

Ag- antygen (*ang. antigen*)

ANA-przeciwciała przeciwjądrowe (*ang. anti-nuclear antibodies*)

anty- oxLDL- przeciwciała przeciwko utlenionym LDL

APA- przeciwciała antyfosfolipidowo-białkowe (*ang. antiphospholipid-protein antibodies*)

APASS- *The Antiphospholipid Antibodies and Stroke Study*

APC- aktywna forma białka C (*ang. activated protein C*)

aPL- przeciwciała przeciwfosfolipidowe

APOH- apolipoproteina H (*ang. Apolipoprotein H*)

APS- zespół antyfosfolipidowo-białkowy (*ang. antiphospholipid syndrome*)

aPT- *anti-prothrombin antibodies*

BMI- wskaźnik masy ciała (*ang. body mass index*)

β2 GPI- β2 –glikoproteina I

CMV- wirus cytomegalii

dRVVT- czas aktywacji jadem żmii Russela (*ang. diluted Russell's viper venom time*)

ds-DNA -przeciwciała przeciwko dwuniciowemu DNA (*ang. double- stranded DNA*)

EBV- wirus Epsteina i Barr

ELISA- metoda immunoenzymatyczna (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

EPCR- śródbłonkowy receptor białka C (*ang. endothelial protein C receptor*)

F- czynnik (*ang. factor*)

GFR- współczynnik przesączania kłębuszkowego (*ang. glomerular filtration rate*)

GP- glikoproteina płytki krwi

HBV- wirus zapalenia wątroby typu B

HCV- wirus zapalenia wątroby typu C

HIV- ludzki wirus niedoboru odporności

ICAM-1 -(*ang. intercellular adhesion molecule 1*)

IL-1- interleukina 1

IL-6- interleukina 6

ISTH- *International Society on Thrombosis and Haemostasis*

KCT- (*ang. kaolin clotting time*)

LA- antykoagulant toczeniowy (*ang. lupus anticoagulant*)

LDL- frakcja cholesterolu LDL

MIC- choroba niedokrwienna serca (*łac. morbus ischemicus cordis*)

MP- mikrocząsteczki (*ang. microparticles*)

ns- różnica nieistotna statystycznie (*ang. not significant*)

OR- iloraz szans (*ang. odds ratio*)

ox-LDL- utlenione LDL

PAI-1- inhibitor aktywatora fibrynolizy typu tkankowego (*ang. plasminogen activator inhibitor*)

PAPS- pierwotny zespół antyfosfolipidowy (*ang. primary antiphospholipid syndrome*)

PCR- polimerazowa reakcja łańcuchowa (*ang. polymerase chain reaction*)

PGI2- prostacyklina

RATIO -*Risk of Arterial Thrombosis In relation to Oral contraceptive*

RIA- metoda radioimmunoenzymatyczna (*radio-immuno assay*)

RP- objaw Raynaud (*ang. Raynaud's phenomenon*)

SAPS – wtórny zespół antyfosfolipidowy (*ang. secondary antiphospholipid syndrome*)

SARA- reaktywne zapalenie stawów nabyte drogą płciową (*ang. sexually acquired reactive arthritis*)

„*selection bias*”- błąd selekcji

SLE – toczeń rumieniowaty układowy (*ang. systemic lupus erythematosus*)

SNP- polimorfizm jednego nukleotydu (*ang. single-nucleotide polymorphism*)

TAFI- inhibitor fibrynolizy (*ang. thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*)

TG- triglicerydy

TF- czynnik wewnętrzny (*ang. tissue factor*)

TFPI- inhibitor zewnętrznej drogi krzepnięcia (*ang. tissue factor pathway inhibitor*)

TIA- przejściowe niedokrwienie mózgu (*ang. transient ischemic attack*)

TP- małopłytkowość (*ang. thrombocytopenia*)

t-PA - aktywator fibrynolizy typu tkankowego (*ang. tissue plasminogen activator*)

TXA2- tromboksan A2

u-PA- urokinazowy aktywator plazminogenu (*ang. urokinase plasminogen activator*)

WZW- wirusowe zapalenie wątroby

VCAM-1- (*ang. vascular cell adhesion molecule 1*)

vWF- czynnik von Willebranda (*ang. von Willebrand factor*)

wsp.- współpracownicy



## 2. Wstęp

Zespół antyfosfolipidowy (APS- *antiphospholipid syndrome*) jest jedną z najczęstszych przyczyn wtórnej trombofilii- czyli nabytej skłonności do występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych.

Zaliczany jest do jednostek chorobowych o etiologii autoimmunologicznej. Cechuje się występowaniem typowych objawów klinicznych (tj. zakrzepicą żylną, tętniczą i/lub niepowodzeniami położniczymi) i szczególnym rodzajem autoprzeciwciał (APA- *antiphospholipid antibodies*), które są skierowane przeciwko białkowym kofaktorom powiązanych z ujemnie naładowanymi fosfolipidami. Mimo, iż przeciwciała te w badaniach *in vitro* hamują generację trombiny, to klinicznie ich obecność wiąże się z predyspozycją do nadkrzepliwości krwi.

Patomechanizmy tego z pozoru paradoksalnego zjawiska nie są do końca znane, a liczne hipotezy, które powstały na przestrzeni wielu lat, potwierdzają jedynie złożony charakter zjawisk z udziałem ujemnie naładowanych fosfolipidów biorących udział w procesach hemostazy *in vivo*.

Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem nadkrzepliwości krwi wydaje się być nasilona generacja trombiny *in vivo* (1). Wpływ na to mają liczne czynniki. Najważniejszą rolę odgrywa najpewniej wzmożona ekspresja czynnika tkankowego (TF), przy upośledzonej czynności jego inhibitora (TFPI- inhibitor czynnika tkankowego; ang. *Tissue factor pathway inhibitor*) (2,3). Przeciwciała antyfosfolipidowe poprzez interakcję z receptorami błonowymi monocytów i komórek śródbłonna, zwiększają ekspresję TF, który tworzy kompleksy z krążącymi we krwi mikrocząsteczkami, pochodzącymi z komórek śródbłonna, mięśni gładkich naczyń, leukocytów i płytek krwi i nasila tendencje prozakrzepowe (4).

Ponadto przeciwciała antyfosfolipidowe mogą wpływać na antykoagulacyjny układ białka C poprzez blokowanie fosfatydyloetanolaminy, niezbędnej do inaktywacji czynnika V przez aktywowane białko C (APC), przy jednoczesnym braku wpływu na układ protrombinazy. Prowadzi to do rozwoju nabytej oporności na APC (5). Są to najprawdopodobniej tylko jedne z wielu mechanizmów mogących prowadzić do powstawania zakrzepów u ludzi z przeciwciałami antyfosfolipidowymi.

APS występuje jako zespół pierwotny, niezwiązany z innymi chorobami (PAPS) oraz zespół wtórny (SAPS), występujący w przebiegu innych chorób, z reguły autoimmunologicznych, a wśród nich najczęściej w przebiegu toczenia rumieniowatego układowego (SLE - *systemic lupus erythematosus*) (6).

Zespół antyfosfolipidowy to niezwykle postać trombofilii z kilku powodów. Po pierwsze, jest to nabyta skłonność do nadkrzepliwości o etiologii immunologicznej. Pod tym względem zespół dzieli podobne podłoże patogenetyczne z małopłytkowością poheparynową, czy nabytą postacią plamicy zakrzepowej małopłytkowej. Po drugie, mimo znacznych wysiłków, nie udało się dotąd stworzyć jednolitej, spójnej teorii patogenezy powikłań zakrzepowych i zidentyfikować szczegółowych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie zakrzepów. Po trzecie, zespół antyfosfolipidowy niesie ze sobą równocześnie ryzyko zakrzepicy, tak w łożysku żylnym, jak i tętniczym. Po czwarte wreszcie, zakrzepica tętnicza lokalizuje się z zupełnie niewyjaśnionych powodów, przede wszystkim w krążeniu mózgowym, wiodąc do mikrozawałów lub pełnoobjawowego udaru niedokrwiennego mózgu.

Wydaje się, że sama obecność przeciwciał przeciwfosfolipidowych nie gwarantuje rozwoju zespołu antyfosfolipidowego. Wykazano np., że tylko u 8,1% takich osób w ciągu 5 lat pojawia się zakrzepica. Stąd stworzono hipotezę tzw. „dwóch bodźców” („*double hit*”), mówiącą o konieczności pojawienia się jeszcze jednego czynnika niezbędnego do manifestacji klinicznej APS (71).

Biorąc pod uwagę bezpośrednie i odległe następstwa kliniczne to właśnie zakrzepica tętnicza wydaje się nieść dla chorego najpoważniejsze konsekwencje. Istotnym staje się więc znalezienie wyróżników determinujących wystąpienie tego powikłania w APS, a co za tym idzie prób ich zapobiegania.

## 2.1 Rys historyczny

W 1906 roku A. Wasserman opisał u chorych zakażonych krętkiem kiły występowanie specyficznego przeciwciała tzw. reaginy, która była skierowana przeciwko zawierającym fosfolipidy ekstraktom białkowym (7). W 1941 roku Pangborn nazwał aktywną komponentę antygenową testu VDRL (*veneral disease research laboratory test*) wyizolowaną z serca wołu, kardiolipliną (8).

Do dzisiaj mieszanina kardiolipiny, cholesterolu i fosfatydylocholiny używana jest do szybkiego rozpoznawania zakażenia kiłą (test VDRL). Wyniki tego badania nie są jednak swoiste, a fałszywie dodatnie wyniki mogą występować w przebiegu chorób infekcyjnych, nowotworowych lub autoimmunologicznych (9).

W 1952 roku Conley i Hartman wykryli u dwóch osób z SLE wydłużenie czasów krzepnięcia osocza, związane z obecnością krążącego antykoagulantu, który blokował fosfolipidy aktywujące krzepnięcie osocza *in vitro* (10).

Po upływie 11 lat Bowie i wsp. odkryli, że występowanie krążącego antykoagulantu wiąże się paradoksalnie ze zwiększoną częstością występowania powikłań zakrzepowozatorowych (11).

W 1972 roku Feinstein i Rappaport nazwali tę grupę przeciwciał antykoagulantem toczniowym (*lupus anticoagulant*- LA) (12).

W 1983 roku E.N. Harris wykorzystując metodę radioimmunoenzymatyczną dokonał odkrycia przeciwciał przeciwko kardiolipinie (aCL), a następnie po upływie około 2 lat opracował metodę immunoenzymatyczną, która jest wykorzystywana do dzisiaj (13).

W tym samym roku Hughes opisał po raz pierwszy podstawowe objawy kliniczne towarzyszące obecności tych przeciwciał.

Dopiero jednak Harris w 1987 roku wprowadził definicję zespołu antyfosfolipidowego (APS- *antiphospholipid syndrome*). Charakteryzuje go łączne występowanie przeciwciał antyfosfolipidowych z objawami zakrzepicy tętniczej lub żyłnej, a u kobiet powikłań położniczych, głównie pod postacią nawykowych poronień i przedwczesnych porodów (14).

Istotny przełom w badaniach nad przeciwciałami antyfosfolipidowymi przyniósł rok 1990, kiedy to trzy niezależne grupy badaczy odkryły kofaktor białkowy niezbędny do wiązania się przeciwciał przeciwkardiolipinowych z kardiolipiną,  $\beta$ 2 –glikoproteinę I ( $\beta$ 2 GPI) (15, 16, 17).

Rok później wykazano, że również protrombina może być podobnie działającym kofaktorem (13), a w następnych latach odkryto także inne białka, które mogą spełniać tę rolę np. białko C, białko S, aneksyna V, wysoko lub niskocząsteczkowy kininogen, trombomodulina, czynnik XI, TFPI, czy kompleks aktywnego czynnika VII z

czynnikiem VII (VIIa/VII) (18, 19, 20). Ich rola kliniczna jest w chwili obecnej słabo poznana.

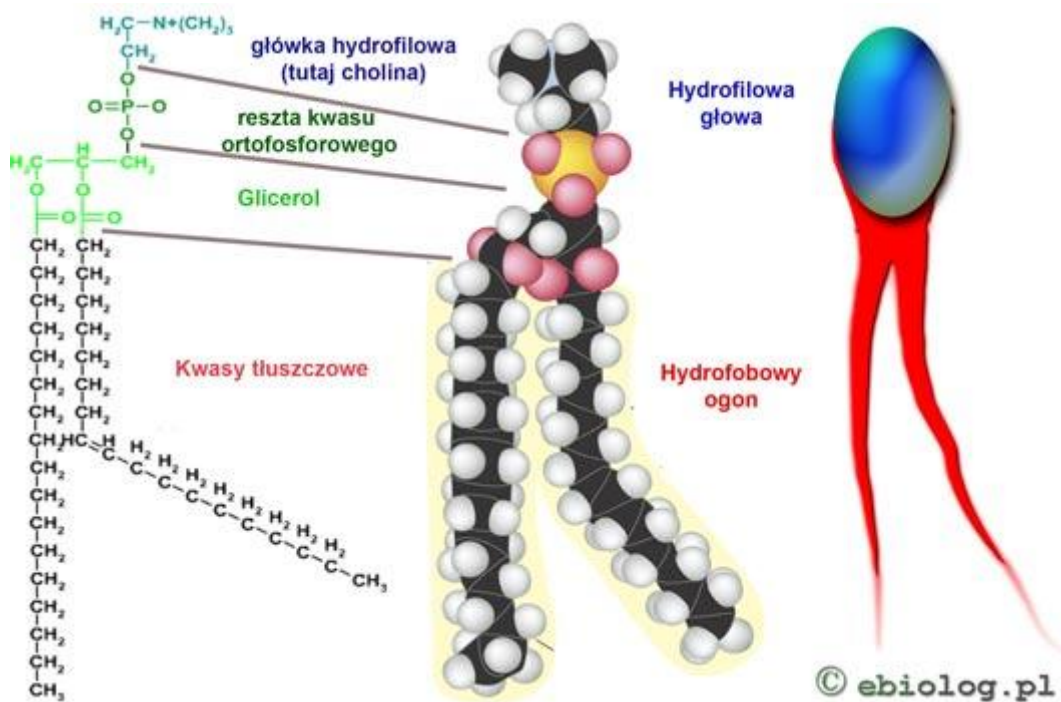
Z uwagi na kluczową rolę białek w powstawaniu przeciwciał przeciwfosfolipidowych i patomechanizmie powstawania zespołu antyfosfolipidowego J. Vermeylen i J. Arnout zaproponowali w 1992r wprowadzenie nowej nomenklatury: przeciwciała antyfosfolipidowo-białkowe (*antiphospholipid-protein antibodies-APA*) i zespół antyfosfolipidowo-białkowy (*antiphospholipid-protein syndrome-APS*) (21). Nomenklatura ta, choć precyzyjna, nie przyjęła się jednak.

W 1999r ogłoszono pierwsze międzynarodowe kryteria APS (22) a w 2006r Myakis i wsp. opublikowali jego obecne, zmodyfikowane kryteria APS, uwzględniające już obecność przeciwciał przeciw  $\beta_2$  –glikoproteinie I oraz określające wymóg obecności, co najmniej średniego lub wysokiego poziomu aCL (23).

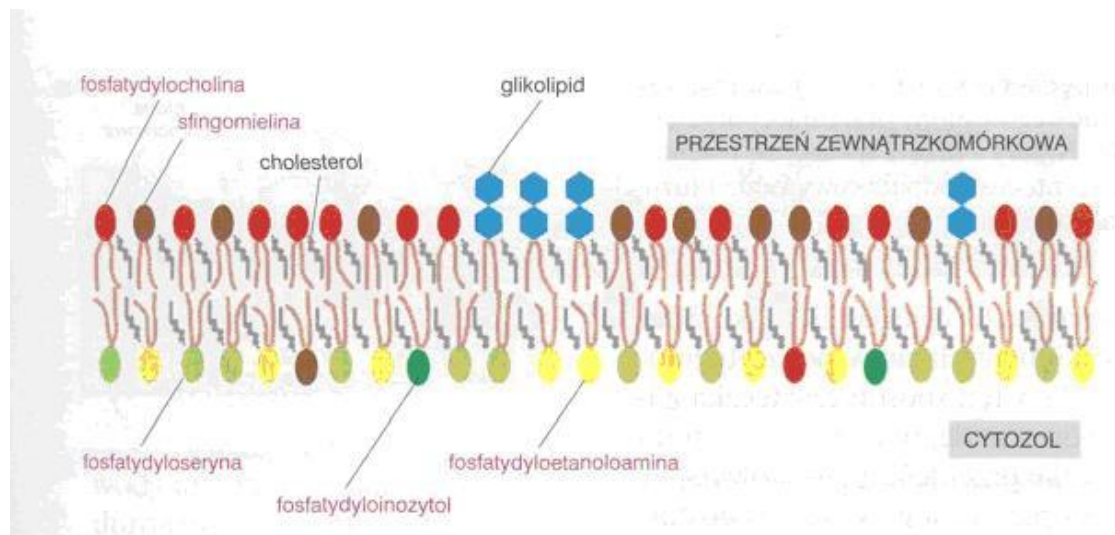
## **2.2 Fosfolipidy i ich rola w procesach hemostazy**

Fosfolipidy to lipidy zbudowane z glicerolu, dwóch łańcuchów kwasu tłuszczowego i fosforylowanego alkoholu (np. inozytolu, seryny, choliny, etanolaminy). Są składnikami wszystkich błon biologicznych i odgrywają pierwszoplanową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki.

Ich asymetryczne rozmieszczenie po obu stronach błony komórkowej, tj. na zewnątrz fosfolipidy obojętne (np. fosfatydylocholina) a wewnątrz fosfolipidy ujemnie naładowane (fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol, kwas fosfatydowy) zapewnia prawidłową komunikację międzykomórkową (24).



Rysunek 1. Schemat budowy fosfolipidu (www.ebiolog.pl)



Rysunek 2. Asymetrycznie rozmieszczenie lipidów i glikolipidów w błonach (Bruce Alberts i in., Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii komórki, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999)

Kardiolipina, która jest powszechnie używana w testach *in vitro* do diagnostyki przeciwciał antyfosfolipidowych, nie jest składnikiem błony komórkowej, występuje w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Nie jest więc ona najpewniej prawdziwym antygenem dla przeciwciał antyfosfolipidowych, a jedynie reaguje krzyżowo z większością przeciwciał skierowanych przeciwko kompleksom kofaktorów białkowych z ujemnie naładowanymi fosfolipidami (24).

Fosfolipidy, jako struktury eksponowane na powierzchni śródbłonna i płytek krwi, umożliwiają przyczepianie się do nich kompleksów czynników krzepnięcia, co stanowi o ich zasadniczej roli w procesie hemostazy.

Po aktywacji komórek ujemnie naładowane fosfolipidy przemieszczają się na zewnątrz (tzw. ruch „flip-flop”), co rozpoczyna wiele reakcji na ich powierzchni (25). I tak, w obecności wapnia, tworzy się m.in. kompleks czynnika FXa- FVa (protrombinaza), który przekształca protrombinę w trombinę. Podobnie FIXa w kompleksie z FVIIIa tworzą na powierzchni fosfolipidów tzw. tenazę, która aktywuje FX 50 razy szybciej niż kompleks TF i FVIIa, tworzony zresztą też na powierzchni błon zawierających ujemnie naładowane fosfolipidy (26).

Z kolei na komórkach śródbłonna fosfolipidy umożliwiają aktywację białka C, hamującego krzepnięcie krwi, a także są niezbędne do prawidłowego działania TFPI.

### **2.3 Rodzaje przeciwciał przeciwfosfolipidowych**

Przeciwciała przeciwfosfolipidowe należą do różnych klas immunoglobulin (IgG, IgM lub rzadziej IgA), występują często w wielu chorobach autoimmunologicznych, przede wszystkim w SLE, rzadziej w zespole suchości, mieszanej chorobie tkanki łącznej, reumatoidalnym zapaleniu stawów, idiopatycznej plamicy małopłytkowej, czy innych chorobach immunologicznych (27).

Mogą one występować zarówno jako alloprzeciwciała jak i autoprzeciwciała.

**Alloprzeciwciała**, czyli tzw. prawdziwe przeciwciała przeciwfosfolipidowe, skierowane wyłącznie przeciwko fosfolipidom (zarówno ujemnym jak i obojętnym), nie wymagają do wiązania białkowych kofaktorów. Powstają podczas szeregu zakażeń, zarówno o etiologii wirusowej, bakteryjnej, jak i pasożytniczej (patrz Tab. 1) (28),

towarzyszą schorzeniom nowotworowym i hematologicznym (np. chłoniakom nieziarnicznym, rakowi prostaty, płuca i białaczce włochatokomórkowej) (29), bywają indukowane przez zażywanie niektórych leków (np. prokainamid, chlorpromazyna) (30). Alloprzeciwciała te nie przedłużają czasów krzepnięcia zależnych od fosfolipidów *in vitro* i nie wiążą się z ryzykiem powikłań zatorowo-zakrzepowych (31).

Natomiast **autoprzeciwciała** są obecne w chorobach układowych tkanki łącznej lub jako jedyny objaw choroby autoimmunologicznej (APS). Są skierowane przeciwko kompleksom fosfolipidów z ich białkowymi kofaktorami (stąd określenie przeciwciała przeciwfosfolipidowe nie jest precyzyjne, ale powszechnie używane). Przedłużają czasy krzepnięcia zależne od fosfolipidów, odpowiadają za fałszywie dodatni wynik odczynu kłowego, a klinicznie za powikłania zakrzepowe (33).

Pojawiają się doniesienia o roli predyspozycji genetycznej do wytwarzania przeciwciał przeciwfosfolipidowych. Udowodniono związek z niektórymi antygenami układu HLA (np. DR 3, DR4, DR7, DRB1\*070, DQB1\*0303, DMA\*0102) (34, 35). Pojawiają się coraz to nowe informacje o genach korelujących ze skłonnością do wytwarzania tych przeciwciał.

**Tabela 1. Występowanie przeciwciał przeciwfosfolipidowych w chorobach o etiologii zakaźnej ( 32)**

<b>Etiologia</b>	<b>Jednostka chorobowa</b>	<b>Czynnik etiologiczny</b>	<b>Częstość występowania aCL (%)</b>
<i>Bakteryjna</i>	kiła	Treponema pallidum	do 100
	borelioza	Borrelia burgdorferi	14-41
	leptospiroza	Leptospira sp.	50
	trąd	Mycobacterium leprae	33-67
	gruźlica	Mycobacterium tuberculosis	28-53
	pneumokokowe zapalenie płuc	Pneumococcus sp.	25
	inne zakażenia	Salmonella sp. Escherichia coli Mycoplasma pneumoniae Streptococcus aureus Streptococcus sp.	20-80
<i>Wirusowa</i>	AIDS	wirus HIV typ I i II	0-80
	ospa wietrzna	wirus ospy wietrznej	20-47
	świnka	wirus świnki	33-54
	różyczka	wirus różyczki	66-80
	mononukleozę	Wirus EBV	9-70
	WZW typu B i C	Wirus HBV i HCV	14-100
	zakażenie CMV	Wirus CMV	14-35
	zakażenie parwowirusem B 19	Parwowirus B19	25-50
<i>Pasożytnicza</i>	toksoplazmoza	Toxoplasma gondi	7
	malaria	Plazmodium vivax	70-100
	zespół SARA	Chlamydia trachomatis	10-25



## 2.4 Białkowe kofaktory przeciwciał przeciwfosfolipidowych

Antygenowość fosfolipidów w związku z ich niewielką masą cząsteczkową jest niewielka. Wzrasta ona jednak bardzo znacznie po interakcji z białkami lub po przejściu w formę heksagonalną (36, 37).

Przyłączenie białkowego kofaktora do fosfolipidu zmienia konformację tego pierwszego, odsłania neoepitopy, łączące się ze swoistymi przeciwciałami (38).

Najważniejsze białkowe kofaktory przeciwciał przeciwfosfolipidowych to  $\beta$ 2 glikoproteina I i protrombina.

### 2.4.1 $\beta$ 2 glikoproteina I ( $\beta$ 2GPI, apolipoproteina H)

$\beta$ 2GPI, opisana po raz pierwszy w 1961r przez Schulza jest syntetyzowana głównie w wątrobie, a w mniejszych ilościach również przez komórki śródbłonna i łożyska (39).

W związku z tym, że może się ona również pojawiać we frakcji chylomikronów, HDL, VLDL i ma zdolność aktywowania *in vitro* lipazy lipoproteinowej, nazywana była wcześniej apolipoproteina H (40).

Białko to ma masę około 43 kD, a jego stężenie w osoczu wynosi ok. 200  $\mu$ g/ml.  $\beta$ 2GPI składa się z 326 aminokwasów tworzących pojedynczy łańcuch polipeptydowy, składający się z pięciu struktur- domen (tzw. „*sushi domain*”). Pierwsze 4 domeny zawierają po 60 aminokwasów a piąta domena ma dodatkowe cząsteczki cysteiny, tworzące C-końcowy fragment, który nadaje jej hydrofobowy charakter, odpowiadający za wiązanie się  $\beta$ 2GPI do ujemnie naładowanych fosfolipidów. Wiązanie  $\beta$ 2GPI z fosfolipidami nie wymaga obecności jonów wapnia (41).

Niektóre badania, oparte o obraz w mikroskopie elektronowym, wskazują na istnienie dwóch form  $\beta$ 2GPI: „aktywnej” otwartej oraz „nieaktywnej” okrągłej, osoczowej (powstałej wskutek interakcji domeny pierwszej z piątą).  $\beta$ 2GPI, będąc w formie zaktywowanej ma odsłonięte epitopy pierwszej domeny (ukryte w formie okrągłej), co umożliwia przyłączenie się w tym miejscu przeciwciał przeciwko  $\beta$ 2GPI. Przeciwciała

rozpoznające epitopy na pierwszej domenie, lepiej korelują z epizodami zakrzepowymi, niż przeciwciała skierowane przeciwko innym domenom (42).

$\beta$ 2GPI uważana jest za antykoagulant, gdyż hamuje ona aktywację wewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia (43), czynnik XII (44), aktywację czynnika Xa i protrombinazy (45) oraz ADP- zależnej agregacji płytek krwi (46). Hamuje ona również układ białka C, co może przyczyniać się do powstawania zakrzepów (47). Niedobór tego białka wykrywany jest rzadko i nie niesie ze sobą zwiększonej tendencji prozakrzepowej (48).

### 2.4.2 Protrombina

**Protrombina** (czynnik II) zbudowana jest z 579 aminokwasów tworzących pojedynczy łańcuch glikoproteinowy o masie 72 kD. Jest syntetyzowana w wątrobie przy udziale witaminy K, co prowadzi do potranslacyjnej karboksylacji resztami kwasu glutaminowego N-końcowego obszaru łańcucha. Taka zmiana umożliwia wiązanie jonów wapnia, a następnie oddziaływanie z ujemnie naładowanymi fosfolipidami. Protrombina jest nieczynnym zymogenem osoczym, przekształcanym w proteazę serynową- trombinę (czynnik IIa). Okres półtrwania protrombiny w osoczu to 2-4 dni a jej stężenie wynosi 1-2  $\mu$ mol/l (26, 49).

**Trombina**, powstająca z protrombiny, pełni kluczową rolę w powstawaniu skrzepu, gdyż powoduje przekształcenie cząsteczki fibrynogenu w monomery fibryny, aktywuje czynnik XIII stabilizujący skrzep oraz nasila własną produkcję wskutek aktywacji czynnika V i VIII. Z drugiej strony, na śródbłonku naczyń po połączeniu z trombomoduliną, aktywuje antykoagulacyjny układ białka C. Przy uszkodzeniu śródbłonka, a tym samym zmniejszeniu ekspresji trombomoduliny, zaczyna dominować prozakrzepowa aktywność trombin (50).

Od dawna postulowano udział protrombiny w patogenezie zespołu antyfosfolipidowego. Początkowo tłumaczono zjawisko antykoagulantu toczniowego zahamowaniem powstawania kompleksu protrombinazy na powierzchni fosfolipidów (51). W 1960r S.I. Rapaport opisał przypadek hipoprotrombinemii z przedłużeniem czasów krzepnięcia w przebiegu SLE (52).

Podejrzewano, że hipoprotrombinemia może być spowodowana powstawaniem przeciwciał skierowanych przeciwko protrombinie (aPT) (53). Ten rodzaj przeciwciał występuje znacznie częściej w SLE, ale bardzo rzadko powoduje obniżenie stężenia protrombiny (54). Identyfikuje się je u ok. połowy chorych z LA (55).

W latach 90-tych Galli i wsp. stwierdzili, że istnieją co najmniej dwa typy przeciwciał przeciwfosfolipidowych o właściwościach antykoagulantu: zależny od protrombiny i drugi, zależny od  $\beta$ 2GPI (56).

Jednakże rola aPT w zespole antyfosfolipidowym nie jest do końca wyjaśniona. Rzadko prowadzą one do powikłań krwotocznych poprzez zmniejszenie stężenia protrombiny. Znacznie częściej nie wpływają na jej stężenie w osoczu, a powodują raczej powikłania zakrzepowe i niepowodzenia położnicze (57).

### **2.4.3 Aneksyna V (łożyskowy czynnik przeciwkrzepliwy-1)**

Aneksyna V jest białkiem z grupy adhezyn, wiąże silnie ujemnie naładowane fosfolipidy w obecności jonów wapnia. Jest szeroko rozpowszechniona w narządach i tkankach, a szczególnie w łożysku, na powierzchni śródbłonna oraz na erytrocytach, gdzie pełni funkcję tkankowego czynnika antykoagulacyjnego (hamuje reakcje krzepnięcia zależne od fosfolipidów). W łożysku jest zlokalizowana na mikrokosmkach syncytiotrofoblastu i poprzez swoją funkcję zapobiega wykrzepianiu w jego naczyniach (58).

Zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z 319 aminokwasów; masa jej wynosi 36 kD. Składa się z N-końcowego ogona i rdzenia, utworzonego przez cztery powtarzające się domeny, zawierające po 65-70 reszt aminokwasowych. Jej stężenie w osoczu wynosi  $<10$  ng/mL (59).

W kaskadzie krzepnięcia aneksyna V hamuje FX, protrombinę oraz kompleks TF z FVII (60, 61).

Wykazano ponadto, iż hamuje ona aktywację białka C na powierzchni śródbłonna i rozkład FV przez aktywowane białko C i S (62).

W niektórych pracach opisywano, iż pacjenci z APS i powikłaniami zakrzepowymi wykazują obecność przeciwciał przeciwko aneksynie V (63, 64).

Inni nie wskazywali jednak takiej zależności (65, 66, 67).

#### **2.4.4 Pozostałe kofaktory przeciwciał przeciwfosfolipidowych**

Poza wymienionymi powyżej, rolę kofaktorów dla przeciwciał przeciwfosfolipidowych mogą pełnić inne związki, np. białko C i S, trombomodulina i siarczan heparanu (68, 69).

Rola tych kofaktorów i przeciwciał przeciwko nim skierowanych jest niejasna.

#### **2.4.5 Mechanizm prozakrzepowego działania przeciwciał przeciwfosfolipidowych**

Przyczyny powstawania przeciwciał przeciwfosfolipidowych nie zostały dotąd wyjaśnione. Bardzo prawdopodobna wydaje się teoria sformułowana w 1996r przez Arnouta. Zakłada ona, że ujemnie naładowane fosfolipidy, przede wszystkim fosfatydyloseryna, znajdujące się po wewnętrznej stronie błony komórkowej, w trakcie aktywacji, uszkodzenia lub apoptozy komórki, zostają przemieszczone na zewnątrz. Wiąże się do nich wykazująca silne powinowactwo  $\beta$ 2GPI, zmieniając swoją konformację, a powstały w ten sposób kompleks może indukować reakcję autoimmunologiczną, wskutek której powstają skierowane przeciwko niemu autoprzeciwciała (70).

Pomimo znanego faktu, iż obecność przeciwciał przeciwfosfolipidowych wiąże się z większym ryzykiem epizodów zakrzepowych, do tej pory nie udało się jednoznacznie określić mechanizmów leżących u podstawy tego zjawiska. Istnieje jednak kilka hipotez próbujących wyjaśnić powyższy związek, uwzględniających zarówno wpływ aktywacji śródbłonna, monocytów, płytek krwi oraz prozakrzepowych mikrocząsteczek, powstających z w/w komórek, jak i hamowanie aktywności naturalnych inhibitorów krzepnięcia ( m.in. białka C, TFPI, aneksyny V), układu dopełniacza i fibrynolizy.

### 2.5.1 Hamowanie układu białka C

Białko C jest endogennym osoczymym inhibitorem krzepnięcia, produkowanym w wątrobie i zależnym od witaminy K. Posiada swój kofaktor- białko S (również produkowane w wątrobie w sposób zależny od witaminy K), który wielokrotnie zwiększa aktywność białka C. Tylko forma wolna białka S ma aktywność kofaktora dla białka C (71).

Do aktywacji białka C dochodzi na powierzchni fosfolipidów błony śródbłonka naczyniowego, gdy trombina wiąże się z swoim receptorem trombomoduliną lub śródbłonkowym receptorem białka C (EPCR). Trombomodulina jako kofaktor przyspiesza tempo aktywacji białka C około 400 razy i pełni funkcję głównie w łożysku drobnych naczyń (nie występuje na śródbłonku naczyń mózgowych), natomiast działanie trombiny przez EPCR przeważa w dużych naczyniach, gdzie skuteczność trombomoduliny jest bardzo mała. Wskutek tej reakcji powstaje aktywna forma białka C (APC). APC inaktywuje FVa i FVIIIa, co zapobiega dalszemu tworzeniu trombiny (72).

Przeciwwakrzepowe działanie APC polega również na inaktywacji inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1).

Smirnov i wsp. wykazali, że przeciwciała przeciwfosfolipidowe blokują fosfatydyloetanolaminę, niezbędną do inaktywacji aktywnego FV przez APC (5). To wybiórcze uszkodzenie przeciwwakrzepowego działania białka C, przy braku wpływu na układ protrombinazy, jest prawdopodobnie odpowiedzialne za obserwowaną u osób z przeciwciałami przeciwfosfolipidowymi, nabytą oporność na działanie białka C (73).

Przeciwciała przeciwfosfolipidowe rozpoznają białko C tylko w obecności  $\beta$ 2GPI, stąd powstała sugestia, że dysfunkcja białka C powodowana przez przeciwciała przeciwfosfolipidowe jest promowana przez  $\beta$ 2GPI (74).

Wpływ aPL na układ białka C mógłby także tłumaczyć tzw. paradoks trombiny. Trombina jest z jednej strony głównym enzymem krzepnięcia, a z drugiej, aktywatorem białka C, stymuluje uwalnianie z komórek śródbłonka aktywatora fibrynolizy typu tkankowego (t- PA), jego inhibitor (PAI-1) oraz inhibitor fibrynolizy (TAFI). W sytuacji zablokowania przez aPL niewielkiej ilości trombiny miałyby dochodzić do obniżenia aktywacji białka C i wystąpienia powikłań zakrzepowych (75, 76).

Ponadto u osób z APS opisywano obecność przeciwciał skierowanych przeciwko komponentom układu białka C, np. trombomodulinie, białku C, białku S oraz składowej dopełniacza C4b (77, 78, 79). Jednak rola tych przeciwciał nie jest do końca jasna.

### **2.5.2 Hamowanie aktywności antytrombiny**

Antytrombina jest głównym inhibitorem krzepnięcia krwi. Hamuje przede wszystkim trombinę, a poza tym czynnik IXa, Xa oraz słabo VIIa (tylko w kompleksie z TF). Fizjologicznym aktywatorem antytrombiny jest siarczan heparanu, obecny na śródbłonku.

Istnieje kilka hipotez blokowania funkcji antytrombiny, m.in. poprzez bezpośredni wpływ przeciwciał skierowanych przeciwko siarczanowi heparanu lub w wyniku interakcji aPL z  $\beta$ 2GPI i fosfolipidami śródbłonka naczyń blokującymi pośrednio siarczan heparanu (80, 81). Istnieją też doniesienia o wpływie aPL na obniżenie stężenia antytrombiny w osoczu oraz na zmniejszenie jej aktywności (82).

### **2.4.6 Hamowanie przeciwzakrzepowego działania aneksyny V**

Aneksyna V jest antykoagulantem, który zapewne swą główną rolę pełni w łożysku, gdzie chroni powierzchniowe fosfolipidy przed kontaktem z osoczowymi czynnikami krzepnięcia (83)

Przeciwciała przeciwfosfolipidowe w kompleksie z ich białkowymi kofaktorami wypierają aneksynę z jej połączeń z fosfolipidami, co uszkadza barierę ochronną tworzoną przez aneksynę, prowadząc prawdopodobnie do powikłań zakrzepowych w łożysku, a w następstwie niepowodzeń położniczych (84).

Opisywano, iż obecność przeciwciał przeciwko aneksynie V korelowała z nawracającymi poronieniami (85).

#### **2.4.7 Hamowanie przeciwzakrzepowej aktywności $\beta$ 2GPI**

Istnieją pewne dane sugerujące wpływ przeciwciał przeciwfosfolipidowych na czynność  $\beta$ 2GPI, tj. zaburzenie jej funkcji jako słabego antykoagulantu, co mogłoby powodować wzrost aktywności trombiny (83, 86). W APS nie stwierdza się jednak obniżenia stężenia  $\beta$ 2GPI (87).

Rola hamowania funkcji tego białka w APS jest ciągle słabo udokumentowana.

#### **2.4.8 Wpływ na ekspresję czynnika tkankowego (TF) i inhibitor zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia (TFPI)**

TF jest integralnym białkiem błonowym, składającym się z domeny cytoplazmatycznej zawierającej cysteinę, domeny przezbłonowej i domeny pozakomórkowej wiążącej ligand. W warunkach fizjologicznych TF nie jest ekspozycyjny na powierzchni śródbłonna i monocytów. Staje się on dostępny po uszkodzeniu ściany naczynia oraz po ekspozycji komórek na lipopolisacharydy bakterii, TNF- $\alpha$ , IL-1, czy kompleksy immunologiczne (88).

Podstawową rolą TF jako kofaktora jest znaczne przyspieszenie konwersji czynnika VII do VIIa. Następnie kompleks TF-FVIIa (tzw. tenaza zewnątrzpochodna) katalizuje aktywację czynnika X i IX, prowadząc ostatecznie do generacji trombiny.

Działanie TF reguluje inhibitor zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia (TFPI). Jest on białkiem osoczym, syntetyzowanym przede wszystkim przez śródbłonek naczyniowy, megakariocyty i wątrobę. Posiada trzy domeny, które zawierają miejsca wiążące dla kompleksu TF-FVIIa, czynnika Xa i heparyny. Przyłączenie FXa do TFPI aktywuje ten ostatni, umożliwiając dalsze inaktywowanie kompleksu TF-FVIIa. Hamowanie kompleksu TF-FVIIa może występować, choć słabiej, także w nieobecności FXa (89, 90).

W APS stwierdzano, powodowaną przez aPL, podwyższoną ekspresję TF na krążących we krwi monocytach (91). Cuadrado i wsp. wykazali, że ekspresja i poziom mRNA czynnika tkankowego w monocytach jest wyższa u pacjentów z pierwotnym APS i epizodami zakrzepowymi w wywiadzie, w porównaniu do grupy bez manifestacji

zakrzepowo-zatorowej i do osób zdrowych. Zwiększona ekspresja TF korelowała również z obecnością aPL IgG (92, 93).

Wykazywano także wpływ przeciwciał przeciwfosfolipidowych na TFPI. Salemiak i wsp. zauważyli u pacjentów z aPL wyższą generację FXa oraz mniejsze stężenie TFPI. Wysłano hipotezę, że przeciwciała przeciwko  $\beta$ 2GPI hamują inhibitorową aktywność TFPI, ponieważ kompleksy przeciwciał anti-  $\beta$ 2GPI z  $\beta$ 2GPI konkurują z kompleksami TFPI- FXa o miejsca wiązania na powierzchni fosfolipidów (94).

W APS opisywano także obecność przeciwciał przeciwko TFPI, które mogą obniżać jego aktywność (95).

#### **2.4.9 Zaburzenia powstawania eikozanoidów**

Jednym z kolejnych postulowanych mechanizmów predysponujących do zakrzepicy w APS jest zmniejszona produkcja prostacykliny (PGI<sub>2</sub>) w śródbłonku naczyń oraz zwiększenie produkcji tromboksanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) w płytkach krwi (96).

Opisywano związki pomiędzy zahamowaniem syntezy PGI<sub>2</sub> a obecnością LA, wyższym mianem aPL IgG, mniejszą ilością płytek krwi i zakrzepicą tętniczą (97).

Sugerowano również wpływ LA na uwalnianie kwasu arachidonowego z błon komórkowych (98) oraz hamowanie fosfolipazy A<sub>2</sub> przez niektóre aPL (99).

Wpływ aPL na produkcję PGI<sub>2</sub> jest jednak kontrowersyjny (100, 101).

#### **2.4.10 Upośledzenie fibrynolizy**

Autoprzeciwciała obecne w APS mogą także upośledzać fibrynolizę i w ten sposób prowadzić do powikłań zakrzepowych (102, 103). Może się to wiązać z dysfunkcją komórek śródbłonka. W osoczu chorych dochodzić może do podwyższenia poziomu inhibitora aktywatora fibrynolizy (PAI-1) oraz obniżenia stężenia t-PA (104, 105).



Przeciwciała przeciwko t-PA opisywano także w osoczu pacjentów z APS. Skierowane one były przeciwko katalitycznej domenie tego aktywatora, co miało hamować jego czynność (106).

Istnieje również możliwość wpływu  $\beta$ 2GPI na układ fibrynolizy. Wysłunięto hipotezę, że chroni ona aktywność t-PA przed hamowaniem przez PAI-1, a aPL mogłyby zniwelować ten efekt (107).

$\beta$ 2GPI może także wpływać na wytwarzanie plazminy, która powoduje proteolizę cząsteczki  $\beta$ 2GPI w domenie V, wskutek czego traci białko powinowactwo do fosfolipidów, a nabywa zdolności do wiązania z plazminogenem. Może to obniżać ilość tworzącej się z plazminogenu plazminy (108).

Rozważano również możliwość wpływu zwiększonej generacji TAFI pod wpływem aPL. Jednak prace opublikowane w ostatnim okresie nie potwierdziły związku podwyższonego poziomu TAFI z większą tendencją do zakrzepicy i nawykowych poronień (109, 110).

#### **2.4.11 Nasilanie aktywacji i agregacji płytek krwi**

Płytki krwi pełnią kluczową rolę w pierwotnej hemostazie. Interakcja aPL z płytkami może dokonywać się na trzy sposoby: pierwszy, gdy aPL jak każde inne immunoglobuliny poprzez swój fragment Fab łączą się ze specyficznym antygenem na powierzchni płytki krwi w klasycznej reakcji antygen- przeciwciało (Ag-Ab); drugi, gdy kompleksy Ag-Ab wiążą się z płytkami poprzez receptor Fc $\gamma$ RII i trzeci, gdy aPL łączą się z płytkami krwi w niespecyficzny sposób, związany najpewniej z uszkodzeniem ich błony komórkowej (111) Ten ostatni mechanizm wydaje się nie mieć znaczenia w patofizjologii powstawania zakrzepów w APS (83).

Bez względu na mechanizm, płytki krwi mogą ulegać aktywacji u chorych z APS (112). Zwiększoną aktywację płytek krwi obserwowano także w modelu *in vitro* pod wpływem monoklonalnych i poliklonalnych aPL, pochodzących od osób z APS (113).

Również przeciwciała przeciwko  $\beta$ 2GPI mogą sprzyjać przyleganiu płytek krwi do warstwy podśródbłonkowej (114). Niebagatelne znaczenie przypisuje się tu

dimerycznej formie  $\beta$ 2GPI, która powstaje wskutek związania jednocześnie jej dwu cząsteczek z dwoma ramionami przeciwciała. Taki dimer wykazuje zwiększone powinowactwo do fosfolipidów.

De Groot i wsp. wykazali w modelu *in vitro*, że ta forma  $\beta$ 2GPI, naśladując efekt działania kompleksów  $\beta$ 2GPI i anty- $\beta$ 2GPI, powoduje zwiększoną adhezję płytek krwi do kolagenu, a następnie ich agregację. Sugerowali oni, że dimeryczne formy  $\beta$ 2GPI wiążą się z płytkami krwi za pomocą receptora apoER2` (*apolipoprotein E receptor 2`*), jednego z rodziny receptorów lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), obecnego na płytkach krwi (115).

Wpływ aPL na aktywację płytek może się też dokonywać przy udziale układu dopełniacza. U pacjentów z APS i niedokrwieniem centralnego systemu nerwowego stwierdzano zwiększony poziom kompleksu C5b-9, powodującego aktywację płytek krwi (116, 117).

Dodatkowo udowodniono, że C5b-9 może zwiększać przezbłonową migrację fosfatydyloseryny, powodując zwiększone wiązanie  $\beta$ 2GPI, co w mechanizmie błędnego koła pobudza C5b-9, a następnie aktywuje płytki krwi (118).

#### **2.4.12 Aktywacja komórek śródbłónka i powstawanie mikrocząstek**

$\beta$ 2GPI jest główną molekułą odpowiedzialną za wiązanie się aPL do komórek śródbłónka poprzez ekspresję neoepitopu swoistego dla krążących aPL (119).

Związanie się kompleksu aPL-  $\beta$ 2GPI do powierzchni śródbłónka powoduje jego aktywację i uwalnianie różnych substancji biologicznie czynnych (m.in. prozapalnych i prozakrzepowych) (120, 121).

U chorych z pierwotnym APS i nawracającymi epizodami zakrzepowymi stwierdzano zwiększenie osoczowego poziomu rozpuszczalnych VCAM-1, a także E-selektyny, ICAM-1 oraz prozapalnych cytokin (np. interleukiny 1 i interleukiny 6) (122, 123, 124).

U chorych z SLE i obecnością aPL zwracało uwagę zwiększenie poziomu t-PA i czynnika von Willebranda, jako wskaźników uszkodzenia śródbłonna (125). Nie wszyscy jednak potwierdzali te obserwacje (126).

Istotny udział w etiopatogenezie powikłań zakrzepowych w APS przypisuje się również mikrocząstkom. Mikrocząstki to fragmenty błon komórkowych, które odrywają się od aktywowanych lub ulegających apoptozie komórek (płytek krwi, komórek śródbłonna, granulocytów i monocytów). Wzrost ich liczby w osoczu obserwuje się m.in. w stanie zapalnym, pod wpływem czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ), czy w sytuacji stresu oksydacyjnego (127).

W 2004r Morel udowodnił, że mikrocząstki pochodzące z leukocytów i płytek krwi wiążą się z aktywowanymi komórkami śródbłonna za pośrednictwem E- selektyny i P- selektyny, co powoduje wzrost lokalnego stężenia TF w osoczu i aktywacji procesów krzepnięcia krwi (128).

Natomiast Dignat-George wykazała zwiększoną ilość mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego w osoczu osób, zarówno z APS. Pod wpływem wiązania aPL do śródbłonna, następuje jego aktywacja, zwiększenie ekspresji molekuł adhezyjnych i TF, oraz zmiany jego profilu z przeciwzakrzepowego na prozakrzepowy, czemu towarzyszy powstawanie mikrocząstek (129).

Również mikrocząstki pochodzące z monocytów mogą wpływać prozakrzepowo u chorych z APS i powikłaniami zakrzepowymi (130).

Dodatkowym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakrzepicy u pacjentów z APS może być także obecność przeciwciał przeciwko kompleksom ox-LDL i  $\beta$ 2GPI. Ich związek z zakrzepicą tętniczą jest kontrowersyjny (131, 132, 133).

## **2.5 Zespół antyfosfolipidowy**

Objawy związane z APS mogą dotyczyć prawie wszystkich narządów i układów, stąd zespół ten jest problemem interdyscyplinarnym.

Najczęstszą manifestacją kliniczną APS jest zakrzepica, która może dotyczyć całego łożyska naczyniowego, zarówno tętniczego, jak i żylnego, a u kobiet dodatkowo może powodować występowanie niepowodzeń położniczych.

### **2.6.1 Kryteria rozpoznawania**

Obecne kryteria diagnostyczne zespołu antyfosfolipidowego przyjęły ostateczną formę na kongresie w Sydney w 2005r., a opublikowane zostały w roku 2006 (patrz Tab. 2) (23).

Objawy kliniczne muszą być potwierdzone obiektywnymi metodami, a za dodatnie przyjmuje się te wyniki oznaczeń laboratoryjnych, które wypadną dodatnio przynajmniej 2 razy, w odstępie co najmniej 12 tygodni.

Zespół antyfosfolipidowy rozpoznaje się, gdy jest spełnione  $\geq 1$  kryterium kliniczne i  $\geq 1$  kryterium laboratoryjne. Kryteriów tych nie można zastosować, gdy objawy kliniczne choroby wystąpiły w okresie  $< 12$  tygodni lub  $> 5$  lat od momentu wykrycia aPL.

**Tabela 2. Kryteria diagnostyczne zespołu antyfosfolipidowego**

<p><b>Kryteria kliniczne</b></p>	<p><b>1. Zakrzepica naczyń:</b></p> <p>Jeden lub więcej epizodów zakrzepicy w naczyniach tętniczych, żylnych (z wyjątkiem zakrzepicy żył powierzchniowych) lub włosowatych w obrębie jakiejkolwiek tkanki i narządu, potwierdzonej badaniem obrazowym, dopplerowskim lub histologicznym. W obrazie histopatologicznym zmianom zakrzepowym nie powinno towarzyszyć zapalenie ściany naczynia.</p> <p><b>2. Niepowodzenia położnicze</b></p> <p>a) <math>\geq 1</math> obumarcie morfologicznie prawidłowego płodu po 10 tygodniu ciąży (prawidłowa morfologia płodu udokumentowana za pomocą USG lub badania bezpośredniego)</p> <p>b) <math>\geq 1</math> przedwczesny poród morfologicznie prawidłowego noworodka przed 34 tygodniem ciąży w związku ze stanem przedrzucawkowym lub rzucawką bądź ciężką niewydolnością łożyska</p> <p>c) <math>\geq 3</math> samoistne poronienia o niewyjaśnionej przyczynie przed 10 tygodniem ciąży, z wykluczeniem przyczyn związanych ze zmianami anatomicznymi lub zaburzeniami hormonalnymi u matki oraz chromosomalnymi u obojga rodziców</p>
<p><b>Kryteria laboratoryjne</b></p>	<p>1. antykoagulant toczniowy obecny w osoczu, wykryty <math>\geq 2</math> krotnie w odstępach <math>\geq 12</math> tygodni, metodami zaleconymi przez International Society on Thrombosis and Haemostasis</p> <p>2. przeciwciała antykardiolipinowe w klasie IgG lub IgM obecne w surowicy lub w osoczu, w średnim lub dużym stężeniu (tzn. <math>&gt;40</math> GPL* lub MPL*, lub <math>&gt;99</math> percentyla), wykryte <math>\geq 2</math>-krotnie w odstępie <math>\geq 12</math> tygodni, standaryzowaną metodą ELISA.</p> <p>3. przeciwciała przeciwko <math>\beta 2</math>-glikoproteinie I obecne w surowicy lub w osoczu (w mianie <math>&gt;99</math> percentyla) <math>\geq 2</math>-krotnie w odstępie <math>\geq 12</math> tygodni, standaryzowaną metodą ELISA</p>

\* GPL (IgG), MPL (IgM)-umowne jednostki międzynarodowe, odpowiadające stężeniu przeciwciał około 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Dla celów naukowych zalecono także klasyfikowanie obecności aPL ze względu na ich liczbę u pojedynczego chorego (Tab. 3).

**Tabela 3. Klasy obecności przeciwciał antyfosfolipidowych**

<b>Klasa</b>	<b>Kryteria diagnostyczne</b>
<b>I</b>	obecność więcej niż jednego kryterium laboratoryjnego (różne kombinacje)
<b>IIa</b>	obecny tylko LA
<b>IIb</b>	obecne tylko przeciwciała aCL (IgG i/lub IgM); >40 GPL lub MPL, lub >99 percentyla
<b>IIc</b>	obecne tylko przeciwciała przeciwko $\beta$ 2GPI (IgG i/lub IgM); >99 percentyla

Do czasu wejścia w życie najnowszych kryteriów rozpoznawania APS istniał podział tego zespołu na pierwotny (PAPS) i wtórny (SAPS).

Pacjenci, którzy spełniali laboratoryjne i kliniczne cechy APS, ale nie mieli innych cech chorób autoimmunologicznych (w tym nie spełniali kryteriów rozpoznania SLE wg ACR), byli zaliczani do grupy pierwotnego APS.

SAPS rozpoznawano wtedy, gdy zespół antyfosfolipidowy towarzyszył innej chorobie autoimmunologicznej, najczęściej SLE (134, 135).

Obecnie nie zaleca się stosowania tych terminów, ponieważ: a) u części chorych z APS z czasem rozwija się pełny obraz SLE, b) obraz choroby, przebieg i postępowanie w APS, niezależnie od postaci jest identyczne (23).

W związku z częstszym występowaniem zakrzepicy u pacjentów z licznymi czynnikami ryzyka, zalecono podział pacjentów zgodnie z:

a) obecnością innych czynników wrodzonych lub nabytych mogących wywołać zakrzepicę lub b) brakiem tych czynników. Do w/w czynników zaliczono: wiek > 55 lat dla mężczyzn i > 65 lat dla kobiet, obecność znanych czynników ryzyka chorób sercowo–naczyniowych (nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, zwiększonego stężenia LDL i niskiego HDL, palenia papierosów, dodatniego wywiadu rodzinnego wczesnego występowania chorób sercowo-naczyniowych, BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>, mikroalbuminurii, obniżonego GFR<60 ml/min) oraz występowanie dziedzicznej trombofilii, zespołu nerczycowego, choroby nowotworowej, unieruchomienia, interwencji chirurgicznej oraz stosowanie doustnej antykoncepcji w wywiadzie. Stąd pacjenci spełniający kryteria rozpoznania APS powinni być analizowani pod kątem przyczyn zakrzepicy.

Epizody powikłań zakrzepowych w przeszłości powinny być uznawane jako kryterium kliniczne APS pod warunkiem braku alternatywnej diagnozy lub czynników mogących sprzyjać rozwojowi zakrzepicy (23).

## **2.6.2 Obraz kliniczny APS**

### **2.6.2.1 Powikłania zakrzepowo-zatorowe**

Epizody zakrzepowo-zatorowe mogą występować u ponad połowy osób, u których stwierdzono obecność aPL (136, 137). Statystyki ze zrozumiałych względów są tu jednak niepewne.

Obraz kliniczny APS zależy od tego, w jakim łożysku naczyniowym doszło do zakrzepicy. Zbiorcze opracowania wskazują, iż zakrzepica w tym zespole w około 2/3 przypadków dotyczy łożyska żylnego, a w 1/3 łożyska tętniczego (135). Bliższych danych dostarcza badanie dotyczące ponad 1200 osób z obecnością aPL i epizodów zakrzepowych potwierdzonych w badaniach obrazowych. Izolowaną zakrzepicę żylną obserwowano u 59% badanych, zakrzepicę tętniczą u 28%, a w 13% zakrzepica dotyczyła obu łożysk (137).

Zakrzepica żylna w APS dotyczy najczęściej żył głębokich kończyn dolnych, ma często charakter obustronny i nawracający (33, 137).

W znacznie rzadszych przypadkach dotyczy łożysk nietypowych: żył szyjnych, podobojczykowych, jamy brzusznej, miednicy małej oraz zatok żylnych mózgu i żył siatkówki (137).

Zakrzepica w łożysku tętnicznym lokalizuje się głównie (ok. 67%) w naczyniach mózgowia (135), ale może dotyczyć każdego narządu, a wówczas skutki są zależne od umiejscowienia procesu zakrzepowego.

Udar niedokrwienny i napady przemijającego niedokrwienia mózgu występują u ok. 30% wszystkich chorych, z reguły osób młodych i znacznie częściej niż w populacji ogólnej (135). Wskutek powtarzających się udarów i mikrozawałów, nierzadko skąpoobjawowych lub bezobjawowych, może rozwinąć się otępienie. Objawowa zakrzepica naczyń oka przebiega pod postacią przemijającej nagłej ślepoty (*amaurosis fugax*), neuropatii nerwu wzrokowego lub zakrzepicy tętnicy lub żyły siatkówki.

Zakrzepica tętnic wieńcowych występuje stosunkowo rzadko (ok. 5%), ale częściej u chorych <45 rż, pod postacią dławicy piersiowej lub zawału serca (135).

Zmiany w naczyniach nerkowych najczęściej przebiegają bezobjawowo. Objawowa zakrzepica tętnicy nerkowej i zawał nerki są rzadkie (<3% chorych), natomiast częściej występuje (>30% chorych) wewnątrznerkowa mikroangiopatia zakrzepowa, nierzadko z towarzyszącą sinością siateczkowatą (*livedo reticularis*), nadciśnieniem tętniczym i niewielkim zwiększeniem stężenia kreatyniny w surowicy (23, 138). Natomiast zmiany zakrzepowe w obrębie pozostałych narządów jamy brzusznej występują bardzo rzadko (<1% przypadków) (135). Ich skutkiem może być niedokrwienie przełyku, krezki, zawał śledziony, trzustki i nadnerczy.

Najbardziej niebezpieczną manifestacją APS jest katastrofalny zespół antyfosfolipidowy. Zakrzepica dotyczy wówczas kilku narządów jednocześnie (>3) i prowadzi do niewydolności wielonarządowej, nierzadko kończącej się zgonem (ok. 50% chorych). Najczęściej zakrzepica małych naczyń obejmuje nerki, płuca, OUN i serce (139, 140).

Nie jest jasne dlaczego w APS lokalizacja pierwszej zakrzepicy żyłnej determinuje wystąpienie następnego epizodu w tym samym łożysku. Podobnie ma się rzecz z łożyskiem tętniczym. Pozwala to podejrzewać, iż istnieją nieznanne jeszcze, dodatkowe czynniki decydujące o pierwotnej lokalizacji epizodu zakrzepowego. Część badań wskazuje tutaj na rolę miana przeciwciał aPL (aCL >40 GPL), które mogłyby jednocześnie wpływać na zwiększone ryzyko nawrotów zakrzepicy (144, 145).

### **2.6.2.2 Niepowodzenia położnicze**

Kryteria kliniczne rozpoznania APS obejmują 3 rodzaje powikłań położniczych (Tab. 2). Do innych powikłań położniczych, których związek z APS jest mniej pewny, zaliczamy: stan przedrzucawkowy, rzucawka ciężarnych, zahamowanie wewnątrzmacicznego wzrostu płodu, przedwczesne odklejenie się łożyska i wewnątrzmaciczne obumarcie płodu. U kobiet z APS obserwowano także zespół HELLP (hemolysis, elevated liver enzymem, low platelets), poporodowy zespół płucno-nerkowy oraz pływawicę ciężarnych (143, 144).

Ryzyko utraty ciąży w APS zależy od miana przeciwciał antyfosfolipidowych, a wystąpienie niepomyślnego zakończenia poprzednich ciąż stanowi najważniejszy czynnik ryzyka kolejnej utraty płodu (145).

U zdrowej kobiety obecność aPL wiąże się z ok. 16 procentowym ryzykiem poronienia (146), natomiast u kobiety z APS prawdopodobieństwo wystąpienia poronienia wynosi



ok. 30% i znacząco wzrasta (do ok. 70%) w przypadku wcześniejszych niepowodzeń położniczych (147).

Kobiety z obecnymi aPL mają także większe ryzyko zakrzepicy żył głębokich w ciąży i porożu.

U podłoża niepowodzeń położniczych w APS leży najpewniej zakrzepica naczyń spiralnych łożyska, co prowadzi do upośledzenia krążenia płodowego, z następowym niedotlenieniem i obumarciem płodu (148).

Ponadto aPL mogą wypierać aneksynę V z jej połączeń z fosfatydyloseryną w błonach komórkowych syncytiotrofoblastu kosmków łożyskowych, co doprowadza do odsłonięcia fosfolipidów i ich interakcji z aPL i następową zakrzepicą w ich obrębie (149).

### **2.6.2.3 Kliniczne i laboratoryjne cechy związane z APS niewiązane do kryteriów diagnostycznych**

Istnieją pewne objawy kliniczne i wyniki laboratoryjne, które występują często w APS, ale nie są dla tego zespołu swoiste. Zaliczamy tu: patologię zastawek w sercu (pogrubienie i/lub wypadanie płatków, wegetacje), siność siatkowatą (*livedo reticularis*), objaw Raynauda, schorzenia ośrodkowego układu nerwowego (m.in. padaczka, migrena, depresja, zaburzenia funkcji poznawczych), małopłytkowość (<100 tys./ul), niedokrwistość hemolityczną z dodatnim odczynem Coombsa, nefropatię, oraz w zakresie badań laboratoryjnych obecność: przeciwciał antyfosfolipidowych w klasie IgA, przeciwciał przeciwko fosfatydyloserynie, protrombinie oraz kompleksowi fosfatydyloseryna- protrombina. Znaczenie kliniczne tych oznaczeń nie zostało dotąd ustalone (23). Obecność w/w cech klinicznych i laboratoryjnych, choć nie mają one charakteru kryteriów diagnostycznych, powinna być odnotowana.

### 3. Polimorfizm glikoprotein płytek krwi ( GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2) a występowanie epizodów zakrzepowo-zatorowych

Kompleks glikoprotein (GP) IIb/IIIa należy do rodziny adhezyjnych receptorów integrynowych (integryna  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) płytek krwi. Kluczową rolą tego kompleksu jest udział w procesach adhezji, agregacji i retrakcji skrzepu fibrynowego poprzez wiązanie białek adhezyjnych. Po aktywacji płytek krwi dochodzi do zmiany konformacji glikoproteiny i przyłączenia fibrynogenu, głównego ligandu GP IIb/IIIa. Efektem jest ich przyleganie i agregacja (150).

GP IIb/IIIa ma również zdolność wiązania innych ligandów: czynnika von Willebranda (vWF), trombospondyny, fibronektyny, czy witronektyny (151).

Gen kodujący glikoproteinę IIIa znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 17 w pozycji 17q21.32. Wśród polimorfizmów pretendujących do roli genetycznych czynników wpływających na odpowiedź płytek krwi na czynniki aktywujące wyróżnia się polimorfizm genu integryny  $\beta$ 3 (PIA1/PIA2). Polega on na zamianie tymidyny na cytozynę w pozycji 1565, co powoduje substytucję leucyny w pozycji 33  $\beta$ 3 integryny (PIA1) na prolinę (PIA2) (152).

Polimorfizm PIA1/PIA2 występuje u 20–30% zdrowych osób rasy białej (153), wydaje się, że nieco częściej u osób z zaawansowaną chorobą wieńcową (154).

Znane są liczne doniesienia oceniające znaczenie polimorfizmu PIA1/PIA2 na ryzyko wystąpienia epizodów zakrzepowo-zatorowych i jego wpływ na odpowiedź na leczenie lekami przeciwplatekowymi (155, 156, 157).

Polimorfizm ten miałby też wiązać się z zakrzepicą tętniczą w zespole antyfosfolipidowym (158).

**GP Ia/IIa** (integryna  $\alpha$ 2 $\beta$ 1; VLA-2) występuje na błonie komórkowej płytki krwi i pełni funkcję receptora dla kolagenu I-IV. Jest odpowiedzialna za adhezję płytek do uszkodzonej ściany naczynia. W ostatnich latach sugerowano, iż polimorfizmy w obrębie genu GP Ia (np. C 807T i G 873A) wpływając na ekspresję GP Ia/IIa na powierzchni płytek, mogą sprzyjać występowaniu epizodów zakrzepicy tętniczej.

Przy obecności alleli 807T/873A ekspresja GP Ia/IIa na powierzchni płytek krwi jest wyższa, a w przypadku alleli 807C/873G niższa. Obecność jedynie allelu 807T

(homozygoty TT) może predysponować do zawału serca, a także udaru mózgu u młodych osób (159, 160).

Powyższe dane spowodowały zainteresowanie występowaniem polimorfizmów integryn  $\beta 3$  i  $\alpha 2$  u pacjentów z APS. Sugerowano, iż polimorfizm (807 C/T; homozygota TT) stanowi dodatkowy czynnik ryzyka zakrzepicy tętniczej (158).

#### **4. Polimorfizm $\beta 2$ –glikoproteiny I a występowanie epizodów zakrzepowo-zatorowych**

Polimorfizm genu kodującego  $\beta 2$ GPI (zamiana waliny na leucynę w pozycji 247) może wpływać na indukcję produkcji przeciwciał antyfosfolipidowych i potencjalnie wpływać na rozwój APS.

Wykazywano w APS związek występowania polimorfizmu tego genu (Val/Leu; homozygota VV) z epizodami zakrzepicy w obu łóżyskach naczyniowych (161).

#### **5. Założenia i cele pracy**

W przeszłości stosunkowo mało miejsca poświęcono poszukiwaniom czynników, które mogłyby decydować o lokalizacji zakrzepicy u osób z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych. Tymczasem poznanie tych czynników może poza charakterem poznawczym, mieć także olbrzymie znaczenie kliniczne w prewencji i wtórnie- leczeniu chorych z APS.

Jeśli weźmie się pod uwagę, że przeważająca część epizodów zakrzepicy tętniczej obejmuje krążenie mózgowe i dotyczy ludzi młodych, określenie czynników determinujących wystąpienie niedokrwiennego udaru mózgu i demencji pozawałowej nabiera dodatkowej wagi.

We wstępie zasygnalizowano prace wskazujące na pojedyncze czynniki, które wydają się występować częściej u osób z APS i dominującą zakrzepicą tętniczą. Przypomnijmy, że obejmują one: wysoki poziom przeciwciał antykardiolipinowych (> 40 GPL), czy polimorfizm genu integryny  $\beta 3$ .

Ponieważ w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CMUJ obserwujemy od szeregu lat ponad stuosobową grupę chorych cierpiących na APS, podjęliśmy próbę szerokiej analizy czynników, które mogłyby charakteryzować tych, którzy przeżyli epizod

zakrzepicy tętniczej w porównaniu z innymi osobami z potwierdzonym APS, jednak bez zakrzepicy tętniczej.

Potencjalnym następstwem takiej analizy mogłyby być sugestie, co do sposobu pierwotnej i wtórnej prewencji, wykraczające poza ogólnie obowiązujące zalecenia.

## **Cele pracy:**

1. Określenie czynników determinujących ryzyko zakrzepicy tętniczej u pacjentów z APS, obejmujące:
  - a. analizę kryteriów laboratoryjnych APS u chorych z przebytą zakrzepicą tętniczą w porównaniu z pozostałymi pacjentami chorymi na APS.
  - b. zbadanie ewentualnego wpływu genetycznych polimorfizmów glikoprotein płytek krwi (polimorfizm GP Ia/IIa 807 C/T i polimorfizm GP IIb/IIIa PIA1/2) oraz polimorfizmu genu kodującego  $\beta 2$  –glikoproteinę I na ryzyko zakrzepicy tętniczej u pacjentów z APS.
  - c. określenie roli klasycznych czynników ryzyka epizodów sercowo-naczyniowych u badanych chorych.

## **6. Badani**

### **6.1 Kryteria włączenia do badania**

Grupę badaną stanowiły osoby z rozpoznaniem zespołem antyfosfolipidowym, zgodnie z obowiązującymi kryteriami, będące w ciągu ostatnich 5 lat pod opieką Kliniki Alergii i Immunologii CMUJ w Krakowie.

Kryterium włączenia do grupy z zakrzepicą tętniczą, tj. udarem mózgu, przejściowym niedokrwieniem mózgu (TIA), zawałem serca, czy zakrzepicą tętniczą w pozostałym łożysku naczyniowym, było potwierdzenie takiego epizodu obiektywnymi badaniami.

Kryterium włączenia do grupy osób z zakrzepicą żylną było potwierdzenie obiektywnymi metodami przebytego epizodu zakrzepowo-zatorowego.

Przyjęto następujące kryteria wykluczające z badania:

- migotanie przedsionków
- brak świadomej zgody na udział w badaniu

- niestosowanie się do zaleceń lekarskich przez pacjenta, m.in. nieregularne stosowanie leków przeciwzakrzepowych i przeciwplatekcyjnych

## **6.2 Grupa badana**

Do badania zakwalifikowano 163 osoby, które spełniały aktualne kryteria diagnostyczne APS (23), w tym 123 kobiety i 40 mężczyzn w wieku od 21 do 75 lat. Z całej grupy pacjentów z APS wyodrębniono 78 osób z przebyłym co najmniej jednym epizodem zakrzepicy tętniczej. Część pacjentów miała kilka różnych epizodów zakrzepicy tętniczej lub równocześnie powikłania zakrzepowe dotyczące obu łożysk naczyniowych w przebiegu APS.

## **6.3 Grupa kontrolna**

Grupę kontrolną dla pacjentów z przebyłą zakrzepicą tętniczą stanowiły osoby z APS, które miały inną kliniczną manifestację tego zespołu, tzn. zakrzepicę żylną i/lub powikłania położnicze. Zakwalifikowano do tej grupy 85 osób, przy czym kobiet było w niej 70, a mężczyzn tylko 15.

Dla kontroli niektórych oznaczeń wykorzystano 100-osobową grupę zdrowych osób, dobranych pod względem płci i wieku. Grupa kontrolna służyła standaryzacji oznaczeń przeciwciał przeciwfosfolipidowych i innych koniecznych oznaczeń laboratoryjnych.

Każda osoba, zarówno z grupy chorych, jak i zdrowych, podpisywała świadomą zgodę na udział w badaniu klinicznym, zatwierdzoną przez Komisję Bioetyczną UJ.

# **7. Metody**

## **7.1 Wywiad ankietowy**

Dla uzyskania pełnych informacji klinicznych, niezbędnych do zakwalifikowania pacjentów do odpowiedniej grupy badanej, przeprowadzono dokładny wywiad ankietowy dotyczący objawów choroby podstawowej, przebytych epizodów zakrzepowo-zatorowych, znanych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i zakrzepicy żyłnej, w tym obciążenia rodzinnego tymi schorzeniami. W szeregu przypadkach uwzględniono wyniki koniecznych badań laboratoryjnych dostarczonych

przez pacjenta, mających charakter kryteriów klasyfikacyjnych SLE wg ACR (162), a u wszystkich wyniki obiektywnych badań potwierdzających przebyty epizod zakrzepowozatorowy (formularz ankiety-patrz załącznik nr 1).

## 7.2 Badania dodatkowe

Kryterium rozpoznania zakrzepicy był dodatni wywiad ankietowy poparty obiektywnymi badaniami dodatkowymi:

-w przypadku zakrzepicy tętniczej- USG tętnic, angiografia tętnicza lub:

- w przypadku udaru mózgu lub TIA- charakterystyczne zmiany w obrazie tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego
- w przypadku zawału serca- charakterystyczne zmiany w badaniach laboratoryjnych i w zapisie EKG

-w przypadku zakrzepicy żyłnej i zatorowości płucnej- USG żył, angiografia tętnic płucnych metodą wielowarstwowej tomografii komputerowej.

## 7.3 Rutynowe diagnostyczne oznaczenia laboratoryjne

Do zaplanowanych badań laboratoryjnych pobierano krew żylną:

- surowica- krew pobierano do próbki bez antykoagulantu, a następnie po 2h wirowano zgodnie z rutynową procedurą
- osocze- krew żylną mieszano z 3,8% cytrynianem sodu w stosunku 9:1, a następnie wirowano zgodnie z rutynową procedurą
- surowica lub osocze były używane do badań od razu, zgodnie ze szczególnymi wymogami metody, lub przechowywane w temperaturze -80°C

Wykonano następujące oznaczenia:

- podstawowe parametry krwi obwodowej: morfologia krwi, lipidogram, stężenie kreatyniny, glukozy, elektrolitów
- stężenie białka C-reaktywnego (CRP)
- stężenie składowej C3 dopełniacza
- stężenie składowej C4 dopełniacza
- przeciwciała przeciwjądrowe (ANA)- metodą immunofluorescencji pośredniej z użyciem komórek Hep-2, immunodyfuzji oraz immunoblotu (metoda Western-

Blot) oznaczono miana, typy świecenia oraz rodzaj ANA. Za wynik dodatni przyjęto obecność przeciwciał w mianie  $> 1: 160$ . Wyróżnione typy świecenia i rodzaje ANA-patrz załącznik nr 2.

- przeciwciała antykardiolipinowe w klasie IgG i IgM - metodą immunoenzymatyczną (ELISA), opisaną przez Harrisa w 1985r, po wprowadzeniu modyfikacji własnych –własnoręczne przygotowanie mikroplątki ELISA (*home-made ELISA*); standard własny-surowica pacjenta o wysokim mianie przeciwciał aCL IgG i IgM (13, 163)
- przeciwciała przeciwko  $\beta 2$  –glikoproteinie I w klasie IgG i IgM – metodą immunoenzymatyczną (ELISA), opisaną przez Arvieux, w modyfikacji własnej –własnoręczne przygotowanie mikroplątki ELISA (*home-made ELISA*); standard własny-surowica pacjenta o wysokim mianie przeciwciał anty  $\beta 2$ GPI IgG i IgM (164)
- antykoagulant toczniowy –według trójetapowej procedury zalecanej przez ISTH (165)
- obecność polimorfizmu glikoprotein płytek krwi: GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2- metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR)
- obecność polimorfizmu walina/leucyna w pozycji 247  $\beta 2$  –glikoproteiny I- metoda PCR

## 7.4 Szczegółowy opis metod oznaczania przeciwciał antyfosfolipidowych

### 7.4.1 Oznaczanie antykoagulantu toczniowego (LA)

Materiałem do badania LA jest ubogopłytkowe osocze cytrynianowe (liczba płytek powinna być niższa niż  $1 \times 10^{10}/l$ ), uzyskiwane metodą podwójnego wirowania (2000 g przez 15 min., następnie  $>2500$  g przez 10 min.).

#### I etap- test przesiewowy

Wykazanie przedłużenia co najmniej jednego czasu krzepnięcia zależnego od fosfolipidów nakazuje przejść do etapu II.

Stosowane testy przesiewowe:

- **APTT-** (*ang. activated partial thromboplastin time* – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji)- Pathromtin SL, Dade Behring; norma: 28-40 s.

- **dRVVT**-(ang. *Dilute Russell's viper venom time*- czas aktywacji krzepnięcia jadem żmii Russela) ; DVV test, American Diagnostica; norma 34-46 s.
- **PT**- czas protrombinowy- Thromborel S, Dade Behring; norma 0,85-1,15 INR
- **PTTTLA**- czas kaolinowo-kefalinowy o wysokiej wrażliwości na LA (Diagnostica Stago; zakres wartości prawidłowych: 24-46 s)

## **II etap- testy mieszania osocza badanego i osocza kontrolnego**

Badane osocze mieszano z osoczem kontrolnym w stosunku 1:1 i wykonywano te same testy co w pierwszym etapie badania.

O obecności LA świadczy brak korekcji przedłużonego czasu krzepnięcia po dodaniu osocza kontrolnego.

## **III etap- testy potwierdzające**

W celu potwierdzenia obecności LA zastosowano następujące testy potwierdzające:

- **Staclot LA**, czas neutralizacji fosfolipidami płytek krwi w formie heksagonalnej (Staclot LA, Diagnostica Stago, Francja); skrócenie czasu poniżej 5 s - wynik ujemny; 5-8 s - wynik wątpliwy, powyżej 8 s - wynik dodatni
- **dRVVT confirm**, test normalizacji czasu DVV po dodaniu nadmiaru fosfolipidów (DVV confirm, American Diagnostica, USA). Wynik przedstawia się jako stosunek testu przesiewowego (DVV test) do testu potwierdzającego; norma: poniżej 1,3.

Oznaczenia wykonywano na analizatorze Behring Coagulation Timer (BCT, Dade Behring, Niemcy) oraz na aparacie Fibrintimer (Dade Behring, Niemcy).

Wszystkie testy wykonywano zgodnie z zaleceniami producentów.

Wyniki badania określano jako dodatnie, ujemne lub wątpliwe. Prawidłowo nie stwierdza się antykoagulantu toczniowego.

### **7.4.2 Oznaczanie przeciwciał antykardiolipinowych**

Mikropłytki ELISA o średniej sile wiązania (PoliSorb, NUNC, BioKOM) opłaszczano 30 µl/studzienkę bydłcej kardiolipiny (Sigma) w roztworze 96 % etanolu o stężeniu 50 µg/ml i pozostawiano w temperaturze 4°C na 18 godzin. W tym czasie



etanol odparowywał a kardiolipina opłaszczala płytkę. Następnie płytki płukano trzykrotnie buforem fosforanowym (PBS) o pH 7,4 i blokowano przez dodanie po 150µl/studzienkę 1% albuminy wołowej (BSA, Sigma) rozpuszczonej w PBS i pozostawiano pod przykryciem przez 90 minut w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym wypłukaniu płytki roztworem PBS, nakładano po 100 µl/ studzienkę surowicy badanej, rozcieńczonej w stosunku 1:50 w 10% roztworze surowicy wołowej (NBCS- *new born calf serum*, Gibco Life Technologies, Nowa Zelandia) i inkubowano pod przykryciem w temperaturze pokojowej przez 150 minut. Po kolejnym płukaniu płytek roztworem PBS do studzienek nakładano po 100 µl kozich przeciwciał przeciwko ludzkim immunoglobulinom G lub M sprzężonych z peroksydazą chrzanową (Goat F(ab`)<sup>2</sup> Anti Human IgG, HRP; Goat F(ab`)<sup>2</sup> Anti Human IgM, HRP; BIOSOURCE, USA) i pozostawiano pod przykryciem na kolejne 90 minut. Po ostatnim płukaniu płytki dodawano po 100 µl/ dołek roztworu o-fenylendiaminy (OPD, Sigma, USA) z nadtlenkiem wodoru (Sigma, USA) w buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 5,0. Reakcję barwną hamowano 2 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, w ilości 50 µl/studzienkę (przez 15 minut), gdy gęstość optyczna najwyższego punktu krzywej standardowej wynosiła od 1,2 do 0,9. Absorbancję mierzono na czytniku ELx808 (BIOKOM, USA) przy długości fali 492 nm. Do wyznaczenia punktu odcięcia wartości dodatnich wykorzystano wartość 99 percentyla obliczonego dla próby populacyjnej liczącej 100 osób.

Wynik podano w zalecanych jednostkach GPL dla aCL IgG i MPL dla aCL IgM, gdzie 1 jednostka odpowiadała aktywności wiązania 1µg/ml kardiolipiny do oczyszczonych aCL uzyskanych z referencyjnej surowicy.

Uzyskane wyniki podano w następujących normach (patrz Tab. 4):

**Tabela 4. Zakres norm dla przeciwciał antykardiolipinowych (aCL) klasy IgG i IgM**

	<b>aPL IgG (GPL)</b>	<b>aPL IgM (MPL)</b>
Wynik ujemny	do 10	do 20
Wynik słabo dodatni (wątpliwy)	10-20	20-40
Wynik dodatni	powyżej 20	powyżej 40

### 7.4.3 Oznaczanie przeciwciał przeciwko $\beta$ 2-glikoproteinie I

Mikro płytki ELISA o dużej sile wiązania (MaxiSorp, NUNC, Dania) opłaszczano 50  $\mu$ l/dolek ludzką  $\beta$ 2GPI (Diagnostica Stago, Francja) o stężeniu 10  $\mu$ g/ml w buforze TBS o pH 7,4 i pozostawiano pod przykryciem na około 18 godzin w temperaturze 4°C. Następnie płytki płukano dwukrotnie buforem TBS i blokowano 0,1% roztworem żelatyny (Sigma, USA) w TBS po 150  $\mu$ l/ dołek i pozostawiano pod przykryciem na 60 minut w temperaturze 37°C. Po trzykrotnym wypłukaniu płytki roztworem TBS z 0,1% Tweenem, dodawano po 50  $\mu$ l/ dołek badanej surowicy, rozcieńczonej w stosunku 1:50 w 0,1% roztworze żelatyny w TBS z 0,1% Tweenem i inkubowano przez 60 minut w 37°C pod przykryciem. Po kolejnym płukaniu płytek roztworem TBS/Tween nakładano po 50  $\mu$ l/ dołek kozich przeciwciał przeciwko ludzkim immunoglobulinom IgG i IgM sprzężonych z peroksydazą chrzanową, odpowiednio w rozcieńczeniu 1:5000 i 1:3000, (Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti Human IgG, HRP; Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti Human IgM, HRP; BIOSOURCE, USA) i pozostawiano pod przykryciem na kolejne 60 minut w temperaturze 37°C. Po ostatnim cyklu płukania płytki, dodawano po 100  $\mu$ l/ dołek roztworu o-fenylendiaminy (OPD, Sigma, USA) z nadtlenkiem wodoru (Sigma, USA) w buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 5,0. Reakcję barwną hamowano 2 mol/l kwasem siarkowym 50  $\mu$ l/dolek (przez 15 minut). Absorbancję mierzono na czytniku Elx 808 (BIOKOM, USA) przy długości fali 492 nm.

Do wyznaczenia krzywej standardowej dla przeciwciał klasy IgG i IgM użyto standardu własnego (surowica pacjenta o wysokim mianie przeciwciał w klasie IgG lub IgM). Surowice rozcieńczano od 1:50 do 1:6400, a przy wykreślaniu krzywej standardowej użyto modelu czteroparametrowego. Do wyznaczenia punktu odcięcia wartości dodatnich wykorzystano wartość 99 percentyla obliczonego dla próby populacyjnej liczącej 100 osób. W związku z tym, że podczas każdorazowego oznaczania miana tych przeciwciał wyznaczano wartość 99 percentyla, którego wartość różniła się pomiędzy poszczególnymi partiami oznaczeń, nie można określić konkretnych wartości liczbowych dla całej grupy. Wyniki uznawano za dodatnie lub ujemne w zależności od wartości tego 99 percentyla dla poszczególnych partii oznaczeń.

## **7.5 Oznaczanie polimorfizmu glikoprotein płytek krwi ( GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2)**

Badania molekularne przeprowadzono na genomowym DNA uzyskanym z leukocytów krwi obwodowej. Izolację DNA przeprowadzono metodą wysalania z użyciem DNA-zolu (Invitrogen).

### **Oznaczanie polimorfizmu GP Ia/IIa 807 C/T**

Polimorfizm C807T płytkowej glikoproteiny Ia oceniono za pomocą metody PCR w niewielkiej modyfikacji własnej i trawienia enzymem restrykcyjnym Taq I (Fermentas) (158, 166).

Produkty PCR wraz z kontrolą negatywną oceniano, przeprowadzając elektroforezę na 2-procentowym żelu agarozowym.

Uzyskiwano następujące wyniki polimorfizmu GP Ia/IIa 807 C/T:

- Homozygota CC (wariant prawidłowy)
- Heterozygota CT
- Homozygota TT

### **Oznaczanie polimorfizmu GP IIb/IIIa PIA1/2**

Polimorfizm PIA1/2 płytkowej glikoproteiny IIb/IIIa oceniono za pomocą metody PCR w niewielkiej modyfikacji własnej i trawienia enzymem restrykcyjnym MspI (Fermentas) (158, 167).

Produkty PCR wraz z kontrolą negatywną oceniano, przeprowadzając elektroforezę na 2-procentowym żelu agarozowym.

Uzyskiwano następujące wyniki polimorfizmu GP IIb/IIIa PIA1/2:

- A1/A1- homozygota (wariant prawidłowy)
- A1/A2- heterozygota
- A2/A2- homozygota

## 7.6 Oznaczanie polimorfizmu $\beta 2$ –glikoproteiny I (Val/Leu<sup>247</sup>)

Polimorfizm genu  $\beta 2$  –glikoproteiny I -Val/Leu<sup>247</sup>, polimorfizm jednego nukleotydu (SNP), był oznaczany za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy. Fragmenty DNA były trawione przez endonukleazę RsaI (Sigma), a ich produkty wraz z kontrolą negatywną oceniano za pomocą elektroforezy (168, 169).

Uzyskano następujące wyniki polimorfizmu genu dla  $\beta 2$ GPI -Val/Leu<sup>247</sup>:

- Val/Val- homozygota (wariant prawidłowy)
- Val/Leu- heterozygota
- Leu/Leu –homozygota

## 8. STATYSTYCZNA ANALIZA WYNIKÓW

Uzyskane dane kliniczne i laboratoryjne wprowadzono do arkusza kalkulacyjnego Excel (Microsoft, USA). Do analizy statystycznej danych oraz wykonania testów parametrycznych i nieparametrycznych wykorzystano program Statistica (Statsoft, USA).

W pracy zastosowano metody dla tablic czteropolowych (*fourfold tables*):

- test  $\chi^2$

- test dokładny Fishera (dwustronny)

- gdy pojawiły się istotne różnice dodatkowo wyznaczano iloraz szans OR (*odds ratio*) i 95% przedział ufności dla OR (95% CI ; *confidence interval using the approximation of Woolf*). Jeśli 95% przedział ufności nie zawierał 1, to porównywane grupy różniły się między sobą częstością występowania badanego czynnika. Z uwagi na typ eksperymentu (*retrospective case-control studies*) do porównania częstości

występowania cechy dychotomicznej w 2 grupach użyto ilorazu szans 
$$OR = \frac{\frac{p_1}{1-p_1}}{\frac{p_2}{1-p_2}}$$
 a nie różnicy  $p_1-p_2$ , gdzie  $p_i$  oznacza prawdopodobieństwo (estymowane częstością) występowania badanej cechy w  $i$ -tej grupie.

Dla porównania średnich poziomów zmiennych ilościowych w 2 grupach zastosowano test t- Studenta (wariant dla problemu Behrensa Fishera). Niezbędna była transformacja symetryzująca prawostronnie skośne rozkłady. Zastosowano również nieparametryczny

odpowiednik testu t- Studenta czyli test U-Manna Whitneya oparty na rangach a nie na bezpośrednich danych.

We wszystkich rozpatrywanych testach różnice uznawano za znamienne dla poziomu istotności  $p < 0,05$ .

W przypadku określania zależności wystąpienia badanego parametru od kilku objawów klinicznych przeprowadzono wieloczynnikową analizę regresji stosując uogólniony model liniowy dla dychotomicznej odpowiedzi (wariant-model logitowy).

## **9. WYNIKI**

### **9.1 Charakterystyka grup badanych**

#### **9.1.1 Grupa osób zdrowych (grupa kontrolna)**

Grupę tę stanowiło 147 osób: 107 kobiet w wieku od 20 do 81 lat i 40 mężczyzn w wieku od 20 do 82 lat; dobranych pod względem płci i wieku do grupy chorych z zespołem antyfosfolipidowym. Ich surowicę wykorzystano do standaryzacji metod oznaczania aPL, przeciwciał przeciwko  $\beta 2$ GPI oraz jako grupę porównawczą do oznaczeń genetycznych.

#### **9.1.2 Ogólna charakterystyka grupy chorych**

W analizie uwzględniono 163 osoby z APS, w tym 123 kobiety i 40 mężczyzn w wieku od 21 do 75 lat. Badanych chorych podzielono na dwie grupy: z przebyciem co najmniej jednym epizodem zakrzepicy tętniczej i bez zakrzepicy tętniczej (patrz Tabela 5). Wśród badanej grupy 35 osób miało izolowany zespół antyfosfolipidowy (PAPS), a u 42 osób APS współistniał z jedną z chorób autoimmunologicznych (SAPS), najczęściej z SLE.

**Tabela 5. Ogólna charakterystyka grupy chorych**

	<b>APS z zakrzepicą tętniczą</b> <b>N:78/163</b>	<b>APS bez zakrzepicy tętniczej</b> <b>N:85/163</b>
Kobiety; liczba osób (%) N:123	53 (67,9)	70 (82,4)
Mężczyźni; liczba osób (%) N:40	25 (32,1)	15 (17,6)
Przedział wieku; średnia wieku Ogółem: Mężczyźni: Kobiety:	(25-72) 45,9 (25-72) 46,12 (25-70) 45,83	(21-75) 41,6 (21-52) 36,06 (21-75) 42,77
PAPS; liczba osób (%)	35 (63,6%)	20 (36,4%)
SAPS; liczba osób (%)	42 (39,3%)	65 (60,7%)

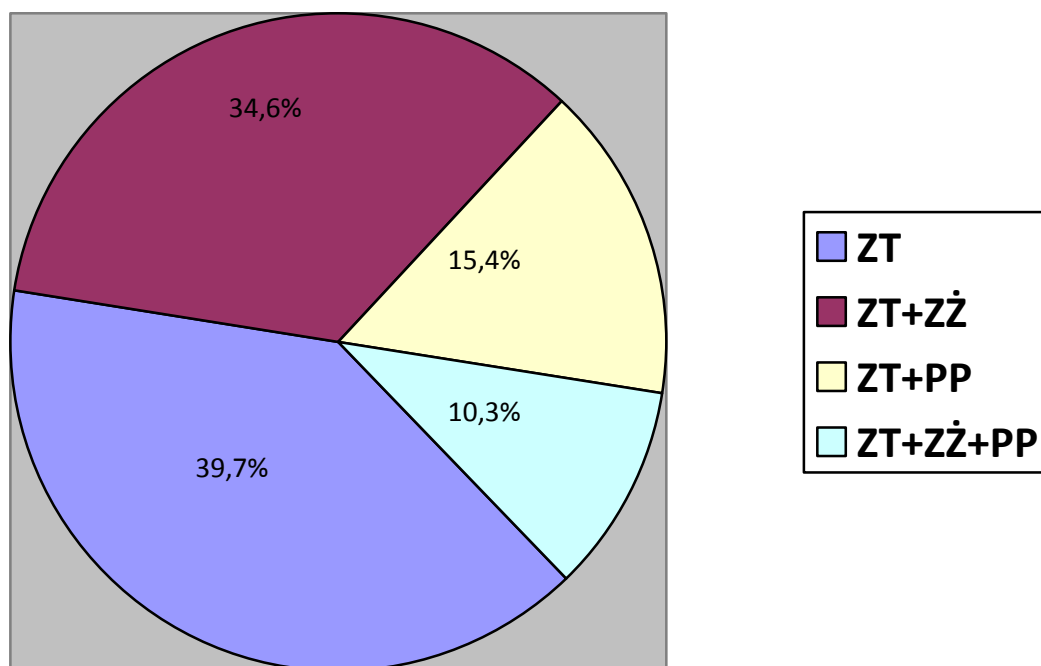
### **9.1.3 Grupa pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym i przebytą zakrzepicą tętniczą**

Grupę tę stanowiło 78 osób: 53 kobiety w wieku od 25 do 70 lat i 25 mężczyzn w wieku od 25 do 72 lat. Kryterium włączenia do grupy było spełnienie warunków rozpoznania APS oraz przebycia minimum jednego epizodu zakrzepicy tętniczej, potwierdzonego wynikami obiektywnych badań.

W grupie tej znalazło się 31 osób, które miało manifestację APS tylko pod postacią zakrzepicy tętniczej (jeden lub więcej epizodów), a w pozostałych przypadkach współwystępowała ona z innymi manifestacjami APS (patrz Tabela 6 i Ryc. 3).

**Tabela 6. Liczebność w poszczególnych podgrupach chorych z APS i zakrzepicą tętniczą**

	<b>Liczba osób</b>
N (kobiety/mężczyźni)	78 (53/25)
Zakrzepica tętnicza	31
Zakrzepica tętnicza i żylna	27
Zakrzepica tętnicza i powikłania położnicze	12
Zakrzepica tętnicza, żylna i powikłania położnicze	8



**Rysunek 3. Rozkład procentowy osób z APS i zakrzepicą tętniczą (ZT) oraz współwystępującą zakrzepicą żylną (ZZ) i powikłaniami położniczymi (PP)**

W tej grupie zakrzepica tętnicza manifestowała się najczęściej jako niedokrwienne epizody w OUN. U 5 chorych zakwalifikowanych do tej grupy stwierdzono rzadszą lokalizację zakrzepicy tętniczej, tj. zawał śledziony, zakrzepicę tętnic kończyn i tętnic nerkowych; a u 3 chorych współwystępowały one z udarem mózgu, TIA oraz zawałem serca.

Wśród grupy badanej zanotowano łącznie 123 epizody zakrzepicy tętniczej. Najczęściej była to, jak już wcześniej wspomniano zakrzepica OUN (udar mózgu i TIA), rzadziej zawał serca, czy zakrzepica dotycząca pozostałej części łożyska naczyniowego (patrz Tab. 7).

**Tabela 7. Rodzaj i liczba epizodów zakrzepicy tętniczej w grupie badanej**

	<b>Ilość osób</b>	<b>Ilość epizodów</b>
<b>Udar mózgu</b>	51	65
<b>TIA</b>	8	22
<b>Zawał serca</b>	16	19
<b>Zakrzepica tętnic kończyn</b>	4	4
<b>Zawał śledziony</b>	1	1
<b>Zakrzepica tętnic nerkowych</b>	3	3

W grupie z zakrzepicą tętniczą u 35 osób rozpoznano APS bez innej towarzyszącej choroby autoimmunologicznej (PAPS), a u 42 osób występował on łącznie z jedną z chorób autoimmunologicznych (SAPS), najczęściej z SLE (34 przypadki).

Zakrzepicę tętniczą obserwowaliśmy aż w 63,6% przypadkach zdiagnozowanych jako PAPS. W SAPS procent ten wynosił 39,3. Młodzi chorzy po przebytych epizodzie niedokrwienia OUN oraz rzadziej zawale serca, są często kierowani do naszego ośrodka celem diagnostyki w kierunku APS. Stąd też, to właśnie udar mózgu lub TIA w grupie PAPS występował częściej niż w grupie SAPS (54,5% v 24,3%).

#### **9.1.4 Grupa pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym bez przebytej zakrzepicy tętniczej**

Grupę tę stanowiło 85 osób: 70 kobiet w wieku od 21 do 75 lat i 15 mężczyzn w wieku od 21 do 52 lat.

W tej grupie znalazły się osoby z zespołem antyfosfolipidowym, które przebyły zakrzepicę żylną i/lub miały niepowodzenia położnicze. Odnotowano 94 epizody zakrzepicy żylniej u 67 osób. Najczęściej występowała zakrzepica żył głębokich kończyn dolnych, rzadziej zatorowość płucna, pozostałą ilość powikłań żylnych stanowiła zakrzepica żył kończyn górnych i żyły głównej dolnej (patrz Tabela 8). W 19 przypadkach wystąpił więcej niż 1 epizod zakrzepicy żylniej (maksymalnie 6 epizodów).



36 kobiet w tej grupie miało powikłania położnicze, a u 18 kobiet występowała również zakrzepica żylna.

U 65 osób APS współistniał z jedną z chorób autoimmunologicznych, najczęściej z SLE (53 przypadki) a u 20 osób występował jako postać pierwotna.

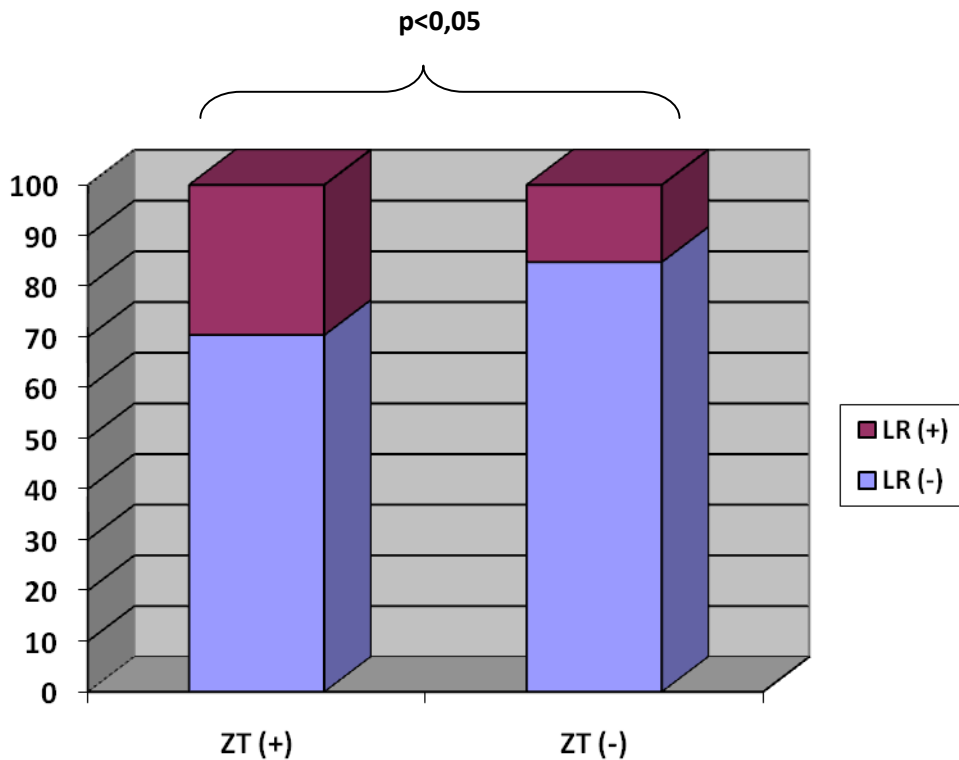
**Tabela 8. Rodzaj i liczba epizodów zakrzepicy żyłnej w grupie badanej**

	Ilość osób	Ilość epizodów
<b>Zakrzepica żył głębokich</b>	57	76
<b>Zatorowość płucna</b>	14	16
<b>Zakrzepica żył kończyn górnych</b>	1	1
<b>Zakrzepica żyły głównej dolnej</b>	1	1

## **9.2 Zależność występowania objawów związanych z APS w grupie z zakrzepicą tętniczną**

Wśród badanych uwzględniono również objawy APS, nie mieszczące się w kryteriach rozpoznania tego zespołu, lecz często u chorych na APS występujące, tj. siność siatkowatą (*livedo reticularis*), objaw Raynauda oraz małopłytkowość (< 100 tys./ $\mu$ l).

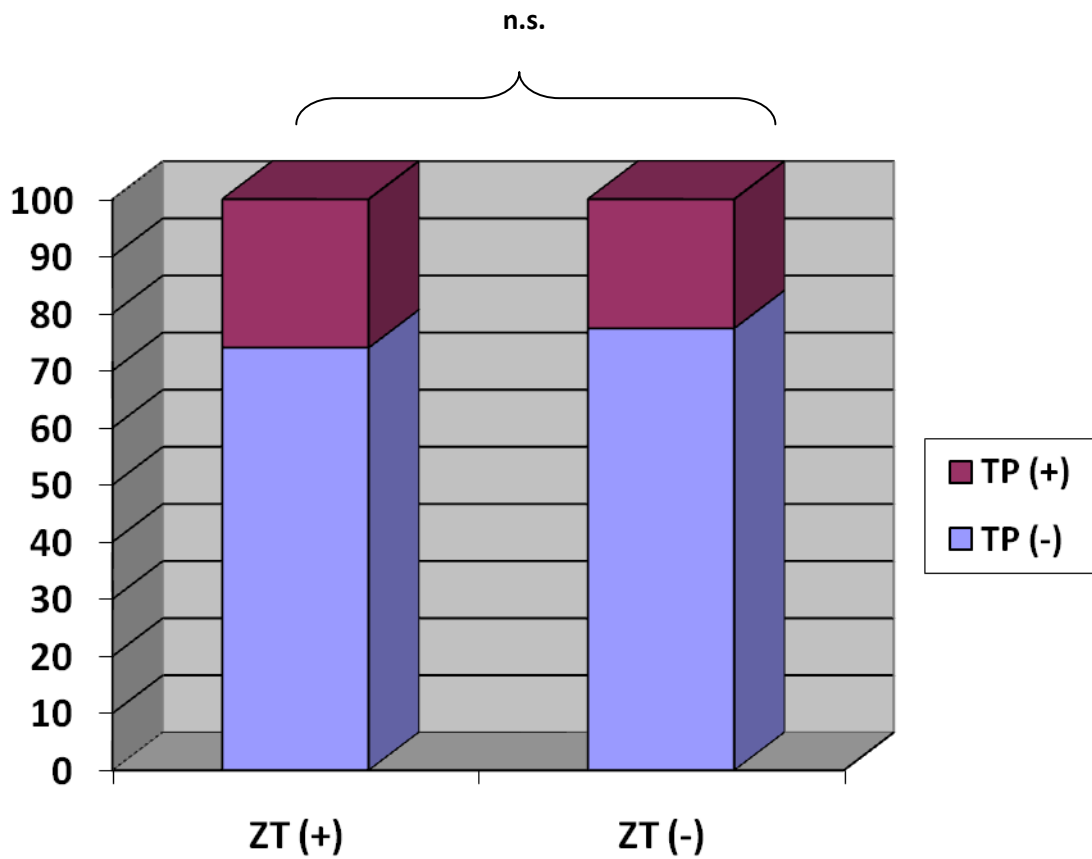
Co ciekawe, **siność siatkowata (LR)** występowała częściej w grupie osób z zakrzepicą tętniczną (21 osób; 29,6 %), niż bez niej (12 osób; 15,2 %) (**p=0,03; OR=2.3; 95% CI: 1.055 ÷ 5.211**) (Ryc. 4).



**Rysunek 4. Częstość występowania livedo reticularis (LR) wśród chorych z APS**

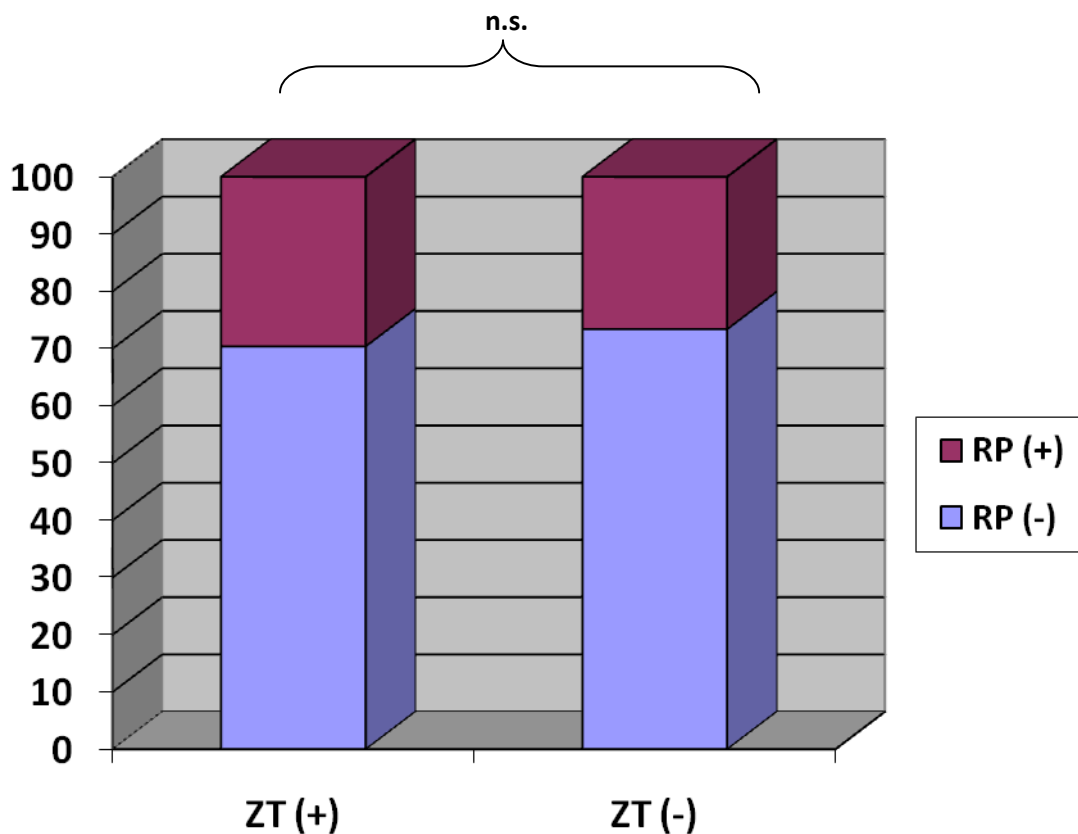
Zależność ta była szczególnie widoczna u osób z przebyłym udarem mózgu, gdzie szansa wystąpienia LR wynosiła aż 3,6 (95% CI: 1,2561  $\square$  0,461).

Umiarkowana małopłytkowość występowała u około  $\frac{1}{4}$  wszystkich chorych, podobnie często u chorych z, oraz bez zakrzepicy tętniczej (26% vs. 22,6%, ns) (Ryc. 5).



**Rysunek 5. Częstość występowania małopłytkowości (TP) wśród chorych z APS (test  $\chi^2$ ,  $p=0.6$ )**

Także **objaw Raynaud (RP)** występował równie często w obu grupach badanych (29,6 % v 26,6% ) (Ryc. 6).



Rysunek 6. Częstość występowania objawu Raynaud (RP) wśród chorych z APS (test  $\chi^2$ ,  $p=0.7$ )

### 9.3 Zależność występowania różnych typów przeciwciał przeciwfosfolipidowych u pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym i zakrzepicą tętniczą

W obu badanych grupach nie stwierdzono znamienych różnic w częstości występowania podwyższonych poziomów poszczególnych rodzajów przeciwciał antyfosfolipidowych i przeciwciał p/  $\beta 2$ GPI, poza zwiększoną częstością pojawiania się przeciwciał aCL klasy IgG w grupie osób z zakrzepicą tętniczą (test  $\chi^2$   $p=0.036$ ; **OR=2.032**; 95% CI: (1.042; 3.956) (patrz Tab. 9)

**Tabela 9. Zależność występowania różnych typów przeciwciał przeciwfosfolipidowych i p/  $\beta$ 2GPI u pacjentów w obu badanych grupach.**

	<b>APS + zakrzepica tętnicza</b>	<b>APS bez zakrzepicy tętnicznej</b>	<b>p</b>
	<b>liczba osób (%)</b>	<b>liczba osób (%)</b>	
<b>LA</b>	49 (62,8)	58 (69,9)	ns
<b>aCL IgG</b>	58 (74,4)	50 (58,8)	<b>p=0.036</b>
<b>aCL IgM</b>	27 (34,6)	28 (32,9)	ns
<b>a<math>\beta</math>2GPI IgG</b>	36 (46,2)	37 (43,5)	ns
<b>a<math>\beta</math>2GPI IgM</b>	44 (56,4)	38 (44,7)	ns
<b>LA+ aCL IgG lub/i a<math>\beta</math>2GPI IgG</b>	44 (56,4)	41 (49,4)	ns
<b>LA+ aCL IgG + a<math>\beta</math>2GPI IgG</b>	30 (38,5)	30 (36,1)	ns
<b>LA+ aCL IgM lub/i a<math>\beta</math>2GPI IgM</b>	33 (42,3)	30 (35,7)	ns
<b>LA+ aCL IgM + a<math>\beta</math>2GPI IgM</b>	17 (21,8)	12 (14,3)	ns

ns- różnica nieistotna statystycznie

Gdy z grupy pacjentów z APS wyosobniono grupę (20 osób), które miały w wywiadzie więcej niż 1 epizod zakrzepicy tętnicznej, zaobserwowano, iż częściej występowały u nich aCL IgM (**p=0,032, OR-2.75** 95% CI 1.063÷ 7.111) (patrz Tab. 10).

**Tabela 10. Zależność występowania różnych typów przeciwciał przeciwfosfolipidowych u pacjentów z więcej niż 1 epizodem zakrzepicy tętniczej**

	<b>zakrzepica tętnicza ≤1 epizod; n:143 liczba osób (%)</b>	<b>zakrzepica tętnicza &gt;1 epizod; n:20 liczba osób (%)</b>	<b>p</b>
<b>aCL IgG</b>	93 (65)	15 (75)	ns
<b>aCL IgM</b>	44 (30,8)	11 (55)	<b>p=0.03</b>
<b>aβ2GPI IgG</b>	64 (44,8)	9 (45)	ns
<b>aβ2GPI IgM</b>	69 (48,3)	13 (65)	ns
<b>LA</b>	93 (66)	14 (70)	ns
<b>LA+ aCL IgG + aβ2GPI IgG</b>	52 (36,9)	8 (40)	ns
<b>LA+ aCL IgG lub/i aβ2GPI IgG</b>	73 (51,8)	12 (60)	ns

W analizie uwzględniono również średnie poziomy aCL i aβ2GPI w klasie IgG i IgM. Również w tym przypadku nie zaobserwowano istotnej różnicy miana poszczególnych rodzajów przeciwciał (patrz Tab. 11).

**Tabela 11. Poziom analizowanych przeciwciał przeciwfosfolipidowych u badanych chorych**

	<b>APS + zakrzepica tętnicza śr. ±SD</b>	<b>APS bez zakrzepicy tętniczej śr. ±SD</b>	<b>p</b>
<b>aCL IgG (GPL)</b>	63,57±58,11	55,12±57,4	ns
<b>aCL IgM (MPL)</b>	44,73±65,67	40,86±46,65	ns
<b>aβ2GPI IgG (GPL)</b>	22,26±41,61	15,46±22,46	ns
<b>aβ2GPI IgM (MPL)</b>	24,46±35,81	24,33±52,5	ns

śr.- średnia

SD-odchylenie standardowe

Uwzględniając miana aCL i aβ2GPI w grupie osób, które miały w wywiadzie więcej niż 1 epizod zakrzepicy tętniczej, zaobserwowano tendencję w stronę wyższych mian aCL IgM. Różnica ta nie osiągnęła jednak poziomu istotności statystycznej (test U- Manna-Whitneya; p=0,09, a po transformacji logarytmicznej również testem t Studenta; p=0,094) (patrz Tab. 12).

**Tabela 12. Poziom analizowanych przeciwciał przeciwfosfolipidowych u pacjentów z APS z więcej niż 1 epizodem zakrzepicy tętniczej**

	<b>zakrzepica tętnicza ≤1 epizod; n:143 śr. ±SD</b>	<b>zakrzepica tętnicza &gt;1 epizod; n:20 śr. ±SD</b>	<b>p</b>
<b>aCL IgG (GPL)</b>	58,113±56,11	66,693±69,31	ns
<b>aCL IgM (MPL)</b>	38,644±43,64	71,798±109,0	ns
<b>aβ2GPI IgG (GPL)</b>	19,192±34,57	15,254±19,93	ns
<b>aβ2GPI IgM (MPL)</b>	24,795±47,03	21,519±29,01	ns

#### **9.4 Polimorfizm glikoprotein płytek krwi ( GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2) u pacjentów z zakrzepicą tętniczą**

Badanie polimorfizmu glikoprotein płytkowych wykonano u 131 osób z potwierdzonym zespołem antyfosfolipidowym, w tym u 59 osób z zakrzepicą tętniczą i 72 osób bez takiej zakrzepicy.

U pozostałych 19 osób w grupie z przebytą zakrzepicą tętniczą i u 13 osób bez tej zakrzepicy w wywiadzie, nie oznaczono polimorfizmów GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2 z różnych przyczyn: brak zgody na badania genetyczne, problemy z oznaczeniem z przyczyn technicznych, niedostępność materiału genetycznego- krew na badania genetyczne pobierano w ostatnim etapie pracy.

Nie zaobserwowano różnicy w częstości występowania zmutowanych genów glikoprotein płytkowych pomiędzy badanymi grupami (patrz Tab. 13 i Tab. 14). Wpływ mogła tu mieć liczebność osób, u których możliwe było wykonanie badań genetycznych.

### Polimorfizm GP Ia/IIa 807 C/T (ITGA2.C807T)

Tabela 13. Częstość występowania polimorfizmów GP Ia/IIa 807 C/T i allelu T wśród badanych chorych

	APS + zakrzepica tętnicza; n:59	APS bez zakrzepicy tętnicznej; n:72	p
<b>Homozygota CC (wariant prawidłowy) liczba osób (%)</b>	16 (27,1)	22 (30,5)	ns
<b>Heterozygota CT liczba osób (%)</b>	28 (47,5)	40 (55,6)	ns
<b>Homozygota TT liczba osób (%)</b>	15 (25,4)	10 (13,9)	ns
<b>Częstość allelu T (%)</b>	49,1	41,7	ns

### Polimorfizm GP IIb/IIIa PIA1/2 (ITGB3.Leu33Pro)

Tabela 14. Częstość występowania polimorfizmów GP IIb/IIIa PIA1/2 i allelu A2 wśród badanych chorych

	APS + zakrzepica tętnicza; n:59	APS bez zakrzepicy tętnicznej; n:72	p
<b>Homozygota A1/A1 (wariant prawidłowy) liczba osób (%)</b>	42 (71,2)	46 (63,8)	ns
<b>Heterozygota A1/A2 liczba osób (%)</b>	14 (23,7)	25 (34,7)	ns
<b>Homozygota A2/A2 liczba osób (%)</b>	3 (5,1)	1 (1,4)	ns
<b>Częstość allelu A2 (%)</b>	16,9	18,7	ns



## 9.5 Polimorfizm Val/Leu<sup>247</sup> $\beta$ 2 –glikoproteiny I (APOH.Val247Leu) u pacjentów z zakrzepicą tętniczą

Podobnie, jak w przypadku polimorfizmów glikoprotein płytkowych, także polimorfizm genu  $\beta$ 2 –glikoproteiny I oznaczono u nieco mniejszej liczby chorych (129 osób), u 57 osób z zakrzepicą tętniczą i 72 osób bez niej.

Również tutaj nie obserwowaliśmy różnic w częstości występowania zmutowanych alleli (patrz Tab. 15).

**Tabela 15. Częstość występowania polimorfizmu Val/Leu<sup>247</sup>  $\beta$ 2 –glikoproteiny I i allelu Leu wśród badanych chorych**

	APS + zakrzepica tętnicza; n:57	APS bez zakrzepicy tętnicznej; n:72	p
wariant prawidłowy (Val/Val) liczba osób (%)	33 (57,9)	49 (68,1)	ns
heterozygota (Val/Leu) liczba osób (%)	18 (31,6)	14 (19,4)	ns
homozygota (Leu/Leu) liczba osób (%)	6 (10,5)	9 (12,5)	ns
częstość allelu Leu (%)	26,2	22,2	ns

W analizie uwzględniono ponadto potencjalny związek dodatniego wyniku  $\beta$ 2GPI IgG i/lub IgM z występowaniem jednego z polimorfizmów Val/Leu<sup>247</sup>  $\beta$ 2 –glikoproteiny I w obu badanych grupach i także w tym przypadku nie obserwowano istotnej korelacji z występowaniem zakrzepicy tętnicznej (patrz Tab. 16).

**Tabela 16. Zależność występowania dodatniego wyniku  $\beta$ 2GPI IgG i/lub IgM z badanymi wariantami polimorfizmu Val/Leu<sup>247</sup>  $\beta$ 2 –glikoproteiny I**

	<b>APS + zakrzepica tętnicza liczba osób/ liczebność grupy (%)</b>	<b>APS bez zakrzepicy tętnicznej liczba osób/ liczebność grupy (%)</b>	<b>p</b>
<b><math>\beta</math>2GPI IgG i IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Val/Val)</b>	6/66 (9)	7/75 (9,3)	ns
<b><math>\beta</math>2GPI IgG i IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Val/Leu)</b>	4/66 (6)	1/75 (1,3)	ns
<b><math>\beta</math>2GPI IgG i IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Leu/Leu)</b>	1/66 (1,5)	1/75 (1,33)	ns
<b><math>\beta</math>2GPI IgG lub IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Val/Val)</b>	18/49 (36,7)	23/62 (37)	ns
<b><math>\beta</math>2GPI IgG lub IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Val/Leu)</b>	8/49 (16,3)	7/63 (11,1)	ns
<b><math>\beta</math>2GPI IgG lub IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Leu/Leu)</b>	2/49 (4)	3/63 (4,7)	ns
<b><math>\beta</math>2GPI IgG i IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Val/Leu lub Leu/Leu)</b>	5/66 (7,6)	2/75 (2,7)	ns
<b><math>\beta</math>2GPI IgG lub IgM + polimorfizm Val/Leu247 <math>\beta</math>2 GPI (Val/Leu lub Leu/Leu)</b>	10/49 (20,4)	10/63 (15,9)	ns

Na podstawie powyższej tabeli widać, iż niektóre podgrupy były bardzo nieliczne, stąd najpewniej wynikał brak istotności pomiędzy badanymi grupami.

### **9.6 Współwystępowanie polimorfizmów: Val/Leu247 $\beta$ 2 -GP I, GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/A2 u pacjentów z zakrzepicą tętniczą**

Sprawdzono też ewentualne jednoczesne występowanie polimorfizmu GP Ia/IIa 807 C/T (homozygota TT lub/i heterozygota CT, lub tylko homozygoty TT) i polimorfizmu GP IIb/IIIa (homozygota A2/A2 lub heterozygota A1/A2) wśród badanych chorych,

lecz nie znaleziono związku z częstszym występowaniem zakrzepicy tętniczej w grupie APS (patrz Tab. 17).

**Tabela 17. Zależność występowania kombinacji polimorfizmów GP Ia/IIa 807 C/T z polimorfizmem GP IIb/IIIa PIA1/A2 w badanej grupie**

	<b>APS + zakrzepica tętnicza; n:59</b>	<b>APS bez zakrzepicy tętniczej; n:72</b>	<b>p</b>
<b>Polimorfizm GP Ia/IIa 807 (CT lub TT) + polimorfizm GP IIb/IIIa (A1/A2 lub A2/A2 liczba osób (%))</b>	16 (27)	21 (29)	ns
<b>Polimorfizm GP Ia/IIa 807 (homozygota TT) + polimorfizm GP IIb/IIIa (A1/A2 lub A2/A2 liczba osób (%))</b>	5 (8,5)	5 (7)	ns

Przeanalizowano również związek współwystępowania wszystkich trzech badanych polimorfizmów lub któregośkolwiek z nich w badanej grupie, nie znajdując jednak związku z częstszym występowaniem zakrzepicy tętniczej (patrz Tab. 18). Grupa osób z współwystępowaniem wszystkich trzech polimorfizmów była jednakże bardzo nieliczna.

**Tabela 18. Zależność występowania polimorfizmów: Val/Leu<sup>247</sup> β2 –glikoproteiny I, GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/A2 pomiędzy badanymi grupami**

	<b>APS + zakrzepica tętnicza; n:59</b>	<b>APS bez zakrzepicy tętnicznej; n:72</b>	<b>p</b>
<b>Łączne występowanie wszystkich polimorfizmów:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ GP Ia/IIa 807 (CT lub TT)</li> <li>➤ GP IIb/IIIa (A1/A2 lub A2/A2)</li> <li>➤ Val/Leu<sup>247</sup> βGPI (Val/Leu lub Leu/Leu)</li> </ul> <b>liczba osób (%)</b>	3 (5)	3 (4)	ns
<b>Którykolwiek z polimorfizmów:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ GP Ia/IIa 807 (CT lub TT)</li> <li>➤ GP IIb/IIIa (A1/A2 lub A2/A2)</li> <li>➤ Val/Leu<sup>247</sup> βGPI (Val/Leu lub Leu/Leu)</li> </ul> <b>liczba osób (%)</b>	46 (78)	57 (79)	ns

Nie odnotowano również częstszego występowania małopłytkowości łącznie z którymkolwiek z wymienionych powyżej polimorfizmów w obu badanych grupach (patrz Tab. 19).

**Tabela 19. Zależność występowania małopłytkowości i polimorfizmów: Val/Leu<sup>247</sup> β2 –glikoproteiny I, GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/A2 pomiędzy badanymi grupami**

	APS + zakrzepica tętnicza; n:59	APS bez zakrzepicy tętnicznej; n:72	p
<b>Małopłytkowość i którykolwiek z polimorfizmów:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ GP Ia/IIa 807 (CT lub TT)</li> <li>➤ GP IIb/IIIa (A1/A2 lub A2/A2)</li> <li>➤ Val/Leu<sup>247</sup> βGPI (Val/Leu lub Leu/Leu)</li> </ul> <b>liczba osób (%)</b>	13 (16,05)	11 (16,18)	ns

### **9.7 Klasyczne czynniki ryzyka występowania zakrzepicy tętnicznej u pacjentów z APS**

W populacji ogólnej istnieją dobrze zdefiniowane i zweryfikowane („klasyczne”) czynniki ryzyka chorób sercowo- naczyniowych. Nie mogło zatem zabraknąć ich analizy w badanej populacji.

Uwzględniono obecność najistotniejszych czynników ryzyka, zarówno epizodów niedokrwiennych OUN, zawału serca i zakrzepicy tętnicznej w innej lokalizacji, jak i zakrzepicy żyłnej, które objęły:

#### **Czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego niepodlegające modyfikacji:**

- wiek (mężczyźni  $\geq 45$  rż, kobiety  $\geq 55$  rż)
- płeć męska
- wczesne (u mężczyzn  $< 55$  rż, u kobiet  $< 65$  rż) występowanie w rodzinie choroby niedokrwiennej serca lub chorób innych tętnic na podłożu miażdżycy
- wcześniej rozpoznana choroba niedokrwiennej serca lub choroba innych tętnic na podłożu miażdżycy

#### **Czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego podlegające modyfikacji:**

- palenie tytoniu (obecnie i w przeszłości)

- nadciśnienie tętnicze (ciśnienie skurczowe >140 mmHg, ciśnienie rozkurczowe > 90 mmHg)
- hipercholesterolemia (cholesterol całkowity >5,2 mmol/l, LDL>3,34 mmol/l, TG>2,26 mmol/l)
- cukrzyca typu 2

**Czynniki ryzyka zakrzepicy żyłnej:**

- ciąża i połóg
- żyłaki kończyn dolnych
- doustna antykoncepcja hormonalna
- długotrwałe unieruchomienie
- dodatni wywiad rodzinny w kierunku choroby zakrzepowo- zatorowej
- rozpoznanie nowotworu złośliwego
- urazy (zwłaszcza wielonarządowe lub złamania miednicy i kości długich kończyn dolnych)

Do szczegółowej analizy związków z występowaniem epizodów zakrzepicy tętniczej użyto najlepiej udokumentowanych i najsilniejszych czynników ryzyka i sprawdzono zarówno model jednoczynnikowy jak i wieloczynnikowy (patrz Tab. 20). Tam gdzie to możliwe zadbano o potwierdzenie czynnika ryzyka za pomocą wyników obiektywnych badań.

**Tabela 20. Klasyczne czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej w badanych grupach**

	<b>APS z zakrzepicą tętniczą; n:78</b> <b>liczba osób (%)</b>	<b>APS bez zakrzepicy tętniczej; n:85</b> <b>liczba osób (%)</b>	<b>p</b>
<b>Kobiety; n:123</b>	53 (67,9)	70 (82,4)	ns
<b>Mężczyźni; n:40</b>	25 (32,1)	15 (17,6)	<b>p=0,03</b>
<b>Hipercholesterolemia</b>	32 (45,1)	14 (18,2)	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Nadciśnienie tętnicze</b>	36 (46,8)	20 (23,8)	<b>p=0,002</b>
<b>Palenie tytoniu-aktualnie</b>	12 (17,6)	7 (9,1)	ns
<b>Palenie tytoniu- w wywiadzie</b>	23 (33,8)	22 (28,6)	ns
<b>Choroba niedokrwienna serca (MIC)</b>	8 (10,4)	2 (2,4)	<b>p=0,039*</b>
<b>Cukrzyca typu 2</b>	2 (2,7)	2 (2,5)	ns
<b>Dodatni wywiad rodzinny w kierunku MIC</b>	45 (35,7)	6 (33,3)	ns
<b>Doustna antykoncepcja hormonalna; liczba kobiet (%)</b>	3(6,8)	10 (15,9)	ns
<b>Wiek ( średnia; zakres)</b>			
<b>Ogółem:</b>	45,9 (25-72)	41,6 (21-75)	<b>p=0,025</b>
<b>Mężczyźni:</b>	46,12 (25-72)	36,06 (21-52)	
<b>Kobiety:</b>	45,83 (25-70)	42,77 (21-75)	

MIC- choroba niedokrwienna serca

\* różnica istotna, ale niepewność z uwagi na niewielką liczbę przypadków MIC

### **Wiek jako czynnik ryzyka zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS**

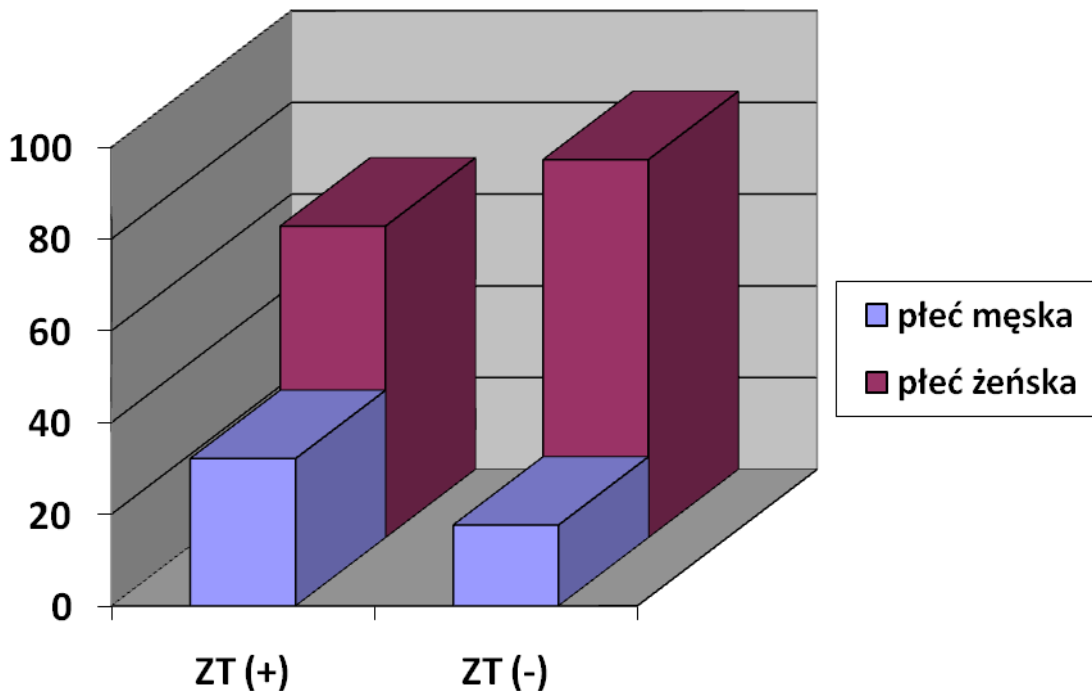
Chorzy na APS z zakrzepicą tętniczą w wywiadzie byli średnio starsi o ponad 4 lata od osób bez zakrzepicy tętniczej (45,9 ±11,18 lat vs. 41,6±13,18 lat) (patrz Tab. 20), przy czym średnia wieku w grupie osób z udarem mózgu i/lub TIA była niższa o ok. 3 lata od średniej wieku w grupie z zawałem serca (patrz Tab. 21).

**Tabela 21. Struktura wieku w badanych grupach**

	APS z zakrzepicą tętniczą n:78	APS i udar mózgu lub/i TIA n: 59	APS i zawał serca n: 16	APS bez zakrzepicy tętniczej n: 85
Przedział wieku	25-72	25-72	25-68	21-75
średnia wieku	45,9	46	48,9	41,6
SD ±	11,18	1,414	11,46	13,18

### Płeć jako czynnik ryzyka zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS

W grupie z przebytą zakrzepicą tętniczą znalazły się 53 kobiety i 25 mężczyzn, natomiast w grupie bez takiej zakrzepicy 70 kobiet i 15 mężczyzn. Pojawiła się zatem istotna przewaga mężczyzn wśród osób z zakrzepicą tętniczą (32,1% vs. 17,6%; test  $\chi^2$   $p=0,033$ ; test Fishera  $p=0,045$  ; **OR= 2,201**; 95% CI: 1,085 ÷ 4,582) (patrz Tab. 19, Ryc. 7).

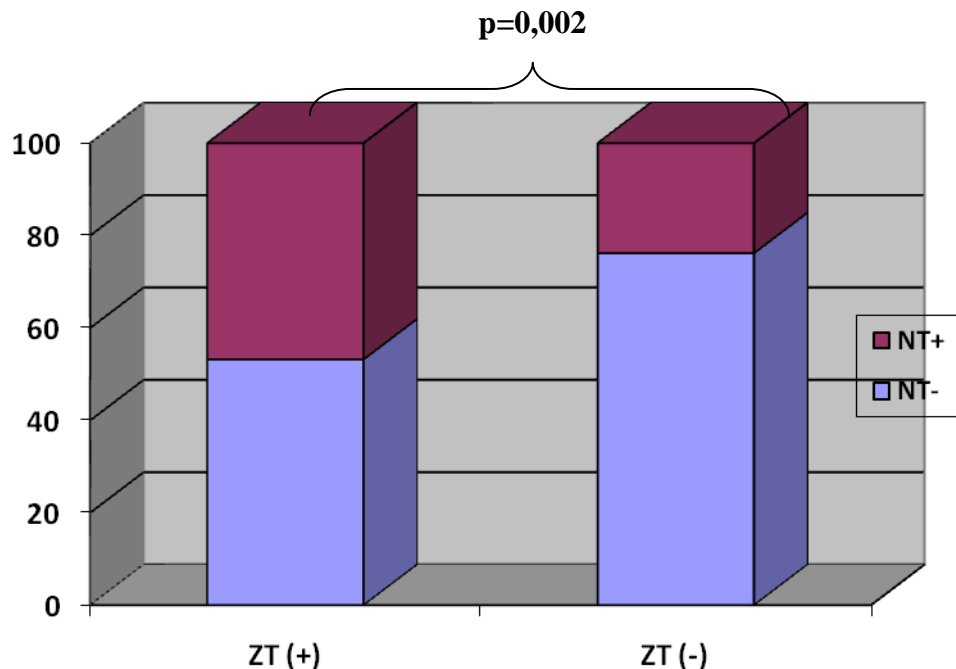


**Rysunek 7. Procentowy udział kobiet i mężczyzn w badanej grupie**



## Nadciśnienie tętnicze jako czynnik ryzyka zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS

W grupie osób z APS i przebyłym epizodem zakrzepicy tętniczej nadciśnienie tętnicze występowało u 36 osób (46,8%), czyli u prawie połowy osób z tej grupy. W grupie porównawczej nadciśnienie tętnicze stwierdzono u 20 osób (23,8 %), czyli ok. jednej czwartej. Stąd różnica pomiędzy grupami stała się istotna (test  $\chi^2$   $p=0,002$ ; test Fishera  $p=0,003$ ), a szansa wystąpienia nadciśnienia tętniczego w grupie z zakrzepicą tętniczą okazała się prawie trzykrotnie większa niż w grupie bez tej zakrzepicy (**OR-2,81**; 95% CI: 1,43÷ 5,55) (patrz Tab. 19, Ryc. 8).



NT+ obecność nadciśnienia tętniczego

NT- brak nadciśnienia tętniczego

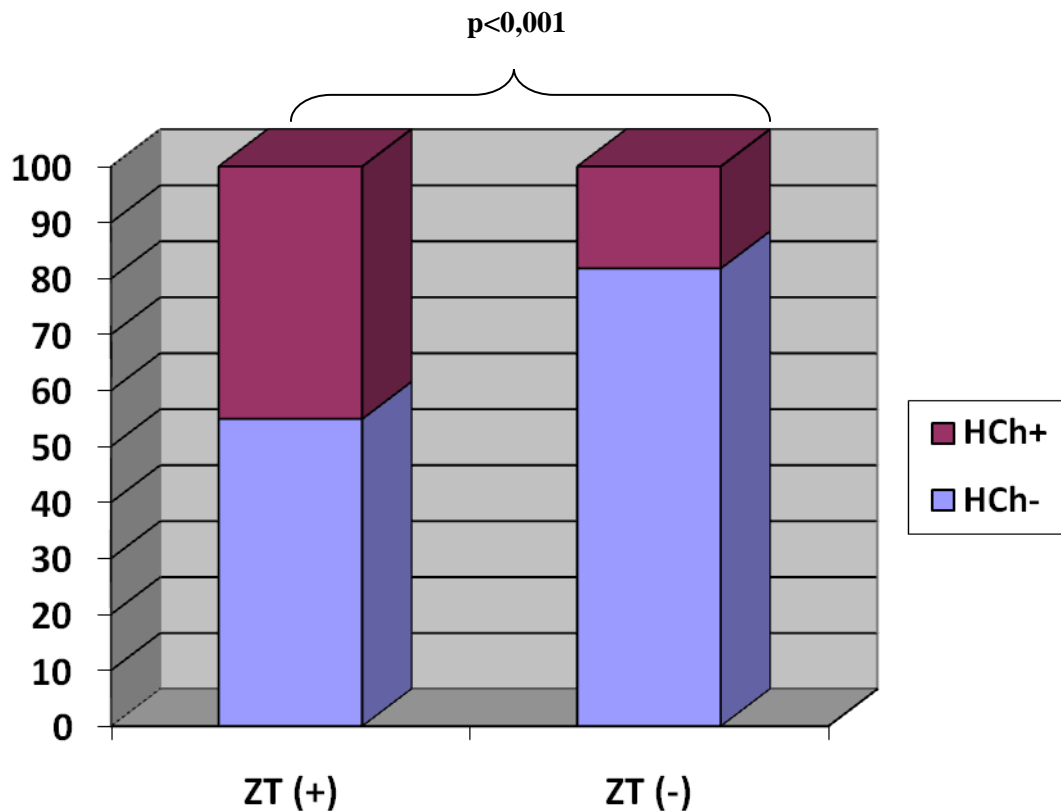
**Rysunek 8. Częstość występowania nadciśnienia tętniczego w obu badanych grupach**

W grupie kobiet szansa wystąpienia była 2,345 razy większa w przypadku nadciśnienia tętniczego (OR=2,345; 95%CI:1,094÷5,027), natomiast w grupie mężczyzn ok. 6,500 razy (OR=6,5; 95%CI:1,199÷35,245). Jednakże wpływ nadciśnienia tętniczego na wystąpienie zakrzepicy tętniczej nie był istotnie większy w grupie mężczyzn, z uwagi

na słabą reprezentację grupy mężczyzn z tą zakrzepicą bez nadciśnienia tętniczego (tylko 2 osoby). Stąd bardzo szeroki przedział ufności dla OR w grupie mężczyzn i nieistotność interakcji nadciśnienie tętnicze i płeć.

### **Hipercholesterolemia jako czynnik ryzyka zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS**

Wśród osób z APS i przeżytym epizodem zakrzepicy tętniczej hipercholesterolemia występowała u 32 osób (45,1%), a w grupie porównawczej tylko u 14 osób (18,2 %) (patrz Tab. 19, Ryc. 9). Różnica ta jest wysoce statystycznie istotna (test  $\chi^2$   $p < 0,001$ ; test Fishera  $p = 0,001$ ). Szansa występowania hipercholesterolemii w grupie z zakrzepicą tętniczną była prawie czterokrotnie większa niż w grupie bez zakrzepicy tętniczej (OR- 3,69; 95%CI: 1,74 ÷ 7,77).



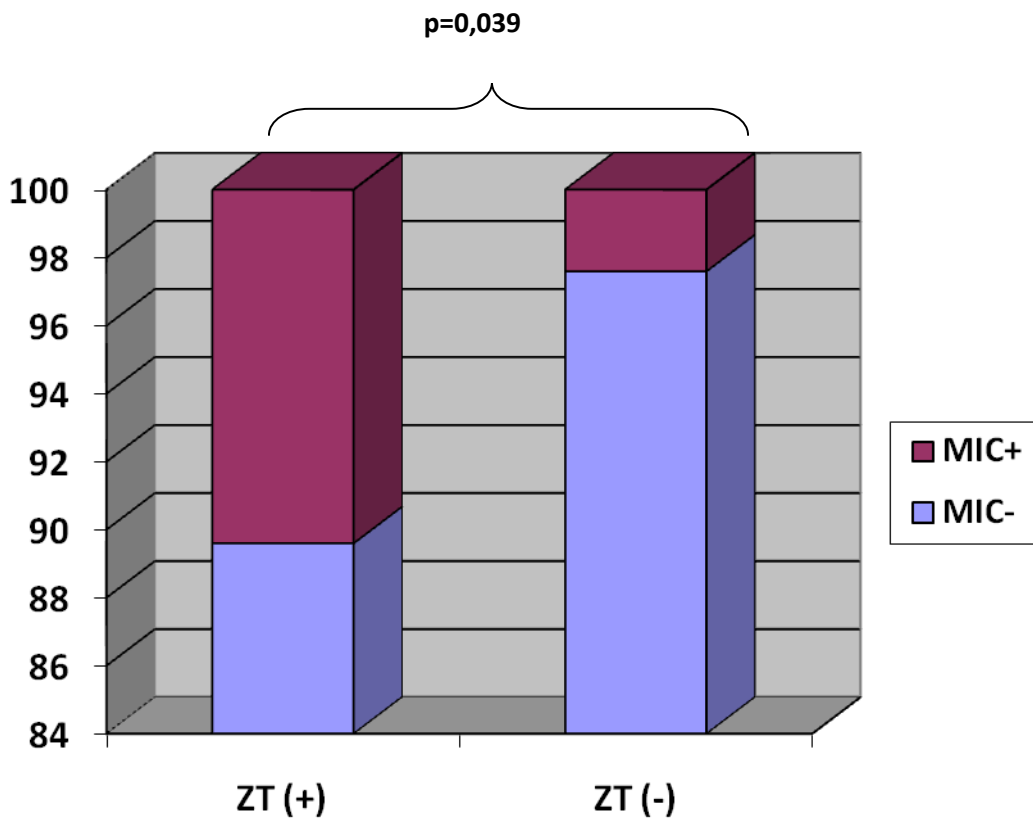
**HCh+** Hipercholesterolemia

**HCh-** brak hipercholesterolemii

**Rysunek 9. Częstość występowania hipercholesterolemii w obu badanych grupach**

## Choroba niedokrwienna serca (MIC) jako czynnik ryzyka zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS

W grupie osób z APS i przebyłym epizodem zakrzepicy tętniczej choroba niedokrwienna serca występowała u 8 osób (10,4 %), natomiast w grupie porównawczej rozpoznano ją u zaledwie 2 osób (2,4 %) (Ryc. 10). Różnica osiągnęła istotność statystyczną (test  $\chi^2$   $p=0,039$ ; test Fishera  $p=0,051$ ), a szansa stwierdzenia MIC w grupie z zakrzepicą tętniczą była prawie pięciokrotnie większa niż w grupie bez tej zakrzepicy (**OR-4,64**; 95% CI:0,95÷ 22,58). Jednakże na zależność tą należy patrzeć z ostrożnością z uwagi na niewielką liczbę przypadków objawowej choroby wieńcowej wśród badanych.



MIC+ zdiagnozowana choroba niedokrwienna serca

MIC- bez choroby niedokrwiennej serca

**Rysunek 10. Częstość występowania MIC w obu badanych grupach**

Z uwagi na to, że niektóre z w/w czynników ryzyka sercowo-naczyniowego są, lub mogą być ze sobą powiązane, przeprowadzono wieloczynnikową analizę regresji stosując uogólniony model liniowy- logitowy, aby sprawdzić, które z nich w sposób istotny wpływają na szansę wystąpienia zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS.

W ostatecznej analizie uwzględniono 4 czynniki ryzyka, które okazały się optymalnymi predyktorami do budowy modelu do obliczeń wg AIC Akaike (*Akaike information criterion*) (170).

- płeć
- nadciśnienie tętnicze
- hipercholesterolemia
- aktualne palenie papierosów

Istotnymi czynnikami, które niezależnie wpływały na szansę stwierdzenia zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS, okazały się ostatecznie: **nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia i aktualne palenie papierosów.**

I tak w grupie osób z APS i hipercholesterolemią szansa stwierdzenia zakrzepicy tętniczej była prawie dwukrotnie większa niż w grupie bez hipercholesterolemii (**p=0,002; OR=2,001; 95% CI 1,28÷3,15**).

Z kolei w grupie chorych na APS z nadciśnieniem tętniczym szansa stwierdzenia zakrzepicy tętniczej była ponad półtora razy większa niż w grupie bez nadciśnienia (**p=0,008; OR=1,78; 95% CI 1,16÷2,75**).

Natomiast w grupie osób aktualnie palących papierosy szansa ta była ok. 2 razy większa niż u osób, które obecnie nie palą (**p=0,015; OR=2,048 95% CI (1,15÷3,66)**).

Natomiast płeć, który w analizie jednoczynnikowej była istotna, w analizie wieloczynnikowej okazała się być powiązana z innymi badanymi czynnikami ryzyka chorób sercowo naczyniowych.

Do zbadania swoistego związku badanych zmiennych z zakrzepicą tętniczą użyto modelu addytywnego.

Badano również istotność interakcji czynników: hipercholesterolemii i nadciśnienia tętniczego, ale okazała się ona nieistotna (**p=0,884**).

## **10. DYSKUSJA**

W niniejszej pracy podjęto próbę znalezienia cech klinicznych i laboratoryjnych, które wyróżniają pacjentów z rozpoznaniem zespołem antyfosfolipidowym i zakrzepicą tętniczą. Znalezienie takich markerów mogłoby w przyszłości zaowocować zmianą standardów postępowania w zakresie profilaktyki takich powikłań.

Przeprowadzona analiza kliniczna miała charakter retrospektywny, stąd pewne jej ograniczenia. W celu porównania częstości występowania niektórych cech klinicznych w badanej populacji ujednolicono proces zbierania informacji ustalając jednakowy wzór ankiety dla wszystkich badanych (patrz załącznik nr 1). Stąd wnioski z powyższych analiz można było uznać za wiarygodne.

### **10.1 Rozpoznanie zespołu antyfosfolipidowego**

Analizę danych klinicznych i laboratoryjnych wykonano u grupy chorych zgłaszających się do Oddziału Alergii i Immunologii Szpitala Uniwersyteckiego oraz Paradni Nadkrzepliwości Krwi i Ośrodka Chorób Immunologicznych przy II Katedrze Chorób Wewnętrznych CMUJ w Krakowie w latach 2008-2010r.

Nieuniknioną sytuacją był więc wpływ profilu działalności tych jednostek na dobór grupy chorych objętych badaniem. W związku z tym, w badanej populacji dominowały przede wszystkim osoby z zespołem antyfosfolipidowym po przebytych udarze mózgu. Rzadziej obserwowaliśmy inne postacie zakrzepicy tętniczej w tym zespole. Jest to podyktowane faktem, że nasz ośrodek jako jeden z nielicznych w Polsce zajmuje się pełną diagnostyką zespołu antyfosfolipidowego. Trzeba jednak podkreślić, że w dużych wieloośrodkowych badaniach niedokrwienny udar mózgu stanowi wśród chorych z APS dominującą postać zakrzepicy tętniczej (171).

W związku z opublikowaniem w 2006r nowych kryteriów rozpoznawania APS do badania kwalifikowano tylko tych chorych, którzy spełniali wspomniane warunki. Z wstępnie zakwalifikowanej grupy pacjentów wykluczono więc wszystkich, którzy mieli graniczne miana aPL i u których objawy kliniczne choroby wystąpiły w okresie <12 tygodni lub > 5 lat od momentu wykrycia tych przeciwciał.

Ponadto przyjęto pewne uproszczenie, dzieląc APS na niezwiązany z żadną inną chorobą (PAPS) lub też powiązany z jakąś inną jednostką chorobową (SAPS). Z uwagi na to, iż część pacjentów w grupie PAPS spełniało 1 lub 2 kryteria rozpoznania SLE wg

ARA (162), nie można wykluczyć, że prospektywna obserwacja tych chorych wykazałaby ich przejście po kilku latach do grupy SAPS. Należy zatem traktować powyższy podział jako porządkowy. Stąd analizując wszystkie potencjalne czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej grupę chorych z APS rozpatrywano jako całość.

## 10.2 Manifestacje zakrzepicy tętniczej w APS

W badanej przez mnie populacji incydenty zakrzepicy żyłnej wystąpiły w 52% przypadków, zakrzepicy tętniczej w 19%, a zarówno zakrzepicy żyłnej i tętniczej u 16,6% osób. Odzwierciedla to w przybliżeniu dane z literatury, gdzie w jednym z opracowań obejmujących grupę ok. 1300 pacjentów z aPL i wynikami obiektywnych badań potwierdzającymi przebycie incydentu zakrzepowego żylnego i/lub tętniczego, stwierdzono, iż izolowana zakrzepica żylna występuje w 59%, zakrzepica tętnicza w 28%, a jednocześnie w obu łóżyskach naczyniowych w 13% przypadków (135). Natomiast w innym opracowaniu, *The Euro-Phospholipid Project Group*, dotyczącym 1000 osób z APS, izolowana zakrzepica żylna wystąpiła u 37,1% chorych, zakrzepica tętnicza u 15,2%, a w obu łóżyskach naczyniowych u 12,1% (171).

Najczęściej występującą manifestacją zakrzepicy tętniczej w badanej przez mnie populacji było niedokrwienie w zakresie OUN: udar mózgu- 65,3% i TIA- 10,25% przypadków. Natomiast zawał serca w naszej populacji wystąpił u 20,5% pacjentów. Inne rzadsze manifestacje zakrzepicy tętniczej np. zakrzepica tętnic kończyn wystąpiła u 5,12% naszych chorych.

W cytowanym powyżej prospektywnym badaniu (171,172) najczęściej występującą manifestacją zakrzepicy tętniczej było również niedokrwienie w zakresie OUN (udar mózgu wystąpił u 19,8% badanych a TIA u 11,1%). Udar mózgu stanowił tam ok. 40% wszystkich manifestacji zakrzepicy tętniczej, TIA ok. 22%, a zawał serca ok. 10%. Tak duża ilość epizodów udaru mózgu i zawału serca w przebiegu APS u naszych badanych była związana najpewniej z tym, iż większość młodych pacjentów po przebytych udarze mózgu lub zawale serca, bez ewidentnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, była kierowana do naszej kliniki jako ośrodka referencyjnego w celu dalszej diagnostyki. Nierzadko wtedy przyczyną manifestacji klinicznych okazywał się zespół antyfosfolipidowy.

W badanej grupie odnotowano tylko pojedyncze przypadki zakrzepicy tętnic nerkowych i 1 epizod zawału śledziony. We wszystkich przypadkach te rzadkie manifestacje zakrzepicy tętniczej wystąpiły u osób, które przeżyły również udar mózgu lub/i zawał serca. W opracowaniach dotyczących populacji osób z APS te rodzaje zakrzepicy stanowiły tylko kilka procent wszystkich odnotowanych epizodów zakrzepicy tętniczej (135, 171, 173).

Siność siatkowata, która w mojej analizie skorelowana była z zakrzepicą tętniczą, szczególnie epizodami niedokrwiennymi OUN, wystąpiła u ok. 20% wszystkich naszych badanych (29,6% pacjentów z zakrzepicą tętniczą), w porównaniu do 24,1% pacjentów w grupie *The Euro-Phospholipid Project* (172). Tę zależność występowania LR i zakrzepicy tętniczej, szczególnie epizodów niedokrwiennych OUN potwierdzają również inne prace (173).

### **10.3 Udział przeciwciał przeciwfosfolipidowych w występowaniu zakrzepicy tętniczej w przebiegu APS**

W literaturze medycznej opisywano zależności pomiędzy obecnością konkretnych przeciwciał antyfosfolipidowych a rodzajem zakrzepicy w APS.

W moim badaniu znalazłam jedynie istotny statystycznie związek pomiędzy obecnością aCL w klasie IgG a wystąpieniem zakrzepicy tętniczej.

Znany jest fakt, iż średnie i wysokie miano aCL IgG jest silnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakrzepicy w obu łóżyskach naczyniowych w zespole antyfosfolipidowym (174, 175, 176, 177). W jednej z prac pochodzących z naszego ośrodka wykazano również, że zakrzepica tętnicza u osób z rozpoznaniem APS lub/i SLE częściej wiązała się z obecnością aCL, szczególnie w klasie IgG (178)

Podobne zależności pomiędzy wystąpieniem pierwszego epizodu udaru niedokrwiennego mózgu lub TIA a obecnością aCL u kobiet zaobserwowano podczas badania populacji Framingham (OR dla kobiet wynosiło 2.6; 95% CI 1.3 do 5.4); w grupie mężczyzn nie znaleziono takich korelacji. Jednakże w tej prospektywnej pracy objęto 11-letnią obserwacją osoby bez rozpoznanego zespołu antyfosfolipidowego, dlatego nie można bez zastrzeżeń porównywać wyników tego badania z doniesieniami dotyczącymi osób z rozpoznaniem APS (179).

W niniejszej pracy porównując obie grupy badane nie znaleziono związku z obecnością aCL w klasie IgM a częstszym występowaniem zakrzepicy tętniczej. Natomiast, kiedy wzięto pod uwagę osoby z APS, które przeżyły więcej niż 1 epizod zakrzepicy tętniczej w porównaniu z pacjentami, którzy mieli 1 taki epizod w wywiadzie, lub nie mieli go wcale, znamiennej częściej obserwowano miano aCL w klasie IgM powyżej 99 percentyla (OR-2,75, 95% CI:1,063÷7,111; p=0,032). Zwracała również uwagę w tej podgrupie tendencja do wyższego miana aCL IgM, jednakże zależność ta nie była istotna (p=0,09).

W mojej analizie nie obserwowałam natomiast korelacji pomiędzy obecnością LA, a częstszym występowaniem zakrzepicy tętniczej u osób z APS w porównaniu do grupy osób bez tej zakrzepicy.

Antykoagulant toczeniowy jest wskazywany w kilku opracowaniach na najsilniejszy czynnik ryzyka zakrzepicy, nie tylko u osób spełniających aktualne kryteria rozpoznania APS, lecz również u osób z SLE i obecnością aPL, lub u kobiet z powikłaniami położniczymi w APS (180, 181, 182, 183). W jednej z prac udowodniono także, że obecność LA wiąże się ze znacznie większym ryzykiem zakrzepicy tętniczej u osób z SLE (OR- 15.69, 95% CI: 4.79-51.42, p < 0.001) (184). Obszerna metaanaliza wykonana przez Monicę Galli i wsp. wskazywała także na korelację obecności LA z występowaniem zakrzepicy, niezależnie od umiejscowienia i rodzaju, czy rozpoznania SLE. Ta analiza nie uwzględniała jednak wyłącznie osób z rozpoznaniem APS, a raczej heterogenną, szeroką grupę osób, pochodzącą z 25 różnych badań, którzy wykazywali obecność przeciwciał antyfosfolipidowych, oznaczanych niestandardowymi metodami. Zaletą tej pracy było natomiast rozpatrywanie wyłącznie badań prospektywnych (182).

Podobne wyniki uzyskano w jednym z holenderskich badań wieloośrodkowych (RATIO -*Risk of Arterial Thrombosis In relation to Oral contraceptive*) analizujących profil przeciwciał antyfosfolipidowych u kobiet < 50 rż, po udarze mózgu lub zawale serca. Obecność LA wiązała się tam z większym ryzykiem niedokrwiennego udaru mózgu (OR-43,1) i zawału serca (OR-5,3), a ryzyko to znacznie wzrastało u kobiet równocześnie palących papierosy i stosujących hormonalne środki antykoncepcyjne (OR-201,0 dla udaru mózgu i OR-33,7 dla zawału serca) (185). Nie można jednak bezpośrednio interpolować wyników tego badania na populację osób z APS rozpoznanych zgodnie z obowiązującymi obecnie kryteriami.



Z kolei w badaniu (APASS- *the Antiphospholipid Antibodies and Stroke Study*), dotyczącym ok. 1800 osób z udarem mózgu i obecnymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi, nie wskazywano, aby obecność LA i aCL zwiększała ryzyko kolejnych epizodów zakrzepowych przez kolejne 2 lata od pierwszego zachorowania (186). Niestety nie jest ono reprezentatywne dla grupy osób z APS i udarem mózgu, gdyż większość osób nie spełniała kryteriów rozpoznania tego zespołu, a szczególnie wymogów laboratoryjnych dwukrotnego oznaczania i rodzaju aCL.

Do 2004r w diagnostyce APS uwzględniano jedynie LA i przeciwciała antykardiolipinowe. W 2004r w Sydney na XI międzynarodowym kongresie dotyczącym przeciwciał antyfosfolipidowych, ogłoszono nowe kryteria rozpoznawania zespołu antyfosfolipidowego, w których ujęto również przeciwciała p/  $\beta$ 2-glikoproteinie I w klasie IgG i IgM, jako jedno z równorzędnych kryteriów laboratoryjnych APS (23). Przeciwciała te są uważane obecnie za bardziej swoiste, ale mniej czułe niż aCL czynnik ryzyka manifestacji klinicznych w APS (187, 188). Wykazano, że u zaledwie 3-10% chorych na APS wykrywa się wyłącznie przeciwciała p/  $\beta$ 2-glikoproteinie I, a ich obecność koreluje m.in. z pierwszym epizodem zakrzepicy żył głębokich (OR-2,4, 95% CI: 1,3-4,2) (189).

Natomiast w badanej przez mnie populacji nie odnotowano zależności pomiędzy obecnością przeciwciał p/  $\beta$ 2-glikoproteinie I, a większym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy tętniczej. Izolowana obecność przeciwciał p/  $\beta$ 2-glikoproteinie I, która decydowała o rozpoznaniu APS, miała miejsce jedynie u 3 chorych. W grupie bez przebytej zakrzepicy tętniczej nie znaleziono takiej osoby w ogóle.

W większości prac nie wykazywano związku pomiędzy obecnością przeciwciał a $\beta$ 2GPI, a istotnym ryzykiem zakrzepicy w APS (182, 189).

Jedynie w badaniu Adrian Danowski i wsp. dotyczącym 418 osób z APS lub SLE stwierdzono, iż utrzymująca się obecność przeciwciał p/  $\beta$ 2 GPI IgG wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zakrzepicy żyłnej, a przeciwciał p/  $\beta$ 2 GPI IgM z ryzykiem zakrzepicy tętniczej (190).

W cytowanym już powyżej badaniu RATIO znaleziono natomiast związek z obecnością przeciwciał p/  $\beta$ 2-glikoproteinie I, a zwiększonym ryzykiem udaru niedokrwiennego mózgu (OR-2.3). Nie odnotowano jednak takiej zależności z zawałem serca (185). W innym badaniu obejmującym grupę 172 kobiet (<45 rż) hospitalizowanych z powodu niedokrwiennego udaru mózgu, wykazano, iż

przeciwciała p/β2-glikoproteinie I w obu klasach są niezależnym czynnikiem ryzyka (po uwzględnieniu palenia papierosów, nadciśnienia tętniczego i stopnia zwężenia tętnic wieńcowych) wystąpienia tego powikłania (OR-2,47 dla przeciwciał p/ β2 GPI IgG i OR-3,68 dla przeciwciał p/ β2 GPI IgM) (191). Podobne wyniki uzyskał także Brey i wsp. w badaniu grupy mężczyzn po przebytych epizodach niedokrwienia OUN i zawału serca, gdzie udowodniono, że przeciwciała p/ β2-glikoproteinie I w klasie IgG są niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia w przyszłości tych powikłań zakrzepowych (192). Badania to jednak dotyczyły ogólnej populacji osób, a nie pacjentów z APS.

W związku z doniesieniami, iż współwystępowanie kilku aPL wiąże się z większym ryzykiem zakrzepicy u osób z APS (193, 194, 195), sprawdzono w populacji objętej moim badaniem również i tą możliwość.

Nie udowodniono jednak, aby jednoczesne występowanie LA z aCL lub/i aβ2GPI w obu klasach, wiązało się z częstszym występowaniem zakrzepicy tętniczej. Nie obserwowano również częstszego występowania kilku rodzajów aPL w grupie osób z przebytych więcej niż jednym takim epizodem.

Z uwagi na retrospektywny charakter pracy nie analizowano wpływu utrzymujących się dodatnich wyników aPL na ryzyko wystąpienia zakrzepicy tętniczej. Istnieją jednak doniesienia, oparte o grupę chorych z SLE, iż zwiększa to ryzyko wystąpienia epizodów zakrzepowych u osób bez przebytej dotychczas zakrzepicy (180, 204, 209, 210).

Nie znalazłam jednak takich badań w grupie osób z rozpoznaniem APS. Wymagałoby to zaplanowania prospektywnego badania, o co najmniej 5 letnim czasie obserwacji.

#### **10.4 Występowanie klasycznych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z APS**

Powszechnie wiadomo, iż u chorych na toczeń rumieniowaty układowy istotnie częściej rozwija się wczesna miażdżycza tętnic i choroba wieńcowa. Ryzyko to jest szczególnie wysokie (nawet 50 razy wyższe) dla kobiet w 3 i 4 dekadzie życia, szczególnie jeśli są leczone glikokortykosteroidami lub mają dodatkowo inne klasyczne czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (199, 200).

Pojawia się zatem pytanie, czy rozpoznanie zespołu antyfosfolipidowego niesie ze sobą również takie zwiększone ryzyko i czy istnieją jakieś czynniki, które mogą mieć wpływ na jego nasilenie. Istnieją opracowania, które sugerują tę hipotezę (201, 202, 203).

Innym zagadnieniem jest wpływ różnych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i konkretnych aPL na ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowych w łożysku tętnicznym u chorych z APS. W szerszych opracowaniach udowodniono, iż zwiększona „gotowość zakrzepowa” w APS wpływa na wzrost ryzyka ostrych incydentów wieńcowych oraz odległe skutki ich leczenia (204). Czy więc podobne spektrum czynników ryzyka odgrywa rolę w występowaniu epizodów niedokrwienia OUN, szczególnie udaru mózgu, prowadzącym niejednokrotnie do znacznego i nieodwracalnego upośledzenia sprawności chorych?

Potencjalny wpływ rodzaju przeciwciał antyfosfolipidowych na zakrzepicę tętniczną w APS, omówiono już powyżej. Natomiast uwzględniając obowiązujące kryteria rozpoznawania APS, istotną staje się analiza w dwu grupach w zależności od obecności klasycznych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (23).

Jednym z istotnych czynników ryzyka jest **wiek**. Przyjęto, iż dla kobiet wynosi on powyżej 65 lat, a dla mężczyzn 55 rż. Wśród badanych osób z APS po przebytych epizodzie zakrzepicy tętnicznej średnia wieku wynosiła 45,9 lat, przy czym dla mężczyzn było to 46,1 lat a dla kobiet 45,8. Osoby te były zatem stosunkowo młode, poniżej granicy uznanej za niezależny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Mimo to wśród chorych z APS, osoby z przebytych epizodem zakrzepicy tętnicznej były nieco starsze, średnio o 4 lata, niż osoby z innymi objawami tego zespołu.

Zgodnie z trendem w populacji ogólnej zakrzepica tętnicza u chorych na APS dotyczyła częściej osób płci męskiej.

Kolejnym niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakrzepicy tętnicznej w APS okazało się **nadciśnienie tętnicze** (OR=1,78; p=0,008). Istnieje, jak dotąd jedno bieżące doniesienie potwierdzające naszą obserwację i wskazujące, iż leczenie nadciśnienia tętniczego jest najistotniejszą interwencją zmniejszającą ryzyko udaru mózgu (196).

Kolejnym potwierdzonym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakrzepicy tętnicznej okazała się **hipercholesterolemia** (OR=2,001; p=0,002). Analiza nie obejmowała tu poszczególnych frakcji lipidogramu.

**Aktualne palenie papierosów** okazało się także zwiększać ryzyko wystąpienia zakrzepicy tętniczej w grupie osób z APS (OR=2,048; p=0,015).

Pozostałe czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej, takie jak: palenie papierosów w przeszłości, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób sercowo-naczyniowych, doustna antykoncepcja hormonalna, czy cukrzyca, nie okazały się istotnymi predyktorami tej manifestacji APS. Jednakże w moim badaniu populacja kobiet z przebyłym epizodem zakrzepicy tętniczej, które jednocześnie stosowały doustną antykoncepcję hormonalną liczyła tylko 3 osoby, w tym 1 osoba w przeszłości paliła papierosy. Można przypuszczać, iż w przypadku znacznego zwiększenia liczebności tej grupy, można byłoby uzyskać odmienne wyniki.

Również w analizie wieloczynnikowej nie znaleziono wpływu współwystępowania klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego i któregośkolwiek przeciwciała antyfosfolipidowego na wzrost ryzyka zakrzepicy tętniczej w APS. Wpływała na to najpewniej zbyt mała liczba osób, co uniemożliwiło zbudowanie optymalnego modelu tego typu analizy.

W literaturze znalazłam kilka starszych prac dotyczących nie tylko pacjentów z APS, lecz najczęściej z SLE i obecnymi aPL, obejmujących niestety niewielkie grupy chorych, a sugerujące zwiększenie ryzyka zakrzepicy tętniczej u osób z współwystępowaniem hipercholesterolemii i nadciśnienia tętniczego (205, 206) oraz dodatkowo palenia papierosów oraz wysokiego miana aCL IgG (207). Hansen i wsp. znaleźli także zależność pomiędzy występowaniem nadciśnienia tętniczego, hiperlipidemii i cukrzycy w wywoływaniu zakrzepicy tętniczej u 99 osób z aPL (208). Z kolei w pracy hiszpańskich badaczy tylko nadciśnienie tętnicze miało istotny wpływ na występowanie epizodów zakrzepicy tętniczej w grupie osób z SLE i obecnymi aPL (OR 7,70, 95% CI 2,33-25,3) (209). Podobne wyniki uzyskano również w jednej z prac, wykonanej w USA na zróżnicowanej rasowo populacji osób z APS, gdzie istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakrzepicy tętniczej okazało się nadciśnienie tętnicze i palenie papierosów, a obecność więcej niż jednego czynnika znacząco zwiększała ryzyko wystąpienia tej zakrzepicy (196).

Znalazłam jak dotąd jedynie jedno doniesienie analizujące wpływ powyższych czynników ryzyka na wystąpienie zakrzepicy tętniczej we właściwie rozpoznanym APS. Wspomniane wcześniej opracowanie Adrian Danowski i wsp. (205) wskazuje, iż

hipertriglicydemia wiąże się z 6,4 krotnym wzrostem ryzyka, ale jedynie w przypadku zakrzepicy żyłnej.

. W literaturze medycznej nie ma jednoznacznego stanowiska, co do częstości występowania zakrzepicy tętniczej w SAPS, w stosunku do PAPS. Osoby z rozpoznaniem SLE mają teoretycznie większe ryzyko tych powikłań, z uwagi na przewlekły proces zapalny toczący się w naczyniach, przyczyniający się do szybszego rozwoju miażdżycy oraz obecność nadciśnienia tętniczego związanego z przewlekłą chorobą nerek.

Nasze wyniki wskazują jednak na częstsze występowanie zakrzepicy tętniczej w PAPS niż w SAPS ( $p=0,003$ ), co należy wiązać z tym, iż młode osoby po przebytych epizodach zakrzepicy tętniczej są często diagnozowane w naszej klinice w kierunku APS i stąd stanowią dużą część badanej grup. Można traktować to jako „*selection bias*”, związany z ośrodkiem referencyjnym. Część z tych pacjentów spełniała pojedyncze kryteria rozpoznania SLE wg ARA, stąd nie można wykluczyć, iż po kilku latach może rozwijać się u nich pełnoobjawowy toczeń rumieniowaty układowy. Dane należy więc interpretować bardzo ostrożnie. Rozstrzygnięciem, o niewielkim jednak znaczeniu, byłoby badanie prospektywne.

Szereg prac wskazuje bowiem na taką samą częstość zakrzepicy tętniczej w SAPS i w PAPS (210, 211), a tylko niektóre na przewagę w SAPS (196). Donoszono też, że w przypadku osób u których SLE rozwinął się po kilku latach od rozpoznania APS, mogą częściej rozwijać się powikłania zakrzepowe, a rzadziej te związane z przewlekłym procesem zapalnym, niż u osób u których początkowo rozpoznano SLE, a dopiero później APS (212).

Wobec tych rozbieżnych wyników i dostępnych już danych należy każdy rozpoznany zespół antyfosfolipidowy traktować jako istotny czynnik ryzyka następnych epizodów zakrzepowych i leczyć zgodnie z zaleceniami (213, 214).

## **10.5 Rola badań genetycznych w ocenie ryzyka wystąpienia zakrzepicy tętniczej u pacjentów z APS**

Możliwość genetycznej predyspozycji do rozwoju zespołu antyfosfolipidowego oraz do produkcji przeciwciał antykardiolipinowych i antykoagulantu toczniowego była przedmiotem wielu badań rodzin chorych oraz populacji osób z APS. Wskazywano w

przeszłości na rodzinne występowanie przeciwciał antyfosfolipidowych u osób z obecnością lub brakiem klinicznych cech zespołu antyfosfolipidowego (215, 216). Stąd pytanie, czy istnieją jakieś genetyczne cechy predysponujące do rozwoju zakrzepicy tętniczej w zespole antyfosfolipidowym.

Z uwagi na doniesienia, dotyczące roli polimorfizmów glikoprotein płytkowych: GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2 w zwiększaniu takiego ryzyka u osób z APS (158), jak również w populacjach osób z cukrzycą typu 2 (217) i nawracającym udarem mózgu (218), podjęto próbę sprawdzenia tej hipotezy.

Nie udało się jednak wykazać związku pomiędzy występowaniem polimorfizmu GP Ia/IIa 807 C/T (zarówno heterozygot CT, jak i homozygot TT) oraz izolowanym występowaniem polimorfizmu GP IIb/IIIa PIA1/2, a zakrzepicą tętniczą. Nie znaleziono również takiego związku, gdy w/w polimorfizmy występowały razem, bez względu na to, czy występował 1 lub dwa zmienione allele (C/T lub TT i A1/A2 lub A2/A2).

Badanie Sonii Jimenez i wsp. wśród 131 pacjentów z APS wskazywało na taką możliwość w odniesieniu do polimorfizmu GP Ia/IIa 807 C/T jako dodatkowego czynnika ryzyka zakrzepicy tętniczej w APS (OR-3,59; p=0,04), a szczególnie w przypadku współistnienia obu polimorfizmów: GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2 (dalszy wzrost tego ryzyka ; OR-4,84; p=0,005) (158). Wyniki są zatem odmienne od moich mimo, iż badanie było przeprowadzone u podobnej liczby chorych. W mojej populacji było także więcej pacjentów z przebytą zakrzepicą tętniczą (36 v 59) oraz w sumie dwukrotnie więcej tych epizodów (50 v 101). Natomiast podobnie jak w badaniu hiszpańskim nie odnotowałam żadnego związku pomiędzy izolowanym występowaniem polimorfizmu GP IIb/IIIa PIA1/2 a ryzykiem zakrzepicy tętniczej.

W związku ze znacznym udziałem przeciwciał przeciwko  $\beta 2$  –glikoproteinie I w patogenezie zespołu antyfosfolipidowego, wyniki kilku prac sugerowały, iż polimorfizm genu kodującego  $\beta 2$  GPI (zamiana waliny na leucynę w pozycji 247) cechuje osoby z pierwotnym APS (161), a także odgrywa rolę w powstawaniu przeciwciał p/  $\beta 2$ GPI, szczególnie u osób z APS i zakrzepicą tętniczą (219).

W badanej przez mnie grupie nie udało się jednak potwierdzić tej hipotezy, podobnie zresztą jak w innym badaniu wykonanym w naszym ośrodku (169) i w populacji kaukaskiej w Wielkiej Brytanii (220). Nie odnotowano również związku pomiędzy obecnością przeciwciał p/ $\beta 2$  GPI w obu klasach, a w/w polimorfizmem.

Zależność taką wykazywano jedynie w nielicznych grupach chorych japońskich (161, 221) oraz w jednym opracowaniu z Brazylii. W tym ostatnim badaniu dotyczącym ok. 100 osób, wykazano, iż u homozygot Val/Val znacząco częściej występuje zakrzepica tętnicza (52%) i żylna (44%) (222). Podobne wyniki uzyskano też w grupie pacjentów meksykańskich, ale badanie objęło nieliczną grupę chorych z pierwotnym APS (219).

Być może za te rozbieżność odpowiada rzadsze występowanie polimorfizmu Val/Val wśród Japończyków, w odróżnieniu od ludzi rasy kaukaskiej, w której genotyp ten występuje najczęściej (169, 223). Dla wyjaśnienia związków polimorfizmu Val247Leu i równoczesną obecnością przeciwciał p/β2 GPI z zakrzepicą tętniczą konieczne byłoby zatem badanie porównawcze wśród różnych ras.

## **10.6 Potencjalny wpływ otrzymanych wyników na standardy leczenia pacjentów z APS**

Do rozpoznania zespołu antyfosfolipidowego niezbędne jest spełnienie co najmniej 1 kryterium klinicznego i 1 kryterium laboratoryjnego. Pojawia się zatem pytanie, czy należy leczyć pacjentki z niepowodzeniami położniczymi w wywiadzie i obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, celem zapobiegania ewentualnemu wystąpieniu zakrzepicy tętniczej, potencjalnie znacznie groźniejszej niż zakrzepica żylna. Ten sam problem dotyczy chorych na kolagenozy z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, lecz nie spełniających żadnego kryterium klinicznego APS. W świetle obowiązujących standardów wg ACCP (American College of Chest Physicians) i polskich wytycznych profilaktyki i leczenia żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej z 2009r., powyższym chorym nie zaleca się profilaktyki przeciwzakrzepowej (213, 214). Wyjątek stanowi jedynie okres unieruchomienia, a u kobiet okres ciąży i porodu.

Oczekujemy, że odpowiedź na te pytania przyniosą kolejne badania. W międzyczasie w oparciu o nasze wyniki badań należałoby zwrócić szczególną uwagę na chorych z obecnymi przeciwciałami aCL w klasie IgG oraz pewnymi klasycznymi czynnikami ryzyka zakrzepicy tętniczej, tj. nadciśnieniem tętniczym, hipercholesterolemią oraz aktualnie palących tytoń. Mogłoby to zminimalizować ryzyko wystąpienia epizodów tętnicznych, szczególnie poprzez eliminację tych czynników.

Odrębnym problemem jest zakres terapeutyczny INR we wtórnej profilaktyce zakrzepicy tętniczej u chorych z APS. Biorąc pod uwagę wyniki powyższej pracy oraz dane z literatury, wydaje się, iż takim chorym powinno się zalecać docelową wartość INR  $>3$ , przy uwzględnieniu indywidualnego ryzyka powikłań krwotocznych. Ten problem został szczegółowo omówiony w jednej z obszerniejszej metaanaliz (224). Chorzy z APS i zakrzepicą tętniczą oraz nawracającą zakrzepicą żylną, traktowani są tu jako grupa największego ryzyka, a zalecany zakres terapeutyczny INR wynosi dla nich  $>3$  (zalecenie 1C). Zalecenia te oparto jednak o prace z niewielką liczebnością badanych (142, 225, 226, 227, 228). Problem pozostaje zatem nadal otwarty.

## 10.7 Ograniczenia badania

Powyższe badanie ma swoje ograniczenia. Po pierwsze jest to badanie kliniczno-kontrolne, a więc ma ono mniejszą siłę niż badanie prospektywne. Kolejnym ograniczeniem jest niewielka liczebność w pojedynczych rozpatrywanych podgrupach osób z rzadszymi manifestacjami zakrzepicy tętniczej, uniemożliwiająca rzetelne statystyczne o nich wnioskowanie.

Nie uwzględniono także dużej zmienności przebiegu chorób układowych towarzyszących APS, różnorodności ich objawów klinicznych, a także czasu trwania, co mogło niezależnie wpływać na ryzyko powikłań serowo-naczyniowych.

Nie uwzględniono także czasu trwania choroby, co wynikało przede wszystkim z trudności w określeniu momentu zachorowania na APS w stosunku do czasu obserwacji klinicznej.

Ponadto w analizie nie ujęto sposobów leczenia poszczególnych epizodów zakrzepowych w ich ostrej fazie, jak również przewlekłej farmakoterapii i stosowania się pacjenta do zaleceń, co mogło wpływać na ryzyko nawrotów zakrzepicy.

Nie analizowaliśmy także innych polimorfizmów genetycznych opisywanych w pojedynczych doniesieniach jako potencjalne czynniki sprzyjające powstawaniu APS, np. polimorfizm tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i jego inhibitora (PAI-1) oraz polimorfizm przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji 4 (STAT4) (229, 230, 231). Niewykluczone, iż stanie się to przedmiotem następnego badania.



## 11. Wnioski

1. Obecność siności siatkowatej w przebiegu zespołu antyfosfolipidowego zwiększa ryzyko wystąpienia zakrzepicy tętniczej, szczególnie epizodu niedokrwiennego OUN
2. U osób z rozpoznanyim zespołem antyfosfolipidowym ryzyko powikłań w postaci zakrzepicy tętniczej istotnie wzrasta przy dodatnim wyniku przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG
3. Dodatni wynik przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgM u osób z APS i przebytych co najmniej jednym epizodem zakrzepicy tętniczej zwiększa ryzyko wystąpienia kolejnych epizodów
4. Nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia i aktualne palenie tytoniu są najistotniejszymi czynnikami ryzyka wystąpienia zakrzepicy tętniczej w zespole antyfosfolipidowym
5. Starszy wiek i płeć męska są także czynnikami ryzyka zakrzepicy tętniczej- zależność znana dla populacji ogólnej
6. Obecność polimorfizmów genów glikoprotein płytkowych: IIb/IIIa PIA1/2, Ia/IIa 807 C/T oraz  $\beta$ 2 –glikoproteiny I (Val247Leu) nie zwiększa ryzyka wystąpienia zakrzepicy tętniczej w zespole antyfosfolipidowym

Reasumując, wnioski z mojego badania wskazują, iż u niektórych chorych, szczególnie z obecnością kilku wymienionych czynników ryzyka, należałoby rozważyć wcześniejsze wdrożenie profilaktyki przeciwzakrzepowej. Natomiast kategorycznie należałoby zwalczać wszystkie zidentyfikowane, klasyczne czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

## 12. Streszczenie

Zakrzepica tętnicza jest najgroźniejszym powikłaniem zespołu antyfosfolipidowego. Celem pracy było znalezienie, zarówno laboratoryjnych, jak i klinicznych, czynników determinujących ryzyko zakrzepicy tętniczej u pacjentów z APS. Badaniom poddano 163 osoby, które spełniały aktualne kryteria diagnostyczne APS, w tym 123 kobiety i 40 mężczyzn w wieku od 21 do 75 lat. Z całej grupy pacjentów z APS wyodrębniono 78 osób z przebyłym co najmniej jednym epizodem zakrzepicy tętniczej (53 kobiety i 25 mężczyzn; średnia wieku- 45,9 lat). Grupę kontrolną dla pacjentów z przebytą zakrzepicą tętniczą stanowiło 85 osób z APS (70 kobiet i 15 mężczyzn; średnia wieku- 41,6 lat), z inną manifestacją tego zespołu, tzn. zakrzepicą żylną i/lub powikłaniami położniczymi. Ponadto w celu standaryzacji metod oznaczania aPL oraz jako grupę porównawczą do oznaczeń genetycznych wykorzystano grupę 147 zdrowych osób, dobranych pod względem płci i wieku do grupy chorych z zespołem antyfosfolipidowym.

Wszystkich chorych poddano retrospektywnej analizie, uwzględniającej objawy kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych. W ankiecie uwzględniono znane czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego min. wiek, płeć, nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemię, palenie papierosów, cukrzycę, stosowanie hormonalnych doustnych leków antykoncepcyjnych oraz dodatni wywiad rodzinny w kierunku epizodów zakrzepowych. Analizowano również cechy związane z APS, ale niewłączone obecnie do kryteriów rozpoznania tego zespołu, w tym małopłytkowość i siność siatkowatą.

Potwierdzenie obiektywnymi wynikami badań przebycia epizodu zakrzepicy tętniczej u osoby z rozpoznaniem APS stanowiło kryterium włączenia do grupy badanej. Natomiast kryterium wykluczającym z badania było migotanie przedsionków, brak świadomej zgody na udział w badaniu oraz niestosowanie się do zaleceń lekarskich przez pacjenta, m.in. nieregularne stosowanie leków przeciwzakrzepowych i przeciwplatekothrombocytarnych.

W całej grupie badanej oznaczono: LA, aCL IgG i IgM, przeciwciała przeciw  $\beta 2$  GPI w klasie IgG i IgM, obecność polimorfizmu glikoprotein płytek krwi: GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/2 oraz obecność polimorfizmu walina/leucyna w pozycji 247  $\beta 2$  – glikoproteiny I. Analizie poddano zarówno częstość występowania poszczególnych

przeciwciał antyfosfolipidowych w obu badanych grupach, jak i ich wzajemne powiązania.

Wśród oznaczonych przeciwciał największe i istotne zagrożenie zakrzepicą tętniczą było związane z obecnością aCL IgG ( $p=0,036$ ;  $OR=2,032$ ). Nie udowodniono natomiast, aby występowanie LA, izolowanego i w powiązaniu z aCL i/lub przeciwciałami przeciw  $\beta 2$  GPI w obu klasach, niesło ze sobą zwiększone ryzyko tej zakrzepicy.

Natomiast po wyodrębnieniu z badanej grupy 20 osób, które miały w wywiadzie więcej niż 1 epizod zakrzepicy tętniczej, zaobserwowano, iż częściej występowały u nich aCL IgM ( $p=0,032$ ,  $OR=2,75$ ) oraz pojawiła się tendencja do wyższych mian tych przeciwciał; różnica ta nie osiągnęła jednak poziomu istotności statystycznej.

Nie znaleziono istotnego związku pomiędzy występowaniem zakrzepicy tętniczej, a żadnym z badanych polimorfizmów glikoprotein płytkowych (Ia/IIa 807 C/T i IIb/IIIa PIA1/2) oraz polimorfizmem Val/Leu247  $\beta 2$  –glikoproteiny I. Nie obserwowano również takiej korelacji pomiędzy obecnością przeciwciał przeciw  $\beta 2$ GPI IgG i/lub IgM, a występowaniem jednego z polimorfizmów Val/Leu247  $\beta 2$ –glikoproteiny I. Również występowanie małopłytkowości w grupie pacjentów z APS i zakrzepicą tętniczą nie było związane z występowaniem żadnego z wymienionych powyżej polimorfizmów.

Natomiast analizując objawy związane z APS, niewłączone do kryteriów rozpoznania tego zespołu, tj. siność siatkowatą (LR), objaw Raynauda i małopłytkowość, wykazano częstsze występowanie LR w grupie z zakrzepicą tętniczą ( $p=0,03$ ;  $OR=2,3$ ), szczególnie u tych z przebyłym udarem mózgu, gdzie szansa wystąpienia ( $OR$ ) objawu wynosiła aż 3,6.

Po uwzględnieniu obecności najistotniejszych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego w obu badanych grupach i przeprowadzeniu analizy jednoczynnikowej stwierdzono, iż zakrzepica tętnicza w APS występowała istotnie częściej w grupie mężczyzn ( $p=0,03$ ;  $OR= 2,201$ ), oraz u osób z rozpoznaną hipercholesterolemią ( $p<0,001$ ;  $OR=3,69$ ) i nadciśnieniem tętniczym ( $p=0,002$ ;  $OR=2,81$ ). Chorzy na APS z zakrzepicą tętniczą w wywiadzie byli też średnio starsi o ponad 4 lata od osób bez takiej zakrzepicy.

Natomiast analiza wieloczynnikowa wskazała, iż istotnymi czynnikami ryzyka zakrzepicy tętniczej w APS są nadciśnienie tętnicze ( $p=0,008$ ;  $OR=1,78$ ),

hipercholesterolemia ( $p=0,002$ ;  $OR=2,001$ ) i aktualne palenie papierosów ( $p=0,015$ ;  $OR=2,048$ ).

A zatem to klasyczne, modyfikowalne czynniki ryzyka miażdżycy tętnic wydają się decydować w zespole antyfosfolipidowym o lokalizacji zakrzepicy w łożysku tętnicznym.

Stąd ich intensywne i wielokierunkowe zwalczanie (uwzględniające również modyfikację stylu życia) u osób z rozpoznaniem zespołem antyfosfolipidowym, szczególnie, gdy współwystępują przeciwciała aCL w klasie IgG, mogłoby zminimalizować ryzyko wystąpienia tego rodzaju epizodów, zarówno w profilaktyce pierwotnej, jak i wtórnej.

### **13. Summary**

In antiphospholipid syndrome (APS) arterial thrombosis is less common than venous, but results in a greater disability and morbidity. The aim of the study was to find characteristic laboratory and/or clinical features which distinguish APS patients with arterial thrombosis.

We retrospectively studied 163 patients (123 women and 40 men) with definite APS (updated classification criteria of APS -2006).

Patients were divided into 2 groups: first with arterial thrombosis (78 subjects; 53 women and 25 men; median age, 45,9 years) and second with other manifestations of APS, i.e.: venous thrombosis and obstetrical complications (85 subjects; 70 women and 15 men; median age, 41,6 years). We used sex and age matched control group (147 healthy subjects) for standardization of aPL detection and as a control group for genetic study.

Patients were interviewed in a retrospective manner. The following factors were examined to determine their possible influence on the thrombosis risk: gender, age, arterial hypertension, diabetes mellitus, smoking, family history of thrombosis, oral contraceptive pills and hypercholesterolemia. Clinical features typical for APS (updated classification criteria) as well as other antiphospholipid antibody-associated symptoms (e.g. livedo reticularis, thrombocytopenia) were also analyzed.

Arterial events were assessed clinically and confirmed by objective methods. Patients with atrial fibrillation, without a conscious consent to participate in the study

and not-applying regularly antiplatelet or anticoagulation drugs were excluded from the study.

Laboratory evaluation included: lupus anticoagulant (LA), anticardiolipin (aCL) and anti-beta2-glycoprotein I (anti-β2GPI) antibodies [IgG and IgM class], platelet GP polymorphisms (Ia/IIa 807 C/T and PIA1/2) and Val/Leu 247 β2GPI polymorphism.

Significant association between arterial thrombosis and the presence of aCL IgG ( $p=0,036$ ;  $OR=2,032$ ) was found. The presence of LA, as well as of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in both classes showed no association with arterial events.

When a group of twenty people with more than one episode of arterial thrombosis was analyzed separately, a positive result for aCL IgM ( $p=0,032$ ,  $OR=2,75$ ) was associated with that thrombosis.

There were no significant associations between any of the polymorphisms studied (GP Ia/IIa 807 C/T, GP PIA1/2 and Val/Leu 247 β2GPI) and arterial thrombosis in APS patients. There were also no associations between positive findings of anti-beta2-glycoprotein I (IgG and/or IgM class) and the Val/Leu 247 β2GPI polymorphism. When we checked for possible associations between APS-associated symptoms (e.g. livedo reticularis, thrombocytopenia, Raynaud's phenomenon) and arterial thrombosis, we found a significant relationship with livedo reticularis ( $p=0,03$ ;  $OR=2,3$ ), especially in a stroke group ( $OR=3,6$ ).

In an univariate analysis of classic risk factors for atherosclerosis a predictors of arterial thrombosis were: male sex ( $p=0,03$ ;  $OR= 2,201$ ), hypercholesterolemia ( $p<0,001$ ;  $OR=3,69$ ) and arterial hypertension ( $p=0,002$ ;  $OR=2,81$ ). Patients with APS and arterial thrombosis were on average four years older than subjects without that thrombosis.

Multivariate analysis showed that independent risk factors for arterial thrombosis included arterial hypertension ( $p=0,008$ ;  $OR=1,78$ ), hypercholesterolemia ( $p=0,002$ ;  $OR=2,001$ ) and present smoking ( $p=0,015$ ;  $OR=2,048$ ).

In conclusion our results, point to an increased risk of arterial thrombosis in APS patients, who are male, show the presence of aCL IgG, suffer from arterial hypertension and/or hypercholesterolemia and are present smokers. Such patients require aggressive treatment and a modification of their lifestyle to decrease the likelihood of arterial episodes.

## 14. Piśmiennictwo

1. Musiał J, Swadźba J, Jankowski M, Grzywacz M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Thrombin generation measured ex vivo following microvascular injury is increased in SLE patients with antiphospholipid-protein antibodies. *Thromb Haemost.* 1997;78:1173-1177.
2. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 1998;79: 276-281.
3. Adams MJ, Donohoe S, Mackie IJ, Machin SJ. Anti-tissue factor pathway inhibitor activity in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2001;114: 375-379.
4. López-Pedreira Ch, Buendía P, Aguirre MA, Velasco F, Cuadrado MJ. Antiphospholipid syndrome and tissue factor: a thrombotic couple. *Lupus.* 2006;15: 161-166.
5. Smirnov MD, Triplett DT, Comp PC, Esmon NL, Esmon CT. On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest.* 1995; 95: 309-316.
6. Musiał J. Zespół antyfosfolipidowy. W: *Choroby Wewnętrzne tom 2.* Pod redakcją Andrzeja Szczeklika, Medycyna Praktyczna, Kraków, 2006:1666-1667.
7. Wasserman A., Neisser A., Bruck C.: Eine serodiagnostische reaction bei syphilis. *Dtsch med Wochenschr.* 1906; 32: 745-746.
8. Pangborn M.C.: A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1941; 48: 484-486.
9. Davis B.D.: Biologic false positive serologic tests for syphilis. *Medicine* 1944; 23: 359-414
10. Conley C.L., Hartmann R.C.: A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Lab Clin Invest.* 1952; 31: 621-622.
11. Bowie E.J.W., Thompson J.H., Pascuzzi C.A., Owen C.A. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med.* 1963; 62: 416-430.
12. Feinstein D.I., Rappaport S.I. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Haemost Thromb.* 1972; 1: 75-95.
13. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol.* 1987; 68: 215-222.
14. Harris E.N. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol.* 1987; 26: 324-326.
15. McNeil H.P., Simpson R.J., Chesterman C.N., Krilis S.A. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibition of coagulation:  $\beta 2$  – glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 4120-4124.
16. Matsuura E., Igarashi Y., Fujimoto M., Ichikawa K., Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336: 177-178.
17. Galli M, Comfurius P, Maassen C., Hemker HC, de Baets MH, van Breda Vriesman PJC, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet.* 1990; 335: 1544-1547.

18. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, et al.: Antiphospholipid antibodies directed against combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81: 2618-2625.
19. Forastiero R.R., Martinuzzo M.E., Broze G.J. High titers of autoantibodies to tissue factor pathway inhibitor are associated with the Antiphospholipid syndrome. *J. Thromb haemost.* 2003; 1: 718-724.
20. Bidot CJ, Jy W, Horstman LL, Huang H, Jimenez JJ, Yaniz M, Ahn YS: Factor VII/VIIa: A new antigen in the antiphospholipid antibody syndrome. *Br J Haematol.* 2003; 120: 618-626.
21. Vermynen J., Arnout J.: Is the antiphospholipid syndrome caused by antibodies directed against physiologically relevant phospholipid-protein complexes? *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 120: 9-12.
22. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Report of an International workshop. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1309-1311.
23. Miyakis S. Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA.: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.*, 2006; 4: 295-306.
24. www. ebiolog, pl, Jan Paweł Jastrzębski, Lipidy.
25. Robert F.A. Zwaal and Alan J. Schroit. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood*; 1997; 89: 1121-1132
26. Undas A. Fizjologia krzepnięcia. W: Leczenie przeciwzakrzepowe. Po redakcją Pasierski T., Undas A., Zawilska K., Sosnowski C., *Medycyna praktyczna, Kraków, 2007: 21- 25.*
27. Colman R.W., Marder V. J, Clowes A. W, George J. N, Goldhaber S. Z. Antiphospholipid antibodies and the Antiphospholipid syndrome. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* 2006:1621
28. Cervera R., Asherson R.A. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics. *Immunobiology.* 2005; 210: 735-741.
29. Stasi R, Stipa E, Masi M, Oliva F, Sciarra A, Perrotti A, Zaccari G, Papa G. Antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical significance and correlation to cytokine levels in acute myeloid leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Thromb Haemost.* 1993;70: 568-572.
30. Schlesinger P.A., Peterson L. Procainamid-associated lupus anticoagulants and thrombotic events. *Arthritis. Rheum* 1998; 31: 54.
31. Musiał J. Zespół antyfosfolipidowy. W: *Zakrzepy i zatory.* Pod red. S. Łopaciuka PZWL, Warszawa, 2002: 89-104.
32. Loizou SA, Walport MJ, Davies KA. The Antiphospholipid syndrome in infectious diseases. In: Asherson R, Cervera R, Piette JC, Schoenfeld Y, eds. *The Antiphospholipid Syndrome.* CRC Press Inc. 1996: 30-47.
33. Gromnica-Ihle E., Schössler W. Antiphospholipid syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000; 123: 67-76.

34. Caliz R, Atsumi T, Kondeatis E, Amengual O, Khamashta MA, Vaughan RW, et al. HLA class II gene polymorphisms in antiphospholipid syndrome: haplotype analysis in 83 caucasoid patients. *Rheumatology* 2001; 40: 31–36.
35. M L Sanchez, K Katsumata, T Atsumi, et al. Association of HLA-DM polymorphism with the production of antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1645-1648.
36. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 1990; 335: 1544-1547.
37. Aguilar L, Ortega-Pierres G, Campos B, Fonseca R, Ibáñez M, Wong C, Farfán N, Naciff JM, Kaetzel MA, Dedman JR, Baeza I. Phospholipid membranes form specific nonbilayer molecular arrangements that are antigenic. *J Biol Chem*. 1999; 274: 25193-25196.
38. Anglés-Cano E, Guillin MC. Antiphospholipid antibodies and the coagulation cascade. *Rheum Dis Clin North Am*. 2001; 27: 573-586.
39. Schultze H.E., Heide K., Haupt H.: Uber einbisher unbekanntes niedermole kulares 2 globulin des human serums. *Naturwissen Schaften*. 1961; 48: 719-724.
40. Crook MA, Ch'ng SI, Lumb P. Serum apolipoprotein H and its relationship to lipids and other apolipoproteins in normal human men and women. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999; 10:197-200.
41. Agar C, van Os G, Morgelin M et al: b2-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010; 116: 1336-1343.
42. de Laat B, Derksen RH, van LM, Pennings MT, de Groot PG. Pathogenic antibeta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood*. 2006; 107: 1916-1924.
43. Schousboe I. Beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*. 1985;66: 1086-1091.
44. Schousboe I, Rasmussen MS. Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of factor XII in plasma by beta 2-glycoprotein I and anti-beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost*. 1995; 73: 798-804.
45. Lean SY, Ellery P, Ivey L, Thom J, Oostryck R, Leahy M, Baker R, Adams M. The effects of tissue factor pathway inhibitor and anti-beta-2-glycoprotein-I IgG on thrombin generation. *Haematologica*. 2006; 91: 1360-1366.
46. Nimpf J., Wurm K., Kostner G.M. Interaction of  $\beta$ 2-glycoprotein I with human blood platelets: influence upon ADP induced aggregation. *Thromb Haemost*.1985; 54: 397-401.
47. Keeling DM, Wilson AJG, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Role of  $\beta$ 2-glycoprotein I and antiphospholipid antibodies in activation of protein C in vitro. *J Clin Pathol* 1993; 46: 908-911.
48. Bancsi LF, van der Linden IK, Bertina RM.  $\beta$ 2-glycoprotein I deficiency and the risk of thrombosis. *Thromb Haemost*. 1992; 67: 649-653.
49. Undas A. Badania laboratoryjne w ocenie układu krzepnięcia i fibrynolizy.  
W: Leczenie przeciwzakrzepowe. Po redakcją Pasierski T., Undas A., Zawilska K., Sosnowski C., *Medycyna praktyczna*, Kraków, 2007: 61-95.



50. Bombeli T., Mueller M., Haeberli A.: Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 1997; 77: 408-423.
51. Loeliger A.: Prothrombin as a co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus?. *Thromb Haemost.* 1959; 3: 237-256.
52. Rapaport S.I., Ames S.B., Duval B.J.: A plasma coagulation defect in systemic lupus erythematosus arising from hypoprothrombinemia combined with antiprothrombinase activity. *Blood.* 1960; 15: 212-216.
53. Bajaj S.P., Rapaport S.I., Fierer D.S., Herbst K. D., Schwartz D.B.: A mechanism of the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia –lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983; 61: 684-691.
54. Edson J. R., Vogt J.M., Hasegawa D.K.: Abnormal prothrombin crossed-immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood.* 1984; 64: 807-816.
55. Galli M., Barbui T.: Prothrombin as a cofactor for antiphospholipids. *Lupus.* 1998; 7:37-40.
56. Bevers E.M., Galli m., Barbui T., Comfurius P.,Zwaal R.F.A.: Lupus anticoagulant IgGs (LA) are not directed to phospholipid s only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb haemost.* 1991; 66: 629-632.
57. Donohoe S., Mackie IJ, Isenberg D., Machin S.J., Anti-prothrombin antibodies: assay conditions and clinical associations in the anti-phospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2001; 113: 544-549.
58. Munther A. Khamashta: Reproductive failure and experimental APS. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. 2006; 378.
59. Flaherty MJ, West S, Heimark RL, Fujikawa K, Tait JF. Placental anticoagulant protein-I: measurement in extracellular fluids and cells of the hemostatic system. *J Lab Clin Med.* 1990; 115: 174-181.
60. Vora S, Shetty S, Ghosh K. Coagulation factor deficiency as a cause of recurrent fetal loss: a red herring! *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007;18:571-574.
61. Huang X, Ding WQ, Vaught JL, Wolf RF, Morrissey JH, Harrison RG, Lind SE. A soluble tissue factor-annexin V chimeric protein has both procoagulant and anticoagulant properties. *Blood.* 2006;107: 980-986.
62. Sun J., Bird P., Salem H.H.: Effects of Annexin Von the activity of the anticoagulant proteins C and S. *Thromb Res.* 1993; 69: 279-287.
63. Satoh A, Suzuki K, Takayama E, Kojima K, Hidaka T, Kawakami M, et al. Detection of anti-annexin IV and V antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999; 26: 1715-1720.
64. Lakos G, Kiss E, Regeczy N, Tarjan P, Soltesz P, Zeher M, et al. Antiprothrombin and antiannexin V antibodies imply risk of thrombosis in patients with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* 2000; 27: 924-929.
65. Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Futsukaichi Y, Yamanishi H, Machii T, et al. Association between the prevalence of antibodies to beta(2)-glycoprotein I, prothrombin, protein C, protein S, and an-

- nexin V in patients with systemic lupus erythematosus and thrombotic and thrombocytopenic complications. *Clin Chem* 2001; 47: 1008-1015.
66. Pasquier E, Amiral J, de Saint ML, Mottier D. A cross sectional study of antiphospholipid-protein antibodies in patients with venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86: 538-542.
  67. Ogawa H, Zhao D, Dlott JS, Cameron GS, Yamazaki M, Hata T, et al. Elevated anti-annexin V antibody levels in Antiphospholipid syndrome and their involvement in antiphospholipid antibody specificities. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 619-628.
  68. Anglés-Cano E, Guillin MC. Antiphospholipid antibodies and the coagulation cascade. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001; 27: 573-586.
  69. de Groot PG, Horbach DA, Derksen RH. Protein C and other cofactors involved in the binding of antiphospholipid antibodies: relation to the pathogenesis of thrombosis. *Lupus.* 1996; 5: 488-493.
  70. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. A hypothesis based on parallelism with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.* 1996; 75: 536-541.
  71. Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost.* 1991; 66: 49-61.
  72. Pasiński T., Undas A., Zawilska K., Sosnowski C., Leczenie przeciwzakrzepowe. 2007: 29-30.
  73. De Groot P.G. , Derksen R. H. M. The influence of antiphospholipid antibodies on the protein C pathway. W: Hughes syndrome. Antiphospholipid syndrome. (red. M.A. Khamashta). Springer-Verlag, London, 2000: 307-316.
  74. Atsumi T, Khamashta MA, Amengual O, Donohoe S, Mackie I, Ichikawa K et al. Binding of anticardiolipin antibodies to protein C via  $\beta$ 2-glycoprotein I: A possible mechanism in the inhibitory effect of antiphospholipid antibodies on the protein C system. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 325-333.
  75. Wang W., Boffa B.P., Bajzar L., Walker J.B., Nesheim M.E. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 27176-27181.
  76. De Groot PG, Derksen RH. Antiphospholipid antibodies: update on detection, pathophysiology and treatment. *Curr Opin Hemat.* 2004; 11: 165-169.
  77. Oosting JD, Preissner KT, Derksen RHW, De Groot PG. Autoantibodies directed against the epidermal growth factor-like domains of thrombomodulin inhibit protein C activation in vitro. *Br J Haematol* 1993; 85: 761-768.
  78. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost.* 1996; 75: 721-724.
  79. Guerin J, Sim RB, Feighery C, Jackson J. Antibody recognition of complement regulatory proteins, factor H, CR1, and C4BP in antiphospholipid syndrome patients. *Lupus* 1998; 7: S180.
  80. Fillit H, Shibata S, Sasaki T, Speira H, Kerr LD, Blake M. Autoantibodies to the protein core of vascular basement membrane heparan sulfate proteoglycan in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 1993; 14: 243-249.

81. Chamley L.W., McKay E.J., Pattison N.S.: Inhibition of heparin/antithrombin cofactor activity by anti-cardiolipin antibodies: a mechanism of thrombosis. *Thromb Res.* 1993; 72: 103-108.
82. Cosgriff PM, Martin BA. Low functional and high antigenic antithrombin III level in a patient with the lupus anticoagulant and recurrent thrombosis. *Arthritis Rheum.* 1981; 24: 94-96.
83. Espinosa G., Cervera J., Font R., Reverter J.C., Shoenfeld Y. Mechanisms of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Inmunología*; 2003: 53-62.
84. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, Palomo I, Harris EN, Meroni PL. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2008;34: 236-250.
85. Arnold J, Holmes Z, Pickering W, Farmer C, Regan L, Cohen H. Anti-beta 2 glycoprotein I and anti-annexin V antibodies in women with recurrent miscarriages. *Br J Haematol*; 2001; 113: 911-914.
86. Rahgozar S, Yang Q, Giannakopoulos B, Yan X, Miyakis S, Krilis S: Beta2 Glycoprotein I Binds Thrombin via Exosite I and Exosite II: Anti-b2 Glycoprotein I Antibodies Potentiate the Inhibitory Effect of b2-Glycoprotein I on Thrombin-Mediated Factor XIa Generation. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 605-613.
87. De Benedetti E, Reber G, Miescher PA, de Moerloose P. No increase of  $\beta$ 2-glycoprotein I levels in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1992; 68: 624.
88. Herbert JM, Savi P, Laplace MC, Lale A. IL-4 inhibits LPS, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes. *FEBS Lett*; 1992; 310: 31-33.
89. Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII/tissue factor complex also inhibits factor Xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood*; 1988; 71: 335.
90. Rao LVM, Rapaport SI. Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. *Blood*; 1987; 69: 645.
91. Kornberg A, Blank M, Kaufman S, Shoenfeld Y. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anticardiolipin antibodies. *J Immunol.* 1994; 153: 1328-1332.
92. Cuadrado MJ, López-Pedrerá C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 834-841.
93. Dobado-Barrios PM, Lopez-Pedrerá C, Velasco F, Aguirre MA, Torres A, Cuadrado MJ. Increased levels of tissue factor mRNA in mononuclear blood cells of patients with primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 1578-1582.
94. Salemink I, Blezer R, Willems GM, Galli M, Bevers E, Lindhout T. Antibodies to beta2-glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 2000; 84: 653-656.
95. Adams M, Breckler L, Stevens P, Thom J, Baker R, Oostryck R. Anti-tissue factor pathway inhibitor activity in subjects with antiphospholipid syndrome is associated with increased thrombin generation. *Haematologica.* 2004; 89: 985-990.
96. Carreras LO, Maclouf J. Antiphospholipid antibodies and eicosanoids. *Lupus* 1994; 3: 271-273.

97. Watson KV, Schörer AE. Lupus anticoagulant inhibition of in vitro prostacyclin release is associated with a thrombosis-prone subset of patients. *Am J Med* 1991; 90: 47-53.
98. Carreras LO, Vermeylen JG. «Lupus» anticoagulant and thrombosis. Possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Haemost.* 1982; 48: 38-40.
99. Schörer AE, Duane PG, Woods VL, Niewoehner DE. Some antiphospholipid antibodies inhibit phospholipase A2 activity. *J Lab Clin Med.* 1992; 120: 67-77.
100. Hasselaar P, Derksen RHW, Blokzijl L, De Groot PG. Thrombosis associated with antiphospholipid antibodies cannot be explained by effects on endothelial and platelet prostanoid synthesis. *Thromb Haemost.* 1988; 59: 80-85.
101. Petraiuolo W, Bovill E, Hoak J. The lupus anticoagulant stimulates the release of prostacyclin from human endothelial cells. *Thromb Res.* 1988; 50: 847-855.
102. Anglés-Cano E, Sultan Y, Clauvel JP. Predisposing factors to thrombosis in systemic lupus erythematosus. Possible relation to endothelial cell damage. *J Lab Clin Med.* 1979; 94: 312-323.
103. Ferro D, Pittoni V, Quintarelli C, Basili S, Saliola M, Caroselli C, et al. Coexistence of antiphospholipid antibodies and endothelial perturbation in systemic lupus erythematosus patients with ongoing prothrombotic state. *Circulation.* 1997; 95: 1425-1432.
104. Jurado M, Páramo JA, Gutiérrez-Pimentel M, Rocha E. Fibrinolytic potential and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and other connective tissue disorders. *Thromb Haemost.* 1992; 688: 516-520.
105. Viola F, Ferro D, Valesini G, Quintarelli C, Saliola M, Grandilli MA, et al. Tissue plasminogen activator inhibitor in patients with systemic lupus erythematosus and thrombosis. *Br Med J.* 1990; 300: 1099-1102.
106. Cugno M, Cabibbe M, Galli M, Meroni PL, Caccia S, Russo R, Bottasso B, Mannucci PM. Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients. *Blood.* 2004; 103: 2121-2126.
107. Ieko M, Ichikawa K, Atsumi T, Takeuchi R, Sawada KI, Yasukouchi T, et al. Effects of beta2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26: 85-90.
108. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, Kato H, Tanaka H, Yamakado M, Akino M, Saitou H, Amasaki Y, Jodo S, Amengual O, Koike T. Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood.* 2004; 103: 3766-3772.
109. Ieko M, Yoshida M, Naito S, Nakabayashi T, Kanazawa K, Mizukami K, Mukai M, Atsumi T, Koike T. Increase in plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor may not contribute to thrombotic tendency in antiphospholipid syndrome because of inhibitory potential of antiphospholipid antibodies toward TAFI activation. *Int J Hematol.* 2010; 91: 776-783.
110. Martínez-Zamora MA, Tassies D, Carmona F, Espinosa G, Cervera R, Reverter JC, Balasch J. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and clot lysis time in pregnant patients with antiphos-

- pholipid syndrome: relationship with pregnancy outcome and thrombosis. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 62: 381-389.
111. Chong BH, Brighton TC, Chesterman CN. Antiphospholipid antibodies and platelets. *Semin Thromb Hemost.* 1995; 21: 76-84.
  112. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol.* 2001; 115: 451-459.
  113. Reverter JC, Tàssies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, Escolar G, Hughes GR, Ingelmo M, Ordinas A. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 1420-1427.
  114. Font J, Espinosa G, Tàssies D, Pino M, Khamashta MA, Gallart T, Cervera R, Escolar G, Hughes GR, Ingelmo M, Ordinas A, Reverter JC. Effects of beta2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies in platelet interaction with subendothelium under flow conditions. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 3283-3289.
  115. Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem.* 2003; 278: 33831-33838.
  116. Davis WD, Brey RL. Antiphospholipid antibodies and complement activation in patients with cerebral ischemia. *Clin Exp Rheumatol.* 1992; 10: 455-460.
  117. Rinder CS, Rinder HM, Smith BR, Ficht JC, Smith MJ, Tracey JB, et al. Blockade of C5a and C5b-9 generation inhibits leukocyte and platelet activation during extracorporeal circulation. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1564-1572.
  118. Solum NO, Rubach-Dahlberg E, Pedersen TM, Reisberg T, Hogasen K, Funderud S. Complement-mediated permeabilization of platelets by monoclonal antibodies to CD9: inhibition by leupeptin, and effects on the GP Ib-acting-binding protein system. 1994; 75: 437-452.
  119. Chang CP, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine. *J Biol Chem.* 1993; 268: 7171-7178.
  120. Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara P, Borghi MO, Tincani A, Balestrieri G, Meroni PL. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III: beta 2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clin Exp Rheumatol.* 1995; 13: 179-185.
  121. Meroni PL, Raschi E, Camera M, Testoni C, Nicoletti F, Tincani A, Khamashta MA, Balestrieri G, Tremoli E, Hess DC. Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun.* 2000; 15: 237-240.
  122. Williams FMK, Parmar K, Hughes GRV, Hunt BJ. Systemic endothelial cell markers in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2000; 84: 742-746.
  123. Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Hall J, Harris EN, Pierangeli SS. E-Selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 843-848.

124. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2211-2219.
125. Ferro D, Pittoni V, Quintarelli C, Basili S, Saliola M, Caroselli C, et al. Coexistence of antiphospholipid antibodies and endothelial perturbation in systemic lupus erythematosus patients with ongoing prothrombotic state. *Circulation.* 1997; 95: 1425-1432.
126. Frijns CJM, Derksen RHW, de Groot PG, Algra A, Fijnheer R. Lupus anticoagulant and history of thrombosis are not associated with persistent endothelial cell activation in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 149-154.
127. Pericleous C, Giles I, Rahman A. Are endothelial microparticles potential markers of vascular dysfunction in the antiphospholipid syndrome? *Lupus.* 2009; 18: 671-675.
128. Morel O., Toti F., Hugel B., Freyssinet J.M., Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004; 11: 156-164.
129. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, Veit V, Combes V, Gentile S, Moal V, Sanmarco M, Sampol J. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2004; 91: 667-673.
130. Nagahama M, Nomura S, Kanazawa S, Ozaki Y, Kagawa H, Fukuhara S. Significance of anti-oxidized LDL antibody and monocyte-derived microparticles in anti-phospholipid antibody syndrome. *Autoimmunity.* 2003; 36: 125-131.
131. Cuadrado MJ, Tinahones F, Camps MT, de Ramon E, Gómez-Zumaquero JM, Mujic F, Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid, anti-beta 2-glycoprotein-I and anti-oxidized-low-density-lipoprotein antibodies in antiphospholipid syndrome. *QJM.* 1998; 91: 619-626.
132. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Tinahones F, Hughes GR. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol.* 1997; 36: 964-968.
133. Pengo V, Bison E, Ruffatti A, Iliceto S. Antibodies to oxidized LDL/beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome patients with venous and arterial thromboembolism. *Thromb Res.* 2008; 122: 556-559.
134. Wilson W.A., Gharavi A.E., Koine T. i wsp. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: Report of an International workshop. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1309–1311.
135. Cervera R., Piette J.C., Font L. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestation and patterns of disease expression in cohort of 1000 pts. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1019–1027.
136. Swadźba J., Musiał J., Jankowski M., Grzywacz M., Szczeklik A. Powikłania zakrzepowo-zatorowe we wtórnym zespole antyfosfolipidowo-białkowym. *Pol Merk Lek.* 1996; 5: 310-312.
137. Provenzale JM, Ortel TL, Allen NB. Systemic thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: lesion distribution and imaging findings. *AJR Am J Roentgenol.* 1998; 170: 285-290.
138. Tektonidou MG, Sotsiou F, Nakopoulou L, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospho-

- lipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2569-2579.
139. Cervera R, Bucciarelli S, Plasín MA, Gómez-Puerta JA, Plaza J, Pons-Estel G, Shoenfeld Y, Ingelmo M, Espinos G; Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (CAPS) Registry Project Group (European Forum On Antiphospholipid Antibodies). Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): descriptive analysis of a series of 280 patients from the "CAPS Registry". *J Autoimmun.* 2009; 32: 240-245.
  140. Erkan D, Espinosa G, Cervera R. Catastrophic antiphospholipid syndrome: Updated diagnostic algorithms. *Autoimmun Rev.* 2010; 10: 74-79.
  141. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciaverella N, Mazzucconi MG, Schinco PC, Ruggeri M, Pogliani EM, Gamba G, Rossi E, Baudo F, Manotti C, D'Angelo A, Palareti G, De Stefano V, Berrettini M, Barbui T. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med.* 1996; 100: 530-536.
  142. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med.* 1995; 332: 993-997.
  143. Stone S, Khamashta MA, Poston L. Placentation, antiphospholipid syndrome and pregnancy outcome. *Lupus.* 2001; 10: 67-74.
  144. Tincani A, Bazzani C, Zingarelli S, Lojacono A. Lupus and the antiphospholipid syndrome in pregnancy and obstetrics: clinical characteristics, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34: 267-273.
  145. Khamashta MA. Antiphospholipid antibodies in pregnancy. *Proceedings of XIX-th ILAR Congress of Rheumatology.* Singapore 1997: 454-455.
  146. Lynch A, Marlar R, Murphy J, Davila G, Santos M, Rutledge J, Emlen W. Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome. A prospective study. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 470-475.
  147. Ramsey-Goldman R, Kutzer JE, Kuller LH, Guzick D, Carpenter AB, Medsger TA Jr. Pregnancy outcome and anti-cardiolipin antibody in women with systemic lupus erythematosus. *Am J Epidemiol.* 1993; 138: 1057-1069.
  148. Rand JH, Wu XX, Andree HA, Lockwood CJ, Guller S, Scher J, Harpel PC. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome--a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med.* 1997; 337: 154-160.
  149. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis. *Lupus.* 2010; 19: 460-469.
  150. Lefkowitz J., Plow E.F., Topol E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N. Engl. J. Med.* 1999; 332: 1553-1559.
  151. Andrews R.K., Berndt M.C.: Platelet physiology and thrombosis. *Thromb. Res.* 2004; 114: 447-453.
  152. Cadroy Y, Sakariassen K, Grandjean H, Thalamas C, Boneu B, Sié P. The effect of platelet P1A polymorphism on experimental thrombus formation in man depends on blood flow and thrombogenic substrate. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 1097-1103.

153. Sperr WR, Huber K, Roden M, et al. Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young Central Europeans. *Thromb Res.* 1998; 90: 117-123.
154. Kastrati A, Schöming A, Seufarth M, et al. P1A polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent replacement. *Circulation* 1999; 99: 1005-1010.
155. Ridker P.M., Hennekens C.H., Schmitz C., Stampfer M.J., Lindpainter K. P1A1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of myocardial infarction and stroke and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349: 385–388.
156. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabaté M, Fernández C, Stranieri C, Trabetti E, Pignatti PF, Macaya C. P1A polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004; 15: 89-93.
157. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GP IIIa P1A and GP Ib variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1124-1131.
158. Jiménez S, Tàssies D, Espinosa G, García-Criado A, Plaza J, Monteagudo J, Cervera R, Reverter JC. Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: 835-840.
159. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, et al. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood.* 1999; 93: 2449-2453.
160. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, et al. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 1999; 353: 351-354.
161. Atsumi T, Tsutsumi A, Amengual O, Khamashta MA, Hughes GR, Miyoshi Y, Ichikawa K, Koike T. Correlation between beta2-glycoprotein I valine/leucine247 polymorphism and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 1999; 38: 721-723.
162. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
163. Pierangeli SS, Harris EN. A protocol for determination of anticardiolipin antibodies by ELISA. *Nat Protoc.* 2008; 3: 840-848.
164. Arvieux J., Rousiel B., Jacob M.C., Colomb M.G. Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using  $\beta_2$ -glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods.* 1991; 143: 223-229.
165. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7: 1737-1740.
166. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, et al. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999; 93: 2449-2453.



167. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*. 1997; 349: 385-388.
168. Chen Q, Kamboh MI. Complete DNA sequence variation in the apolipoprotein H (beta-glycoprotein I) gene and identification of informative SNPs. *Ann Hum Genet*. 2006; 70: 1-11.
169. Swadzba J, Sanak M, Iwaniec T, Dziedzina S, Musiał J. Valine/Leucine247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome: lack of association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Lupus*. 2006; 15: 218-222.
170. Hastie, T., Tibshirani R., Friedmann J.: *The Elements of Statistical Learning*. 2001; Springer.
171. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tin-cani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M, Meroni PL, Derksen RH, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quéré I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernández-Nebro A, Boffa MC, Hughes GR, Ingelmo M; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 1019-1027.
172. Cervera R, Boffa MC, Khamashta MA, Hughes GR. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus*. 2009; 18: 889-893.
173. Francès C, Niang S, Laffitte E, Pelletier F, Costedoat N, Piette JC. Dermatologic manifestations of the antiphospholipid syndrome: two hundred consecutive cases. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 1785-1793.
174. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciaverella N, Mazzucconi MG, Schinco PC, Ruggeri M, Pogliani EM, Gamba G, Rossi E, Baudo F, Manotti C, D'Angelo A, Palareti G, De Stefano V, Berrettini M, Barbui T. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med*. 1996; 100: 530-536.
175. Turiel, M, Sarzi-Puttini, P, Peretti, R, et al. Thrombotic risk factors in primary antiphospholipid syndrome: a 5-year prospective study. *Stroke* 2005; 36: 1490-1494.
176. Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M, Bortolati M, Bison E, Salvan E, Facchinetti M, Pengo V. Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 1693-1696.
177. Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M et al: Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers. A multicentre, retrospective follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68, 397-399.
178. Swadzba J, Iwaniec T, Szczeklik A, Musiał J. Revised classification criteria for antiphospholipid syndrome and the thrombotic risk in patients with autoimmune diseases. *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 1883-1899.
179. Janardhan, V, Wolf, PA, Kase, CS, et al. Anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack. The Framingham Cohort and Offspring Study. *Stroke* 2004; 35: 736.

180. Tektonidou MG, Laskari K, Panagiotakos DB, Moutsopoulos HM. Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 2009; 61: 29-36.
181. Woo KS, Kim KE, Kim JM, Han JY, Chung WT, Kim KH. Prevalence and clinical associations of lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies, and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Korean J Lab Med.* 2010; 30: 38-44.
182. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood.* 2003; 101: 1827-1832.
183. Martinez-Berriotxo A, Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Garmendia M, Gabriel Erdozain J, Villar I, Aguirre C. Transiently positive anticardiolipin antibodies and risk of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007; 16: 810-816.
184. Martinez-Berriotxo A, Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Garmendia M, Gabriel Erdozain J, Villar I, Aguirre C. Transiently positive anticardiolipin antibodies and risk of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007; 16: 810-816.
185. Urbanus RT, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, de Groot PG, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischemic stroke in young women in the RATIO study: a case –control study. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 998-1005.
186. Levine SR, Brey RL, Tilley BC, Thompson JL, Sacco RL, Sciacca RR, Murphy A, Lu Y, Costigan TM, Rhine C, Levin B, Triplett DA, Mohr JP; APASS Investigators. Antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke. *JAMA.* 2004; 4; 291: 576-584
187. Obermoser G, Bitterlich W, Kunz F, Sepp NT. Clinical significance of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004; 135: 148-153.
188. Musial J, Swadzba J, Motyl A, Iwaniec T. Clinical significance of antiphospholipid protein antibodies. Receiver operating characteristics plot analysis. *J Rheumatol.* 2003; 30: 723-730.
189. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2003; 102: 2717-2723.
190. Danowski A., Kickler TS, Petri M. Anti-β2-Glycoprotein I: Prevalence, Clinical Correlations, and Importance of Persistent Positivity in Patients with Antiphospholipid Syndrome and Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2006; 33: 1775–1779.
191. Meroni PL, Peyvandi F, Foco L, Bernardinelli L, Fetichev R, Mannucci PM, Tincani A. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies and the risk of myocardial infarction in young premenopausal women. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 2421-2428.
192. Brey RL, Abbott RD, Curb JD, Sharp DS, Ross GW, Stallworth CL, Kittner SJ. beta(2)-Glycoprotein 1-dependent anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and myocardial infarction: the Honolulu Heart Program. *Stroke.* 2001; 32: 1701-1706.
193. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 1147-1152.

194. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Gresele P, Barcellona D, Erba N, Testa S, Marongiu F, Bison E, Denas G, Banzato A, Padayattil Jose S, Iliceto S. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 237-242.
195. Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, Marfisi RM, Finazzi G, Marchioli R, Wisloff F, Marziali S, Morboeuf O, Barbui T. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood.* 2007; 110: 1178-1183.
196. Erkan D, Yazici Y, Peterson MG, Sammaritano L, Lockshin MD. A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2002; 41: 924-929.
197. Tarr T, Lakos G, Bhattoa HP, Shoenfeld Y, Szegedi G, Kiss E. Analysis of risk factors for the development of thrombotic complications in antiphospholipid antibody positive lupus patients. *Lupus.* 2007; 16: 39-45.
198. Ishii Y, Nagasawa K, Mayumi T, Niho Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49: 387-390.
199. Musiał J. Toczeń rumieniowaty układowy. W: *Choroby Wewnętrzne tom 2.* Pod redakcją Andrzeja Szczeklika, Medycyna Praktyczna, Kraków, 2006: 1659-1665.
200. Frostegård J. Systemic lupus erythematosus and cardiovascular disease. *Lupus.* 2008; 17: 364-367.
201. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O. Systemic antiphospholipid syndrome and atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007; 32: 172-177.
202. Ames PR et al. Premature atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome: preliminary data. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 315–317.
203. Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006; 2: 99-106.
204. Koniari I, Siminelakis SN, Baikoussis NG, Papadopoulos G, Goudevenos J, Apostolakis E. Antiphospholipid syndrome; its implication in cardiovascular diseases: a review. *J Cardiothorac Surg.* 2010; 5: 101.
205. Danowski A, de Azevedo MN, de Souza Papi JA, Petri M. Determinants of Risk for Venous and Arterial Thrombosis in Primary Antiphospholipid Syndrome and in Antiphospholipid Syndrome with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol.* 2009; 36: 1195-1199.
206. Petri M. Thrombosis and systemic lupus erythematosus: the Hopkins Lupus Cohort perspective. *Scand J Rheumatol.* 1996; 25: 191–193.
207. Verro P, Levine SR, Tietjen GE. Cerebrovascular Ischemic Events With High Positive Anticardiolipin Antibodies. *Stroke.* 1998; 29: 2245-2253.
208. Hansen KE, Kong DF, Moore KD, Ortel TL. Risk factors associated with thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 2001; 28: 2018-2024.
209. Martínez-Berriotxo A, Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Rueda M, Aguirre C. Homocysteine, antiphospholipid antibodies and risk of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2004; 13: 927-933.

210. Chwalińska-Sadowska H, Meissner M, Wudarski M, Zabek J, Wojciechowska B. Antiphospholipid syndrome (APS) primary (PAPS) and secondary (SAPS). *Pol Arch Med Wewn.* 2006; 115: 401-406.
211. Camps García MT, Fernández Nebro A, Díaz Cobos C, Haro Liger M, Barón Ramos MA, de Ramón Garrido E. Clinical and immunological features in 112 patients with antiphospholipid syndrome. *Med Clin (Barc).* 2004; 123: 466-470.
212. Tarr T, Lakos G, Bhattoa HP, Szegedi G, Shoenfeld Y, Kiss E. Primary antiphospholipid syndrome as the forerunner of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007; 16: 324-328.
213. H.R. Büller, G. Agnelli, R.D. Hull, T.M. Hyers, M.H. Prins, G.E. Raskob S.M. Bates, I.A. Greer, J. Hirsh, J.S. Ginsberg. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy Use of antithrombotic agents during pregnancy: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 2004; 126 (suppl.): 401-428, 627-644.
214. Zawilska K. i wsp. Polskie wytyczne profilaktyki i leczenia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej. Aktualizacja 2009. *Med. Prakt.* 2009; 4 (Suppl).
215. Matthey F., Walshe K., Mackie I.J, Familial occurrence of the antiphospholipid syndrome. *J Clin Pathol.* 1989; 42: 495-497.
216. Goldberg SN, Conti-Kelly AM, Greco TP. A family study of anticardiolipin antibodies and associated clinical conditions. *Am J Med.* 1995; 99: 473-479.
217. Pellitero S, Reverter JL, Tàssies D, Pizarro E, Monteagudo J, Salinas I, Aguilera E, Sanmartí A, Reverter JC. Polymorphisms in platelet glycoproteins Ia and IIIa are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Thromb Haemost.* 2010; 103: 630-637.
218. Cervera A, Tàssies D, Obach V, Amaro S, Reverter JC, Chamorro A. The BC genotype of the VNTR polymorphism of platelet glycoprotein I $\alpha$  is overrepresented in patients with recurrent stroke regardless of aspirin therapy. *Cerebrovasc Dis.* 2007; 24: 242-246.
219. Prieto GA, Cabral AR, Zapata-Zuñiga M, Simón AJ, Villa AR, Alarcón-Segovia D, Cabiedes J. Valine/valine genotype at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 471-474.
220. Camilleri RS, Mackie IJ, Humphries SE, Machin SJ, Cohen H. Lack of association of 2-glycoprotein I polymorphisms Val247Leu and Trp316Ser with antiphospholipid antibodies in patients with thrombosis and pregnancy complications. *Br J Haematol* 2003; 120: 1066–1072.
221. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. Significance of valine/leucine247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies to the valine 247 beta2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 212-218.
222. Pernambuco-Climaco JM, Brochado MJ, Freitas MV, Roselino AM, Louzada-Junior P. Val/Leu247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in Brazilian patients with antiphospholipid syndrome- a genetic risk factor? *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173: 509-514.

223. Hirose N, Williams R, Alberts AR, Furie RA, Chartash EK, Jain RI, Sison C, Lahita RG, Merrill JT, Cucurull E, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Hashimoto S, Sawada T, Chu CC, Gregersen PK, Chiorazzi N. A role for the polymorphism at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in the generation of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1655-1661.
224. Ruiz-Irastorza G, Hunt BJ, Khamashta MA. A systematic review of secondary thromboprophylaxis in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 2007; 57: 1487-1495.
225. Rosove MH, Brewer PM. Antiphospholipid thrombosis: clinical course after the first thrombotic event in 70 patients. *Ann Intern Med* 1992; 117: 303– 308.
226. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hunt BJ, Escudero A, Cuadrado MJ, Hughes GR. Bleeding and recurrent thrombosis in definite antiphospholipid syndrome: analysis of a series of 66 patients treated with oral anticoagulation to a target international normalized ratio of 3.5. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1164 –1169.
227. Krnic-Barrie S, O'Connor CR, Looney SW, Pierangeli SS, Harris EN. A retrospective review of 61 patients with antiphospholipid syndrome: analysis of factors influencing recurrent thrombosis. *Arch Intern Med* 1997; 157: 2101– 2108.
228. Wittkowsky AK, Downing J, Blackburn J, Nutescu E. Warfarin-related outcomes in patients with antiphospholipid antibody syndrome managed in an anticoagulation clinic. *Thromb Haemost* 2006; 96: 137– 141.
228. Munoz-Rodriguez FJ, Font J, Cervera R, Reverter JC, Tassies D, Espinosa G, et al. Clinical study and follow-up of 100 patients with the antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 1999; 29: 182–90.
229. Castro-Marrero J, Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Genetic risk factors of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2009;147:289-296.
230. Yasuda S, Tsutsumi A, Atsumi T, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Khamashta MA, Hughes GR, Koike T. Gene polymorphisms of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 2002; 29: 1192-1197.
231. Svenungsson E, Gustafsson J, Leonard D, Sandling J, Gunnarsson I, Nordmark G, Jönsen A, Bengtsson AA, Sturfelt G, Rantapää-Dahlqvist S, Elvin K, Sundin U, Garnier S, Simard JF, Sigurdsson S, Padyukov L, Syvänen AC, Rönnblom L. A STAT4 risk allele is associated with ischaemic cerebrovascular events and anti-phospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 834-840

## 15. Dodatek

<b>Załącznik nr 1</b>			
Nazwisko	Imię:	Płeć	PESEL:

<b>KRYTERIA OGÓLNE</b>	<b>TAK</b>	<b>NIE</b>
rumień na twarzy w kształcie motyla		
rumień krążkowy		
nadwrażliwość na światło		
owrzodzenia w jamie ustnej		
zapalenie stawów (bez nadżerek w RTG)		
zapalenie opłucnej lub osierdzia		
zmiany w nerkach (utrzymujący się białkomocz >0,5g/dobę lub wałeczki w moczu)		
zmiany w układzie nerwowym (napady drgawek, zaburzenia psychiczne)		
<b>zaburzenia hematologiczne:</b>		
▪ niedokrwistość hemolityczna z retikulocytozą		
▪ leukopenia <4000/ $\mu$ l stwierdzana $\geq$ dwukrotnie		
▪ limfopenia < 1500/ $\mu$ l stwierdzana $\geq$ dwukrotnie		
▪ małopłytkowość < 100000/ $\mu$ l stwierdzana $\geq$ dwukrotnie		
<b>zaburzenia immunologiczne:</b>		
▪ przeciwciała przeciwko ds.-DNA		
▪ przeciwciała przeciwko Sm		
▪ obecność przeciwciał antyfosfolipidowych		
obecność przeciwciał przeciwjądrowych w nieprawidłowym mianie		

<b>KRYTERIA APS</b>	<b>TAK</b>	<b>NIE</b>	<b>ILOŚĆ</b>
<b>Powikłania zakrzepowo-zatorowe:</b>			
Zakrzepica tętnicza:			
▪ Udar mózgu			
▪ TIA			
▪ Zakrzepica tętnic obwodowych (rodzaj):.....			
Zakrzepica żylna:			
▪ Zakrzepica żył głębokich			
▪ Zatorowość płucna			
▪ Inne:.....			
Powikłania położnicze:			

<b>INNE OBJAWY ZWIĄZANE Z APS:</b>	<b>TAK</b>	<b>NIE</b>
▪ Objaw Raynauda:		
▪ Siność siatkowata:		

<b>CZYNNIKI RYZYKA ZAKRZEPICY:</b>	<b>TAK</b>	<b>NIE</b>
▪ Operacja		
▪ Cięża		
▪ Żylaki kończyn dolnych		
▪ Nadciśnienie tętnicze		
▪ Choroba niedokrwienna serca		
▪ Migotanie przedsionków (kryterium wykluczające zakwalifikowania do grupy badanej)		
▪ Zaburzenia rytmu		
▪ Palenie papierosów w przeszłości		
▪ Palenie papierosów aktualnie		
▪ Antykoncepcja hormonalna		
▪ Hipercholesterolemia		
▪ Cukrzyca		
▪ Unieruchomienie		
▪ Dodatni wywiad rodzinny		

<b>INFORMACJE DODATKOWE</b>

## Załącznik nr 2

Wyróżniono następujące typy świecenia ANA:

- homogenny
- ziarnisty
- cytoplazmatyczny
- mitochondrialny
- obwodowy
- jąderkowy
- rybosomalny

Wyróżniono następujące rodzaje ANA:

- Ro (przeciwno podjednostkom 52 i 60 kDa)
- La
- Sm
- RNP
- Scl-70
- Jo-1
- Pm-Scl
- Fibrylarynowe
- RNA-Polimeraza I
- Cyklinowe
- ACA
- Mitochondrialne
- Cytoszkietowe
- Rybosomalne
- „nuclear dots”
- p/ aparatu Golgiego
- p/ lizosomom oraz wrzecionu podziałowemu
- Mi, Ku
- p/Histonowe
- rib-P-Protein
- przeciwciała przeciwko dwuniciowemu DNA (ds- DNA)- metoda immunofluorescencji pośredniej przy użyciu wiciowca *Crithidium luciliae*. Za wynik dodatni uznawano miano > 1: 10



## **Lista rysunków**

Rysunek 1. Schemat budowy fosfolipidu ([www.ebiolog.pl](http://www.ebiolog.pl))

Rysunek 2. Asymetryczne rozmieszczenie lipidów i glikolipidów w błonach (Bruce Alberts i in., Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii komórki; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999)

Rysunek 3. Rozkład procentowy osób z APS i zakrzepicą tętniczą (ZT) oraz współwystępującą zakrzepicą żylną (ZZ) i powikłaniami położniczymi (PP)

Rysunek 4. Częstość występowania livedo reticularis (LR) wśród chorych z APS

Rysunek 5. Częstość występowania małopłytkowości (TP) wśród chorych z APS (test  $\chi^2$ ,  $p=0,6$ )

Rysunek 6. Częstość występowania objawu Raynaud (RP) wśród chorych z APS (test  $\chi^2$ ,  $p=0,7$ )

Rysunek 7. Procentowy udział kobiet i mężczyzn w badanej grupie

Rysunek 8. Częstość występowania nadciśnienia tętniczego w obu badanych grupach

Rysunek 9. Częstość występowania hipercholesterolemii w obu badanych grupach

Rysunek 10. Częstość występowania MIC w obu badanych grupach

## Lista tabel

Tabela 1. Występowanie przeciwciał przeciwfosfolipidowych w chorobach o etiologii zakaźnej

Tabela 2. Kryteria diagnostyczne zespołu antyfosfolipidowego

Tabela 3. Klasy obecności przeciwciał antyfosfolipidowych

Tabela 4. Zakres norm dla przeciwciał antykardiolipinowych (aCL) klasy IgG i IgM

Tabela 5. Ogólna charakterystyka grupy chorych

Tabela 6. Liczebność w poszczególnych podgrupach chorych z APS i zakrzepicą tętniczą

Tabela 7. Rodzaj i liczba epizodów zakrzepicy tętniczej w grupie badanej

Tabela 8. Rodzaj i liczba epizodów zakrzepicy żyłnej w grupie badanej

Tabela 9. Zależność występowania różnych typów przeciwciał przeciwfosfolipidowych i p/  $\beta$ 2GPI u pacjentów w obu badanych grupach.

Tabela 10. Zależność występowania różnych typów przeciwciał przeciwfosfolipidowych u pacjentów z więcej niż 1 epizodem zakrzepicy tętniczej

Tabela 11. Poziom analizowanych przeciwciał przeciwfosfolipidowych u badanych chorych

Tabela 12. Poziom analizowanych przeciwciał przeciwfosfolipidowych u pacjentów z APS z więcej niż 1 epizodem zakrzepicy tętniczej

Tabela 13. Częstość występowania polimorfizmów GP Ia/IIa 807 C/T i allelu T wśród badanych chorych

Tabela 14. Częstość występowania polimorfizmów GP IIb/IIIa PIA1/2 i allelu A2 wśród badanych chorych

Tabela 15. Częstość występowania polimorfizmu Val/Leu247  $\beta$ 2 –glikoproteiny I i allelu leu wśród badanych chorych

Tabela 16. Zależność występowania dodatniego wyniku  $\beta$ 2GPI IgG i/lub IgM z badanymi wariantami polimorfizmu Val/Leu247  $\beta$ 2 –glikoproteiny I

Tabela 17. Zależność występowania kombinacji polimorfizmów GP Ia/IIa 807 C/T z polimorfizmem GP IIb/IIIa PIA1/A2 w badanej grupie

Tabela 18. Zależność występowania polimorfizmów: Val/Leu247  $\beta$ 2 –glikoproteiny I, GP Ia/IIa 807 C/T i GP IIb/IIIa PIA1/A2 pomiędzy badanymi grupami

Tabela 19. Klasyczne czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej w badanych grupach

Tabela 20. Klasyczne czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej w badanych grupach

Tabela 21. Struktura wieku w badanych grupach