

*Uniwersytet Jagielloński*

*Collegium Medium*

*Wydział Lekarski*

**Teresa Iwaniec**

**Ocena zastosowania przeciwciał monoklonalnych  
dla ujednoczenia metod oznaczania  
przeciwciał przeciwfosfolipidowych.**

*Praca doktorska*

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

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

Kraków, 2007

*Pragnę serdecznie podziękować Panu Profesorowi Jackowi Musiałowi,  
mojemu Promotorowi, za cierpliwość, cenne rady, dopingowanie do pracy i czas poświęcony  
w toku realizacji projektu.*

*Składam również podziękowania Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikiowi  
za ogromną życzliwość, opiekę i umożliwienie przeprowadzenia badań  
w II Katedrze Chorób Wewnętrznych.*

*Chciałabym także wyrazić wdzięczność Panu Doktorowi Jakubowi Swadźbie  
za życzliwość i zaangażowanie,  
bez którego realizacja tego projektu nie byłaby możliwa.*

# SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP</b>	8
1.1. Rys Historyczny	9
1.1.1. Białkowe kofaktory przeciwciał antyfosfolipidowych: β <sub>2</sub> -glikoproteina I i protrombina	10
1.1.1.1. β <sub>2</sub> -glikoproteina I (β <sub>2</sub> GPI, apolipoproteina H)	10
1.1.1.2. Protrombina	11
1.2. Rola fosfolipidów w procesach hemostazy	12
1.3. Rodzaje przeciwciał przeciwfosfolipidowych	13
1.4. Etiologia i mechanizm prozakrzepowego działania przeciwciał przeciwfosfolipidowych	14
1.5. Zespół antyfosfolipidowy (APS) – kryteria rozpoznawania	20
1.6. Antykoagulant toczniowy (LA)	21
1.6.1. Mechanizm antykoagulacyjnego działania LA <i>in vitro</i>	21
1.6.2. Wykrywanie LA	22
1.6.3. Kontrola jakości oznaczania antykoagulantu toczniowego	23
1.7. Przeciwciała przeciwko kardiolinie (aCL)	24
1.8. przeciwciała przeciwko β <sub>2</sub> -glikoproteinie I (aβ <sub>2</sub> GPI)	26
<b>2. UZASADNIENIE I CEL BADANIA</b>	29
<b>3. MATERIAŁ I METODY</b>	30
3.1. Oznaczanie antykoagulantu toczniowego (LA)	30
3.2. Oznaczanie przeciwciał antykardiolinowych (aCL)	31
3.2.1. Ocena zmienności wewnątrz serii i między seriami dla aCL	32
3.3. Oznaczanie przeciwciał przeciwko β <sub>2</sub> -glikoproteinie I	33
3.4. Analiza statystyczna	34

3.5. Przebieg badania	34
3.5.1. I i III etap badania	35
3.5.2. II etap badania	36
<b>4. WYNIKI</b>	37
4.1. Charakterystyka grup badanych	37
4.1.1. Grupa osób zdrowych (grupa kontrolna)	37
4.1.2. Grupa pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi (grupa badana)	37
4.2. I etap badania	38
4.2.1. Antykoagulant toczniowy	38
4.2.2. Przeciwciała antykardiolipinowe (aCL)	39
4.2.2.1. Wyznaczenie punktu odcięcia ( <i>cut off</i> ) dla wartości prawidłowych aCL IgG i IgM	39
4.2.2.2. Ocena zmienności wewnątrz serii dla aCL	40
4.2.2.3. Ocena zmienności pomiędzy seriami dla aCL	41
4.2.3. Przeciwciała przeciwko $\beta_2$ -glikoproteinie I ( $a\beta_2$ GPI)	46
4.2.3.1. Wyznaczenie punktu odcięcia ( <i>cut off</i> ) dla wartości prawidłowych $a\beta_2$ GPI IgG i IgM	46
4.3. II etap badania	47
4.3.1. Antykoagulant toczniowy (przeciwciała monoklonalne o własnościach LA, skierowane przeciwko $\beta_2$ GPI i protrombinie)	47
4.3.2. Przeciwciała antykardiolipinowe (aCL)	52
4.3.3. Przeciwciała przeciwko $\beta_2$ GPI ( $a\beta_2$ GPI)	53
4.4. III etap badania	55
4.4.1. Antykoagulant toczniowy (LA)	55
4.4.2. aCL w grupie pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi	55
4.4.3. $a\beta_2$ GPI w grupie osób z chorobami autoimmunologicznymi	56

4.4.4. Współwystępowanie przeciwciał antyfosfolipidowych	57
4.4.5. Przeciwciała antyfosfolipidowe a ryzyko wystąpienia powikłań klinicznych (zakrzepicy i powikłań położniczych)	60
<b>5. DYSKUSJA</b>	62
<b>6. WNIOSKI</b>	73
<b>7. STRESZCZENIE</b>	74
<b>8. SUMMARY</b>	76
<b>9. PIŚMIENNICTWO</b>	78

## WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

<b>a<math>\beta</math><sub>2</sub>GPI</b>	-przeciwciała przeciwko $\beta$ <sub>2</sub> -glikoproteinie I
<b>aCL</b>	-przeciwciała antykardiolipinowe
<b>APC</b>	-aktywna forma białka C ( <i>activated protein C</i> )
<b>aPL</b>	-przeciwciała antyfosfolipidowe ( <i>antiphospholipid antibodies</i> )
<b>APS</b>	-zespół antyfosfolipidowy ( <i>antiphospholipid syndrome</i> )
<b>aPTT</b>	-czas częściowej tromboplastyny po aktywacji
<b><math>\beta</math><sub>2</sub>GPI</b>	- $\beta$ <sub>2</sub> -glikoproteina I
<b>dPT</b>	-czas protrombinowy ze znacznym rozcieńczeniem tromboplastyny
<b>dRVVT</b>	-czas krzepnięcia aktywowany jadem żmii Russela (DVV test)
<b>dRVVT confirm</b>	-test normalizacji czasu DVV po dodaniu nadmiaru fosfolipidów (DVV confirm)
<b>ELISA</b>	-metoda immunoenzymatyczna ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
<b>EPCR</b>	-śródbłonkowy receptor dla białka C ( <i>endothelial cell protein C receptor</i> )
<b>HCAL i EY2C9</b>	-mysie, humanizowane przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiej $\beta$ <sub>2</sub> -glikoproteinie I
<b>LA</b>	-antykoagulant toczniowy ( <i>lupus anticoagulant</i> )
<b>PAI-1</b>	-inhibitor aktywatora plazminogenu -1
<b>PAPS</b>	-pierwotny zespół antyfosfolipidowy ( <i>primary antiphospholipid syndrome</i> )
<b>PT</b>	-czas protrombinowy
<b>PTT LA</b>	-czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, o wysokiej wrażliwości na LA
<b>RIA</b>	-metoda radioimmunoenzymatyczna
<b>SAPS</b>	-wtórny zespół antyfosfolipidowy ( <i>secondary antiphospholipid syndrome</i> )
<b>SLE</b>	-toczeń rumieniowaty układowy ( <i>systemic lupus erythematosus</i> )
<b>SLE-like</b>	-zespół toczniopodobny ( <i>lupus-like syndrome</i> )
<b>Staclot LA</b>	-czas neutralizacji fosfolipidami płytek krwi w formie heksagonalnej
<b>TFPI</b>	-inhibitor czynnika tkankowego ( <i>tissue factor pathway inhibitor</i> )
<b>VDRL</b>	-odczyn kiłowy nieswoisty ( <i>veneral disease research laboratory test</i> )

- 23H9** -mysie przeciwciała monoklonalne o własnościach antykoagulantu toczniowego, zależnego od  $\beta_2$ -glikoproteiny I
- 28F4** -mysie przeciwciała monoklonalne o własnościach antykoagulantu toczniowego, zależnego od protrombiny

## 1. WSTĘP

Przeciwciała antyfosfolipidowe (aPL) stanowią zróżnicowaną, niejednorodną grupę immunoglobulin. Skierowane są one przeciwko białkom związanym w kompleksy z fosfolipidami (głównie ujemnie naładowanymi). Najważniejsze z nich to  $\beta_2$ -glikoproteina I ( $\beta_2$ -GPI) oraz protrombina. Ponieważ fosfolipidy są niezbędne dla procesów hemostazy, autoprzeciwciała te interferują z procesami krzepnięcia krwi, sprzyjając powstawaniu zakrzepicy.

Współistnienie przeciwciał antyfosfolipidowych z charakterystycznymi dla ich obecności objawami klinicznymi to kryteria pozwalające na rozpoznanie zespołu antyfosfolipidowego, uważanego obecnie za jedną z najczęstszych chorób autoimmunologicznych na świecie.

Zespół antyfosfolipidowy najczęściej występuje u chorych z toczeniem rumieniowatym układowym (wtórny zespół antyfosfolipidowy), ale rozpoznawany jest także u osób bez cech innej choroby autoimmunologicznej (pierwotny zespół antyfosfolipidowy).

Przeciwciała antyfosfolipidowe wykrywa się dwiema niezależnymi metodami: koagulometryczną (antykoagulant toczeniowy) i immunoenzymatyczną (np. przeciwciała przeciwko kardiolinie, czy  $\beta_2$ -glikoproteinie).



### 1.1. Rys historyczny.

Pierwszym odkrytym przeciwciałem z grupy antyfosfolipidowych była tzw. reagina, opisana przez A. Wassermana w 1906 roku, u chorych zakażonych krętkiem kiły<sup>1</sup>. Antygenem stosowanym do jej wykrywania w teście VDRL (*veneral disease research laboratory test*) był alkoholowy wyciąg z serca wołu nazwany przez Pangborna kardiolipiną<sup>2</sup>. Okazało się jednak, że testy te nie są swoiste dla kiły, a fałszywie dodatnie odczyny pojawiały się szczególnie często u chorych z toczeniem rumieniowatym układowym (*systemieć lupus erythematosus* - SLE).

W 1952 roku Conley i Hartman stwierdzili u dwóch osób cierpiących na SLE przedłużenie czasów krzepnięcia osocza, związane z obecnością krążącego antykoagulantu, który blokował fosfolipidy aktywujące krzepnięcie osocza *in vitro*<sup>3</sup>. Po 11 latach Bowie i współpracownicy odkryli, że występowanie krążącego antykoagulantu paradoksalnie wiąże się ze zwiększoną częstością występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych<sup>4</sup>. W 1972 roku Feinstein i Rappaport nazwali tę grupę przeciwciał antykoagulantem toczniowym (*lupus anticoagulant* – LA)<sup>5</sup>.

W 1983 roku E.N. Harris stosując metodę radioimmunoenzymatyczną (RIA) odkrył przeciwciała przeciwko kardiolipinie (aCL), a następnie, po upływie zaledwie dwóch lat, opracował metodę immunoenzymatyczną (ELISA) wykorzystywaną do dnia dzisiejszego<sup>6</sup>.

To także Harris w 1987 roku wprowadził definicję zespołu antyfosfolipidowego (*antiphospholipid syndrom* – APS). Charakteryzuje go współwystępowanie przeciwciał antyfosfolipidowych z objawami zakrzepicy żyłnej lub tętniczej, a u kobiet powikłań położniczych, głównie w postaci nawykowych poronień oraz przedwczesnych porodów<sup>7</sup>.

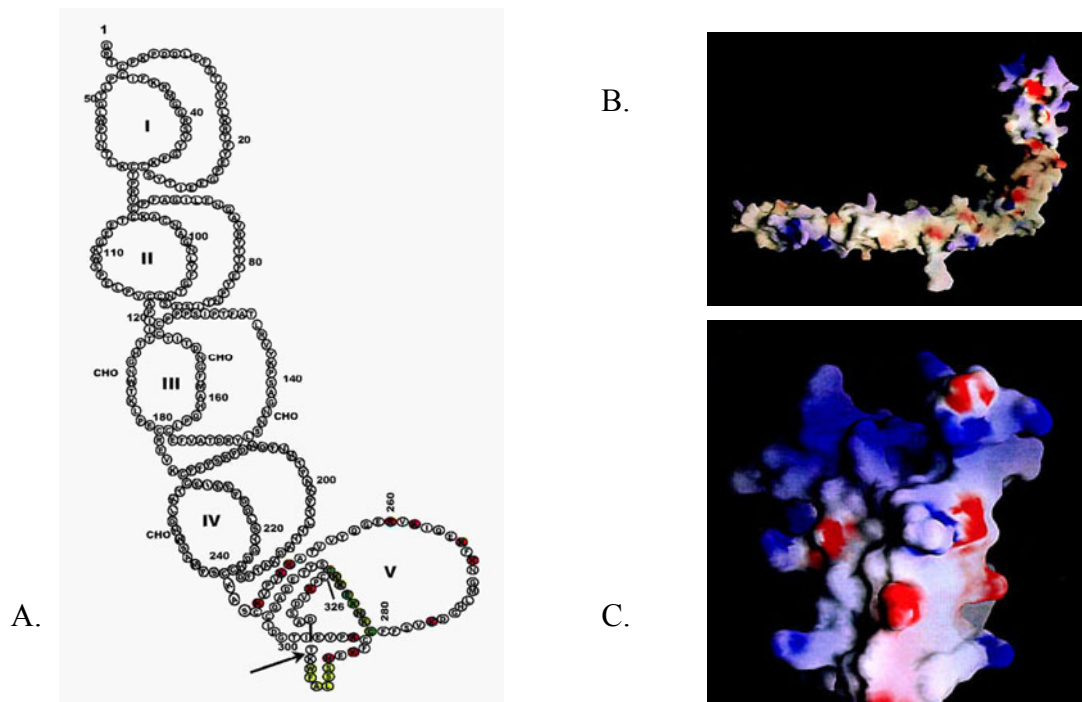
Przełom w badaniach nad przeciwciałami antyfosfolipidowymi to rok 1990, kiedy to trzy niezależne grupy badaczy odkryły niezbędny do wiązania się przeciwciał antykardiolipinowych z kardiolipiną białkowy kofaktor –  $\beta_2$ -glikoproteinę I ( $\beta_2$ GPI),<sup>8, 9, 10</sup>.

W rok później wykazano, że także protrombina może być podobnie działającym kofaktorem.<sup>11</sup>. Podobną rolę mogą także odgrywać między innymi: białko C, białko S, aneksyna V, trombomodulina, wysoko lub niskocząsteczkowy kininogen, czynnik XI, inhibitor czynnika tkankowego (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*), kompleks aktywnego czynnika VII z czynnikiem VII (VIIa/VII)<sup>12, 13, 14, 15, 16</sup>.

### **1.1.1. Białkowe kofaktory przeciwciał antyfosfolipidowych: $\beta_2$ -glikoproteina I i protrombina.**

#### **1.1.1.1. $\beta_2$ -glikoproteina I ( $\beta_2$ GPI, apolipoproteina H).**

$\beta_2$ GPI, po raz pierwszy opisana przez Schulza w 1961 roku, jest syntetyzowana przede wszystkim w wątrobie, a w mniejszych ilościach przez komórki śródbłonna i łożyska. Występuje w osoczu w stężeniu około 150  $\mu\text{g/ml}$ . Białko o masie 44 kD posiada cztery boczne łańcuchy wodorowęglanowe, które stanowią około 15% całkowitej masy cząsteczki białka. Cząsteczkę tworzy pojedynczy łańcuch polipeptydowy (326 aminokwasów), który składa się z pięciu struktur - domen (tzw. "sushi domain"). Każda domena składa się z 60 aminokwasów (domeny od I do IV) z wyjątkiem domeny V, która składa się z 82 aminokwasów i zawiera dodatkowe cząsteczki cysteiny, które nadają jej właściwości hydrofobowe. Stąd domena ta staje się miejscem wiązania  $\beta_2$ GPI do ujemnie naładowanych fosfolipidów<sup>17</sup>. Wiązanie  $\beta_2$ GPI z fosfolipidami nie wymaga obecności jonów wapnia.



Rys.1 Cząsteczka  $\beta_2$ GPI A. schemat struktury molekularnej  $\beta_2$ GPI; B. obraz cząsteczki  $\beta_2$ GPI z mikroskopu elektronowego; C. obraz domeny V z mikroskopu elektronowego.

Potencjalny wpływ  $\beta_2$ GPI na zjawiska hemostazy związany jest m.in. z hamowaniem aktywacji wewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia<sup>18</sup>, aktywacją protrombinazy<sup>19</sup>, zależną od ADP agregacją płytek<sup>20</sup> oraz hamowaniem układu białka C<sup>21</sup>.

### 1.1.1.2. Protrombina

Protrombina jest syntetyzowana w wątrobie z udziałem witaminy K. Cząsteczka protrombiny jest pojedynczym łańcuchem glikoproteinowym o masie 72 kD, składającym się z 579 aminokwasów. W osoczu krąży w postaci nieczynnego zymogenu, w stężeniu około 1,5  $\mu\text{mol/l}$ .

Jest prekursorem trombiny, kluczowego enzymu w tworzeniu skrzepu poprzez przekształcenie cząsteczki fibrynogenu w monomery fibryny, aktywację czynnika XIII,

stabilizującego skrzep, oraz działanie nasilające własną produkcję w wyniku aktywacji czynnika V i VIII. Trombina aktywuje także antykoagulacyjny układ białka C.

Epitopy rozpoznawane przez autoprzeciwciała skierowane przeciwko protrombinie nie zostały jeszcze w pełni scharakteryzowane. Opisano mechanizmy wiązania tych przeciwciał do protrombiny,  $F_{1+2}$  i fragmentu 1<sup>22, 23</sup>. Puurunen opisała epitopy dla przeciwciał przeciwko protrombinie usytuowane pomiędzy aminokwasami 210-229, na *kringlu* 2<sup>24</sup>.

## **1.2. Rola fosfolipidów w procesach hemostazy.**

Fosfolipidy to lipidy zbudowane z glicerolu, dwóch łańcuchów kwasu tłuszczowego i fosforylowanego alkoholu (np. choliny, seryny, inozytolu lub etanolaminy). Występują one we wszystkich błonach biologicznych, asymetrycznie rozmieszczone po obu jej stronach, co jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek. Po stronie zewnętrznej najczęściej występują fosfolipidy obojętne (np. fosfatydylocholina), a ujemnie naładowane (fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol, kwas fosfatydowy) znajdują się po wewnętrznej stronie błony<sup>25, 26</sup>. Kardiolipina, powszechnie wykorzystywana w testach *in vitro* do diagnostyki przeciwciał antyfosfolipidowych, nie występuje w błonach komórkowych lecz w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Tak więc nie jest ona prawdopodobnie prawdziwym antygenem dla przeciwciał antyfosfolipidowych, a jedynie reaguje krzyżowo z większością przeciwciał skierowanych przeciwko ujemnie naładowanym fosfolipidom<sup>27</sup>.

Fosfolipidy współuczestniczą w wielu reakcjach procesu hemostazy, wchodzi m.in. w skład kompleksu protrombinazy, oraz jako kofaktor czynnika VIIa i IXa w kompleksie tenazy. Potęgują także aktywację czynnika X przez czynnik VIIa. Podczas aktywacji komórek ujemnie naładowane fosfolipidy ukazują się po stronie zewnętrznej (tzw. ruch „flip-flop”), co zapoczątkowuje wiele procesów, zachodzących na ich powierzchni. Odslonięcie fosfatydyloseryny w płytkach krwi powoduje przyłączenie się do niej kompleksu

protrombinazy, co prowadzi do generacji trombiny<sup>28</sup>. Przemieszczenie i odsłonięcie fosfolipidów na komórkach śródbłonna umożliwia natomiast aktywację układu białka C, hamującego procesy krzepnięcia krwi. Są one także niezbędne dla rozwinięcia pełnego działania inhibitora czynnika tkankowego (TFPI).

Udowodniono także, że erythrocyty wykazujące na swojej powierzchni obecność fosfatydyloseryny mają zdolność inicjowania alternatywnej drogi aktywacji układu dopełniacza. Erythrocyty te, traktowane już jako uszkodzone, są rozpoznawane przez fagocyty i wychwytywane przez śledzionę<sup>29</sup>.

### **1.3. Rodzaje przeciwciał przeciwfosfolipidowych.**

Przeciwciała przeciwfosfolipidowe to heterogenna grupa immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) występująca u około jednej trzeciej chorych na SLE<sup>30</sup> oraz inne choroby autoimmunologiczne - głównie małopłytkowość samoistną, niedokrwistość autoimmunohemolityczną, rzadziej inne<sup>31</sup>.

Mogą występować jako alloprzeciwciała lub autoprzeciwciała<sup>32</sup>.

Alloprzeciwciała, czyli tzw. prawdziwe przeciwciała przeciwfosfolipidowe (skierowane przeciw fosfolipidom), nie wymagają białkowych kofaktorów i nie wiążą się ani ze zjawiskiem antykoagulantu toczniowego, ani z ryzykiem zakrzepicy<sup>33</sup>. Pojawieniu się tych przeciwciał mogą sprzyjać infekcje bakteryjne, wirusowe, a nawet pasożytnicze (Tabela I)<sup>34</sup>. Mogą towarzyszyć także schorzeniom hematologicznym i nowotworowym, np. rakowi płuca, prostaty, chłoniakom nieziarnicznym lub białaczce włochatokomórkowej<sup>35</sup> a także być indukowane przyjmowaniem niektórych leków (chloropromazyny, prokainamidu)<sup>36</sup>.

Tabela I. Infekcje, którym towarzyszą przeciwciała przeciwfosfolipidowe.

Infekcje wirusowe	Adenowirusy, CMV, EBR, Hepatitis C, HIV, wirus różyczki, parwowirus B19, wirus ospy
Infekcje bakteryjne	gruźlica, Salmonella, trąd, gorączka Q krwotoczna, zakażenia Staphylococcami i Streptococcami, leptospiroza, kiła
Infekcje pasożytnicze	malaria, toksoplazmoza, choroba Kala-Azar

Autoprzeciwciała, spotykane w chorobach tkanki łącznej, odpowiadają za zjawisko antykoagulantu toczniowego, fałszywie dodatniego odczynu kiłowego oraz związane są ryzykiem powikłań zakrzepowych. Skierowane są przeciwko kompleksom białek i fosfolipidów<sup>33</sup>.

Przypuszcza się, że istnieją predyspozycje genetyczne do wytwarzania przeciwciał przeciwfosfolipidowych. Może to mieć związek z antygenami układu HLA (np. DR 53, DR 4)<sup>37</sup>.

#### **1.4. Etiologia i mechanizm prozakrzepowego działania przeciwciał przeciwfosfolipidowych.**

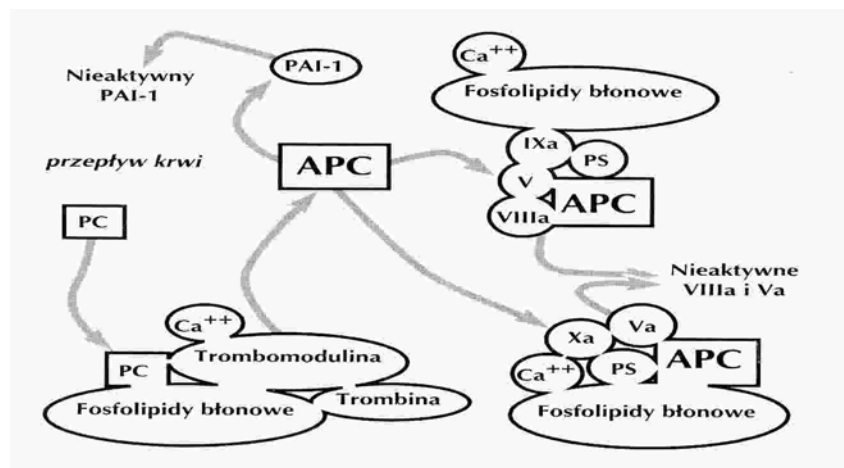
Brak jednoznacznej odpowiedzi jakie są przyczyny powstawania przeciwciał przeciwfosfolipidowych. Najbardziej prawdopodobna wydaje się być hipoteza Arnouta z 1996 roku. Ujemnie naładowane fosfolipidy, przede wszystkim fosfatydyloseryna, znajdują się po wewnętrznej stronie błony komórkowej, pojawiają się na jej powierzchni w trakcie aktywacji lub uszkodzenia komórki a także podczas apoptozy. Do fosfolipidów tych wykazuje powinowactwo  $\beta_2$ -glikoproteina I, która wiążąc się z nimi zmienia swoją konformację, a tak powstały kompleks w określonych warunkach może zapoczątkować

reakcję autoimmunologiczną i pojawienie się skierowanych przeciwko niemu autoprzeciwciał<sup>38</sup>.

Etiopatogeneza prozakrzepowego działania przeciwciał przeciwfosfolipidowych *in vivo* pozostaje wciąż niewyjaśniona. Istnieje kilka hipotez, które próbują wyjaśnić ten mechanizm, aczkolwiek żadna z nich nie daje pełnej odpowiedzi.

Jedną z nich dotyczy hamowania antykoagulacyjnego układu białka C.

Białko C to endogenny inhibitor krzepnięcia syntetyzowany w wątrobie w sposób zależny od witaminy K. Jego kofaktorem jest białko S (również produkowane w wątrobie w sposób zależny od witaminy K), które wielokrotnie zwiększa aktywność białka C. W skład układu antykoagulacyjnego białka C wchodzi także: trombomodulina (białko receptorowe śródbłonnka naczyniowego dla trombiny) i śródbłonkowy receptor dla białka C (EPCR, *endothelial cell protein C receptor*). Aktywna forma białka C (APC, *activated protein C*) powstaje na powierzchni ujemnie naładowanych fosfolipidów, a sygnałem do rozpoczęcia tej reakcji jest wiązanie trombiny z trombomoduliną. Przeciwwzakrzepowe działanie APC polega na inaktywacji i degradacji aktywnych czynników V i VIII. APC inaktywuje także inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1). Przeciwciała antyfosfolipidowe blokują fosfatydyloetanolaminę, niezbędną dla inaktywacji aktywnego czynnika Va przez aktywowane białko C. Stąd być może zjawisko nabytej oporności na działanie aktywnego białka C, spotykane u ludzi z obecnymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi<sup>39</sup>.



Rysunek 2. Schemat antykoagulacyjnego działania układu białka C (PC - białko C; APC - aktywne białko C; PS - białko S; PAI-1 - inhibitor aktywatora plazminogenu; Va, VIIIa, Xa – aktywne formy czynników krzepnięcia V, VIII i X).

Wpływ aPL na układ białka C może też tłumaczyć tzw. paradoks trombiny. Otóż trombina w niewielkich stężeniach jest przede wszystkim aktywatorem białka C, natomiast jej działanie prokoagulacyjne w tym zakresie stężeń jest niewielkie. Blokowanie tej minimalnej generacji trombiny przez aPA powodowałoby obniżenie aktywacji białka C, a więc zwiększone ryzyko powikłań zakrzepowych.

Inna hipoteza dotyczy hamowania antykoagulacyjnego działania aneksyny V.

Aneksyna V należy do rodziny białek o wysokim powinowactwie do fosfolipidów w obecności jonów wapnia. Po raz pierwszy została wyizolowana z łożyska (stąd nazwa łożyskowy czynnik przeciwkrzepliwy 1, *placental anticoagulant-1*), a następnie także z płuc, wątroby i śledziony<sup>40</sup>. W procesach krzepnięcia pełni rolę inhibitora czynnika X, protrombiny oraz kompleksu czynnika tkankowego z czynnikiem VII<sup>41, 42, 43</sup>.

Rand opisał mechanizm antykoagulacyjnego działania aneksyny w zakrzepicy naczyń łożyska<sup>44</sup>. Mikrokosmki syncytiotrofoblastu pokryte są aneksyną V, która przylegając do powierzchniowych fosfolipidów chroni je przed kontaktem z osocзовymi czynnikami krzepnięcia. Przeciwciała antyfosfolipidowe, w kompleksach z ich białkowymi kofaktorami,



wypierają aneksynę z jej połączeń z fosfolipidami, uszkadzając w ten sposób ochronną „tarczę aneksynową”. Mechanizm ten mógłby być przyczyną niepowodzeń położniczych.

Przeciwciała antyfosfolipidowe mogą także upośledzać procesy fibrylizy.

Opisano przeciwciała przeciwko tkankowemu aktywatorowi plazminogenu (anty-tPA) obecne w osoczu pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym, a skierowane przeciwko katalitycznej domenie tego aktywatora, które hamują jego aktywność<sup>45</sup>.

B<sub>2</sub>GPI może także hamować wytwarzanie plazminy. Plazmina powoduje proteolizę cząsteczki β<sub>2</sub>GPI pomiędzy Lys 317 a Thr 318 w domenie V, w wyniku czego traci ona powinowactwo do fosfolipidów a nabywa zdolności do wiązania się z plazminogenem. To z kolei może zmniejszać ilość tworzącej się z plazminogenu plazminy<sup>46</sup>. Guerin wykazał, że jednym z czynników przyspieszających proteolizę β<sub>2</sub>GPI pod wpływem plazminy jest heparyna<sup>47</sup>.

W zespole antyfosfolipidowym mogą także powstać przeciwciała przeciwko TFPI, obniżając jego aktywność.

TFPI (inhibitor zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia – *tissue factor pathway inhibitor*), jest białkiem osoczym syntetyzowanym głównie przez śródbłonek naczyniowy, wątrobę i megakariocyty. Cząsteczka posiada trzy domeny, które zawierają miejsca wiążące dla kompleksu TF/VIIa, czynnika Xa oraz heparyny. Aktywna postać TFPI (aktywacja cząsteczki następuje po przyłączeniu czynnika Xa) inaktywuje kompleks TF/VIIa.

Salemniak<sup>48</sup> jako pierwszy zauważył u pacjentów z obecnymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi zwiększoną generację czynnika Xa i zmniejszone stężenie TFPI. Sugerował on także, że aktywność przeciwciał anti-TFPI jest konsekwencją obecności przeciwciał przeciwko β<sub>2</sub>GPI. Anti-β<sub>2</sub>GPI hamują inhibitorową aktywność TFPI ponieważ kompleksy anti-β<sub>2</sub>GPI/β<sub>2</sub>GPI konkurują z kompleksami TFPI/FXa o miejsca wiązania na powierzchni fosfolipidów. Tak więc, zarówno przeciwciała przeciwko TFPI jak i przeciwko

$\beta_2$ GPI mogą wpływać na obniżenie aktywności TFPI. Anty-TFPI, w obecności ujemnie naładowanych fosfolipidów, *in vitro*, zmniejszają zależną od TFPI inhibicję czynnika Xa.

Obecność wysokich stężeń anty-TFPI wydaje się być charakterystyczna dla pacjentów z obecnymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi i bardzo wysokim ryzykiem wystąpienia powikłań klinicznych<sup>49</sup>.

W patogenezie powikłań zakrzepowych istotne znaczenie przypisuje się dimerycznej formie  $\beta_2$ -glikoproteiny I.

Dimeryczna forma  $\beta_2$ GPI powstaje podczas związania się jej dwu cząsteczek jednocześnie z dwoma ramionami przeciwciała. Wykazuje ona zwiększone powinowactwo do fosfolipidów. W takiej postaci cząsteczka  $\beta_2$ GPI wiąże się także z siarczanem heparanu na powierzchni błony komórkowej. W wyniku tego na drodze receptorowej może dochodzić do aktywacji komórek<sup>50</sup>. Konsekwencją aktywacji komórek śródbłónka jest zwiększona ekspresja czynnika tkankowego. Przypuszcza się, że funkcję takiego receptora dla przeciwciał antyfosfolipidowych na komórkach śródbłónka mogłaby pełnić aneksyna A2<sup>51</sup>.

Natomiast z płytkami krwi dimeryczne formy  $\beta_2$ GPI wiążą się za pośrednictwem receptora apoER2' (*apolipoprotein E receptor 2*') obecnego na błonie płytki. Skutkiem jest zwiększona adhezja płytek do kolagenu w modelu *in vitro*<sup>52</sup> oraz wzrost syntezy tromboksanu A2 w płytkach w modelu *in vivo*. Opisywano znacznie podwyższone wydalanie końcowych produktów metabolizmu tromboksanu A2 u chorych z zespołem antyfosfolipidowym<sup>53</sup>.

Istotną rolę przypisuje się także mikrocząstkom (*microparticles*) różnych typów.

Mikrocząstki to fragmenty błon komórkowych, które ulegają oderwaniu od aktywowanych lub ulegających apoptozie komórek (płytki krwi, komórki śródbłónka, monocyty oraz granulocyty). Zwiększoną ich ilość obserwuje się między innymi w stanach zapalnych oraz pod wpływem czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) i stresu oksydacyjnego.

Morel w 2004 roku wykazał, że mikrocząstki pochodzenia płytkowego i leukocytnego wiążą się z aktywowanymi komórkami śródbłonka za pośrednictwem E-selektyny i P-selektyny. To powoduje lokalny wzrost czynnika tkankowego w osoczu, sprzyjający aktywacji krzepnięcia i tworzeniu się zakrzepu. Mechanizm ten wydaje się być znaczący w patogenezie nadkrzepliwości i zakrzepicy w stanach zapalnych<sup>54</sup>.

Grupa Ferrary w 2004 roku udowodniła, że aPL zwiększają ekspresję czynnika tkankowego na komórkach śródbłonka u pacjentów z pierwotnym i wtórnym zespołem antyfosfolipidowym, u których osoczowy poziom czynnika tkankowego jest zazwyczaj podwyższony<sup>55</sup>.

Dignat-George natomiast w swoich badaniach wykazała zwiększoną ilość mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego w osoczu pacjentów z PAPS i SAPS. Wiązanie się przeciwciał antyfosfolipidowych z komórkami śródbłonka zapoczątkowuje proces jego aktywacji i zwiększenie ekspresji czynnika tkankowego oraz molekuł adhezyjnych, w wyniku czego następuje zmiana fenotypu śródbłonka z przeciwwakrzepowego na prozakrzepowy. Co ciekawe zaobserwowano również korelację pomiędzy stężeniem mikrocząstek w osoczu a długością czasu krzepnięcia aktywowanego jadem żmii Russella, który to test wykazuje silną korelację z epizodami zakrzepowymi<sup>56</sup>.

### 1.5. Zespół antyfosfolipidowy (APS) – kryteria rozpoznawania.

Aktualnie obowiązujące kryteria opracowano w 1998 roku w Sapporo, uaktualniono w 2004<sup>57</sup>, a opublikowano dopiero w styczniu 2006 roku<sup>58</sup>.

Tabela II. Kryteria rozpoznawania zespołu antyfosfolipidowego.

Kryterium kliniczne	Kryterium laboratoryjne
1. Zakrzepica - żylna - tętnicza - drobnych naczyń	1. dodatni LA 2. aCL IgG i (lub) IgM, w stężeniach średnich lub wysokich (tj. > 40 GPL* lub MPL*, lub > 99 percentyla)
2. Powikłania położnicze - samoistne poronienia do 10 tygodnia ciąży (≥ 3) - martwe urodzenia przed 34 tyg. ciąży (≥ 1)	3. obecność aβ <sub>2</sub> GPI IgG i (lub) IgM, w stężeniach > 99 percentyla

\* GPL (IgG), MPL (IgM) – umowne jednostki międzynarodowe, odpowiadające stężeniu przeciwciał około 1 µg/ml.

W Sydney zaproponowano także podział APS na dwa typy (I i II) w oparciu o rozszerzone kryteria laboratoryjne (tabela III).

Tabela III. Laboratoryjne kryteria rozpoznawania APS

Typ	Kryteria laboratoryjne
<b>I.</b>	więcej niż jedno jakiegokolwiek kryterium laboratoryjne
<b>II a.</b>	LA dodatni
<b>II b.</b>	aCL (IgG i/lub IgM), 99 percentyl lub > 40 GPL, MPL
<b>II c.</b>	a $\beta_2$ GPI (IgG i/lub IgM), 99 percentyl

Do rozpoznania APS niezbędne jest spełnienie co najmniej jednego kryterium klinicznego i jednego laboratoryjnego. Dodatnie przeciwciała antykardiolipinowe, przeciwko  $\beta_2$ GPI i/lub obecność antykoagulantu toczniowego powinna być stwierdzona co najmniej dwukrotnie, w odstępie nie krótszym niż 12 tygodni. Pomędzy stwierdzeniem typowych objawów klinicznych, a wykryciem przeciwciał antyfosfolipidowych nie może upłynąć więcej niż 5 lat.

### 1.6. Antykoagulant toczniowy (LA).

LA to także heterogenna grupa przeciwciał pośród przeciwciał antyfosfolipidowych, wykrywana metodami koagulometrycznymi. Ich powinowactwo do fosfolipidów i białkowych kofaktorów jest różna. Uważa się, że obecność LA wiąże się z dużym ryzykiem wystąpienia powikłań zakrzepowych<sup>59, 60</sup>.

#### 1.6.1 Mechanizm atykoagulacyjnego działania LA *in vitro*.

Biwalentne przeciwciała o własnościach LA, wiążąc dwie cząsteczki  $\beta_2$ GPI znacząco zwiększają jej powinowactwo do fosfolipidów (nawet 1000 krotnie), dzięki czemu mogą

konkurować z czynnikami krzepnięcia o katalityczną powierzchnię fosfolipidową, opóźniając reakcje prokoagulacyjne i antykoagulacyjne<sup>61, 62</sup>.

Uważa się, że obecność antykoagulantu toczniowego zależnego od przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI związana jest z większym ryzykiem wystąpienia powikłań zakrzepowych<sup>63</sup>.

Także przeciwciała przeciwko protrombinie wykazują aktywność antykoagulantu toczniowego. Niektóre z autoprzeciwciał antyprotrombinowych mogą zwiększać wiązanie protrombiny do ujemnie naładowanych fosfolipidów, poprzez tworzenie biwalentnych kompleksów<sup>64, 65</sup>. W tej postaci mogą konkurować z czynnikami krzepnięcia. Ich związek z powikłaniami zakrzepowymi jest mocno dyskusyjny<sup>66, 67</sup>.

Zaproponowano dwie metody, które mogłyby rozróżnić LA zależny od przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI i protrombinie<sup>68, 69</sup>. Simmelink<sup>64</sup> do wykrywania LA zależnego od przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI zaproponowała test APTT z wykorzystaniem różnych stężeń kardiolipiny. Dodanie kardiolipiny powoduje skrócenie czasu krzepnięcia w przypadku obecności przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI. Efektu tego nie obserwuje się jeśli LA jest zależny od przeciwciał przeciwko protrombinie.

Pengo<sup>65</sup> natomiast wykazał, że redukcja stężenia jonów wapnia w teście dRVVT lub dPT wydłuża czasy krzepnięcia tylko w przypadku LA zależnego od  $\alpha\beta_2$ GPI. Znaczenie kliniczne takiego laboratoryjnego różnicowania LA nie zostało dotąd potwierdzone.

### **1.6.2. Wykrywanie LA**

Materiałem do badania jest ubogopłytkowe osocze cytrynianowe (liczba płytek powinna być mniejsza niż  $1 \times 10^{10}/l$ ), aby uniknąć kontaminacji fosfolipidami płytek krwi. Zaleca się wykonanie oznaczeń w dniu pobrania krwi (w czasie nie dłuższym niż dwie godziny). Jeśli nie ma takiej możliwości osocze winno być szybko zamrożone w temperaturze  $-70^\circ\text{C}$ ; należy unikać kilkakrotnego zamrażania i rozmrażania badanych próbek<sup>70, 71</sup>.

Ze względu na trudności w prawidłowym rozpoznawaniu obecności LA (wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne) Międzynarodowy Komitet Standaryzacyjny ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) opracował wytyczne do oznaczania i rozpoznawania LA<sup>72, 73</sup>. Procedura oznaczania LA jest trój etapowa:

I etap - testy przesiewowe (*screening tests*), wykazanie przedłużenia co najmniej jednego czasu krzepnięcia zależnego od fosfolipidów.

II etap – testy mieszania osocza badanego i osocza kontrolnego (*mixing studies*), wykluczenie niedoboru czynników krzepnięcia, poprzez uzupełnienie ewentualnego niedoboru czynnika krzepnięcia.

III etap – testy potwierdzające (*confirmatory tests*), potwierdzenie swoistości antykoagulantu wobec fosfolipidów (skrócenie czasu krzepnięcia po dodaniu nadmiaru fosfolipidów).

### **1.6.3. Kontrola jakości oznaczania antykoagulantu toczniowego.**

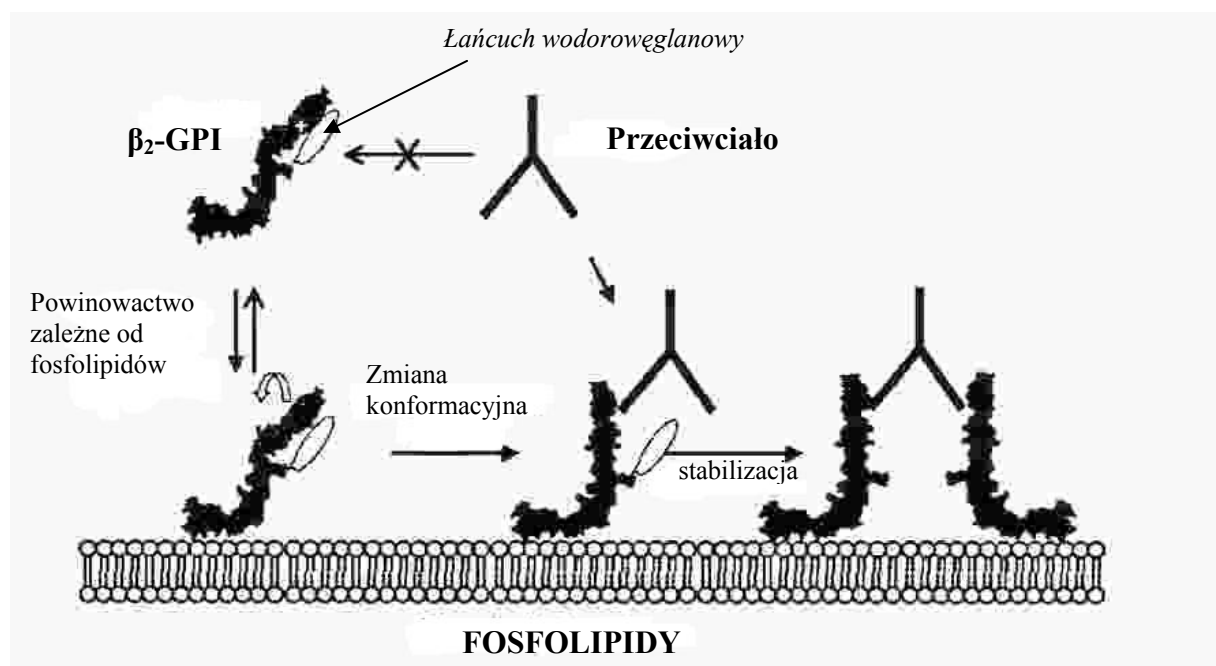
Materiały kontrolne są niezbędne na każdym etapie diagnostyki antykoagulantu toczniowego. Stosowane są bowiem różne zestawy odczynnikowe i różne metody pomiarowe. Aktualnie jako kontrole stosowane są:

- LA-dodatnie i LA-ujemne próbki uzyskiwane z osocza pacjentów (przygotowywane samodzielnie przez laboratoria). Mają one zastosowanie praktycznie tylko dla laboratorium, które przygotowuje dane kontrole, ze względu na ogromną zmienność międzylaboratoryjną.
- komercyjne kontrole, w postaci liofilizatu. Są przeznaczone tylko do pojedynczych testów, nie ma więc możliwości kompleksowej oceny diagnostyki LA.

W 1998 roku Arnout i współpracownicy zaproponowali zastosowanie mysich przeciwciał monoklonalnych przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ -glikoproteinie I ( 22 F 6 i 22 B 3) oraz protrombinie (28 F 4) jako ewentualnego materiału referencyjnego dla oznaczeń LA<sup>74</sup>.

### 1.7. Przeciwciała przeciwko kardiolinie (aCL).

W 1985 roku opracowano i wprowadzono do oznaczania aCL metodę immunoenzymatyczną (ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*)<sup>75</sup>. W metodzie tej wykorzystuje się mikro płytki o małej sile wiązania, a jako antygen kardiolipiny bydlęcej. Przeciwciała antykardiolipinowe wiążą się z kardiolipiną, unieruchomioną na powierzchni płytki za pośrednictwem  $\beta_2$ GPI. Po przyłączeniu się  $\beta_2$ GPI do kardiolipiny poprzez domenę V, białko to ulega zmianom konformacyjnym i odsłonięciu ulega kilka ukrytych epitopów, w tym epitop G40-R43 na domenie I, umożliwiając w ten sposób związanie przeciwciał antykardiolipinowych. Kiedy cząsteczki  $\beta_2$ GPI związane z ujemnie naładowanymi fosfolipidami osiągają wymaganą gęstość, przeciwciała mogą wiązać po dwie cząsteczki białka, zwiększając w ten sposób wzajemne oddziaływanie pomiędzy utworzonymi kompleksami a anionowymi fosfolipidami, stabilizując je<sup>76</sup> (Rys.3). Czyli tak naprawdę w metodzie tej wykrywamy nie aCL a kompleksy aCL z  $\beta_2$ GPI.



Rysunek 3. Mechanizm wiązania się aPL do  $\beta_2$ GPI (wg de Laat, 2006)



Do czasu opublikowania nowych kryteriów z Sydney w 2006 roku, jedynym ogólnodostępnym standardem dla aCL były standardy Harrisa, produkowane w USA. Są to, po osiem dla każdej klasy, liofilizowane próbki o określonym stężeniu przeciwciała, podane w międzynarodowych jednostkach GPL (IgG) i MPL (IgM), które mają odpowiadać stężeniu przeciwciał około 1µg/ml<sup>77</sup>.

Większość laboratoriów pracujących metodami modyfikowanymi lokalnie (*home made*) korzysta ze standardów własnych, tzn. surowicy pacjenta o wysokim mianie przeciwciał w klasie IgG lub IgM.

Różnorodność stosowanych standardów, a także metod do oznaczania aCL jest przyczyną ogromnych różnic w ocenie uzyskiwanych wyników. Czynniki, które wpływają na dużą zmienność międzylaboratoryjną w tych metodach to także:

- pochodzenie, numer serii oraz rozcieńczenie kardiolipiny, wykorzystywanej do opłaszczania płytki
- dobór czynnika blokującego (albumina ludzka czy zwierzęca)
- właściwy dobór buforu płuczającego (z dodatkiem czy bez detergentu)
- czasy inkubacji na poszczególnych etapach procedury
- temperatura przechowywania surowicy pacjentów oraz sposób jej rozcieńczania (tylko w surowicy bydlęcej czy wzbogaconej albuminą i w jakim stosunku)
- sposób kalkulacji wyników w oparciu o krzywą kalibracyjną
- ustalenie punktu odcięcia (*cut off*) dla wartości dodatnich

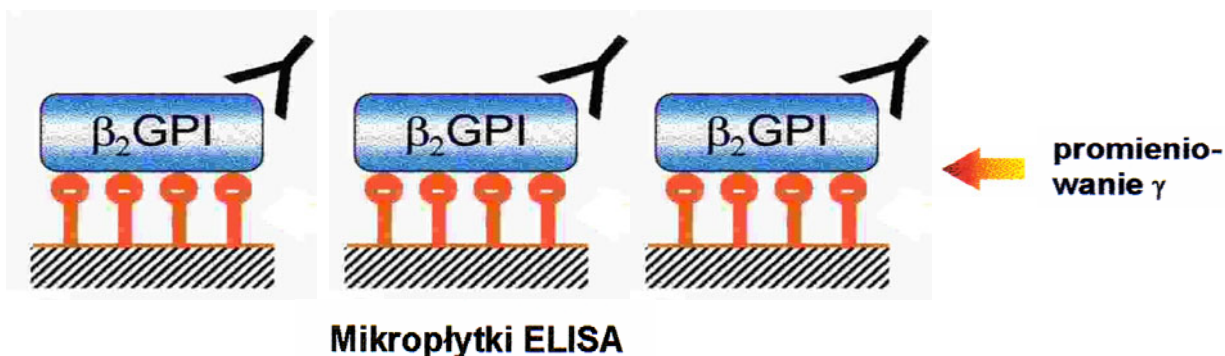
W 1999 roku Ichikawa i Hughes zaproponowali wykorzystanie jako referencyjnych kalibratorów do oznaczania aCL mysich, humanizowanych, monoklonalnych przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI: HCAL dla IgG i EY2C9 dla IgM (tzw. „standardy Sapporo”)<sup>78</sup>.

Jako materiału kontrolnego (dodatniego oraz ujemnego) wykorzystuje się obecnie próbki surowic pacjentów o znanym stężeniu przeciwciał. Rzadziej jako kontroli używa się standardów Harrisa, ze względu na ich bardzo małą powtarzalność w różnych seriach.

### **1.8. Przeciwciała przeciwko $\beta_2$ -glikoproteinie I ( $a\beta_2$ GPI).**

W 1992 roku, Viared jako pierwszy zauważył, że przeciwciała skierowane przeciwko  $\beta_2$ GPI korelują z przypadkami zakrzepicy<sup>79</sup>. De Laat sugeruje nawet, że tylko przeciwciała antyfosfolipidowe o powinowactwie do  $\beta_2$ GPI mają związek z zakrzepicą<sup>80</sup>. Kolejne badania potwierdzały przydatność oznaczania  $a\beta_2$ GPI u pacjentów z klinicznymi objawami zespołu antyfosfolipidowego<sup>66,81,82,83</sup> i w konsekwencji nowe wytyczne z Sydney uwzględniły obecność tych przeciwciał w klasach IgG lub IgM, jako laboratoryjne kryterium APS<sup>59</sup>.

Przeciwciała przeciwko  $\beta_2$ GPI oznacza się metodą immunoenzymatyczną (ELISA), opisaną po raz pierwszy przez Arvieux w 1991 roku<sup>84</sup>, w której przeciwciała obecne w surowicy badanej wiążą się z cząsteczkami ludzkiej  $\beta_2$ GPI unieruchomionymi na powierzchni płytki. Wykorzystuje się mikropłytki o dużej sile wiązania, które przed opłaszczaniem napromieniowuje się promieniami gamma. To utlenienie płytki ma indukować zmiany konformacyjne w obrębie cząsteczki  $\beta_2$ GPI, zwiększając w ten sposób jej powinowactwo do przeciwciał. De Laat w swoich badaniach potwierdził jednak, że to powinowactwo, na skutek braku ujemnie naładowanych fosfolipidów, jest niewielkie (Rys.4)<sup>75</sup>.



Rysunek 4. Schemat oznaczania a $\beta_2$ GPI metodą ELISA.

Sanmarco, w 2005 roku, jako pierwsza zwróciła uwagę na pochodzenie gatunkowe  $\beta_2$ GPI, oraz sposób opłaszczania, jako ewentualną przyczynę ogromnych rozbieżności pomiędzy wynikami uzyskiwanymi w różnych laboratoriach (testy firmowe bądź własne)<sup>85</sup>.

Do 2004 roku praktycznie nie były dostępne żadne materiały kalibracyjne ani kontrolne dla a $\beta_2$ GPI. Większość laboratoriów oznaczała przeciwciała metodami własnymi, a jako kalibratory stosowano surowice pacjentów o wysokim mianie a $\beta_2$ GPI. Także zestawy komercyjne cechowała ogromna różnorodność stosowanych kalibratorów. Stąd na Europejskim Forum dotyczącym przeciwciał antyfosfolipidowych zaproponowano stosowanie jako kalibratorów referencyjnych humanizowanych przeciwciał monoklonalnych przeciwko  $\beta_2$ GPI<sup>86</sup>, wyprodukowanych w Japonii (prof.Koike)<sup>76</sup> i udostępnionych ograniczonej liczbie odbiorców.

Podobnie jak w przypadku aCL, oprócz właściwego doboru  $\beta_2$ GPI i kalibratora, szereg innych czynników ma znaczący wpływ na wynik oznaczania a $\beta_2$ GPI. Są to:

- dobór czynnika blokującego
- właściwy dobór buforu płuczącego (z dodatkiem czy bez detergentu)
- czasy inkubacji na poszczególnych etapach procedury
- temperatura przechowywania surowicy pacjentów oraz sposób jej rozcieńczenia

- sposób kalkulacji wyników w oparciu o krzywą kalibracyjną
- ustalenie punktu odcięcia (*cut off*) dla wartości dodatnich

## 2. UZASADNIENIE I CEL BADANIA.

Jef Arnout, w 1998 roku, uzyskał mysie przeciwciała monoklonalne o własnościach antykoagulantu toczniowego, zależnego od  $\beta_2$ GPI (22F6 i 22B3) oraz protrombiny (28F4) i zaproponował wykorzystanie ich jako referencyjnego materiału kontrolnego w diagnostyce LA.

W 1999 roku grupa, pod kierownictwem prof. Koike, wyprodukowała z kolei mysie, humanizowane przeciwciała przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ GPI (HCAL i EY2C9), i zasugerowała wykorzystanie ich jako referencyjnych kalibratorów do oznaczania aCL oraz a  $\beta_2$ GPI.

Zgodnie z najnowszymi wytycznymi, opublikowanymi w 2006 roku, przeciwciała antyfosfolipidowe stanowią kryterium klasyfikacyjne dla APS, jeśli są oznaczone metodami wystandaryzowanymi, tzn. z wykorzystaniem uznanych kalibratorów tak dla aCL jak i a $\beta_2$ GPI, a w przypadku LA - zgodnie z zaleceniami Komitetu Standaryzacyjnego ISTH<sup>70,71</sup>. Dlatego też konieczne jest przeprowadzenie wielu badań porównawczych, które przyczyniłyby się do ujednoczenia metod oznaczeń przeciwciał antyfosfolipidowych.

Przedstawiona praca miała na celu:

1. Próbę standaryzacji metod oznaczania przeciwciał antyfosfolipidowych w oparciu o dostępne kalibratory w formie przeciwciał monoklonalnych.
2. Ocenę powtarzalności własnych metod oznaczania antykoagulantu toczniowego oraz przeciwciał przeciwko kardiolinie i  $\beta_2$ -glikoproteinie I; w obu przypadkach w klasach IgG i IgM.
3. Weryfikację zmodyfikowanych (2006) kryteriów klasyfikacyjnych zespołu antyfosfolipidowego w oparciu o własny materiał kliniczny.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Oznaczanie antykoagulantu toczeniowego (LA).

Badanie przeprowadzono zgodnie z trójstopniową procedurą zalecaną przez Komitet Standaryzacji Oznaczeń Międzynarodowego Towarzystwa Krzepnięcia Krwi<sup>71, 72</sup>.

I etap – testy przesiewowe:

- PT, czas protrombinowy (Thromborel S, Dade Behring, Niemcy; norma: 0,85-1,15 INR)
- aPTT, czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (Pathromtin SL, Dade Behring, Niemcy; norma: 28-40 s)
- PTTLA, czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, o wysokiej wrażliwości na LA (Diagnostica Stago, Francja, norma: 24-46 s)
- dPT, czas protrombinowy ze znacznym rozcieńczeniem tromboplastyny (wg Arnout)<sup>73</sup>; 50 µl osocza badanego inkubowano z tromboplastyną (Innovin, Dade Behring, Niemcy) rozcieńczoną 1:200 w buforze weronalowym Owrena przez 7 minut, w temperaturze 37°C, a następnie dodawano 50 µl chlorku wapniowego (norma: do 54 s)
- dRVVT, czas krzepnięcia aktywowany jadem żmii Russela (DVV test, American Diagnostica, USA; norma: 31-46 s).

Przedłużenie co najmniej jednego czasu krzepnięcia osocza stanowiło podstawę do wykonania kolejnego etapu badania.

II etap – testy mieszania osocza badanego i osocza kontrolnego. Aby uzupełnić ewentualne niedobory czynników krzepnięcia osocze badane mieszano z osoczem kontrolnym w stosunku 1:1 i wykonywano te same testy co w pierwszym etapie badania. Całkowita (lub prawie całkowita) korekcja czasu krzepnięcia świadczyła o niedoborze czynników krzepnięcia lub

interferencji ze strony doustnych antykoagulantów. Brak skrócenia czasu testu wskazywał na obecność inhibitora krzepnięcia.

III etap – testy potwierdzające. Skrócenie przedłużonego czasu krzepnięcia po dodaniu nadmiaru fosfolipidów świadczy o swoistości inhibitora wobec fosfolipidów i jest ostatecznym dowodem na obecność LA. Zastosowano następujące testy potwierdzające:

- Staclot LA, czas neutralizacji fosfolipidami płytek krwi w formie heksagonalnej (Staclot LA, Diagnostica Stago, Francja; norma: poniżej 8 s)
- 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).

### **3.2. Oznaczanie przeciwciał antykardiolipinowych (aCL).**

aCL, w klasie IgG i IgM, oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) opisaną w 1985 roku, w modyfikacji własnej<sup>74</sup>.

Mikropłytki o średniej sile wiązania (PolySorp, NUNC, Biokom, Dania) opłaszczano (30 µl/dołek) kardiolipiną bydlęcą (Sigma, USA) o stężeniu 50 µg/ml, w 96 % etanolu, i pozostawiano do odparowania na 18 godzin, w temperaturze 4°C. Następnie płytki dwukrotnie płukano buforem fosforanowym (PBS, pH 7,4) i blokowano poprzez dodanie 150 µl/ dołek 1% albuminy wołowej (*BSA-bovine serum albumin*, Sigma, USA) rozpuszczonej w PBS i pozostawiano pod przykryciem na 90 minut w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym wypłukaniu płytki roztworem PBS nakładano po 100 µl/dołek surowicy badanej rozcieńczonej w stosunku 1:50 w 10% surowicy wołowej (NBCS - *new born calf serum*, Gibco Life Technologies, Nowa Zelandia) i inkubowano pod przykryciem w temperaturze

pokojuwej przez 150 minut. Po kolejnym trzykrotnym płukaniu roztworem PBS dodawano po 100  $\mu$ l/dolek kozich przeciwciał przeciwko ludzkim immunoglobulinom G lub M sprzężonych z peroksydazą chrzanową, odpowiednio w rozcieńczeniu 1:4000 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 90 minut. Po ostatnim cyklu płukania płytki dodawano po 100  $\mu$ l/dolek roztworu o-fenylendiaminy (OPD, Sigma, USA) z nadtlakiem wodoru (Sigma, USA) w buforze cytrynianowo-fosforanowym (pH 5,0). Reakcję barwną hamowano 2N kwasem siarkowym (50  $\mu$ l/dolek). 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) oraz „standardu Sapporo” (mysie przeciwciała monoklonalne; HCAL o stężeniu 188 ng/ml dla IgG oraz EY2C9 o stężeniu 156 ng/ml dla IgM; INOVA Diagnostics, USA).

Surowice oraz przeciwciała monoklonalne rozcieńczano w postępie, od 1:50 do 1:6400, a przy wykreślaniu krzywej standardowej użyto skali log-logit.

Do wyznaczenia punktu odcięcia wartości dodatnich wykorzystano wartość 99 percentyla obliczonego dla 147 osób grupy kontrolnej.

### **3.2.1. Ocena zmienności wewnątrz serii i między seriami dla aCL.**

- zmienność wewnątrz serii – wykonano oznaczenia aCL w obu klasach, w 7 próbkach surowicy pacjentów o różnym mianie przeciwciał (od wartości prawidłowych do wysokich), w 20 powtórzeniach w jednej serii oznaczeń.
- zmienność pomiędzy seriami – oznaczenia aCL w klasach IgG i IgM wykonano w 8 kolejnych seriach. Do pomiaru wykorzystano 10 próbek surowicy pochodzącej od zdrowej kontroli oraz 19 próbek surowicy pacjentów o różnym mianie przeciwciał.



W celu określenia zmienności wykonano obliczenia mediany, wartości średniej ( $\bar{x}$ ), odchylenia standardowego (SD) oraz współczynnika zmienności (CV).

### **3.3. Oznaczanie przeciwciał przeciwko $\beta_2$ -glikoproteinie I ( $\alpha\beta_2$ GPI).**

$\alpha\beta_2$ GPI w klasie IgG i IgM oznaczano metodą ELISA opisaną przez Arvieux<sup>84</sup>, w modyfikacji własnej.

Mikro płytki ELISA o dużej sile wiązania (MaxiSorp, NUNC, Dania) opłaszczano 50  $\mu$ l/dolek ludzką  $\beta_2$ GPI (Diagnostica Stago, Francja) o stężeniu 10  $\mu$ g/ml w buforze TBS (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% żelatyną (Sigma, USA) w TBS po 150  $\mu$ l/dolek i pozostawiano pod przykryciem na 60 min w temperaturze 37°C. Po trzykrotnym wypłukaniu płytki roztworem TBS z 0,1% Tweenem dodawano po 50  $\mu$ l/dolek surowicy badanej, rozcieńczonej w 1:50 w 0,1% żelatynie 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/dolek 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/dolek roztworu o-fenylenodiaminy (OPD, Sigma, USA) z nadtlenkiem wodoru (Sigma, USA) w buforze cytrynianowo-fosforanowym (pH 5,0). Reakcję barwną hamowano 2N kwasem siarkowym (50  $\mu$ l/dolek). 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)

oraz „standardu Sapporo” (mysie przeciwciała monoklonalne; HCAL o stężeniu 188 ng/ml dla IgG oraz EY2C9 o stężeniu 156 ng/ml dla IgM, INOVA Diagnostics, USA).

Surowice oraz przeciwciała monoklonalne rozcieńczano w postępie, 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 147 osób grupy kontrolnej.

### **3.4. Analiza statystyczna.**

Obliczenia wykonano na komputerze typu PC IBM z zastosowaniem programów Microsoft Excel (Microsoft) oraz Statistica (Statsoft).

Wartości przedstawiano jako medianę, średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności.

Analizę rozkładu zmiennych ilościowych wykonano przy pomocy testu W Shapiro-Wilka. Dla oceny korelacji między zmiennymi zastosowano test Spearmana. Analizę ryzyka względnego (OR, *odds ratio*) obecności objawów klinicznych APS w zależności od podwyższonego poziomu danego przeciwciała, przeprowadzono w oparciu o test  $\chi^2$ .

### **3.5. Przebieg badania.**

Badanie przeprowadzono w trzech etapach.

Etap I, wstępny, miał na celu standaryzację metod oznaczania aCL i a $\beta_2$ GPI, z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych jako kalibratora referencyjnego i wyznaczenie granic wartości prawidłowych. Do badania posłużyła surowica pochodząca od osób zdrowych spośród losowej próbki mieszkańców Krakowa, dobranych pod względem płci i wieku, do grupy chorych z II Katedry Chorób Wewnętrznych, z uogólnionymi chorobami

autoimmunologicznymi (przebadanych w III etapie badania). Etap ten objął także analizę zmienności wewnątrz serii i pomiędzy seriami dla aCL.

Powtarzalność testów do oznaczania LA i weryfikacja podawanych przez producentów zakresów wartości prawidłowych została określona w grupie osób zdrowych.

W II etapie wykonano oznaczenia LA, aCL i a $\beta$ <sub>2</sub>GPI w próbkach otrzymanych z Belgii i Włoch, w ramach ogólnoeuropejskiego projektu standaryzacji oznaczeń przeciwciał antyfosfolipidowych. Ta faza badania miała na celu kontrolę procedur standaryzacyjnych przeprowadzonych w I etapie.

W III etapie badania wykorzystano osocze i surowicę pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi, leczonych w Ośrodku Chorób Immunologicznych i Poradni Nadkrzepliwości Krwi, II Katedry Chorób Wewnętrznych UJ w Krakowie.

### **3.5.1. I i III etap badania.**

Krew do badań laboratoryjnych, w I i III etapie badania pobierano z wykorzystaniem systemu próżniowego firmy Sarstedt. Próbki krwi do oznaczania LA pobierano do probówek zawierających 3,2% cytrynian sodu (w stosunku 9 objętości krwi do 1 objętości antykoagulantu), a następnie dwukrotnie wirowano aby uzyskać osocze pozbawione płytek krwi (I wirowanie – 3500 obrotów/10 minut; II wirowanie – 14000 obrotów/10 minut). Analizę wykonywano w dniu pobrania, maksymalnie do 2 godzin od chwili pobrania krwi.

W celu uzyskania surowicy, wykorzystywanej do oznaczeń immunoenzymatycznych, krew pobierano do probówek pozbawionych antykoagulantu i pozostawiano do wykrzepienia. Krew następnie wirowano (3500 obrotów/10 minut) a uzyskaną surowicę rozdzielano na próbki o mniejszej objętości (300  $\mu$ l) i przechowywano w -80°C do momentu oznaczenia.

### **3.5.2. II etap badania.**

Materiałem do badania LA, otrzymanym z Centrum Biologii Molekularnej i Naczyniowej Uniwersytetu w Leuven (Belgia) były 24 próbki osocza ludzkiego. Próbki były zakodowane, a sposób ich przygotowania nieznany. Po odesłaniu wyników uzyskano informację, iż do próbek dodawano wzrastające stężenia mysich przeciwciał monoklonalnych przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ GPI (23H9) ludzkiej protrombinie (28F4) lub mieszaninę obydwu tych przeciwciał w równoważnych stężeniach, a także inhibitory czynnika VIII. Trzy próbki były osoczami kontrolnymi.

Oznaczenia aCL i a $\beta_2$ GPI wykonywane w ramach ogólnoeuropejskiego programu standaryzacyjnego, nadzorowanego przez Uniwersytet w Brescii, przeprowadzono w 5 próbkach surowicy, przesłanych do wszystkich ośrodków partycypujących w projekcie. Krzywą kalibracyjną wyznaczano w oparciu o standard własny (surowica pacjenta o wysokim mianie przeciwciał, aCL lub a $\beta_2$ GPI).

## 4. WYNIKI

### 4.1. Charakterystyka grup badanych.

#### 4.1.1. Grupa osób zdrowych (grupa kontrolna).

Grupę tę stanowiło 147 osób: 107 kobiet; wiek 20 – 81 lat i 40 mężczyzn; wiek 20 – 82 lat, dobranych pod względem płci i wieku do grupy chorych z uogólnionymi chorobami autoimmunologicznymi. Ich surowicę wykorzystano w I etapie badania do standaryzacji metod oznaczania aCL i a $\beta_2$ GPI.

Oznaczenia LA wykonano u 28 osób zdrowych (23 kobiet i 5 mężczyzn), w przedziale wiekowym od 26 – 52 lat.

#### 4.1.2. Grupa pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi (grupa badana).

Dane demograficzne badanych grup oraz charakterystykę grupy chorych przedstawiono w Tabelach IV i V.

Tabela IV. Dane demograficzne badanych grup.

	Liczba (n)	Wiek (lat) $\bar{x}$ ; od-do
Osoby zdrowe:		
Kobiety	107	48 (20-81)
Mężczyźni	40	44 (20-82)
<b>Razem</b>	<b>147</b>	
Chorzy:		
Kobiety	283	43 (21-77)
Mężczyźni	53	48 (21-73)
<b>Razem</b>	<b>336</b>	

Tabela V. Charakterystyka chorych.

SLE	235 osób (w tym SAPS* 82 osoby)
SLE-like*	44 osoby (w tym SAPS 14 osób)
PAPS*	32 osób
Inne choroby:	25 osób ( w tym 3 osoby SAPS)
- zespół Sjögrena	6 osób
- zapalenie wielomięśniowe	2 osoby
- mieszana choroba tkanki łącznej	12 osób
- zapalenie skórno-mięśniowe	3 osoby
- wrzodziejące zapalenie jelita grubego	1 osoba
- małopłytkowość immunologiczna	1 osoba

\*SLE-like – zespół toczniopodobny ( $\leq 3$  kryteria ACR)

\*PAPS – pierwotny zespół antyfosfolipidowy

\*SAPS – wtórny zespół antyfosfolipidowy

## 4.2. I etap badania.

### 4.2.1. Antykoagulant toczniowy.

Celem tego oznaczenia było sprawdzenie zachowania się testów przesiewowych, wykonywanych zgodnie z zaleceniami producenta, u osób zdrowych.

LA w grupie 28 osób zdrowych oznaczono poprzez pomiar czasów PTT LA, DVV test oraz dPT. Wyniki interpretowano zgodnie z zaleceniami producenta. U wszystkich osób czasy krzepnięcia w/w testów mieściły się w przedziałach referencyjnych, a zatem nie było potrzeby przechodzenia do testów mieszania ani testów potwierdzających.

Nie było również konieczności wyznaczenia własnego zakresu referencyjnego dla poszczególnych testów, przed przystąpieniem do badania grupy pacjentów.

## 4.2.2. Przeciwciała antykardiolipinowe (aCL).

### 4.2.2.1. Wyznaczenie punktu odcięcia (*cut off*) dla wartości prawidłowych aCL IgG i IgM.

aCL oznaczono w grupie kontrolnej 140 osób zdrowych.

W obu klasach (IgG i IgM) wyniki były odczytywane w oparciu o dwie krzywe standardowe; standard własny oraz standard oparty o przeciwciała monoklonalne („standard Sapporo” – patrz „Metody”). Dla obu grup wyników obliczono medianę (uzyskane wartości nie mają rozkładu normalnego) oraz wartość 99 percentyla. Podano także wartości średnie ( $\bar{x}$ ) oraz odchylenie standardowe (SD), ponieważ wcześniej zalecanym punktem odcięcia były  $2SD + \bar{x}$ . Obecnie, zgodnie z aktualnymi wytycznymi, jako punkt odcięcia dla wartości dodatnich przyjęto wartość 99 percentyla populacji zdrowej.

Zarówno w klasie IgG jak i klasie IgM nie stwierdzono zasadniczych różnic pomiędzy wartościami 99 percentyla uzyskanymi w oparciu o standard własny i przeciwciała monoklonalne (Tabela VI).

Tabela VI. Wartości odcięcia dla aCL IgG i IgM.

	aCL IgG		aCL IgM	
	Standard własny	Moabs (HCAL)	Standard własny	Moabs (EY2C9)
<b>mediana</b>	<b>3,95</b>	<b>4,15</b>	<b>4,73</b>	<b>4,19</b>
$\bar{x}$	4,48	4,76	5,56	5,19
SD	2,94	3,11	3,68	3,80
$2SD + \bar{x}$	10,36	10,97	12,92	12,79
<b>99 percentyl</b>	<b>24,29</b>	<b>26,09</b>	<b>26,08</b>	<b>27,18</b>

Wartości wyrażono w GPL dla aCL IgG i MPL dla aCL IgM.

#### 4.2.2.2. Ocena zmienności wewnątrz serii dla aCL

Dokładność oznaczeń wewnątrz serii oceniano na podstawie wyników uzyskanych dla 7 próbek, o zróżnicowanym stężeniu aCL IgG i IgM w 20 powtórzeniach dla jednej serii oznaczeń. Wartości były odczytywane tylko w oparciu o standard własny. Dla każdej próbki obliczono medianę, wartość średnią, SD oraz CV. Wyniki przedstawiają tabele VII i VIII.

Tabela VII. Zmienność oznaczeń wewnątrz serii dla aCL IgG.  
(Wartości wyrażono w umownych jednostkach GPL (patrz „Metody”).

aCL IgG	Standard własny (GPL)			
	Nr próbki	mediana	$\bar{x}$ *	SD*
1	31,61	31,22	2,66	9
2	89,75	91,67	10,96	12
3	8,86	8,79	0,64	7
4	9,97	9,79	1,19	12
5	31,91	31,36	3,06	10
6	19,47	19,07	1,61	8
7	7,42	7,53	0,78	10

\*  $\bar{x}$  – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności.

Tabela VIII. Zmienność oznaczeń wewnątrz serii dla aCL IgM.  
(Wartości wyrażono w umownych jednostkach GPL (patrz „Metody”).

aCL IgM	Standard własny (MPL)			
	Nr próbki	mediana	$\bar{x}$ *	SD*
1	20,63	20,73	0,83	4
2	174,04	178,49	26,2	15
3	20,85	20,77	1,20	6
4	13,69	13,92	1,30	9
5	4,86	5,05	0,60	12
6	20,98	21,20	2,59	12
7	31,02	31,33	1,68	5

\*  $\bar{x}$  – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności.



Zarówno w klasie IgG jak i w klasie IgM powtarzalność wyników, praktycznie dla każdego zakresu miana aCL, była zadowalająca. Wartości CV wahały się w zakresie 7-12% dla klasy IgG oraz w zakresie 4-15 % dla klasy IgM.

#### **4.2.2.3. Ocena zmienności pomiędzy seriami dla aCL.**

Zmienność oceniano na podstawie badań 7 surowic pochodzących od osób zdrowych (oznaczonych literami A-J) oraz 19 próbek surowicy pacjentów o zróżnicowanym stężeniu aCL (oznaczonych cyframi 1-19), w 8 seriach oznaczeń. W każdej serii wyniki odczytywano w oparciu o dwie krzywe standardowe (standard własny oraz przeciwciała monoklonalne). Dla każdej próbki badanej obliczono medianę, wartość średnią, SD oraz CV (Tabele IX i X).

W grupie osób zdrowych w obydwu klasach CV wahał się w zakresach od 21-36 % dla IgG i 23-44 % dla IgM. Dla przeciwciał klasy IgG nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy wynikami dla próbek mierzonych wobec standardu własnego i przeciwciał monoklonalnych. Zastosowanie tych ostatnich zmniejszyło jednak zmienność przy oznaczeniach przeciwciał antykardiolipinowych klasy IgM (Tabela X).

Tabela IX. Zmienność między seriami dla aCL IgG w grupie osób zdrowych.

aCL IgG	Standard własny				Moabs *			
	Nr próbki	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*	CV (%)*	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*
A	4,75	4,29	1,38	32	4,69	4,55	1,48	33
B	6,6	5,83	2,12	36	6,3	6,07	2,22	37
C	6,5	6,3	1,89	30	6,61	6,56	1,88	29
D	5,89	6,01	1,92	32	6,62	6,3	1,86	30
E	4,42	4,43	1,32	30	5,11	4,7	1,19	25
F	4,66	4,63	0,98	21	5,26	4,89	0,88	18
G	7,59	6,69	1,87	28	7,64	6,95	1,85	27
H	7,16	6,28	2,1	33	7,52	6,58	2,24	34
I	12,29	11,25	3,22	29	12,3	11,25	3,1	28
J	5,69	5,38	1,72	32	5,9	5,65	1,76	31

\*x – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności;  
Moabs – przeciwciała monoklonalne (HCAL)

Tabela X. Zmienność między seriami dla aCL IgM w grupie osób zdrowych.

aCL IgM	Standard własny				Moabs *			
	Nr próbki	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*	CV (%)*	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*
A	4,26	4,7	1,32	28	5,04	5,2	1,23	24
B	2,83	3,38	1,48	44	3,64	3,67	0,97	26
C	12,03	13,61	4,68	34	15,34	15,38	3,57	23
D	11,15	11,76	3,1	26	12,85	13,47	3,2	24
E	6,25	6,72	1,52	23	7,14	7,52	1,82	24
F	5,71	6,12	2,17	35	6,39	6,66	1,99	30
G	4,86	4,81	1,43	30	5,04	5,37	1,72	32
H	1,97	2,35	0,75	32	2,59	2,83	0,95	33
I	10,29	11,57	3,63	31	12,49	13,09	3,43	26
J	11,99	12,89	3,96	31	14,63	14,81	3,35	23

\*x – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności;  
Moabs – przeciwciała monoklonalne (EY2C9).

Ocena zmienności oznaczeń pomiędzy seriami dla osób chorych wskazuje na znaczne różnice wyrażone wysokim wskaźnikiem CV. I tutaj mniejszą zmienność wykazują oznaczenia z użyciem przeciwciał monoklonalnych (Tabela XI i XII).

Warto zwrócić uwagę, iż zmienność ta jest porównywalna dla wartości niskich (osoby zdrowe) jak i bardzo wysokich (niektóre próbki osób chorych).

Tabela XI. Zmienność między seriami dla aCL IgG w grupie osób z chorobami autoimmunologicznymi

aCL IgG	Standard własny				Moabs *			
	Nr próbki	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*	CV (%)*	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*
1	53,16	48,1	12,01	25	43,66	41,71	9,78	23
2	12,14	10,77	3,42	32	11,88	10,8	3,12	29
3	31,23	29,45	7,28	25	27,67	26,96	5,89	22
4	3,09	3,24	1,02	32	3,69	3,46	0,95	27
5	8,65	7,73	3,17	41	8,7	7,89	3,02	38
6	114,99	108,83	17,01	16	105,47	95,27	25,56	27
7	4,56	4,15	1,31	32	4,81	4,43	1,33	30
8	15,89	15,31	4,15	27	15,92	14,94	3,72	25
9	3,62	3,77	1,47	39	4,1	3,98	1,39	35
10	2,19	2,42	0,83	34	2,56	2,52	0,6	24
11	45,5	45,76	14,76	32	41,4	39,26	10,06	26
12	24,85	22,34	6,93	31	23,02	20,89	5,64	27
13	9,71	8,53	2,46	29	9,58	8,69	2,35	27
14	44,56	44,45	12,48	28	38,49	38,53	8,42	22
15	34,35	32,73	7,99	24	32,45	29,51	5,9	20
16	43,01	40,68	11,58	28	38,21	35,69	8,28	23
17	105,37	101,34	13,93	14	79,66	81,92	23,47	29
18	9,38	8,32	2,78	33	9,68	8,5	2,99	35
19	12,86	12,98	4,63	36	12,82	12,61	3,78	30

\* $\bar{x}$  – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności; Moabs – przeciwciało monoklonalne (HCAL).

Tabela XII. Zmienność między seriami dla aCL IgM w grupie osób z chorobami autoimmunologicznymi

aCL IgM	Standard własny				Moabs *			
	Nr próbki	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*	CV (%)*	Mediana	$\bar{x}$ *	SD*
1	158,89	160,98	15,89	10	159,8	155,75	27,23	17
2	7,27	7,88	1,78	23	8,31	8,86	1,97	22
3	3,46	3,75	0,94	25	4,2	4,25	1,12	26
4	61,39	68,46	24,47	36	70,76	88,19	39,41	45
5	4,85	5,84	1,68	29	6,12	6,6	1,96	30
6	14,15	18,43	7,14	39	19,82	21,31	6,65	31
7	37,02	40,12	10,99	27	44,37	48,39	12,31	25
8	6,43	7,61	2,41	32	7,81	8,42	2,43	29
9	6,77	7,87	2,5	32	8,28	8,72	2,58	30
10	16,68	17,74	6,74	38	19,34	20,05	3,17	16
11	4,55	5,47	1,81	33	5,43	6,14	2,19	36
12	71,05	87,68	42,68	49	86,01	101,61	40,2	40
13	25,34	27,63	10,58	38	30,76	32,23	6,87	21
14	10,32	11,69	3,27	28	12,27	13,38	3,63	27
15	9,57	11,15	3,4	30	11,77	12,7	4	32
16	46,04	53,03	15,12	28	61,83	64,16	9,31	15
17	40,18	45,23	14,5	32	50,2	53,08	8,13	15
18	4,28	5,1	1,6	31	5,37	5,66	1,74	31
19	13,48	16,18	4,32	27	17,38	19,03	5,22	27

\*x – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności;  
Moabs – przeciwciało monoklonalne (EY2C9).

### 4.2.3. Przeciwciała przeciwko $\beta_2$ -glikoproteinie I ( $a\beta_2$ GPI).

#### 4.2.3.1. Wyznaczenie punktu odcięcia (*cut off*) dla wartości prawidłowych $a\beta_2$ GPI IgG i IgM.

$a\beta_2$ GPI oznaczono w grupie 140 osób zdrowych, stanowiących kontrolę. W obu klasach (IgG i IgM) wyniki odczytywano w oparciu o dwie krzywe standardowe; z użyciem standardu własnego oraz standardu opartego o przeciwciała monoklonalne („standard Sapporo” – patrz „Metody”). Także w tej grupie przeciwciał uzyskane wyniki nie miały rozkładu normalnego, dlatego też dla obu grup wyników obliczono mediany, wartości średnie ( $\bar{x}$ ), odchylenia standardowego (SD) oraz wartości 99 percentyla.

Analogicznie jak dla aCL, nie zaobserwowano znaczących różnic dla wartości punktu odcięcia w oparciu o 99 percentyl uzyskanych przy użyciu dwu różnych standardów (Tabela XIII).

Tabela XIII. Wartości odcięcia dla  $a\beta_2$ GPI IgG i  $a\beta_2$ GPI IgM.

	$a\beta_2$ GPI IgG		$a\beta_2$ GPI IgM	
	Standard własny	Moabs (HCAL)	Standard własny	Moabs (EY2C9)
<b>mediana</b>	<b>0,56</b>	<b>0,65</b>	<b>1,69</b>	<b>1,51</b>
$\bar{x}$	0,84	0,95	2,20	2,12
SD	1,01	1,21	1,58	1,79
2SD+ $\bar{x}$	2,86	3,37	5,35	5,70
<b>99 percentyl</b>	<b>6,42</b>	<b>8,41</b>	<b>7,03</b>	<b>8,30</b>

Wartości wyrażono w ng/ml.

### **4.3. II etap badania.**

#### **4.3.1. Antykoagulant toczniowy (przeciwciała monoklonalne o własnościach LA, skierowane przeciwko $\beta_2$ GPI i protrombinie).**

Po odesłaniu wyników nieznanymi próbek do Uniwersytetu w Leuven (prof. J. Arnout) uzyskano informację, iż do próbek dodawano wzrastające stężenia mysich przeciwciał monoklonalnych przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ GPI (23H9) w kolejnych stężeniach (3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100  $\mu\text{g/ml}$ ), ludzkiej protrombinie (28F4) w takich samych stężeniach, lub mieszaninę obydwu tych przeciwciał w równoważnych stężeniach (poczynając od poziomu 50  $\mu\text{g/ml}$  każdego z nich). Do pozostałych czterech próbek dodano inhibitory czynnika VIII w kolejnych stężeniach 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g/ml}$ . Trzy próbki były osoczami kontrolnymi.

W próbkach osocza, do których dodano przeciwciała anty- $\beta_2$ GPI (23H9) zaobserwowano wydłużenie czasu aPTT. Dla testu z Pathromtinem SL, który jest słabo wrażliwy na obecność LA, zjawisko to występowało gdy stężenie przeciwciał wynosiło przynajmniej 25  $\mu\text{g/ml}$ . Natomiast w teście z PTT LA, który jest bardzo wrażliwy na obecność LA, wydłużenie czasu krzepnięcia obserwowano już przy stężeniu przeciwciał 6,2  $\mu\text{g/ml}$ . Testy mieszania osocza nie korygowały tych zmian. Test Staclot LA (potwierdzający) był wyraźnie dodatni dla próbek o stężeniu przeciwciał 6,2; 12,5; 25; 50; 100  $\mu\text{g/ml}$ . Testy dPT oraz DVV uległy wydłużeniu w zakresie stężeń od 100 do 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Wyniki testów potwierdzających dla DVV (DVVtest/ DVVconfirm) nie wskazywały jednak na obecność LA. Na podstawie tych wyników próbki osocza z monoklonalnym przeciwciałem anty- $\beta_2$ GPI w zakresie 6,2-100  $\mu\text{g/ml}$  zostały zakwalifikowane jako LA-dodatnie, a tylko próbka o stężeniu przeciwciała 3,1  $\mu\text{g/ml}$  jako LA-ujemna (Tabela XIV).

Tabela XIV. Wyniki testów wykonanych dla próbek osocza wzbogaconych przeciwciałami anti- $\beta_2$ GPI (23H9) o własnościach antykoagulantu toczniowego.

Przeciwciała	INR	APTT	APTT 1:1	PTT LA	PTT LA 1:1	dPT	DVV test	DVV t 1:1	DVV conf	DVVt/DVVc	Staclot LA	Konkluzja
<b>23H9 100</b>	1,30	66,7	55,6	102,9	91,9	112,25	64,3	66,7	57,2	1,12	17,1	Dodatni
<b>23H9 50</b>	1,22	47,5	48,2	80,8	74,8	89,95	56,2	58,7	47,4	1,18	25,8	Dodatni
<b>23H9 25</b>	1,24	42,9	43,8	70,8	61,6	89,15	52,5	74,7	41,2	1,27	15,1	Dodatni
<b>23H9 12.5</b>	1,15	34,1	#	61,6	53,1	61,4	47,9	57,4	43,6	1,1	20,9	Dodatni
<b>23H9 6.2</b>	1,14	33,4	#	53,7	47,7	53,15	44,7	#	42,2	1,06	16	Słabo dodatni
<b>23H9 3.1</b>	1,12	34,5	#	43,6	#	49,9	40,2	#	#	#	#	Ujemny

23H9 100 – 23H9 3.1 – końcowe stężenie dodanego przeciwciała ( $\mu\text{g/ml}$ ).

W osoczu wzbogaconym w przeciwciała przeciwko ludzkiej protrombinie (28F4), we wszystkich 6 próbkach zaobserwowano przedłużenie czasu protrombinowego, wyrażonego jako INR, natomiast dla testu dPT wydłużenie to wystąpiło tylko dla trzech najwyższych stężeń przeciwciała. aPTT oznaczany z użyciem Pathromtinu SL był nieznacznie wydłużony tylko dla najwyższego stężenia przeciwciała, a w teście mieszania uległ nieznacznej korekcji. Dla testu PTT LA wydłużenie czasu odnotowano dla trzech stężeń przeciwciała - od 25  $\mu\text{g/ml}$  wzwyż. Test potwierdzający Staclot LA był dodatni tylko dla dwóch najwyższych stężeń, tj. 50 i 100  $\mu\text{g/ml}$ . Test krzepnięcia DVV był dodatni w zakresie stężeń 25 do 100  $\mu\text{g/ml}$ . Ale podobnie jak to miało miejsce dla przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI także i w tej grupie nie uzyskano potwierdzenia zjawiska LA w teście DVV confirm. W oparciu o uzyskane wyniki tylko próbki zawierające przeciwciała w najwyższym stężeniu (50 i 100  $\mu\text{g/ml}$ ) zostały zakwalifikowane jako LA-dodatnie, próbka o stężeniu przeciwciała 25  $\mu\text{g/ml}$  jako wątpliwa, a próbki o najniższych stężeniach przeciwciała (3,1 i 6,2  $\mu\text{g/ml}$ ) jako ujemne (Tabela XV).



Tabela XV. Wyniki testów dla próbek osocza wzbogaconych przeciwciałami przeciwko ludzkiej protrombinie (28F4) o własnościach antykoagulantu toczniowego.

Przeciwciała	INR	APTT	APTT 1:1	PTT LA	PTT LA 1:1	dPT	DVV test	DVV t 1:1	DVV conf	DVVt/DVVc	Staclot LA	Konkluzja
<b>28F4 100</b>	1,36	53,4	48,8	87	72,7	100,45	84,1	77,4	66	1,27	34,5	Dodatni
<b>28F4 50</b>	1,28	39,3	#	63,3	54,3	71,7	62,6	54,2	51,8	1,21	13,5	Dodatni
<b>28F4 25</b>	1,19	35,2	#	51,1	45,5	67,6	55,1	67,3	53,5	1,03	5,5	Wątpliwy
<b>28F4 12.5</b>	1,20	37,1	#	46	#	53	43,2	#	#	#	#	Ujemny
<b>28F4 6.2</b>	1,19	34,6	#	45,4	#	46,75	40,2	#	#	#	#	Ujemny
<b>28F4 3.1</b>	1,27	35,2	#	46,5	42,2	42,6	36,7	#	#	#	#	Ujemny

28F4 100 do 28F4 3.1 – końcowe stężenie dodanego przeciwciała ( $\mu\text{g/ml}$ ).

W próbkach, do których dodano zarówno przeciwciała przeciwko  $\beta_2\text{GPI}$  jak i przeciwko protrombinie wydłużenie czasu protrombinowego zaobserwowano tylko dla dwóch najwyższych stężeń (25 i 50  $\mu\text{g/ml}$ ), a czasu dPT już dla zakresu stężeń od 6,2 do 50  $\mu\text{g/ml}$ . aPTT mierzony przy pomocy Pathromtinu SL był nieznacznie wydłużony tylko dla dwóch najwyższych stężeń przeciwciała, praktycznie nie ulegając korekcji do wartości prawidłowych w testach mieszania. Stosując natomiast PTT LA zaobserwowano istotne wydłużenie czasu krzepnięcia dla wszystkich próbek osocza. W testach mieszania korekcja do wartości prawidłowych nastąpiła tylko dla dwóch najniższych stężeń dodanego przeciwciała. Test Staclot LA potwierdził obecność LA w próbkach osocza zawierających mieszaninę obu przeciwciał, za wyjątkiem próbki o ich najniższym stężeniu. Test DVV był dodatni w zakresie stężeń od 6,2 do 50  $\mu\text{g/ml}$ , ale ponownie nie znalazł potwierdzenia w teście DVV confirm. Osocza zawierające równocześnie przeciwciała przeciwko  $\beta_2\text{GPI}$  i protrombinie w stężeniach 6,2 - 50  $\mu\text{g/ml}$  zostały zakwalifikowane jako LA-dodatnie a próbka ze stężeniem przeciwciał 3,1  $\mu\text{g/ml}$  jako LA-ujemna (Tabela XVI).

Tabela XVI. Wyniki testów dla próbek osocza wzbogaconych mieszaniną obu rodzajów przeciwciał.

Przeciwciała	INR	APTT	APTT 1:1	PTT LA	PTT LA 1:1	dPT	DVV test	DVV t 1:1	DVV conf	DVVt/ DVVc	Staciot LA	Konkluzja
<b>Mix 50</b>	1,33	58,8	53,1	110,5	101,9	128,8	88,8	76,7	69,1	1,28	41,6	Dodatni
<b>Mix 25</b>	1,31	45,4	45,8	82,6	76,7	67,55	65,1	56	52,2	1,25	22,8	Dodatni
<b>Mix 12.5</b>	1,16	40,6	43,3	61,3	52,9	97,6	52,7	61,3	44,2	1,19	14,6	Dodatni
<b>Mix 6.2</b>	1,16	33,5	#	54,5	44,3	61,05	49,2	54,9	45,6	1,08	17,7	Dodatni
<b>Mix 3.1</b>	1,15	32,4	#	47,3	43,1	49,9	44,5	55,6	43	1,03	4,7	Ujemny

Mix 50 do Mix 3.1 – stężenie końcowe dla obu przeciwciał ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Inhibitor czynnika VIII w stężeniach 5, 10, 20 i 40  $\mu\text{g/ml}$  znacząco wydłużył czasy aPTT (oceniające wewnątrzpochodną drogę kaskady krzepnięcia), mierzone zarówno przy pomocy Pathromtinu SL jak i PTT LA. Za wyjątkiem próbki o najwyższym stężeniu inhibitora czasy PTT LA ulegały znacznej korekcji w testach mieszania. Natomiast test potwierdzający Staciot LA wypadł ujemnie dla wszystkich próbek osocza. Wartości PT, wyrażonego w postaci INR jak i dPT były prawidłowe dla całego zakresu stężeń dodanego inhibitora. Test dPT okazał się ponadto przydatny dla rozróżnienia obecności inhibitorów i heparyny. dPT jest bowiem wrażliwy na obecność heparyny, w odróżnieniu od PT. Test DVV uległ nieznacznemu przedłużeniu tylko przy najwyższym stężeniu inhibitora, ale test potwierdzający wypadł oczywiście ujemnie. Wszystkie próbki uznano za LA-ujemne (Tabela XVII).

Tabela XVII. Wyniki testów dla próbek osocza, do których dodano inhibitora czynnika VIII.

Przeciwciała	INR	APTT	APTT 1:1	PTT LA	PTT LA 1:1	dPT	DVV test	DVV t 1:1	DVV conf	DVVt/DVVc	Staclot LA	Konkluzja
<b>AntiFVIII 40</b>	1,10	109,7	#	125,6	125,9	39,4	48,6	50,2	40,2	1,21	6,8	Ujemny
<b>AntiFVIII 20</b>	1,07	93,6	#	112,4	79,8	36,5	43,3	#	38,7	1,12	4,1	Ujemny
<b>AntiFVIII 10</b>	1,07	84,9	#	126,8	59,8	42,7	41,6	#	#	#	1,2	Ujemny
<b>AntiFVIII 5</b>	1,08	75,7	#	117,3	51,7	42,3	41,5	#	#	#	0,7	Ujemny

Anti FVIII 5 do anti FVIII 40 – końcowe stężenie inhibitora czynnika VIII w próbce (µg/ml).

Wyniki czasów krzepnięcia dla 3 próbek kontrolnych mieściły się w zakresach wartości prawidłowych i zostały rozpoznane jako LA-ujemne (Tabela XVIII).

Tabela XVIII. Wyniki testów dla próbek kontrolnych.

Przeciwciała	INR	APTT	APTT 1:1	PTT LA	PTT LA 1:1	dPT	DVV test	DVV t 1:1	DVV conf	DVVt/DVVc	Staclot LA	Konkluzja
<b>Contr</b>	1,22	34	#	44,6	42,1	42,5	34,6	#	#	#	#	Ujemny
<b>Contr</b>	1,24	36,2	#	44,2	42,5	42,3	34,7	#	#	#	#	Ujemny
<b>Contr</b>	1,13	30,9	#	42,4	#	40,1	39,3	#	#	#	#	Ujemny

#### 4.3.2. Przeciwciała antykardiolipinowe (aCL).

Zgodnie z zaleceniami (A.Tincani, Brescia, Włochy) wyniki dla 5 próbek testowych zostały odczytane tylko wobec standardu własnego i podane jako GPL dla klasy IgG oraz MPL dla klasy IgM.

Obliczono wartości średnie, odchylenie standardowe oraz współczynniki zmienności wyników uzyskanych w 34 ośrodkach współuczestniczących w programie i przedstawiono je w postaci tabel (Tabela XIX i XX). Wartości średnie i SD zostały policzone w ośrodku włoskim, ale nie zostały opublikowane. Uzyskaliśmy zgodę na ich wykorzystanie.

Tabela XIX. Oznaczenia aCL IgG dla 5 próbek testowych; wyniki z 34 ośrodków.

Nr próbki	aCL IgG (GPL)*	$\bar{x}$	SD	CV(%)
1	<b>58,267</b>	68,644	40,100	58
2	<b>12,027</b>	12,296	7,770	63
3	<b>59,978</b>	49,298	25,423	52
4	<b>3,234</b>	3,839	4,835	126
5	<b>3,391</b>	4,701	3,940	84

\*na niebiesko wyróżniono wyniki własne.

Tabela XX. Oznaczenia aCL IgM dla 5 próbek testowych; wyniki z 34 ośrodków.

Nr Próbki	aCL IgM (MPL)*	$\bar{x}$	SD	CV(%)
1	<b>1,102</b>	6,039	15,456	256
2	<b>57,30</b>	46,043	22,261	48
3	<b>4,661</b>	12,543	14,462	115
4	<b>2,444</b>	3,171	3,277	103
5	<b>12,608</b>	16,040	10,780	67

\*na niebiesko wyróżniono wyniki własne.

Zarówno w klasie IgG jak i IgM uzyskane w naszym ośrodku wyniki nie odbiegały znacząco od wartości średniej obliczonej dla pozostałych 34 ośrodków. Zwracają natomiast uwagę ogromne rozrzuty wyników pomiędzy poszczególnymi ośrodkami, (w klasie IgG rozrzut od 3,94 do 40,1 GPL; a w klasie IgM od 3,277 aż do 22,261 MPL), co odzwierciedla współczynnik zmienności.

#### 4.3.3. Przeciwciała przeciwko $\beta_2$ GPI ( $a\beta_2$ GPI).

Podobnie wyniki dla 5 próbek testowych zostały odczytane tylko wobec standardu własnego i przedstawione jako wartości absorbancji (OD), ze względu na brak referencyjnego kalibratora dla porównań.

Wartości średnie, odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności dla 33 uczestniczących ośrodków przedstawiono w postaci tabel (Tabela XXI i XXII).

Tabela XXI. Oznaczenia  $a\beta_2$ GPI IgG dla 5 próbek testowych; wyniki z 33 ośrodków.

Nr próbki	$a\beta_2$ GPI IgG (OD)*	$\bar{x}$	SD	CV(%)
1	<b>0,527</b>	0,913	0,504	55
2	<b>0,103</b>	0,282	0,205	73
3	<b>0,098</b>	0,301	0,154	51
4	<b>0,023</b>	0,117	0,093	80
5	<b>0,039</b>	0,139	0,158	114

\*na niebiesko wyróżniono wyniki własne

Tabela XXII. Oznaczenia a $\beta$ <sub>2</sub>GPI IgM dla 5 próbek testowych; wyniki z 33 ośrodków.

Nr Próbki	a $\beta$ <sub>2</sub> GPI IgM (OD)*	$\bar{x}$	SD	CV(%)
1	<b>0,051</b>	0,182	0,211	116
2	<b>1,224</b>	0,970	0,487	50
3	<b>0,740</b>	0,719	0,345	48
4	<b>0,075</b>	0,190	0,159	84
5	<b>0,688</b>	0,536	0,307	57

\*na niebiesko wyróżniono wyniki własne.

W klasie IgG absorbancja dla próbek testowych w naszym ośrodku była nieco niższa od wartości średniej obliczonej dla 33 uczestników. Nie miało to jednak wpływu na poprawną klasyfikację próbek jako ujemnych i dodatnich. W klasie IgM wartości absorbancji nie odbiegały już tak znacząco od wartości średnich.

Podobnie jak to miało miejsce dla aCL, także i dla a $\beta$ <sub>2</sub>GPI widoczne są ogromne różnice wyników uzyskanych przez poszczególnych uczestników badania. Wartości CV wahają się w zakresie od 51 do 114 % dla klasy IgG i w zakresie od 48 do 116 % dla klasy IgM. Przyczyną tak ogromnych rozrzutów dla obu przeciwciał są najprawdopodobniej istotne różnice metodyczne pomiędzy procedurami stosowanymi przez każdego z uczestników.

#### **4.4. III etap badania.**

Po ustaleniu punktu odcięcia dla aCL i a $\beta$ <sub>2</sub>GPI oraz po uzyskaniu wyników programów standaryzacyjnych (aCL i a $\beta$ <sub>2</sub>GPI) i kontrolnych (LA), wykonano oznaczenia przeciwciał antyfosfolipidowych w populacji pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi.

##### **4.4.1. Antykoagulant toczniowy (LA).**

Spośród 336 osób, które stanowiły grupę badaną, obecność LA wykazano u 95. U 54 osób LA rozpoznano w oparciu o trzy testy (PTT LA, DVV, dPT); u 26 przy pomocy dwóch (PTT LA + dPT – 22 osoby: DVV + dPT – 7 osób). Tylko u 15 osób LA rozpoznano na podstawie jednego dodatniego testu – w każdym przypadku był to PTT LA. Zespół antyfosfolipidowy na podstawie dodatniego wyniku LA i obecności co najmniej jednego kryterium klinicznego<sup>58</sup> rozpoznano u 16 chorych (14 postaci wtórna, 2 postać pierwotna).

Spośród 244 osób, u których nie wykryto obecności LA, PTT LA uległ przedłużeniu u 55 osób, ale u wszystkich test potwierdzający (StacLOT LA) wypadł ujemnie. DVV był przedłużony u 37 osób, ale i tu test potwierdzający (DVVconfirm) wypadł ujemnie. U 19 osób, przyjmujących doustne antykoagulanty, wykazano wydłużenie wszystkich trzech czasów krzepnięcia, tj. PTT LA, DVV i dPT. Uległy one istotnemu skróceniu, nawet do wartości prawidłowych, w testach mieszania z osoczem kontrolnym. Testy potwierdzające (StacLOT LA i DVVconfirm) były we wszystkich przypadkach ujemne.

##### **4.4.2. aCL w grupie pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi.**

Przeciwciała antykardiolipinowe oznaczono u wszystkich 336 chorych. Stężenia aCL odczytywano według dwóch standardów: własnego i zaproponowanego w Sapporo (swoiste przeciwciała monoklonalne). W oparciu o standard Sapporo nieprawidłowo podwyższony poziom aCL wykryto u 120 pacjentów, z czego 79 osób miało przeciwciała w klasie IgG, a 75

w klasie IgM. Dodatkowo wyniki w obu klasach stwierdzono u 34 osób. W oparciu o standard własny podwyższony poziom aCL stwierdzono natomiast u 125 osób, z czego 81 osób wykazywało przeciwciała w klasie IgG, a 79 osób w klasie IgM. Dodatkowo wyniki w obu klasach wystąpiły u 46 osób.

Zespół antyfosfolipidowy na podstawie dodatniego wyniku oznaczania aCL przy współistnieniu swoistych objawów klinicznych<sup>58</sup> rozpoznano u 52 chorych (u 27 – zespół pierwotny, u 25 – wtórny).

#### **4.4.3. a $\beta$ <sub>2</sub>GPI w grupie osób z chorobami autoimmunologicznymi.**

Stężenia a $\beta$ <sub>2</sub>GPI oznaczono także u wszystkich 336 chorych. Wartości odczytywano według dwóch standardów: własnego i Sapporo. Na tej podstawie wyniki klasyfikowano jako dodatnie i ujemne. W oparciu o standard Sapporo podwyższony poziom a $\beta$ <sub>2</sub>GPI stwierdzono u 101 osób (u 46 IgG, u 83 IgM, u 28 oba), a w oparciu o standard własny u 112 osób (u 52 IgG, u 89 IgM, u 29 oba).

APS wyłącznie w oparciu o dodatni wynik a $\beta$ <sub>2</sub>GPI (przy współistnieniu kryterium klinicznego) rozpoznano u 29 chorych (u 6 postaci pierwotna, u 23 – wtórna).

Ostatecznie, zmodyfikowane w 2006 roku kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego spełniło 112 chorych z 336 badanych.



#### 4.4.4. Współwystępowanie przeciwciał antyfosfolipidowych.

Aby ocenić zależność występowania przeciwciał aCL i a $\beta_2$ GPI, posłużono się badaniem korelacji liniowej (Tabela XXIII). Natomiast do oceny korelacji pomiędzy występowaniem LA, którego wynik nie jest wartością liczbową, a aCL i a $\beta_2$ GPI, zastosowano test Rang Spearmana (Tabela XXIV). Dla wszystkich korelacji za wartość istotną przyjęto  $p < 0,05$ .

Tabela XXIII. Współwystępowanie aCL i a $\beta_2$ GPI.

	<b>Współczynnik korelacji</b>
aCL IgG vs. a $\beta_2$ GPI IgG	<b>0,484</b>
aCL IgG vs. a $\beta_2$ GPI IgM	0,150
aCL IgM vs. a $\beta_2$ GPI IgG	0,176
aCL IgM vs. a $\beta_2$ GPI IgM	<b>0,624</b>

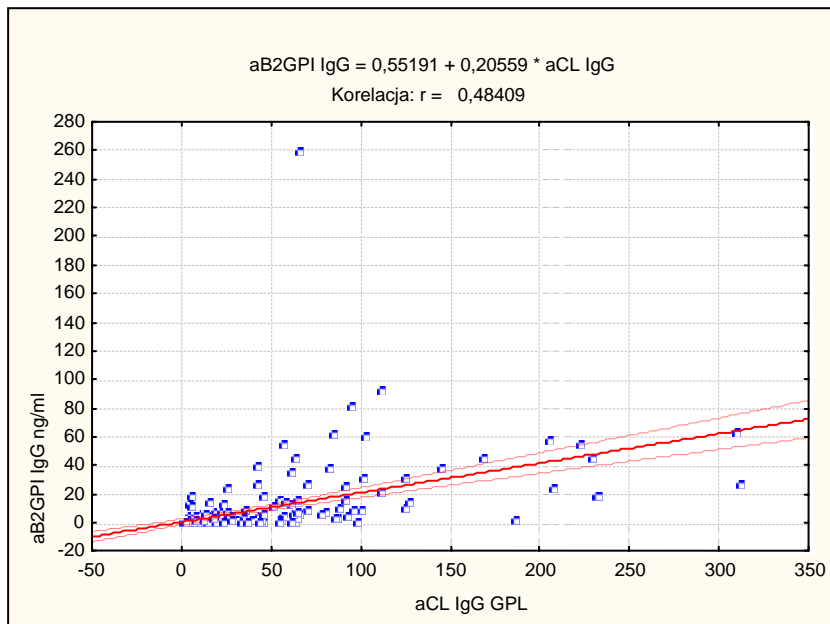
Wartości istotne wytłuszczono.

Tabela XXIV. Współczynniki korelacji dla LA, aCL i a $\beta_2$ GPI.

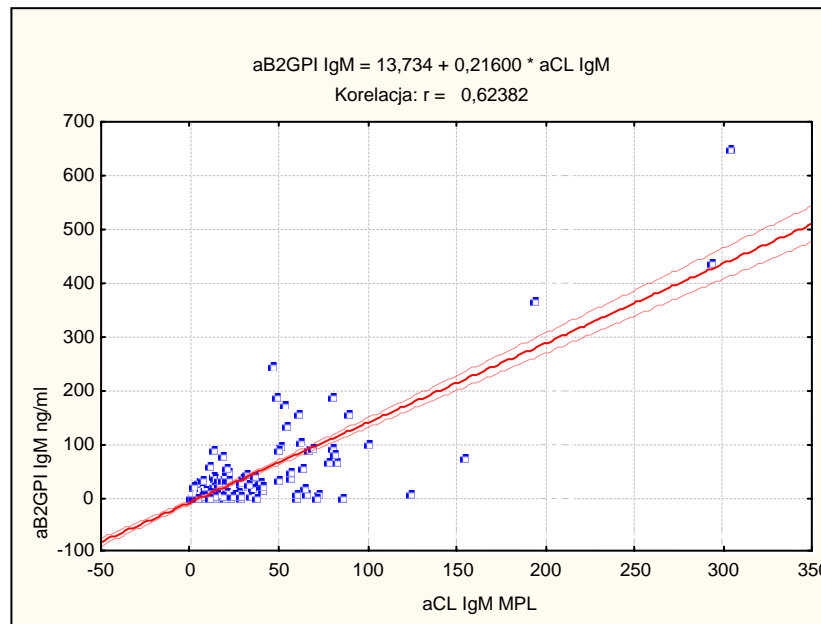
	<b>Współczynnik korelacji</b>
LA v aCL	0,415
LA v aCL IgG	<b>0,493</b>
LA v aCL IgM	0,298
LA v a $\beta_2$ GPI	<b>0,496</b>
LA v a $\beta_2$ GPI IgG	0,480
LA v a $\beta_2$ GPI IgM	0,391

Wartości istotne wytłuszczono.

Dla przeciwciał aCL i a $\beta_2$ GPI najsilniejszy związek obserwowano w obrębie tych samych klas - IgG lub IgM (Rys.5 i 6). Obecność LA koreluje natomiast silniej z obecnością a $\beta_2$ GPI w jakiegokolwiek klasie niż z aCL. Najslabiej obecność LA wiąże się z przeciwciałami aCL i a $\beta_2$ GPI klasy IgM.



Rys 5. Korelacja liniowa aCL IgG z  $a\beta_2\text{GPI IgG}$ .



Rys 6. Korelacja liniowa aCL IgM z  $a\beta_2\text{GPI IgM}$ .

#### **4.4.5. Przeciwciała antyfosfolipidowe a ryzyko wystąpienia powikłań klinicznych (zakrzepicy i powikłań położniczych).**

Wszystkie trzy grupy przeciwciał (tj. aCL, a $\beta$ <sub>2</sub>GPI i LA) związane były z istotnym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy. Największe ryzyko związane było z obecnością przeciwciał a $\beta$ <sub>2</sub>GPI IgG, nieco mniejsze z obecnością aCL IgG oraz LA. Zdecydowanie mniejsze ryzyko nosła za sobą obecność aCL i a $\beta$ <sub>2</sub>GPI w klasie IgM (Tabela XXV). Aktualne kryteria klasyfikacyjne dla APS<sup>58</sup> zalecają łączne ujęcie przeciwciał klasy IgG i IgM. Takie ujęcie obniża jednak znacznie ryzyko względne (OR) wystąpienia zakrzepicy związane z tymi przeciwciałami w porównaniu z obecnością LA. Ryzyko rośnie wyraźnie przy współwystępowaniu różnych przeciwciał; największe obserwujemy gdy współlistnieją wszystkie trzy typy przeciwciał (aCL, a $\beta$ <sub>2</sub>GPI i LA) (Tabela XXV).

Względne ryzyko dla niepowodzeń położniczych jest największe w przypadku współlistnienia trzech lub dwóch typów przeciwciał (aCL, a $\beta$ <sub>2</sub>GPI i LA). Jest nieco niższe w obecności przeciwciał a $\beta$ <sub>2</sub>GPI klasy IgG oraz aCL IgM (Tabela XXVI). Bardzo słabe są natomiast relacje pomiędzy powikłaniami położniczymi a przeciwciałami aCL IgG i a $\beta$ <sub>2</sub>GPI IgM. Warto zauważyć, że w przypadku niepowodzeń położniczych wartość ryzyka względnego wystąpienia objawów klinicznych związana z kryteriami laboratoryjnymi jest znacznie niższa niż dla zakrzepicy.

Tabela XXV. Ryzyko względne\* wystąpienia zakrzepicy u osób z przeciwciałami antyfosfolipidowymi.

	<b>Iloraz szans</b>	<b>Przedział ufności</b>	<b>Swoistość (%)</b>	<b>Czułość (%)</b>	<b>Predykcja dodatnia (%)</b>	<b>Predykcja ujemna (%)</b>
LA	4,04	2,44-6,68	84	44	66	67
aCL	3,71	2,32-5,92	77	53	63	69
aCL IgG	4,15	2,42-7,12	87	38	68	66
aCL IgM	2,20	1,31-3,70	84	30	57	62
a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	2,57	1,60-4,15	78	42	58	65
a $\beta$ <sub>2</sub> GPI IgG	4,77	2,37-9,61	94	24	74	63
a $\beta$ <sub>2</sub> GPI IgM	1,90	1,15-3,14	80	32	54	62
LA i aCL	3,91	2,18-7,00	90	31	69	64
LA i a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	3,78	2,11-6,78	90	30	68	64
LA i aCL i a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	4,00	2,15-7,44	91	28	70	64
aCL i a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	3,19	1,89-5,38	85	36	64	64

Tabela XXVI. Ryzyko względne\* wystąpienia niepowodzeń położniczych u osób z przeciwciałami antyfosfolipidowymi.

	<b>Iloraz szans</b>	<b>Przedział ufności</b>	<b>Swoistość (%)</b>	<b>Czułość (%)</b>	<b>Predykcja dodatnia (%)</b>	<b>Predykcja ujemna (%)</b>
LA	1,94	1,02-3,71	81	32	46	70
aCL	2,01	1,12-3,62	71	45	45	71
aCL IgG	1,75	0,89-3,43	82	27	44	69
aCL IgM	2,54	1,32-4,88	83	34	51	71
a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	1,96	1,06-3,60	76	38	45	70
a $\beta$ <sub>2</sub> GPI IgG	2,76	1,25-6,12	91	22	55	69
a $\beta$ <sub>2</sub> GPI IgM	1,78	0,94-3,37	79	32	44	69
LA i aCL	2,39	1,14-4,98	88	25	51	69
LA i a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	2,96	1,40-6,25	89	26	56	70
LA i aCL i a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	3,52	1,59-7,80	91	25	60	70
aCL i a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	2,67	1,38-5,16	84	34	52	71

do obu tabel \*ryzyko względne = iloraz szans (OD – odds ratio).

## 5. DYSKUSJA

Do rozpoznania zespołu antyfosfolipidowego niezbędne jest spełnienie przynajmniej jednego kryterium klinicznego i jednego laboratoryjnego (obecność LA i/lub aCL i/lub  $\alpha\beta_2$ GPI). Nowe wytyczne klasyfikacyjne APS z 2006 roku zalecają aby LA był oznaczany zgodnie z zaleceniami Komitetu Standaryzacyjnego ISTH, natomiast aCL i  $\alpha\beta_2$ GPI mierzone były wystandaryzowanymi metodami immunoenzymatycznymi<sup>58</sup>.

Stwierdzenie obecności LA, przeciwciał antykardiolipinowych, lub przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI ma istotne znaczenie w ocenie ryzyka pojawienia się powikłań klinicznych oraz przy podejmowaniu decyzji o włączeniu leczenia przeciwkrzepliwego.

### **Antykoagulant toczeniowy**

Pomimo aktualnie obowiązujących wytycznych Komitetu Standaryzacyjnego ISTH<sup>72,73</sup>, które wydają się jasne i klarowne, diagnostyka LA nadal nie należy do najłatwiejszych. Spowodowane jest to głównie heterogenicznością badanych przeciwciał.

W diagnostyce istotną rolę odgrywają w równym stopniu błędy przedlaboratoryjne (właściwe przechowywanie i przygotowanie próbek osocza do badania) jak i laboratoryjne (dobór odczynników o odpowiednio wysokiej czułości i swoistości wobec LA, aparatura pomiarowa, przestrzeganie pełnej, trój etapowej procedury oznaczania LA). To właśnie nieprzestrzeganie pełnej procedury jest główną przyczyną błędnej interpretacji wyników LA, w tym identyfikacji tzw. słabych antykoagulantów. Stosowanie tylko jednego testu przesiewowego, zaniechanie oceny testu potwierdzającego lub pominięcie testów mieszania osocza to najczęstsze przyczyny błędnych ocen, szczególnie w przypadku obecności czynników interferujących, tj.: doustnych antykoagulantów, heparyny, niedoborów czynników krzepnięcia lub też obecności ich inhibitorów<sup>71, 87, 88, 89</sup>.

Spodziewano się, że wprowadzenie dodatknej kontroli poprawi dokładność oznaczania LA. Od początku lat dziewięćdziesiątych w ramach programów standaryzacyjnych (ECAT – *European Concerted Action on Thrombosis*, UK NEQAS – *United Kingdom Quality Assessment Scheme*) próbowano wprowadzić osocza kontrolne, które posiadałyby aktywność LA. Najpierw były to liofilizowane osocza od pacjentów z dodatnim antykoagulantem toczniowym, potem próbki osocza, do których dodawano przeciwciała przeciwko  $\beta_2$ GPI klasy IgG<sup>90, 91, 92</sup>.

Arnout i Le Querrec<sup>74, 93</sup> kierując się tym, że za aktywność LA odpowiada zapewne grupa przeciwciał (przeciwko  $\beta_2$ GPI, protrombinie lub kombinacja obu tych przeciwciał) zaproponowali aby, jako kontroli dodatknej użyć ludzkiego osocza, do którego dodano monoklonalnych mysich przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ -glikoproteinie (23H9) i protrombinie (28F4), wykazujących aktywność LA.

Badania w naszym ośrodku próbek osocza, do których dodane zostały w/w przeciwciała monoklonalne potwierdziły, że efekt antykoagulantu toczniowego (LA) zależny od  $\beta_2$ GPI jest znacznie wyraźniejszy przy zastosowaniu testów krzepnięcia zależnych od fosfolipidów (w naszych rękach - PTT, dPT oraz DVV), w porównaniu z przeciwciałami zależnymi od protrombiny, dodanymi w tym samym stężeniu. Spośród zastosowanych testów przesiewowych najwyższą czułością charakteryzował się test PTT LA, nieco słabszą czułością DVV. Niestety w żadnym przypadku użycia monoklonalnych przeciwciał o własnościach LA nie udało się potwierdzić jego obecności testem potwierdzającym DVV, o zwiększonym stężeniu fosfolipidów. Najpewniej jest to związane z wadliwym przygotowaniem tego handlowego testu. Monica Galli w swoich badaniach zwróciła uwagę na ogromne rozbieżności wyników uzyskiwanych dla tych samych próbek przy pomocy testu DVV pochodzącego od różnych producentów lub wykonywanych przy użyciu różnych analizatorów<sup>94</sup>. Zaobserwowane różnice mogą także wynikać z rozpoznawania odmiennych

epitopów przez przeciwciała monoklonalne w porównaniu z naturalnymi autoprzeciwciałami. Choć monoklonalne przeciwciała dobrze naśladują naturalny antykoagulant toczeniowy zależny od  $\beta_2$ GPI, to jednak nie są one z nimi identyczne.

Wyniki te wskazują równocześnie na wartość wykonywania co najmniej dwóch różnych testów przesiewowych. Opierając się bowiem tylko na teście DVV, wiele próbek określono by błędnie jako LA ujemne.

Testem niezwykle pomocnym w prawidłowej interpretacji próbek zawierających inhibitory czynnika VIII okazał się dPT – modyfikacja klasycznego czasu protrombinowego. Jego zasadą jest rozcieńczanie fosfolipidów, dzięki czemu zwiększa się czułość względem LA. Test wykazuje także wrażliwość w stosunku do doustnych antykoagulantów i heparyny, ulegając w ich obecności znacznemu wydłużeniu.

Niewielkie przedłużenie czasów krzepnięcia w próbkach osocza, do których dodano przeciwciała monoklonalne w najniższych stężeniach wskazują na konieczność określenia dolnej granicy czułości takich testów, szczególnie w odniesieniu do oceny ryzyka powikłań klinicznych. Jest to osobne, dotąd niebadane zagadnienie.

Słabszy efekt, wywołowany przeciwciałem przeciwko protrombinie może mieć co najmniej dwie przyczyny. Po pierwsze, sama aktywność typu LA tego sztucznie wytworzonego przeciwciała może być po prostu znacznie słabsza, niż przeciwciała skierowanego przeciwko  $\beta_2$ GPI. Po drugie, działanie tego przeciwciała słabiej naśladuje naturalny efekt LA. Najpewniej działały tu łącznie oba mechanizmy. Ostatnio publikowane badania wskazują, że z punktu widzenia klinicznego test laboratoryjny, który pomógłby rozróżnić, czy LA jest zależny od  $\beta_2$ GPI czy od protrombiny byłby niezwykle pożądanym.<sup>63</sup>

Konieczność stosowania materiałów kontrolnych (standardów referencyjnych) w diagnostyce LA nie podlega dyskusji. Optymalne byłyby materiały pozwalające na ocenę antykoagulantu w każdych warunkach, bez względu na rodzaj użytego testu czy aparatury.



Przedstawione wyniki sugerują, iż przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ GPI i protrombinie mogły by być przydatne zarówno w procedurach kontrolnych jak i standaryzacyjnych. Otwarta pozostaje na razie tylko kwestia ich powszechnej dostępności. Ich przydatność powinna być także oceniona w badaniach wielośrodkowych i skorelowana, najlepiej prospektywnie z symptomatologią kliniczną. Takich badań dotąd nie prowadzono.

### **Przeciwciała antykardiolipinowe (aCL) i przeciwko $\beta_2$ -glikoproteinie I ( $a\beta_2$ GPI).**

Duże badania wielośrodkowe organizowane od 1986 roku przez European Antiphospholipid Forum, dotyczące przeciwciał antyfosfolipidowych wykazały, iż kluczowym problemem dla oznaczeń aCL i  $a\beta_2$ GPI jest ogromna zmienność międzylaboratoryjna<sup>95, 96, 97, 98, 99, 100</sup>. Konsekwencje tak dużej zmienności przekładają się bezpośrednio na decyzje kliniczne. Wyniki tego samego chorego w różnych laboratoriach, ocenione przy pomocy innych metod, mogą się diametralnie różnić, co utrudnia rozpoznanie, a co ważniejsze wdrożenie leczenia. W ostatnich latach przeprowadzono wielośrodkowe badania (36 europejskich ośrodków medycznych), w których jako kalibratorów użyto, obok standardów własnych, pochodzących z Japonii przeciwciał monoklonalnych (HCAL i EY2C9). Komitet Standaryzacyjny European Antiphospholipid Forum, uznał w 2004 roku, że te przeciwciała monoklonalne będą referencyjnymi kalibratorami dla wszystkich immunoenzymatycznych metod oznaczania aCL i  $a\beta_2$ GPI (komercyjnych i własnych)<sup>98</sup>. Zalecono jednocześnie, aby każde laboratorium ustaliło własny zakres wartości referencyjnych, w oparciu o wyniki uzyskane dla co najmniej 50 osób zdrowych (optymalnie 50-100), dobranych pod względem płci i wieku do badanej populacji chorych. Punktem odcięcia dla wartości dodatnich ustalono 99 percentyl, ponieważ rozkład wartości w grupie osób zdrowych i chorych nie jest normalny. Podjęto także decyzję, iż zewnętrzną kontrolą dodatnią dla obu grup przeciwciał będą także przeciwciała monoklonalne w dwóch

rozcieńczeniach: pierwsze – odpowiadające stężeniu na poziomie punktu odcięcia a drugie – odpowiadające wartościom średnio dodatnim. Kontrola zewnętrzna powinna być wykonywana 2 lub 3 razy w roku<sup>101, 102</sup>. Zalecenia te nie zostały jak dotąd zweryfikowane w badaniach wieloośrodkowych.

W przedstawionej pracy, zgodnie z zaleceniami, użyto przeciwciał monoklonalnych (standardy Sapporo) jako kalibratorów, równoległe ze standardami własnymi, do wyznaczenia punktu odcięcia dla wartości dodatnich przeciwciał antykardiolipinowych i skierowanych przeciwko  $\beta_2$ -glikoproteinie I. Zarówno dla aCL jak i dla  $a\beta_2$ GPI, w klasach IgG i IgM, stwierdzono zaskakującą zgodność wartości 99 percentyla obliczonego dla wyników odczytanych wobec standardu własnego i standardu monoklonalnego. Ta zgodność uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że surowice pacjentów używane wcześniej jako standardy własne zostały dobrane we właściwy sposób. Wartości odczytane wobec przeciwciał monoklonalnych dla obu grup przeciwciał w obydwu klasach były tylko nieco wyższe. Trzeba też pamiętać, iż w surowicy pacjenta (standard własny) mamy do czynienia z przeciwciałami poliklonalnymi, których dostępność i powinowactwo jest z pewnością inne niż przeciwciał monoklonalnych. Już we wcześniejszych doniesieniach zwracano uwagę, że taka poliklonalność przeciwciał pochodzących od różnych chorych może być jedną z podstawowych przyczyn braku porównywalności wyników aCL i  $a\beta_2$ GPI pomiędzy różnymi laboratoriami<sup>99</sup>. Stąd idea stworzenia jednego, referencyjnego kalibratora dla wszystkich dostępnych metod oznaczania obu przeciwciał.

Taką potrzebę jasno potwierdzają wyniki oznaczeń aCL i  $a\beta_2$ GPI, uzyskane w ramach europejskiego programu standaryzacyjnego (II etap badania Europejskiego Forum), które były odczytywane tylko w oparciu o standard własny i oznaczane wg procedury własnej. Rozrzuty wyników pomiędzy poszczególnymi laboratoriami były ogromne, co w oczywisty

sposób przełożyło się na wartości współczynników zmienności (A. Tincani, wyniki nie publikowane; patrz tabele XIX-XXII). Patrząc na te wyniki, pokusić by się można nawet o stwierdzenie, że obydwie testy nie spełniają wymogów prawidłowego testu laboratoryjnego, pozwalającego na odseparowanie wyników ujemnych od dodatnich.

Oczywiście, oprócz właściwego doboru standardu własnego, na tak dużą zmienność miały wpływ także i inne czynniki metodyczne, w tym: dobór antygeny wykorzystywanego do opłaszczania płytki, czynnika blokującego, roztworu płuczającego, roztworu do rozcieńczania próbek surowicy badanej, drugiego przeciwciała, czasów inkubacji czy po prostu typu mikropłytek.

Początkowo wydawało się, iż unifikacja procedury immunoenzymatycznego oznaczania przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI będzie łatwiejsza niż przeciwciał antykardiolipinowych. A to dlatego, że w przypadku  $a\beta_2$ GPI antygen jest dokładnie znany a przeciwciała powinny być bardziej homogenne, podczas gdy w przypadku aCL tak naprawdę oznaczamy różnorodne przeciwciała skierowane przeciwko kompleksowi kardiolipiny z  $\beta_2$ GPI.

Guido Reber w oparciu o dane i wyniki uzyskane z 6 ośrodków europejskich, zebrał i bardzo dokładnie opisał procedury wykorzystywane przez laboratoria do oznaczania  $a\beta_2$ GPI<sup>97</sup>. Zaskoczeniem było stwierdzenie, iż wiele ośrodków stosuje nadal  $\beta_2$ GPI pochodzenia zwierzęcego jako antygeny do opłaszczania płytek, a do rozcieńczania próbek surowicy bydlęcej, w której znajduje się spora ilość  $\beta_2$ GPI. Z kolei Sanmarco zwróciła uwagę na bardzo dużą heterogeniczność tej grupy przeciwciał, a stąd zróżnicowanie ich powinowactwa do cząsteczki  $\beta_2$ GPI<sup>86</sup>. W chwili obecnej dominuje pogląd, iż najbardziej patogenne są przeciwciała  $a\beta_2$ GPI klasy IgG. Nasze wyniki potwierdzają te wcześniejsze doniesienia<sup>103, 104, 108, 110, 111, 112</sup>.

O ile sposób przedstawiania wyników aCL był jasny od 1986 roku (wyrażano je u umownych jednostkach GPL i MPL)<sup>77</sup>, o tyle w przypadku a $\beta$ <sub>2</sub>GPI sposobu nie opracowano praktycznie do tej pory. Najczęściej wyniki przedstawiano jako bezpośrednie wartości ekstynkcji, czyli OD. Ostatnie wytyczne zalecają podawanie wyników w nanogramach, jako tzw. *monoclonal antibodies equivalents*<sup>58</sup>.

Kolejną częścią badań była ocena zmienności wewnątrz serii i pomiędzy seriami dla przeciwciał antykardiolipinowych. Potwierdziła ona spostrzeżenia dotyczące wpływu poszczególnych etapów procedury na końcowy wynik oznaczenia.

Zmienność wewnątrz serii naszej metody była zadowalająca. Współczynniki zmienności, w obu klasach, nie przekroczyły zalecanej przez Komitet Standaryzacyjny wartości 20%, osiągając wartość 12% dla IgG i 15% dla IgM.

Wielkości CV dla zmienności pomiędzy seriami były już dla obydwu klas znacznie wyższe; w dwóch przypadkach przekraczały nawet 40%, ale i tak były znacznie niższe (na każdym poziomie stężeń) od wartości uzyskanych dla próbek w II etapie badania Europejskiego Forum. Współczynnik zmienności był niższy kiedy jako standardu używano przeciwciał monoklonalnych (w kilku przypadkach nawet o kilkanaście procent), choć w większości nadal przekraczały 20%. Dziwi to o tyle, że poszczególnych etapów procedury przestrzegano w sposób bardzo rygorystyczny (zawsze używano dokładnie tych samych odczynników). Być może najistotniejsze okazały się na tym etapie badania czasy inkubacji na finalnym etapie, przed zablokowaniem płytki (przesunięcia rzędu 30-60 sekund) lub tzw. czynnik ludzki.

Zatem, choć przeciwciała HCAL i EY2C9 użyte jako kalibratory nie pozwoliły na rewolucyjne zmiany w standaryzacji metody oznaczania aCL to niewątpliwie stanowią one istotny postęp na drodze do unifikacji i standaryzacji metod oznaczania przeciwciał antyfosfolipidowych. W chwili obecnej są to jedyne uznane kalibratory referencyjne.

Pozostawiono jednak nadal otwartą furtkę, przede wszystkim dla firm diagnostycznych, dla stworzenia lepszego i bardziej dostępnego (tzn. tańszego) standardu dla tych przeciwciał.

Niezbędna jest dalsza unifikacja wszystkich etapów metod oznaczania przeciwciał antyfosfolipidowych.

Oznaczając aCL i a $\beta_2$ GPI nie należy zapominać o czynnikach interferujących. I tak, słabo dodatnie wyniki aCL IgM i a $\beta_2$ GPI IgM obserwuje się często w obecności krioglobulin lub czynnika reumatoidalnego<sup>105, 106</sup>, a średnie stężenia aCL IgM towarzyszą przejściowo chorobom infekcyjnym<sup>34</sup>. Stąd wymóg powtarzania oznaczeń w odstępie minimum 12 tygodni<sup>58</sup>.

### **Przeciwciała antyfosfolipidowe a ryzyko wystąpienia powikłań klinicznych.**

Nie stwierdzono istotnych rozbieżności w interpretacji wyników aCL i a $\beta_2$ GPI, oznaczanych przy pomocy obydwu standardów. Wobec standardu własnego obserwowano nieco więcej wyników zaliczanych jako słabo dodatnie (przede wszystkim w klasie IgG). Przyczyną może być obliczony, nieco niższy punkt odcięcia wartości nieprawidłowych. Stąd dla rozpoznania zespołu antyfosfolipidowego (i zgodnie z ostatnimi zaleceniami) posługiwano się jedynie wynikami uzyskanymi przy pomocy przeciwciał monoklonalnych.

Przeciwciała antykardiolipinowe, przeciwko  $\beta_2$ -glikoproteinie I, oraz antykoagulant toczeniowy są ze sobą ściśle związane, nie są jednak tożsame. U części chorych wykrywamy wszystkie trzy typy, u części dwa, a u wielu tylko jeden rodzaj przeciwciał. Najczęściej, przeciwciałom aCL IgG towarzyszą przeciwciała a $\beta_2$ GPI IgG i analogicznie przeciwciałom aCL IgM towarzyszą aGPI IgM. Ponieważ przeciwciała aCL są w rzeczywistości skierowane przeciwko  $\beta_2$ GPI w kompleksie z fosfolipidami, takie współwystępowanie łatwo

wytłumaczyć. Podobnie, obok antykoagulantu toczeniowego najczęściej pojawiają się aCL i a $\beta_2$ GPI w klasie IgG.

W naszych badaniach największe ryzyko zakrzepicy i powikłań położniczych wiąże się z obecnością przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI w klasie IgG (pomimo ich niskiej czułości). Na ten fakt zwracano uwagę już we wcześniejszych doniesieniach<sup>66, 107, 108</sup>. Nieco słabszym czynnikiem ryzyka dla zakrzepicy, w naszych badaniach była obecność aCL i LA; tu czułość była większa lecz swoistość niższa. Monica Galli w metaanalizie wielu badań, wskazała, że to LA silniej koreluje z objawami zakrzepicy niż aCL IgG i a $\beta_2$ GPI IgG (tylko w mianach średnich i wysokich); te ostatnie korelowały praktycznie tylko z zakrzepicą tętniczą. Autorka zwracała jednak uwagę, że nie w każdym przypadku aCL i a $\beta_2$ GPI oznaczano zgodnie z akceptowanymi kryteriami<sup>109</sup>.

Dla powikłań położniczych tak obecność LA jak i przeciwciał aCL IgG była w naszych badaniach dosyć słabym czynnikiem ryzyka. Tu znacznie większe ryzyko związane było z obecnością przeciwciał aCL IgM. Podobne wyniki publikował w 1997 roku Forastiero<sup>110</sup>.

Zgodnie z naszymi badaniami, największe ryzyko wszystkich powikłań klinicznych wiąże się ze współwystępowaniem dwóch lub trzech różnych autoprzeciwciał. Jest to szczególnie widoczne dla powikłań położniczych, gdzie przy obecności trzech przeciwciał ryzyko to wzrasta do 3,52. Wyróżnienie chorych z obecnością jednego i więcej typów przeciwciał zgodne jest z najnowszymi zaleceniami<sup>58</sup>.

Duże ryzyko wystąpienia powikłań klinicznych (zakrzepicy i niepowodzeń położniczych) związane z obecnością przeciwciał przeciwko  $\beta_2$ GPI, w naszych badaniach i innych doniesieniach<sup>103, 107, 108, 110, 111, 112, 114</sup> potwierdza słuszność włączenia ich do aktualnych kryteriów klasyfikacyjnych zespołu antyfosfolipidowego. Ponadto ich oznaczanie ma istotne znaczenie gdy ewidentnym objawem klinicznym zespołu antyfosfolipidowego nie

towarzyszą przeciwciała aCL ani LA. Według dostępnych danych około 2-10% chorych z kliniczną manifestacją APS wykazuje jedynie obecność przeciwciał  $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ <sup>112, 113, 114</sup>. W naszych badaniach APS, w oparciu o dodatnie  $\text{a}\beta_2\text{GPI}$  rozpoznano aż u 29 chorych (u 6 postać pierwotną, u 23- wtórną).

W chwili obecnej nie ma zatem jednego testu, który z wystarczającą czułością i swoistością wskazywałby na istotną klinicznie obecność przeciwciał antyfosfolipidowych. Nadal konieczne jest oznaczanie antykoagulantu toczeniowego metodami koagulometrycznymi oraz przeciwciał antykardiolipinowych i skierowanych przeciwko  $\beta_2\text{GPI}$  metodami immunoenzymatycznymi.

Trzeba jednak zaznaczyć, że istnieją doniesienia negujące związek pomiędzy obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych a powikłaniami zakrzepowymi<sup>115, 116</sup>. Kwestionuje się także sens oznaczania przeciwciał antykardiolipinowych w ogólnej populacji, w nadziei wykrycia osób zagrożonych w przyszłości powikłaniami zakrzepowymi (badanie HUNT)<sup>117</sup>. W obu przypadkach zasadniczym problemem jest jednak wiarygodność stosowanych metod laboratoryjnych. Bowiem na dzień dzisiejszy metody oznaczania aCL i  $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ , pomimo pojawienia się kalibratorów referencyjnych nadal nie są do końca wystandaryzowane. Po części dlatego właśnie nie są one wystarczająco czułe ani swoiste, co przy oznaczaniu tak bardzo heterogenicznej grupy przeciwciał jest nieodzowne.

Kolejną trudnością jest precyzyjne określenie tych i tylko tych przeciwciał, które są rzeczywiście silnie związane z ryzykiem klinicznych powikłań zespołu antyfosfolipidowego. Tu kolejną, choć jeszcze nie zweryfikowaną propozycją jest dodatkowy test, zaproponowany przez De Groota<sup>118</sup>, wykrywający jedynie „prawdziwe” przeciwciała antykardiolipinowe, tzn. wiążące się z kardioliną bezpośrednio, bez udziału kofaktora jakim jest  $\beta_2\text{GPI}$ . Test ten miałby mieć wartość predykcyjną ujemną i wykrywać niezwiązane z zakrzepicą nieswoiste przeciwciała antyfosfolipidowe, często towarzyszące infekcjom.

A zatem, w diagnostyce zespołu antyfosfolipidowego postęp dokonuje się mozolnie, wolnymi krokami. Przełomowe odkrycia zapewne jeszcze przed nami.



## 6. WNIOSKI

1. Nie istnieje dotąd zaakceptowana forma kontroli dodatniej dla oznaczania antykoagulantu toczniowego. Funkcję tę mogłyby pełnić mysie przeciwciała przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ -glikoproteinie I (23H9) i protrombinie (28F4) o własnościach antykoagulantu.
2. Mysie, humanizowane przeciwciała przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ GPI (HCAL i EY2C9) wydają się być dobrymi kalibratorami dla immunoenzymatycznych metod oznaczania przeciwciał antykardiolipinowych i przeciwko  $\beta_2$ -glikoproteinie I.
3. Konieczne są także dalsze próby ujednoczenia metodyki oznaczania aCL i a $\beta_2$ GPI w celu zminimalizowania zmienności międzylaboratoryjnej.
4. Najsilniejszym (choć mało czułym) czynnikiem ryzyka powikłań klinicznych (zakrzepicy i niepowodzeń położniczych) są przeciwciała a $\beta_2$ GPI klasy IgG. Stąd konieczność stosowania w diagnostyce kilku testów koagulometrycznych i immunoenzymatycznych.

## 7. STRESZCZENIE

Przeciwciała antyfosfolipidowe skierowane są przeciwko białkom (przede wszystkim  $\beta_2$ -glikoproteinie I oraz protrombinie) związanym w kompleksy z ujemnie naładowanymi fosfolipidami.

Współistnienie przeciwciał antyfosfolipidowych (LA i/lub aCL i/lub  $a\beta_2$ GPI) z charakterystycznymi objawami klinicznymi (zakrzepica lub powikłania położnicze) to kryteria pozwalające na rozpoznanie zespołu antyfosfolipidowego.

Przeciwciała antyfosfolipidowe wykrywa się dwiema niezależnymi metodami: koagulometryczną (LA) i immunoenzymatyczną (aCL i  $a\beta_2$ GPI).

Zgodnie z wytycznymi opublikowanymi w 2006 roku, aPL stanowią kryterium klasyfikacyjne dla APS jeśli są oznaczone wystandaryzowanymi metodami, tzn. opartymi o uznane kalibratory (standardy Sapporo) dla aCL i  $a\beta_2$ GPI, a w przypadku LA – zgodnie z zaleceniami Komitetu Standaryzacyjnego ISTH.

Przedstawiona praca miała na celu wykazanie przydatności zastosowania przeciwciał monoklonalnych (23H9 i 28F4 dla LA, oraz HCAL i EY2C9 dla aCL i  $a\beta_2$ GPI) dla ujednolicenia metod oznaczania przeciwciał antyfosfolipidowych.

Zachowanie się mysich przeciwciał monoklonalnych przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ -glikoproteinie I (23H9) i ludzkiej protrombinie (28F4) wykazujących własności antykoagulantu toczeniowego oceniono w 24 próbkach osocza ludzkiego, do których dodano w/w przeciwciała. Stwierdzono, że efekt LA zależny od obecności  $\beta_2$ GPI jest znacznie wyraźniejszy w testach krzepnięcia zależnych od fosfolipidów (PTT LA, DVV test, dPT) w porównaniu z LA związanym z obecnością przeciwciał przeciwko protrombinie. Testem przesiewowym, najbardziej czułym wobec LA okazał się PTT LA, nieco słabszym test krzepnięcia aktywowany jadem żmii Russela (DVV).

Mysie, humanizowane przeciwciała przeciwko ludzkiej  $\beta_2$ GPI (HCAL i EY2C9; tzw. standardy Sapporo) zostały wykorzystane jako kalibratory referencyjne obok standardów własnych (surowice pacjenta o wysokim mianie przeciwciał) do wyznaczenia punktu odcięcia dla wartości dodatnich w grupie osób zdrowych, dla aCL i  $a\beta_2$ GPI, oraz do oceny powtarzalności własnej metody oznaczania aCL.

Zarówno dla aCL jak i dla  $a\beta_2$ GPI stwierdzono zgodność wartości 99 percentyla obliczonego dla wyników odczytanych wobec standardu własnego i przeciwciał monoklonalnych. Nie zaobserwowano także większych rozbieżności w interpretacji wyników, jako dodatnie i ujemne, co miało istotne znaczenie dla postawienia właściwego rozpoznania. Ocena zmienności wewnątrz serii dla aCL była dobra; współczynnik zmienności dla obydwu klas nie przekroczył zalecanej wartości 20 %. Wartość CV dla zmienności pomiędzy seriami była wyższa (dla obydwu klas), ale zaobserwowano, iż była ona niższa jeśli użyto jako standardu przeciwciał monoklonalnych.

W pracy oceniono także, w oparciu o dane kliniczne dla 336 pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi, ryzyko wystąpienia powikłań klinicznych. Stwierdzono, że i dla zakrzepicy i dla powikłań położniczych największe ryzyko związane jest z obecnością przeciwciał  $a\beta_2$ GPI w klasie IgG. Nieco mniejsze z obecnością LA i aCL IgG.

Wyniki badań potwierdzają konieczność dalszych prób ujednoczenia metod oznaczania aCL i  $a\beta_2$ GPI. Wskazują także na konieczność stosowania w codziennej praktyce referencyjnych kalibratorów i materiałów kontrolnych, którymi mogłyby być przeciwciała monoklonalne.

## 8. SUMMARY

Antiphospholipid antibodies are directed against proteins (mostly  $\beta_2$ -glycoprotein I and prothrombin) forming complexes with negatively charged phospholipids.

Association of antiphospholipid antibodies (LA and/or aCL and/or  $a\beta_2$ GPI) with characteristic clinical symptoms (thrombosis and obstretical complications) forms the criteria of antiphospholipid syndrome.

The presence of antiphospholipid antibodies is detected by means of two independent methods, coagulometric (LA) and immunoenzymatic (aCL and/or  $a\beta_2$ GPI).

According to guidelines published in 2006, aPL antibodies are considered as classification criteria for APS, as long as they are determined using standardized methods, i.e. based on recognized calibrators for aCL and  $a\beta_2$ GPI, and according to ISTH Standardization Subcommittee in case of LA.

The purpose of the present study was to assess the usefulness of monoclonal antibodies (23H9 and 28F4 for LA, and HCAL and EY2C9 for aCL and  $a\beta_2$ GPI, respectively) as standards for antiphospholipid antibodies detection methods.

The interaction between mouse antibodies against human  $\beta_2$ -glycoprotein I (23H9) and human prothrombin (28F4), possessing the properties of lupus anticoagulant was analyzed in 24 human plasma samples.  $\beta_2$ GPI-dependent LA effect observed in phospholipid-dependent coagulation assays differed markedly from LA associated with the presence of antibodies against prothrombin. PTT LA turned out to be the most sensitive screening test for LA; dilute Russell Viper Venom Time (DVV) was found to be somewhat less sensitive.

Mouse humanized antibodies against human  $a\beta_2$ GPI (HCAL and EY2C9; “Sapporo standards”) were used as reference calibrators in comparison to in-house standards (serum from patients with known high antibody titer) to establish a cut-off point for positive values in

healthy controls. They were also used for assessing intralaboratory reproducibility for aCL determination method.

Ninety-ninth percentile values calculated for both aCL and a $\beta_2$ GPI with the use of in-house standard and with monoclonal antibodies were very similar. Moreover, no significant difference was observed while classifying the results as positive or negative; a very important finding for establishing the proper diagnosis.

Intra-serial variation for aCL was good; coefficient of variation (CV) for both classes did not exceeded recommended value of 20%. Inter-serial CV value was higher (for both classes). It was lower, however, when monoclonal antibodies were used as a standard.

The present study also assessed the risk of clinical complications in 336 patients suffering from autoimmune diseases. The stronger risk of both thrombosis and obstretic complications was associated with the presence of IgG a $\beta_2$ GPI antibodies. The risk was somewhat lower for IgG aCL and LA.

Our results confirm and justify further attempts to standardize methods of aCL and a $\beta_2$ GPI determination. We also emphasize the need to use in daily practice generally accepted reference calibrators and control materials such as monoclonal antibodies.

## 9. PIŚMIENICTWO

- 
- <sup>1</sup> Wasserman A., Neisser A., Bruk C.: Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. Dtsch Med Wochenschr. 1906; 32: 745-746.
- <sup>2</sup> Pangborn M.C.: A new serologically active phospholipid from beef heart. Proc Soc Exp Biol Med. 1941; 48: 484-486.
- <sup>3</sup> Conley C.L., Hartmann R.C.: A haemorrhage disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. J Lab Clin Invest. 1952; 31: 621.
- <sup>4</sup> 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.
- <sup>5</sup> Feinstein D.I., Rappaport S.I. Acquired inhibitors of blood coagulation. Prog Haemost Thromb. 1972; 1: 75-95.
- <sup>6</sup> Harris E.N. et al. Anticardiolipin antibodies, detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in lupus erythematosus. Lancet. 1983; 2: 1211.
- <sup>7</sup> Harris E.N. Syndrom of the black swan. Br J Rheumatol. 1987; 26: 324-326.
- <sup>8</sup> Galli M., Comfurius P., Maasen C., Hemker H.C., De Baets M.H., van Breda-Vriesman P.J.C., Barbui T., Zwaal R.F.A., Bevers E.M. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. Lancet. 1990; 335: 1544-1547.
- <sup>9</sup> Matsuura E., Igarashi Y., Fujimoto M., Ichikawa K., Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet 1990; 336: 177-178.
- <sup>10</sup> 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 inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci. 1990; 87: 4120-4124.
- <sup>11</sup> Bevers E.M., Galli M., Barbui T., Comfurius P., Zwaal R.F.A. Lupus anticoagulant IgGs (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. Thromb Haemost. 1991; 66: 629.
- <sup>12</sup> Oosting J.D., Derksen R.H., Bobbink I.W., Hackeng T.M., Bouma B.N., de Groot P.G. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? Blood 1993; 81: 2618-2625.
- <sup>13</sup> Sugi T., McIntyre J.A. Autoantibodies to phosphatidyletanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. Blood 1995; 86: 3083-3089.
- <sup>14</sup> Nakamura N., Kuragaki C., Shidara Y., Yamaji K., Wada Y. Antibody to annexin V has anti-phospholipid and lupus anticoagulant properties. Am J Hematol. 1995; 49: 347-348.
- <sup>15</sup> Forastiero R.R., Martinuzzo M.E., Broze G.J. High titers of autoantibodies to tissue factor pathway inhibitor are associated with the antiphospholipid syndrom. J Thromb Haemost. 2003; 1: 718-724.

- 
- <sup>16</sup> Bidot C.J., Jy W., Horstman L.L., Huisheng H., Jimenez J.J., Yaniz M., Ahn Y.S. Factor VII/VIIIa: a new antigen in the antiphospholipid antibody syndrom. *Br J Haematol.* 2003; 120: 618-626.
- <sup>17</sup> Hunt J., Krillis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipids binding site (Cys281-Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol.* 1994; 152: 653:659.
- <sup>18</sup> Schousboe I. B<sub>2</sub>-glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood.* 1985; 5: 1086-1091.
- <sup>19</sup> Nimpf J., Bevers E.M., Bomans P.H.H. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β<sub>2</sub>-glycoprotein I. *Biochem Biophys Acta.* 1986; 884: 142-149.
- <sup>20</sup> Nimpf J., Wurm K., Kostner G.M. Interaction of β<sub>2</sub>-glycoprotein I with human blood platelets: influence upon ADP induced aggregation. *Thromb Haemost.* 1985; 54: 397-401.
- <sup>21</sup> Mori T., Takeya H., Nishioka J., Gabazza E.C., Suzuki K. B<sub>2</sub>-glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Thromb Haemost.* 1996; 75: 49-55.
- <sup>22</sup> Rao L.V., Hoang A.D., Rappaport S.I. Mechanism end effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood.* 1996; 88: 4173-4182.
- <sup>23</sup> Akimoto T., Akama T., Kono I., Sumida T. Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin autoantibodies In patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipis syndrom. *Lupus.* 1999; 8:761-766.
- <sup>24</sup> Puurunen M., Manttari M., Manninen V., Palouso T., Vaarala O. Antibodies to prothrombin crossreact with plasminogen in patients developing myocardial infraction. *Br J. Haematol.* 1998; 100: 374-379.
- <sup>25</sup> Angielski S., Rogulski J. *Biochemia kliniczna.* 1991: 383-386.
- <sup>26</sup> Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. *Biochemia Harpera.* 1995: 173-182.
- <sup>27</sup> Roubey R.A.S. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrom. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1444-1454.
- <sup>28</sup> Bevers E.M., Smeets E.F., Comfurius P., Zwaal R.F.A. Physiology of membrane lipid asymmetry. *Lupus* 1994; 3: 235-240.
- <sup>29</sup> Wang H.R., Philips G., Medof M.F., Mold C. Activation of the alternative complement pathway by exposure of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine on erythrocytes from sickle cell disease patients. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1326-1335.
- <sup>30</sup> Alacron-Segovia D., Perez-Vazquez M.E., Villa A.R., Drenkard C., Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrom within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 21: 275-286.

- 
- <sup>31</sup> Montecucco C., Caporali R. Hemocytopenias in antiphospholipid syndrom. W: Hughes Syndrom. Antiphospholipid syndrom. (red. M. Khamashta). Springer-Verlag, London, 2000; 20-31.
- <sup>32</sup> Mackworth-Young C.G. Antiphospholipid antibodies and disease. *Br J Rheumatol.* 1995; 34: 1009-1030.
- <sup>33</sup> Musiał J. Zespół antyfosfolipidowy. W: Zakrzepy i zatory. Pod red. S. Łopaciuka. PZWL, Warszawa, 2002: 89-104.
- <sup>34</sup> Cervera R., Asherson R.A. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics. *Immunobiology.* 2005; 210: 735-741.
- <sup>35</sup> Stasi R., Stipa E., Masi M., Oliva F., Sciarra A., Perroti A., Zaccari G., Papa G. Antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical significance and correlation to cytokine level in acute myeloid leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Thromb Haemost.* 1993; 70: 568-572.
- <sup>36</sup> Schlesinger P.A., Peterson L. Procainamid-associated lupus anticoagulants and thrombotic events. *Arthritis Rheum.* 1998; 31: 54.
- <sup>37</sup> Gulko P.S., Reveille J.D., Koopman W.J., Burgard S.L., Bartolucci A.A., Alcaron G.S. Anticardiolipin antibodies in SLE: clinical correlates, HLA associations, and impact on survival. *J Rheumatol.* 1993; 20: 1684-1693.
- <sup>38</sup> Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrom: a hypothesis based on parallelism with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 1996; 75: 536-541.
- <sup>39</sup> De Groot P.G., Derksen R.H.M. The influence of antiphospholipid antibodies on the protein C pathway. W: Hughes Syndrom. Antiphospholipid syndrom. (red. M.A. Khamashta). Springer-Verlag, London, 2000: 307-316.
- <sup>40</sup> Bohn H. Placental and pregnancy proteins. In: Carcinoembryonic proteins. Lehman F.G. Vol. Amsterdam: Elsevier, North Holland Biomedical Press. 1979; 289-299.
- <sup>41</sup> Kondo S., Noguchi M., Funakoshi T., Kisiel. Inhibition of human factor VII-tissue factor activity by placental anticoagulant protein. *Thromb Res.* 1987; 48: 449-459.
- <sup>42</sup> London F., Ahmad S.S., Walsh P.N. Annexin V inhibition of factor IXa-catalyzed factor X activation on human platelets and on negatively-charged phospholipids vesicles. *Biochemistry.* 1996; 35: 16886-16897.
- <sup>43</sup> Van Heerde W.L., Poort S., van Veer C., Reutelingsperger C.P.M., de Groot P.G. Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cell-mediated thrombin formation. *Biochemical J.* 1994; 302: 305-312.
- <sup>44</sup> Rand J.H. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for antiphospholipid syndrom. *J Autoimmunity;* 2000: 15: 107-111.
- <sup>45</sup> Cugno M., Cabibbe M., Galli M., Meroni P.L., Caccia S., Russo R. Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrom: evidence of



---

interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients. *Blood*. 2004; 103: 2121-2126.

<sup>46</sup> 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  $\beta_2$ -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood*. 2004; 103: 3766-3772.

<sup>47</sup> Guerin J., Sheng Y., Reddel S., Iverson M., Chapman M.G., Krilis S. Heparin inhibits the binding of  $\beta_2$ -glycoprotein I to phospholipids and promotes the plasmin-mediated inactivation of this blood protein. *J Biol Chem*. 2002; 277: 2644-2649.

<sup>48</sup> Salemniak I, Blezer R, Willems G.M., Galli M., Bevers E., Lindhout T. Antibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*. 2000; 84: 653-656.

<sup>49</sup> Forastiero R.R., Martinuzzo M.E., Broze G.J. High titres of autoantibodies to tissue factor pathway inhibitor are associated with the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 718-724.

<sup>50</sup> Groot P.G., Derksen H.W.M. Antiphospholipid antibodies: update on detection, pathophysiology and treatment. *Curr Opin Hematol*. 2004; 11: 165-169.

<sup>51</sup> Raschi E., Testoni C., Bosisio D., Borghi M.O., Koike T., Mantovani A., Meroni P.L. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood*. 2003; 101: 3495-3500.

<sup>52</sup> Lutters B.C.H., Derksen R.H.W.M., Teklenburg W.L., Lenting P.J., Arnout J., de Groot P.G. 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.

<sup>53</sup> Forastiero R., Martinuzzo M., Carreras L.O., Maclouf J. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid antibodies: association with increased excretion of platelet-derived thromboxane urinary metabolites. *Thromb Haemost*. 1998; 70: 42-46.

<sup>54</sup> 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.

<sup>55</sup> Ferrara D.E., Swerlick R., Casper K., Meroni P.L., Vega-Ostertag M.E., Harris E.N., Pierangeli S. Fluvastatin inhibits up-regulation of tissue factor expression by antiphospholipid antibodies on endothelial cells. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1558-1563.

<sup>56</sup> 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.

<sup>57</sup> Wilson W.W., Gharavi A.E., Koike T., Lockshin M.D., Branch D.W., Piette J.C. Brey R., Derksen R., Harris E.N., Hughes G.R.V., Triplett D.A., Khamashta M.A. International

---

consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrom. Report of an International Workshop. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1309-1311.

<sup>58</sup> Miyakis S., Lockshin T., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R., Derksen R.H.W.M., De Groot P.G., Koike T., Meroni P.L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P.G., Krilis S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2006; 3: 1-12.

<sup>59</sup> Horbach D.A., van Oort E., Donders R.C.J.M., Derksen R.H.W.M., de Groot P.G. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipids antibodies. *Thromb Haemost.* 1996; 76: 916-924.

<sup>60</sup> Swadźba J., DeClerck L.S., Stevens W.J., Bridts C.H., van Cotten K.A., Musiał J., Jankowski M., Szczeklik A. Anticardiolipin, anti B2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies and lupus anticoagulant in patients with SLE with a history of thrombosis. *J Rheumatol.* 1997; 24: 1710-1715.

<sup>61</sup> Arnout J., Wittervrongel C., Vanrusselt M., Hoylaerts M., Vermeylen J. B<sub>2</sub>-glycoprotein I dependent lupus anticoagulants form stable bivalent antibody beta-2-glycoprotein I complexes on phospholipid surfaces. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 79-86.

<sup>62</sup> Arnout J., Vermeylen J. Lupus anticoagulants: mechanistic and diagnostic considerations. W; Hughes Syndrome. *Antiphospholipid Syndrom.* (red. M.A. Khamashta). Springer-Verlag, London. 2000: 225-237.

<sup>63</sup> de Laat B.H., Derksen R.H.W.M., Urbanus R.T., Roest M., de Groot P.G. β<sub>2</sub>-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2004; 104: 3598-3602.

<sup>64</sup> Horbach D.A., van Oort E., Derksen R.H., de Groot P.G. The contribution of anti-prothrombin antibodies to lupus anticoagulant activity - discrimination between functional and non-functional anti-prothrombin antibodies. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 790-795.

<sup>65</sup> Simmelink M.J., Horbach D.A., Derksen R.H., Meijers J.C., Bevers E.M., Willems G.M., de Groot P.G. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic surfaces. *Br J Haematol.* 2001; 113: 621-629.

<sup>66</sup> Galli M., Luciani D., Bertolini G., Barbui T. Anti-β<sub>2</sub>-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2003; 102: 2717-2723.

<sup>67</sup> Galli M. Antiphospholipid Syndrome: Association between laboratory tests and clinical practice. *Patho Haemost Thromb.* 2004; 33: 249-255.

<sup>68</sup> Simmelink M.J., Derksen R.H., Arnout J., de Groot P.G. A simple method to discriminate between beta2-glycoprotein I lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 740-747.

- 
- <sup>69</sup> Pengo V., Biasiolo A., Pegoraro C., Iliceto S. A two-step coagulation test to identify anti-beta2-glycoprotein 1 lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 702-707.
- <sup>70</sup> Sletnes E., Gravem K., Wisloff F. Preparation of plasma for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 1992; 66: 43-53.
- <sup>71</sup> Brnie W.F., Schaus M.R., Cooper K.E., O'Keefe B.T., Inwood M. Lupus anticoagulant testing: effect of the platelet count on the activated partial thromboplastin time. *Br J Biomed Sci.* 1993; 50: 114-116.
- <sup>72</sup> Brandy J.T., Triplett D.A., ALving B., Scharer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995; 74: 1185-1190.
- <sup>73</sup> Exner T. Triplett D.A., Taberner D., Machin S.J. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. SSC Subcommittee for the Standardisation of Lupus Anticoagulants. *Thromb Haemost.* 1991; 65: 320-322.
- <sup>74</sup> Arnout J., Vanrusselt M., Wittevrongel C., Vermylen J. Monoclonal antibodies against beta 2-glycoprotein I; use as reference material for lupus anticoagulant. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 955-958.
- <sup>75</sup> Loizou S., Mc Crea J.D., Rudge A.C., Reynolds R., Boyle C.L., Harris E.N.: Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Exp Immunol.* 1985; 62: 738-745.
- <sup>76</sup> De Laat B., Derksen R.H.W.M., van Lummel M., Pennings M.T.T., de Groot P.G. Pathogenic anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies recognize domain I of  $\beta_2$ -glycoprotein I only after a conformational change. *Blood.* 2006; 107: 1916-1924.
- <sup>77</sup> Harris E.N., Gharavi A.E., Patel S.P., Hughes G.R.V.: Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol.* 1987; 68: 215-222.
- <sup>78</sup> Ichikawa K., Tsutsumi A., Atsumi T., Matsuura E., Kobayashi S., Hughes G. R. Et al. A chimeric antibody with the human gamma1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG beta2-glycoprotein I – dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 2461-2470.
- <sup>79</sup> Viard J.P., Amoura Z., Bach J.F. Association of anti-beta 2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1992; 93: 181-186.
- <sup>80</sup> de Laat B.H., Derksen R.H.W.M., Urbanus R.T., Roest M., de Groot P.G.  $\beta_2$ -glycoprotein I dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2004; 104: 3598-3602.
- <sup>81</sup> Sebastiani G.D., Galeazzi M., Tincani A., Piette J.C., Font J., Allegri F., Mathieu A., Smolen J., Garrido E., Fernandez-Nebro A., Jedryka-Goral J., Papasteriades C., Morozzi G., Bellisai F., De Pita O., Marcolongo R. Anticardiolipin and anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in a

---

large series of European patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 1999; 28: 344-351.

<sup>82</sup> Forastiero R.R., Martinuzzo M.E., Cerrato G.S., Kordach L.C., Carreras L.O. Relationship of anti beta2-glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. 1997; 78: 1008-1014.

<sup>83</sup> Myers B., Goud J. The place of beta 2 glycoprotein I In the assessment of antiphospholipid syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003; 14: 1-6.

<sup>84</sup> 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.

<sup>85</sup> Sanmarco M., Bardin N., Blank M., Pascal V., Alessi M.C., Dignat-George F., Shoenfeld Y., Harle J.R. Heterogeneity of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. A factor of variability in test results. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 796-797.

<sup>86</sup> Reber G., Tincani A., Sanmarco M., de Moerloose P., Boffa M.C. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization Group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1860-1862.

<sup>87</sup> Goudemand J., Caron C., De Prost D., Derlon A., Borg J.Y., Sampol J., Sie P. Evaluation of sensitivity and specificity of a standardized procedure using different reagents for the detection of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*. 1997; 77: 336-342.

<sup>88</sup> Jacobsen E.M., Barna-Cler L., Taylor J.M., Triplett D.A., Wisloff F. The evaluation of clotting times in the laboratory detection of lupus anticoagulants. *Thromb Res*. 2001; 104: 275-282.

<sup>89</sup> Lawrie A.S., Mackie I.J., Purdy G., Machin S.J. The sensitivity and specificity of commercial reagents for the detection of lupus anticoagulant show marked differences in performance between photo-optical and mechanical coagulometers. *Thromb. Haemost*. 1999; 81: 758-762.

<sup>90</sup> Tripodi A., Biasiolo A., Chantarangkul V., Pengo V. Lupus anticoagulant (LA) Testing: Performance of Clinical Laboratories Assessed by a National Survey Using Lyophilized Affinity-purified Immunoglobulin with LA activity. *Clinical Chemistry*. 2003; 10: 1608-1614.

<sup>91</sup> Arnout J., Meijer P., Vermeylen J. Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Action on Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human beta2-glycoprotein I. *Thromb Haemost*. 1999; 81: 929-934.

<sup>92</sup> Jennings I., Mackie I., Arnout J., Preston F.E. Lupus anticoagulant testing using plasmas spiked with monoclonal antibodies: performance in the UK NEQAS proficiency testing programme. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 2178-2184.

<sup>93</sup> Le Querrec A., Arnout J., Arnoux D., Borg J.Y., Caron C., Darnige L., Delahousse B., Reber G., Sie P. Quantification of Lupus Anticoagulants in Clinical Samples Using Anti- $\beta_2$ GPI and Anti-Prothrombin Monoclonal Antibodies. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 584-589.

- 
- <sup>94</sup> Galli M., Lott J., Orbis F., Ruggeri L., Cler L., Triplett D.A., Barbui T. Lupus anticoagulants and thrombosis: clinical association of different coagulation and immunologic tests. *Thromb Haemost.* 2000; 84: 1012-1016.
- <sup>95</sup> Harris E.N., Gharavi A.E., Patel S.P., Hughes G.R.V., Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held April 4 1986. *Clin Exp Immunol.* 1987; 68: 215-222.
- <sup>96</sup> Pierangeli S.S., Steward M., Silva L.K., Harris E.N. Report of an anticardiolipin wet workshop during the VIIth International Symposium on antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1998; 25: 156-162.
- <sup>97</sup> Reber G., Arvieux J., Comby E., Degenne D., de Moerloose P., Sanmarco M, et al. Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost.* 1995; 73: 444-452.
- <sup>98</sup> Tincani A., Allegri F., Sanmarco M., Cinquini M., Taglietti G., Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations. A cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 575-583.
- <sup>99</sup> Harris E.N., Pierangeli S.S. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus.* 2002; 11: 269-275.
- <sup>100</sup> Reber G., Schousboe I., Tincani A., Sanmarco M., Kveder T., de Moerloose P, et al. Inter-laboratory variability of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I measurement. Forum on antiphospholipid antibodies standardization group. *Thromb Haemost.* 2002; 88: 66-73.
- <sup>101</sup> Tincani A., Allegri F., Balestrieri G., Reber G., Sanmarco M., Meroni P., Boffa M.C. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2004; 114: 553-558.
- <sup>102</sup> Wong R.C.W. Gillis D., Adelstein S., Baumgart K., Favaloro M.J., Hendle M.J., et al. Consensus guidelines on anticardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology.* 2004; 36: 63-68.
- <sup>103</sup> Audrain M.A., El-Kouri D., Hamidou M.A., Mioche L., Ibara A., Langlois M.L., Muller J.Y. Value of autoantibodies to  $\beta$ 2-glycoprotein I in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2002; 41: 550-553.
- <sup>104</sup> Swadźba J., Iwaniec T., Wilańska J., Musiał J. Zespół antyfosfolipidowy w przebiegu chorób autoimmunologicznych. *Pol A Med Wew.* 2006; 5: 432-437.
- <sup>105</sup> Bahar A.M., Kwak J.Y., Beer A.E., Kim J.H., Nelson L.A., Beaman K.D., Gilman-Sachs A. Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in non-pregnant women with unexplained spontaneous recurrent abortions. *J Reprod Immunol.* 1993; 24: 213-222.
- <sup>106</sup> Spadaro A., Riccieri V., Terracina S., Rinaldi T., Taccari E., Zoppini A. Class specific rheumatoid factors and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000; 9: 56-60.

- 
- <sup>107</sup> Lee R.M., Branch D.W., Silver R.M. Immunoglobulin A anti beta(2)-glycoprotein I antibodies in women who experienced unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185: 748-753.
- <sup>108</sup> Reber G., Moerloose P. Anti beta(2)-glycoprotein I antibodies – when and how should they be measured? *Thromb Haemost.* 2004; 114: 524-531.
- <sup>109</sup> 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.
- <sup>110</sup> Forastiero R.R., Martinuzzo M.E., Cerrato G.S., Kordach L.C., Carreras L.O. Relationship of anti beta2-glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 1008-1014.
- <sup>111</sup> Obermoser G., Bitterlich W., Kunz F., Sepp N.T., Clinical Significance of Anticardiolipin Antibodies and Anti-β2-Glycoprotein I Antibodies. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004; 135: 148-153.
- <sup>112</sup> Lee E.Y., Lee C.K., Lee T.H., Chung S.M., Kim S.H., Cho Y.S., Yoo B., Moon H.B., Does the anti-beta-2-glycoprotein I antibody provide additional information in patients with thrombosis? *Thromb Res.* 2003; 111: 29-32.
- <sup>113</sup> Nash M.J., Camillieri R.S., Kunka S., Mackie I.J., Machin S.J., Cohen H. The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 1077-1081.
- <sup>114</sup> Ebeling F., Pettersson T., Muukkonen L., Vahtera E., Rasi V. Beta-2-glycoprotein I antibodies in patients with thrombosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2003; 63: 111-118.
- <sup>115</sup> Ginsburg K.S., Liang M.H., Newcomer L., Goldhaber S.Z., Schur P.H., Hennekens C.H., Stampfer M.J. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med.* 1992; 117: 997-1002.
- <sup>116</sup> Runcney S.S., Folsom A.R., Tsai M.Y., Cushman M., McGovern P.D. Anticardiolipin antibodies as a risk factor for venous thromboembolism in a population-based prospective study. *Br J Haematol.* 2002; 119: 1005-1010.
- <sup>117</sup> Naess I.A., Christiansen S.C., Cannegieter S.C., Rosendaal F.R., Hammerstroem J. A prospective study of anticardiolipin antibodies as a risk factor for venous thrombosis in a general population (the HUNT study). *J Thromb Haemost.* 2005; 4: 44-49.
- <sup>118</sup> De Groot P.G., Derksen R.H.W.M. The importance of measuring anticardiolipin antibodies. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 41-43.