

Agata Lehmann-Kopydłowska

Zakrzepica żylna i tętnicza jako objaw zespołu antyfosfolipidowego

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Wykonana w Pracowni Hemostazy i Genetyki Szpitala im. J Strusia w Poznaniu
oraz
Pracowni Hemostazy Kliniki Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu
Krwiotwórczego
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. med. Mieczysław Komarnicki

Kierownik Pracowni Hemostazy,
następnie Pracowni Hemostazy i Genetyki: Prof dr hab. med. Krystyna Zawilska

Promotor: Prof dr hab. med. Krystyna Zawilska

Spis treści

1. Wykaz używanych skrótów.....	3
2. Wstęp.....	4
3. Cel pracy.....	26
4. Materiał kliniczny.....	27
5. Metodyka.....	31
6. Obliczenia statystyczne.....	52
7. Wyniki badań.....	53
8. Omówienie	61
9. Wnioski.....	76
10. Streszczenie.....	77
11. Załączniki.....	79
12. Piśmiennictwo.....	89

Wykaz używanych skrótów

aAPA	-	asymptomatic antiphospholipid antibodies
ACA	-	anticardiolipin antibodies – przeciwciała antykardiolipinowe
APA	-	antiphospholipid antibodies
APS	-	antiphospholipid syndrome
aPCR	-	activated protein C resistance - oporność na aktywowane białko C
aPT	-	antiprothrombin antibodies - przeciwciała przeciw protrombinie
aPTT	-	activated partial thromboplastin time - czas częściowej tromboplastyny po aktywacji
ASD	-	atrial septal defect - ubytek przegrody międzyprzedsionkowej
β_2 -GPI	-	β_2 -glikoproteina-I
CAPS	-	catastrophic antiphospholipid syndrome - katastrofalny zespół antyfosfolipidowy
CD	-	antygen różnicowania komórkowego (cluster of differentiation)
DRVVT	-	dilute Russel viper venom time – czas krzepnięcia osocza po dodaniu jadu żmii Russela
DVT	-	deep vein thrombosis - zakrzepica żył głębokich
ECAT	-	International External Quality Assessment Programme in Thrombosis and Haemostasis
ISTH	-	International Society of Thrombosis and Haemostasis - Międzynarodowe Towarzystwo do Spraw Zakrzepicy i Hemostazy
LA	-	lupus anticoagulant
LMWH	-	low molecular weight heparin - heparyna drobnocząsteczkowa
oxLDL	-	oxidized low density lipoprotein - utlenowane lipoproteiny o niskiej gęstości
PAPS	-	primary antiphospholipid syndrome
PF4	-	platelet factor 4 - czynnik płytkowy 4
PFO	-	patent foramen ovale - drożny otwór owalny
SLE	-	systemic lupus erythematosus
ZP	-	zatorowość płucna
ZŻG	-	zakrzepica żył głębokich
ŻChZZ	-	żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

WSTĘP

Analiza danych epidemiologicznych ostatnich lat dotyczących żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ), obejmującej zakrzepicę układu żył głębokich (ZŻG) wraz z jej niebezpiecznym powikłaniem – zatorowością płucną (ZP), wskazuje, iż w krajach wysoko rozwiniętych choroba ta jest poważnym problemem społecznym. W populacji ogólnej częstość wystąpienia pierwszego, potwierdzonego epizodu ZŻG szacuje się na 0,5/1000/rok (1).

Badanie populacyjne EPI-GETBO przeprowadzone w zachodniej części Francji (Bretania) wykazało, że zachorowalność na ŻChZZ wynosi 183/100 000 mieszkańców rocznie, w tym 123 zachorowań na ZŻG i 60 zachorowań na ZP (2). W Szwecji (Malmö) stwierdzono, iż roczna zachorowalność na ŻChZZ sięga 160/100 000 mieszkańców (3). W 2004 r. w oparciu o badanie VITAE oszacowano, że w 6 krajach Europy Zachodniej (Francja, Niemcy, Włochy, Hiszpania, Szwecja, Wielka Brytania), o populacji liczącej łącznie 310 mln, na objawową ZŻG mogło zachorować ponad 465 tysięcy osób, na zatorowość - ponad 295 tysięcy osób, a z tego powodu mogło umrzeć około 370 tysięcy chorych. Analiza ta pozwoliła też stwierdzić, że na skutek przebytej ŻChZZ zespół pozakrzepowy mógł wystąpić u ponad 395 tysięcy osób, zaś zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne - u ponad 4 tysięcy osób (4).

Nowe dane statystyczne wskazują na ŻChZZ jako przyczynę zgonów ponad 500 tysięcy osób rocznie, tj. ponad dwa razy więcej, niż z powodu raka piersi, raka gruczołu krokowego, wypadków drogowych i zakażeń HIV łącznie (5)! W Stanach Zjednoczonych w ciągu roku na objawową ŻChZZ cierpi ponad 600 tysięcy osób, z czego 200 tysięcy umiera (6), zaś zatorowość płucną rozpoznaje się u ponad 500 000 w skali rocznej, przy czym liczba zgonów na skutek ZP jest trudna do ustalenia. W około 25% przypadków ostrej zatorowości płucnej może wystąpić nagłe zatrzymanie krążenia i zgon, dlatego dane na temat śmiertelności z powodu ZP - ze względu na trudność dokładnego oszacowania - w większości przedstawiane są w zakresach liczbowych. Z rejestru ICOPER (International Cooperative Pulmonary Embolism Registry) wynika, że trzymiesięczna śmiertelność w zatorowości płucnej wynosi około 17% i waha się od 60% przy objawach niestabilności hemodynamicznej do 15% u pacjentów z prawidłowym ciśnieniem tętniczym przy przyjęciu. Wyniki autopsji wskazują na ZP jako bezpośrednią przyczynę zgonów szpitalnych u około 7%, z czego aż około 80% zostaje rozpoznanych dopiero pośmiertnie.

Ilość zachorowań na ŻCHZZ zdecydowanie wzrasta z wiekiem, a u osób w wieku > 80 lat dochodzi do 500/100 000 rocznie, przy czym około 70% zachorowań dotyczy osób w wieku > 60 lat. Fakt ten ma ogromne znaczenie społeczne, gdyż wyżej przedstawione dane jasno wskazują na zwiększoną konieczność rozpoznawania, zapobiegania i leczenia ŻChZZ w dobie starzenia się społeczeństw.

Drogą interpolacji danych z USA i Europy Zachodniej można oszacować, że w Polsce w skali rocznej około 56 tysięcy osób zapada na zakrzepicę żył głębokich, a około 35 tysięcy doznaje objawowej zatorowości płucnej.

Samoistna ŻCHZZ, tj. taka, której nie można wytłumaczyć czynnikami ryzyka wynikającymi z trybu życia, stanu zdrowia i zażywanych leków, w ponad 50% przypadków wykazuje związek z współistniejącą tendencją do występowania zakrzepów – wrodzoną lub nabytą trombofilią. Aż u 10-20% chorych takim czynnikiem prozakrzepowym są przeciwciała antyfosfolipidowe (antiphospholipid antibodies – APA) [7]. I chociaż ŻCHZZ jest najczęstszą manifestacją trombofilii, niejednokrotnie – przeważnie na tle zaburzeń nabytych - dochodzi do wytworzenia zakrzepów tętnicznych. Spośród nich najczęściej występują epizody upośledzające krążenie mózgowe [udar mózgu i przejściowe niedokrwienie mózgu (transient ischemic attack - TIA) oraz naczyniowe zespoły otępienne], krążenie wieńcowe (choroba wieńcowa, mikrozakrzepica mięśnia serca, skrzepliny wewnątrzsercowe nieznanego pochodzenia) oraz zakrzepica naczyń obwodowych (np. tętnic skórnych, siatkówki i nerek). Wśród chorych na udar niedokrwienny mózgu aż u około 30% wykrywa się przeciwciała antyfosfolipidowe (7). Ich obecność jest znaczącym czynnikiem ryzyka żylnych i tętnicznych powikłań zakrzepowych oraz niepowodzeń ciąży, tworzących kliniczne kryteria diagnostyczne tzw. zespołu antyfosfolipidowego (antiphospholipid syndrome – APS) – choroby autoimmunologicznej wywołanej przez autoprzeciwciała komplementarne do kompleksów białkowo-fosfolipidowych biorących udział w procesie krzepnięcia krwi. Powikłania zakrzepowe wnikające przebieg APS z reguły (w 2/3 przypadków) związane są z krążeniem żylnym, głównie układu głębokiego kończyn dolnych, i w konsekwencji – z zatorowością płucną. Rzadziej rozpoznawana jest zakrzepica żylna naczyń szyjnych, żył kończyn górnych albo narządów jamy brzusznej. Spośród zakrzepowych powikłań tętnicznych, jak już wcześniej wspomniano, najczęściej dochodzi do udarów niedokrwiennych mózgu, zaś zakrzepicę tętnic obwodowych stwierdza się u mniej niż 5% chorych. Epizody zakrzepowe w przebiegu zespołu antyfosfolipidowego mają charakter nawracający. Ich nawroty zlokalizowane są przeważnie w miejscu pierwotnego

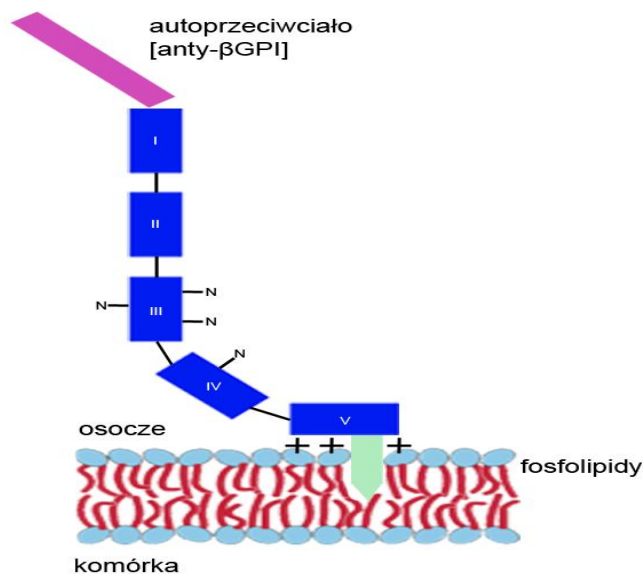
wystąpienia - odpowiednio w układzie żylnym, tętniczym lub niekiedy obu jednocześnie (8). W przypadku APS częstość nawrotów zakrzepicy po zaniechaniu wtórnej profilaktyki przeciwzakrzepowej sięga aż 30% rocznie oraz 78% - w ciągu 8 lat (9). Zespół antyfosfolipidowy stanowi sztandarowy, najczęściej występujący przykład nabytej trombofilii.

APS definiowany jest jako współistnienie żylnych i/lub tętniczych powikłań zakrzepowych i/lub niepowodzeń ciąży z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, manifestujących się paradoksalnym – przy braku objawów skazy krwotocznej - wydłużeniem przesiewowych czasów krzepnięcia krwi zależnych od anionowych fosfolipidów (phospholipids - PL) [10] oraz wzrostem miana APA w wystandaryzowanym teście ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Wyodrębniane są dwie postaci zespołu antyfosfolipidowego – współistniejący z inną chorobą autoimmunologiczną [najczęściej - bo w 30 - 50% przypadków - rozpoznawany jest toczeń rumieniowaty układowy (systemie lupus erythematosus – SLE)] oraz pierwotny - przy ich nieobecności. Wg opinii ekspertów sens takiej klasyfikacji nie ma uzasadnienia, wobec braku różnic w obrazie klinicznym oraz przebiegu powikłań zakrzepowych wywołanych obecnością APA (11). Zalecane jest natomiast rzetelne udokumentowanie współistnienia SLE lub innej choroby autoimmunologicznej (12). Do bardzo groźnych, choć rzadkich stanów klinicznych należy katastrofalna postać zespołu antyfosfolipidowego (catastrophic antiphospholipid syndrome – CAPS), w której rozsiane zakrzepy naczyń małego i dużego kalibru są odpowiedzialne za ostre niedokrwienie, a w konsekwencji zawał i równoczesne lub na przestrzeni tygodnia upośledzenie funkcji wielu (co najmniej trzech) narządów, w tym głównie nerek i płuc, nierzadko - ośrodkowego układu nerwowego. CAPS częściej pojawia się u kobiet niż u mężczyzn, zaś średnim wiekiem występowania jest 38 r.ż (od 10-70 lat). Ustalono, że bezpośrednim czynnikiem sprawczym są zakażenia, urazy i stres, nakładające się na obecność APA. Wśród kluczowych objawów zespołu należy wymienić: stany gorączkowe, obrzęki obwodowe, duszność, płamicę, zaburzenia świadomości. Śmiertelność w CAPS jest bardzo wysoka – sięga 50%, zgon następuje w obrazie niewydolności wielonarządowej: oddechowej, krążenia, nerek. Obraz kliniczny zwodniczo sugeruje rozsiane krzepnięcie śródnacyniowe (DIC – disseminated intravascular coagulation) albo zakrzepową płamicę małopłytkową, dlatego laboratoryjne potwierdzenie obecności APA, obok metod obrazowych, stanowi rozstrzygający element diagnostyczny i terapeutyczny.

Istnieją pewne dodatkowe objawy kliniczne i laboratoryjne bezspornie wykazujące częsty związek z zespołem antyfosfolipidowym, jednak ze względu na zbyt duże ryzyko ograniczenia swoistości diagnostycznej, nie przypisano im charakteru niezależnego kryterium klinicznego czy laboratoryjnego. Należą do nich: uszkodzenie zastawek serca, z jałowym zapaleniem wsierdza typu Libmana-Sacksa jako jedną z przyczyn włącznie, sinica siateczkowata (*livedo reticularis*), objawy neuro- i nefrologiczne, małopłytkowość, niedokrwistość autoimmunohemolityczna, obecność APA nie ujętych w kryteriach diagnostycznych. Wobec trudności z zaklasyfikowaniem chorych prezentujących w/w objawy sformułowano pojęcie tzw. „prawdopodobnego” APS, zaś stwierdzanym zaburzeniom przypisano termin „współistniejących” z zespołem antyfosfolipidowym (12).

Przeciwciała antyfosfolipidowe stanowią bardzo heterogenną grupę autoprzeciwciał klasy IgG, IgM i rzadziej - IgA (tym ostatnim nie przypisuje się charakteru patogenego), dla których celem są antygeny białek osocza (a nie fosfolipidy, jak wyjściowo uważano), czyli kofaktorów białkowych wiążących się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami lub innymi anionowymi powierzchniami w nieobecności PL, tworząc kompleksy fosfolipidowo-białkowe (13). Pojęcie „fosfolipidy” znamionuje nie tylko najpowszechniej znaną kardiolinę, ale także inne ujemnie naładowane związki fosfolipidowe: fosfatydyloglicerol, fosfatydyloserynę, fosfatydyloinozytol oraz fosfolipidy bipolarne i obojętne, jak: fosfatydyloetanolaminę i fosfatydylocholinę.

Do głównych reprezentantów kofaktorów białkowych należy II czynnik krzepnięcia - protrombina oraz β 2-glikoproteina I (β 2-GPI) [14] lub inaczej apolipoproteina H. Jest to 1-łańcuchowe, glikozylowane białko osoczowe, wytwarzane głównie przez wątrobę, zbudowane z 326 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 50 kDa, należące do rodziny białek kontroli komplementu i biorące udział w aktywacji komórek śródbłonna. Łańcuch białkowy zawiera 5 powtarzających się domen liczących 60 aminokwasów (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schematyczna budowa β2-glikoproteiny I (β2-GPI)

W obrębie domeny V-ej mieści się kationowy fragment (w okolicy końca karboksylowego łańcucha peptydowego), który jest odpowiedzialny za zakotwiczenie cząsteczki białka w podwójnej błonie fosfolipidowej, natomiast domena I (okolica N-końcowa) zawiera epitopy rozpoznawane przez APA klasy IgG (głównie IgG₂) immunoglobulin. Wykazano, że β₂-GPI może stanowić jeden z największych epitopów dla APA, ale nie jedyny, zaś kompleks z PL umożliwia stworzenie miejsca antygenowego dla przeciwciał antyfosfolipidowych. Biologiczna funkcja β₂-glikoproteiny w ustroju nie jest poznana - sugeruje się jej rolę w usuwaniu komórek i mikrocząstek wkraczających na drogę apoptozy (15). Znane są inne białka, wykazujące zdolność wiązania APA. Wśród nich można wymienić: trombomodulinę, antytrombinę, białko C i S, aneksynę I i V, wielko- i drobnocząsteczkowy kininogen, czynnik X – każde z nich, w większym lub mniejszym stopniu, zaangażowane jest w proces krzepnięcia krwi, wykazując działanie pro- lub przeciwzkrzepowe (13).

W celu rozpoznania APS wg obowiązujących wytycznych należy wykazać współistnienie 2 kryteriów: klinicznego i laboratoryjnego. Kryterium laboratoryjne obejmuje 2-krotne wykazanie obecności przeciwciał antyfosfolipidowych w odstępie ≥ 12 tygodni, przy czym jeśli pomiędzy objawami klinicznymi a wykryciem przeciwciał antyfosfolipidowych minęło 5 lat, nie należy rozpoznawać APS (12). Obecność APA w osoczu można potwierdzić, wykorzystując albo zjawisko in vitro paradoksalnego wydłużenia przesiewowych czasów krzepnięcia krwi zależnych od anionowych

fosfolipidów w wyniku ich zaburzonego wiązania z czynnikami krzepnięcia krwi (tzw. antykoagulant tocznia - lupus anticoagulant - LA), albo testy immunologiczne fazy stałej. LA powinien być rozpoznany zgodnie z zaleceniami International Society of Thrombosis and Haemostasis z 1995 roku (12, 16). Zgodnie z nimi, diagnostyka laboratoryjna antykoagulantu tocznia (przeprowadzona w ubogopłytkowym osoczu cytrynianowym, uzyskanym po natychmiastowym odwirowaniu pobranej krwi w celu zmniejszenia wpływu PL uwalnianych z płytek krwi) winna być 3-etapowa. Pierwszy krok, mający status testu przesiewowego, wymaga potwierdzenia wydłużenia minimum jednego z czasów krzepnięcia zależnych od fosfolipidów: czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (activated partial thromboplastin time – aPTT), czasu protrombinowego (prothrombin time – PT), PT z rozcieńczeniem (dilute PT – dPT), czasu krzepnięcia osocza po dodaniu jadu żmii Russela (dilute Russel viper venom time - DRVVT). Ponieważ żaden z wymienionych testów nie osiąga 100% czułości, w celu wykluczenia/wykazania obecności LA zaleca się wykonanie co najmniej 2 testów z tej samej próbki. Przedłużenie w/w czasu/czasów krzepnięcia upoważnia do rozpoczęcia II etapu - testów mieszania osocza badanego z kontrolnym (odpowiednio - w stosunku 1:1). Ma on charakter dodatniej kontroli – brak korekcji czasu krzepnięcia mieszaniny wskazuje na zależność zjawiska od PL (wykluczenie rzeczywistego niedoboru czynników krzepnięcia lub stosowania doustnych antykoagulantów). Trzeci etap jest testem potwierdzenia, polegającym na skróceniu przedłużonego czasu krzepnięcia po dodaniu nadmiaru PL pochodzących np. z: liposomów zawierających fosfatydyloserynę, mózgu królika, płytek krwi naprzemiennie zamrażanych i rozmrażanych czy też heksagonalnych fosfolipidów. Skrócenie to wskazuje na swoistość zjawiska wobec PL i świadczy o obecności LA (17, 18, 19).

Wg aktualnych wytycznych metody immunologiczne stosowane w diagnostyce APS obejmują: wykrycie przeciwciał antykardiolipinowych (anticardiolipin antibodies - ACA) klasy G (IgG) i M (IgM) w średnim lub wysokim mianie (tj. > 40 GPL lub MPL lub > 99 percentyla), a także immunoglobulin klasy IgG oraz IgM skierowanych przeciw β_2 -glikoproteinie I (anty- β_2 -GPI) > 99 percentyla) [12]. Zgodnie z opinią ekspertów, zalecany jest zależny od kryteriów laboratoryjnych podział chorych z APS na niższe grupy:

1. grupa I: obecne więcej niż 1 kryterium laboratoryjne w dowolnej kombinacji
2. grupa IIa: obecny tylko LA

3. grupa IIb: obecne tylko ACA
4. grupa IIc: obecne tylko anty- β_2 -GPI

Zapewne podłoże takiej klasyfikacji stanowi znaczna heterogenność przeciwciał antyfosfolipidowych, istotne różnice ryzyka wystąpienia ŻCHZZ wobec obecności różnych przeciwciał antyfosfolipidowych (TABELA 1.) oraz możliwość oceny tego ryzyka w zależności od kombinacji stwierdzonych parametrów laboratoryjnych. Jak wskazują doniesienia z piśmiennictwa, istnieje zależność pomiędzy objawami klinicznymi APS a rodzajem stwierdzonych przeciwciał. Największe zagrożenie zakrzepowe niesie skojarzone występowanie LA z przeciwciałami anty- β_2 -GPI lub wg niektórych autorów - przeciw protrombinie (20). Spostrzeżenie to – głównie w odniesieniu do grupy chorych na SLE i zespół toczniopodobny – potwierdzili Musiał i wsp. Badacze ci dodatkowo wskazali na rolę klasy badanych przeciwciał i dowiedli, że wspomniane ryzyko wzrasta najbardziej w przypadku współistnienia LA i anty- β_2 -GPI klasy IgG lub LA i ACA klasy IgG, wykazując zdecydowany wzrost swoistości takiej koegzystencji (odpowiednio - 95% lub 93% spośród 142 osób), niestety przy stosunkowo małej czułości (odpowiednio - 16% lub 24% ze 142 osób). Obecność przeciwciał klasy IgM (zarówno w odniesieniu do anty- β_2 -GPI jak i ACA) nie cechuje się już tak dużym ryzykiem zakrzepowym (tab. 1.) [21].

RODZAJ APA	OR	SWOISTOŚĆ (%)	CZUŁOŚĆ (%)
LA	4,04	84	44
ACA	3,71	77	53
ACA IgG	4,15	87	38
ACA IgM	2,2	84	30
LA + ACA	5,04	93	28
Anty-B2-GPI IgG	4,77	94	24
Anty-B2-GPI IgM	1,9	80	32
Anty-B2-GPI IgG + IgM	2,57	78	42
LA + anty-B2-GPI	5,28	95	20
LA lub ACA lub Anty-B2-GPI	4,22	65	69

Tabela 1. APL a ryzyko zakrzepicy (Swadźba J. i wsp. J.Thromb.Haemost. 2007;5: 1883-1889)

W 2003 roku przeprowadzono systematyczny przegląd doniesień piśmiennictwa na temat LA, ACA, anty- β_2 -GPI oraz aPT (aPT antibodies), który wykazał jednoznacznie, że najsilniejszym czynnikiem ryzyka żylnych i tętniczych powikłań zakrzepowych jest antykoagulant tocznia, zaś udział innych przeciwciał w patogenezie zakrzepicy jest uzależniony od sytuacji klinicznej. Wykazano też, że pewne podgrupy przeciwciał komplementarnych do β_2 -GPI oraz protombiny (aPT) in vitro mogą rozwijać aktywność antykoagulantu tocznia. (14). Z przeglądu wynika, że ACA-IgG w mianie średnim do wysokiego stanowią prawdopodobnie czynnik ryzyka zakrzepicy tętniczej, anty- β_2 -GPI – żylniej, zaś związek przeciwciał skierowanych przeciw protrombinie z ryzykiem zakrzepowym nie został ostatecznie ustalony, choć oznaczanie miana tych przeciwciał w praktyce klinicznej wydaje się uzasadnione (14, 20, 22).

Wykrycie APA nie jest jednak jednoznaczne z rozpoznaniem choroby. Jak wynika z danych z piśmiennictwa, istnieje populacja ludzi zdrowych rozwijających przeciwciała antyfosfolipidowe przy braku jakichkolwiek objawów (asymptomatic antiphospholipid antibodies – aAPA), czyli bez zakrzepicy żylniej, tętniczej czy niepowodzeń ciąży. Obecność ACA wykazano u 2-5% osób zdrowych w średnim wieku, u 1-10% kobiet w ciąży, aż u 50% osób w wieku > 70 lat (23). Dla porównania, częstość występowania tych przeciwciał u chorych na toczeń rumieniowaty układowy (systemic lupus erythematosus - SLE) wynosi 17-86% i 8-31% u członków rodzin pacjentów z rozpoznaniem APS (23). LA wykrywa się tylko u około 1% osób zdrowych, zaś wśród chorych na SLE – u 7-65% (23). W codziennej praktyce lekarskiej fakt ten niejednokrotnie stanowi przyczynę niepotrzebnego odstąpienia od zabiegu operacyjnego lub jest podstawą diagnostyki nieistniejącej skazy krwotocznej. U podłoża takiego postępowania leży indukowane przez APA, opisane już zjawisko antykoagulantu tocznia zachodzące w próbówce laboratoryjnej. Wśród osób z aAPA kierowanych do poradni hematologicznej, stosunkowo często zdarzają się przypadki nieuzasadnionego stosowania leków zmniejszających ryzyko powikłań krwotocznych, np. inhibitorów fibrynolizy lub witaminy K, a także doustnych środków antykoncepcyjnych z niesłusznej obawy przed nadmiernymi krwawieniami miesięcznymi.

Opisano powstawanie aAPA w przebiegu chorób układowych tkanki łącznej (SLE, reumatoidalnym zapaleniu stawów, zespole Sjögrena), nowotworów i schyłkowej niewydolności nerek. Występowanie ACA może towarzyszyć infekcjom wirusowym (WZW-B i -C, HIV, CMV, HSV, parwowirusem B19), a także bakteryjnym (kiła, trąd,

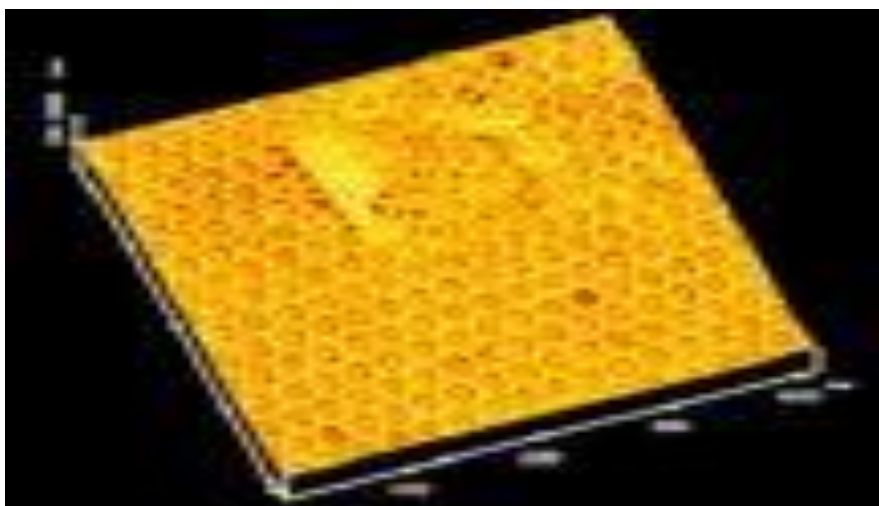
gruźlica, zakażenia gronkowcowe i paciorkowcowe, *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Kebsiella*. Podkreślić należy, że nie wszystkie APA indukowane zakażeniem mają charakter patogenny, czyli zależny od β_2 -GPI. Pojęcie immunoglobulin zależnych od β_2 -GPI obejmuje takie autoprzeciwciała, dla których obecność tej glikoproteiny jest niezbędna dla związania fosfolipidów, np. kardiolipiny pokrywającej płytki w wystandaryzowanym teście ELISA. W obliczu infekcji czy to bakteryjnej, wirusowej, czy też pasożytniczej, przejściowo mogą powstawać przeciwciała w niskich mianach, wiążące się bezpośrednio z kardiolipiną (bez pośrednictwa β_2 -GPI). Takim immunoglobulinom nie przypisuje się charakteru patogennego, z reguły należą one do izotypu M (IgM) immunoglobulin [13].

Tworzenie aAPA może być także indukowane przez niektóre leki (hydralazynę, prokainamid, chlorpromazynę, chinidynę, chininę, izoniazyd) oraz choroby nowotworowe (zwłaszcza limfoproliferacyjne). Powstałe wówczas APA przeważnie należą do klasy IgM i ze względu na przejściowy charakter, mają tendencję do zanikania, nie wywołując uprzednio żadnych powikłań zakrzepowych (13).

Trudno jednoznacznie ustalić czy geneza APA – zarówno objawowych jak i bezobjawowych – jest wspólna. Biorąc pod uwagę nabyty charakter tego zaburzenia, najbardziej prawdopodobnym bodźcem sprawczym wydają się być przyczyny środowiskowe (z dominującą rolą procesów zakaźnych). Wprawdzie badano znaczenie czynników genetycznych, ale ostatecznie nie ustalono ich wpływu na generację APL czy też rozwój pełnoobjawowego APS. Istnieją doniesienia o polimorfizmie ludzkich antygenów zgodności tkankowej klasy II u pacjentów z APL (24). Nie można też wykluczyć indukcji powstawania przeciwciał antyfosfolipidowych ani objawów zespołu antyfosfolipidowego w odpowiedzi na antygen u osób genetycznie predysponowanych (25).

Fakt istnienia APA u osób zdrowych sugeruje udział dodatkowych czynników sprawczych w rozwoju powikłań zakrzepowych, choć patogeneza APS wciąż jest tajemnicą i do dziś stanowi wyzwanie dla naukowców. W oparciu o badania *in vivo* stworzono nie jedną hipotezę tłumaczącą zaburzenia procesów krzepnięcia (i częściowo wtórnie - niepowodzenia ciąży) w APS i najprawdopodobniej wiele mechanizmów prozakrzepowych jest zaangażowanych w kliniczny obraz choroby. Stworzono nawet teorię tzw. „drugiego uderzenia” (second hit), tłumaczącą konieczność jednoczesnego zadziałania dodatkowego bodźca wyzwalającego, który samodzielnie jest zbyt słaby dla

indukcji procesów zakrzepowych. Badania nad grupą kobiet z wykrytymi APL w porównaniu do kobiet bez obecności tych przeciwciał wskazały na potrzebę zadziałania więcej niż jednego czynnika w celu wywołania zakrzepicy (26). W przypadku zakrzepicy naczyń łożyska (jednego z bardziej prawdopodobnych mechanizmów niepowodzeń ciąży wobec obecności APA) podkreśla się możliwość zniszczenia tzw. tarczy aneksynowej - przeciwkrzepliwej warstwy ochronnej mikroosmków syncytiotrofoblastów łożyska.



Ryc.2. Obraz z mikroskopu sił atomowych z korekcją w czasie rzeczywistym przedstawiający przejście pomiędzy dwoma dwuwymiarowymi fazami krystalicznymi utworzonymi przez aneksynę V na podwójnych błonach fosfolipidowych podtrzymywanych na powierzchni stałej (Langmuir 2001, 17, 1680-1686).

Aneksyna V, wiążąc się z fosfolipidami uniemożliwia ich kontakt z osoczowymi czynnikami krzepnięcia. APA (bezpośrednio lub za pośrednictwem kompleksów fosfolipidowo-białkowych) rozrywają warstwę aneksynową i niszczą jej zdolność gromadzenia się na powierzchni PL błonowych łożyska, udostępniając je czynnikom krzepnięcia (10).

Pozostałe hipotezy uwzględniają: ingerencję w układ białka C, białka Z oraz zależny od białka Z inhibitor proteaz, hamujący wpływ na układ fibrynolityczny, aktywację komórek śródbłonka naczyniowego, płytek krwi i monocytów, aktywację komplementu, a także nasilone powstawanie w osoczu mikrocząstek działających prozakrzepowo.

Białko C (protein C – PC) jest inhibitorem osoczowej fazy procesu krzepnięcia warunkowanej przez czynnik Va i VIIIa. Proces ten paradoksalnie zapoczątkowuje trombina, która w niewielkich stężeniach, po przyłączeniu do trombomoduliny (białka receptorowego na komórkach śródbłonka) staje się przede wszystkim silnym

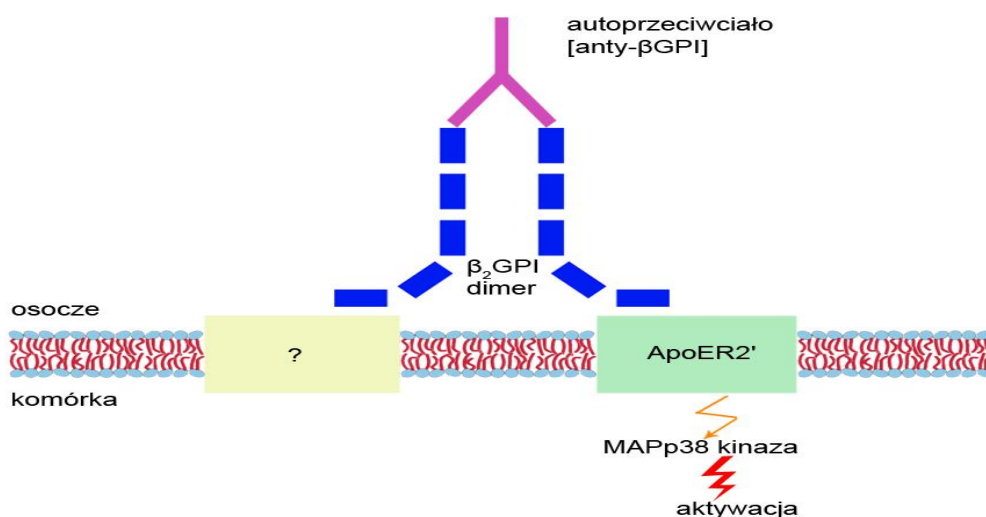
aktywatorem PC, przy zachowaniu niewielkiej zdolności prokoagulacyjnej. Cała reakcja zachodzi na powierzchni PL płytek krwi i śródbłonna naczyniowego w obecności białka S (protein S – PS) jako kofaktora. W wyniku interakcji APA ze wspomnianymi fosfolipidami (np. fosfatydyloetanolaminą, konieczną do unieczynnienia czynnika Va przez aktywne białko C) mogłoby dochodzić do ograniczenia udziału tych PL w uruchomieniu mechanizmu hamującego proces krzepnięcia. Należy podkreślić, iż obserwowano zjawisko nabytej oporności na białko C u osób z APS. Inny mechanizm zakładający udział APA w upośledzeniu inhibitorowego charakteru układu białka C wiąże się z samą trombiną. Jak wspomniano, jej niskie stężenia są niezbędne do zapoczątkowania aktywacji białka C. Ograniczenie powstawania tej minimalnej ilości trombiny przez przeciwciała antyfosfolipidowe, komplementarne do PL kompleksu tenazy (czynniki: IXa-VIIIa-X + PL i Ca²⁺) i w konsekwencji protrombinazy (czynniki: Xa-Va-II + PL i Ca²⁺) układu krzepnięcia mogłoby zmniejszyć aktywację PC i w rezultacie nasilić procesy zakrzepowe (10).

Z kolei białko Z (protein Z) wytwarzane w hepatocytach z udziałem witaminy K, pośredniczy w inaktywacji czynnika Xa na powierzchni fosfolipidów przy współdziałaniu jonów wapnia. Z tak powstałym kompleksem wiąże się inhibitor proteaz zależny od białka Z (protein-Z-dependent-protease inhibitor). Przyłączenie APA ogranicza najprawdopodobniej powierzchnię fosfolipidową, niezbędną dla prawidłowego, szybkiego zajścia zjawiska i w konsekwencji upośledza sprawność tego układu hamującego proces krzepnięcia (18).

Zjawisko nadkrzepliwości w APS można też tłumaczyć upośledzeniem procesu rozpuszczającego śródnaczyniowe złoże fibryny i utrzymującego drożność łożyska naczyniowego - fibrynolizy. Jak wykazali Cugno i wsp. kilka lat temu – w osoczu chorych na zespół antyfosfolipidowy można wykryć obecność przeciwciał hamujących aktywność tkankowego aktywatora plazminogenu (tissue-type plasminogen activator, t-PA), skierowanych przeciw jego domenie katalitycznej (27). Oczywiście obecność ta (wykazana u 2 pacjentów) nie jest bezpośrednim dowodem istnienia związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy APA a zakrzepicą, wskazuje natomiast na pewien mechanizm patologiczny, który trzeba wziąć pod uwagę, analizując prozakrzepowy potencjał tych przeciwciał. Dodatkowym powodem zmniejszenia aktywności fibrynolitycznej ustroju może być też hamujący wpływ β_2 -glikoproteiny-I na powstawanie plazminy. Okazuje się, że plazmina działa proteolitycznie również na β_2 -

GPI, rozszczepiając wiązanie Lys317-Th318. Tak zmodyfikowana cząsteczka traci zdolność wiązania się z PL, zyskuje natomiast powinowactwo do plazminogenu, co staje się powodem zmniejszenia ilości generowanej z plazminogenu plazminy (28). Jak udowodnili Korbach i współpracownicy w swych doświadczeniach, dla hamowania procesu fibrylizacji niezbędne jest duże stężenie β_2 -GPI ($> 0,25\mu\text{M}$), znacznie przewyższające stężenie fizjologiczne ($0,01\mu\text{M}$) (29). Wykazano, że heparyna przyspiesza lityczny wpływ plazminy na β_2 -GPI, co sugeruje możliwość aktywacji tego zjawiska przez glikozamnioglikany ściany naczyniowej w miejscu jej uszkodzenia (30).

Następna teoria tłumacząca prozakrzepowe działanie APA związana jest z dimeryczną formą β_2 -glikoproteiny-I. Powstanie tego dimeru jest możliwe po przyłączeniu cząsteczki immunoglobulin antyfosfolipidowych do 2 cząsteczek β_2 -glikoproteiny (Ryc. 3.).



Ryc. 3. Dimeryczna forma β_2 -GPI utworzona przez przyłączenie komplementarnego przeciwciała antyfosfolipidowego

Tak powstały kompleks cechuje się zdecydowanie większym powinowactwem (35x większym niż monomer) do PL osocza (17, 31) oraz powierzchni błon komórkowych śródbłonna naczyniowego, monocytów i płytek krwi. Siakara i współbadacze niedawno wykazali, że w bezpośrednią i swoistą reakcję cząsteczki β_2 -GPI z trombocytami zaangażowany jest czynnik płytkowy 4 (platelet factor 4 - PF4). Dowiedli oni, że dodatnio naładowana powierzchnia tetrameru, jakim jest PF4, oddziałuje z ujemnie naładowanymi regionami domen od III do V glikoproteiny przy współudziale pomocniczych wiązań wodorowych, utworzonych pomiędzy wieloma resztami

chemicznymi β_2 -GPI i PF4. Reakcja ta stwarza możliwość zajścia zmian powierzchniowych w obrębie tetrameru, co pozwala na związanie drugiej cząsteczki glikoproteiny (wg zasady: każdy z 2 monomerów PF4 wiąże po 1 cząsteczce β_2 -GPI). Zjawisko to ma szczególne znaczenie, gdyż sprzyja opisanej wyżej, naturalnej dimeryzacji glikoproteiny - warunku wstępnego aktywacji płytek krwi. Utworzenie dimerów z kolei prowadzi do stabilizacji wiązania β_2 -GPI na powierzchni PL, co z kolei potęguje zdolność jej rozpoznania przez komplementarne przeciwciała o niskim powinowactwie i w efekcie jeszcze bardziej stabilizuje kompleks β_2 -GPI-PF4. Jego czwartorzędowa struktura umożliwia taką aranżację przestrzenną, że epitopy domeny I glikoproteiny dokładnie pasują do 2 miejsc wiążących komplementarnych przeciwciał, zapoczątkowując powstanie jeszcze większych kompleksów (anty- β_2 -GPI- β_2 -GPI-PF4) i w konsekwencji uruchomienie na drodze receptorowej dalszych reakcji na poziomie śródkomórkowym (32).

Nie wszystkie przeciwciała skierowane przeciw β_2 -GPI wykazują jednocześnie cechy antykoagulantu tocznia, lecz tylko te komplementarne do wiązania gly-40-arg-43 domeny I glikoproteiny (17, 33). Fakt ten może sugerować, że tzw. LA-ujemne immunoglobuliny anty- β_2 -GPI nie mają zdolności krzyżowego wiązania 2 cząsteczek glikoproteiny w sposób stwarzający możliwość efektywnej interakcji obu cząsteczek białka z PL (17). Jak wykazano, dimeryczna forma β_2 -GPI wiąże się nie tylko z PL, ale także z siarczanem heparanu na powierzchni błony komórkowej, co w efekcie kończy się aktywacją wspomnianych komórek na drodze receptorowej (10, 34). Kompleksy β_2 -GPI-anty- β_2 -GPI wiążą się z płytkami krwi za pośrednictwem obecnego w błonie płytkowej receptora 2[']dla apolipoproteiny E (apolipoprotein E receptor 2[']- apo-ER2[']) oraz glikoproteiny GPI α . Powoduje to zwiększoną adhezję płytek do kolagenu w badaniach in vitro (35) oraz nasilenie syntezy tromboksanu A₂ przez płytki w modelach doświadczalnych in vivo. Funkcję receptora dla APA na komórkach śródbłonna przypisuje się aneksynie A₂, choć możliwy jest współdziałanie innych receptorów. W wyniku aktywacji komórek śródbłonna, a także monocytów, dochodzi do wzrostu ekspresji czynnika tkankowego – głównego inicjatora krzepnięcia w układzie zewnątrzpochodnym po zetknięciu z osoczem. Badania in vitro wykazały, że proces aktywacji komórkowej za pośrednictwem immunoglobulin klasy G pochodzących od chorych z APS inicjowany jest przez aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF κ B (nuclear factor κ B), która wiedzie do transkrypcji wielu genów, między innymi warunkujących powstawanie

cząstek adhezyjnych, cytokin i właśnie czynnika tkankowego (36). Także inny mechanizm na poziomie reakcji śródkomórkowej - fosforylacja kinazy proteinowej aktywowanej za pośrednictwem mitogenu p38 (p38 mitogen activated protein kinase – p38MAPK) – może być odpowiedzialny za ten proces. (37). Uruchomienie powyższych, sygnałowych szlaków wewnątrzkomórkowych odbywa się za pomocą swoistych receptorów, znanych jest co najmniej 9 z nich: „toll like” receptor 2 i 4 (TLR-2 i -4), aneksyna 2, apoER2, glikoproteina Iba, receptor dla VLDL i LDL, megalina, LRP (38). Jak dowiedli Raschi i wsp., w wyniku interakcji z przeciwciałami komplementarnymi do β_2 -GPI, komórki śródbłoka nabierają właściwości prozakrzepowych, wyrażonych przez zwiększoną ekspresję czynnika tkankowego, co ma miejsce również w środowisku zawierającym endotoksynę (39). W procesie tym kluczową rolę przypisuje się właśnie receptorowi „toll-like” 4, swoistemu dla bakteryjnych lipopolisacharydów lub endotoksyn (40). Jak ostatnio wykazano, również monocyty pochodzące od chorych na APS cechuje nadekspresja czynnika śródbłonkowego wzrostu naczyniowego (vascular endothelial growth factor – VEGF) oraz jego receptora – FLT-1, co może pobudzać ekspresję czynnika tkankowego. Nasilenie aktywacji komórkowej pod wpływem anty- β_2 -GPI nie jest duże, można mówić tutaj o swego rodzaju stymulacji podprogowej, czy „uczuleniu” komórek śródbłoka, monocytów i płytek krwi na działanie dodatkowego (wyjściowo zbyt słabego bodźca), którego już niewielkie stężenie może wywołać ich pełną aktywację. Taka interpretacja zdarzeń potwierdza słuszność zaprezentowanej już wcześniej teorii „drugiego uderzenia” (28, 41) i jednocześnie pozwala wytłumaczyć bezobjawową obecność przeciwciał antyfosfolipidowych u niektórych osób oraz wzrost ryzyka zakrzepowego w przypadku zadziałania dodatkowego czynnika obciążającego – np. hormonalnej antykoncepcji czy unieruchomienia. Zastanawiającym jest też fakt, że β_2 -glikoproteina-I może przyczyniać się do przyspieszenia miażdżycy u chorych na APS (42).

Koncepcja aktywacji komórki przez przyłączenie kompleksu β_2 -GPI-anty- β_2 -GPI do błony komórkowej jest zbieżna z hipotezą aktywacji komplementu, jako kolejnego mechanizmu prozakrzepowego odpowiedzialnego za kliniczny obraz APS. Wyniki badań ostatnich lat sugerują, że uruchomienie reakcji kaskadowej dopełniacza, na różnych jej etapach, jest niezbędne dla ujawnienia powikłań zakrzepowych i niepowodzeń ciąży wywołanych przez APA. In vivo wykazano na przykład, że hamowanie receptora dla konwertazy składowej C3 dopełniacza związanego z białkiem genowym y, powstrzymuje

rozwój zakrzepicy indukowanej przez przeciwciała antyfosfolipidowe, jak również utratę płodu i opóźnienie jego wzrostu (43). W doświadczeniach przeprowadzonych u myszy z niedoborem składowej C3 i C5 dopełniacza, dowiedziono, iż niedobór ten wiąże się z opornością na indukowaną przeciwciałami antyfosfolipidowymi zakrzepicę, aktywację komórek śródbłonna i utratę ciąży (44). Interakcja składowej C5a z jej swoistym receptorem została oceniona jako proces niezbędny dla rozwoju zakrzepicy naczyń łożyska przez Girardi i zespół w 2003 roku (45). Fishetti i współpracownicy potwierdzili te spostrzeżenia w 2005 roku, jednak dodatkowo wskazali na konieczność zadziałania wyjściowego czynnika sprawczego, np. bakteryjnych lipopolisacharydów, w celu indukowanego przez anty- β_2 -GPI, zależnego od układu dopełniacza utworzenia skrzepu. Autorzy dodatkowo wywnioskowali, że końcowy kompleks składowych komplementu pośredniczy w procesie krzepnięcia (46). W oparciu o przedstawione doniesienia oraz teorie stworzono nawet hipotetyczny model patogenezy powikłań zakrzepowych z udziałem przeciwciał antyfosfolipidowych. Wg niego najpierw dochodzi do związania APA z komórkami śródbłonna i w konsekwencji ich aktywacji, co prowadzi do osiągnięcia statusu prozakrzepowego - nasilenia generacji cząstek adhezyjnych oraz wzrostu ekspresji czynnika tkankowego. Równoległe ma miejsce indukcja aktywacji płytek krwi przez przeciwciała antyfosfolipidowe oraz następcza interakcja z elementami składowymi kaskady układu krzepnięcia. Jednak na tym etapie potencjał prozakrzepowy ustroju nie wydaje się wystarczający – potrzebny jest dodatkowy czynnik stymulujący. Procesem wzmacniającym opisane efekty oddziaływań APA na komórki docelowe może być uruchomienie za ich pośrednictwem kaskady dopełniacza i w konsekwencji pobudzenie generacji mediatorów dalej aktywujących płytki i komórki śródbłonna. Wśród nich należy wymienić składowe C3a, C5a oraz kompleks ataku błonowego (membrane attack complex – MAC), czyli - C5b-9. Z kolei pobudzony układ komplementu niszczy śródbłonek, odsłaniając powierzchnię adhezyjną – np. kolagen i tym samym lokalnie napędza patomechanizm zakrzepicy, zbyt nasilonej, by podporządkować się miejscowym systemom inhibitorowym (40). Znajomość koncepcji wykorzystującej układ dopełniacza jako przyczynę zakrzepicy indukowanej przeciwciałami antyfosfolipidowymi stwarza możliwość zapobiegania lub zatrzymania procesu zakrzepowego na drodze zahamowania aktywacji komplementu.

W ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie mikrocząstkami (microparticles, microvesicles), a zwłaszcza rolą, jaką im się przypisuje w powstawaniu

zakrzepicy u chorych na zespół antyfosfolipidowy. Mikrocząstki są fragmentami błon komórkowych, powstających w wyniku odszczepienia od aktywowanych lub ulegających apoptotycznej śmierci komórek (np. płytek krwi, monocytów, komórek śródbłonna). Ich tworzenie nasila się m.in. w stanach zapalnych, niedotlenieniu, stresie oksydacyjnym, pod wpływem czynnika martwicy nowotworów lub w naczyniach tętniczych przy dużym napięciu ścinającym. Mikrocząstki stanowią swego rodzaju magazyn różnych substancji, wykazujących łącznie ogromny potencjał prozakrzepowy. Zawierają m.in. czynnik tkankowy i ligand P-selektyny (mogą wiązać się z P-selektyną na śródbłonnku, co powoduje zwiększoną generację trombiny), cząstki adhezyjne, a także niektóre składniki cytoplazmy – np. antygeny CD (różnicowania komórkowego - cluster of differentiation) – komórek, z których się wywodzą. Na ich powierzchni zachodzi aktywacja czynników krzepnięcia w obecności anionowych fosfolipidów – np. fosfatydyloseryny, są one aktywatorem płytek krwi i komórek śródbłonna. Ciekawym jest też fakt, że za ich pośrednictwem możliwa jest wymiana biologicznych informacji między komórkami (cell-cell crosstalk). Na przykład mikrocząstki pochodzenia monocytarnego/makrofagowego mogą przekazywać czynnik tkankowy płytkom krwi (10). Aktywacja procesu krzepnięcia za pośrednictwem mikrocząstek również wiąże się z lokalnym wzrostem stężenia czynnika tkankowego. Dzieje się tak na skutek oddziaływań mikrocząstek pochodzenia płytkowego i leukocytarnego z aktywowanymi komórkami śródbłonna przy użyciu P- i E-selektyny. Aktywacja komórek śródbłonna ma miejsce w stanach zapalnych, niedotlenieniu i zastoju żylnym. Mikrocząstki wykazują zdolność stymulowania apoptozy komórek, zaś ich inkorporacja do zakrzepu sprzyja jego narastaniu (47). Ciekawych spostrzeżeń dostarczyli ostatnio Cockrell E. i wsp. (48). Na podstawie analizy w cytometrze przepływowym (ocena ekspresji antygenów CD-144, CD-105 i CD-41) wykazali oni zdecydowanie zwiększone stężenie mikrocząstek/1ml osocza chorego z APS, na 2 dni przed epizodem świeżej zakrzepicy żył głębokich. W okresie bezobjawowym - 2 miesiące przed, jaki i 2 tygodnie po tym epizodzie - stężenie mikrocząstek mieściło się w granicach normy. W kontekście zaprezentowanych wyników analiza mikrocząstek w połączeniu z wynikami badań w kierunku APA stwarza możliwość wyselekcjonowania grupy osób z największym ryzykiem ostrych powikłań zakrzepowych. Potrzebne są jednak dalsze prace badawcze, obejmujące odpowiednio dużą grupę pacjentów, w celu ustalenia tej prawidłowości. Kolejne badania przeprowadzone u chorych z APS wskazały na zwiększoną ilość mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego w porównaniu do osób zdrowych, a także do chorych na

toczeń rumieniowaty układowy oraz żylną chorobę zakrzepowo-zatorową bez przeciwciał antyfosfolipidowych. Dodatkowo stwierdzono korelację pomiędzy stężeniem mikrocząstek w osoczu, a długością czasu krzepnięcia tegoż osocza po dodaniu jadu żmii Russella – podstawowego testu wykorzystywanego w diagnostyce antykoagulantu toczenia. W grupie chorych na toczeń układowy z obecnymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi, ale bez zakrzepicy w wywiadzie również stwierdzono podwyższone stężenie mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego w osoczu, ale wykazywały one mniejszą aktywność prokoagulacyjną w porównaniu do chorych na SLE z przebytymi powikłaniami zakrzepowymi. Koncepcja łącząca zwiększoną aktywację komórek śródbłonka, na skutek interakcji z APA, z nasileniem powstawania mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego oraz płytkowego jako efektem tej aktywacji, stanowi nowopoznaną możliwość zgłębienia genetyki powikłań zakrzepowych w APS (49).

Zaprezentowane koncepcje tłumaczące pochodzenie zaburzeń krzepnięcia w APS z jednej strony wskazują, jak niepoznania jest jeszcze ta jednostka chorobowa i jak duże wyzwanie dla naukowców stanowi zwłaszcza jej patomechanizm. Nie można wykluczyć, że każda z tych koncepcji jest niezbędnym elementem pewnego uporządkowanego procesu patofizjologicznego i nie eliminuje pozostałych. Z drugiej jednak strony, mnogość przedstawionych wyżej poglądów - w przypadku ich potwierdzenia badaniami *in vivo* obejmujących odpowiednio liczną grupę badaną - stwarza szereg nowych, potencjalnych możliwości leczniczych. Znane są doniesienia na temat wykorzystania plejotropowego działania statyn – zwłaszcza fluwastatyny – i potencjału przeciwzakrzepowego tej grupy leków, niezależnie od obniżającego wpływu na stężenie cholesterolu. Jak wykazali Meroni i współpracownicy (50), statyny zapobiegają aktywacji komórek śródbłonka wywołanej przeciwciałami antyfosfolipidowymi przez wpływ na ekspresję cząstek adhezyjnych oraz interleukinę 6 (IL-6) – efekty uruchomienia szlaku NFκB. Badanie przeprowadzone *in vivo* u myszy otrzymujących przez 15 dni fluwastatynę udowodniło, że prozakrzepowy i prozapalny wpływ APA może być zniesiony za pośrednictwem statyny (51). Z kolei *in vitro* potwierdzono hamujący wpływ fluwastatyny, w dawce stosowanej w celu obniżenia stężenia cholesterolu, na ekspresję czynnika tkankowego na komórkach śródbłonka. Z drugiej strony, badania wykonane przez Musiałą i współpracowników nie wykazały zmniejszonej generacji trombiny w miejscu urazu mikronaczyniowego u chorych na SLE z przeciwciałami antyfosfolipidowymi lub z pierwotnym APS po 4 tygodniach leczenia statynami

(ceriwestatyną lub simwastayną), wskazując na konieczność dalszych, pogłębionych badań (52).

Mówiąc o eksperymentalnych, a zarazem potencjalnych opcjach terapeutycznych warto wspomnieć o swoistych inhibitorach wewnątrzkomórkowych mechanizmów transdukcji sygnału, jak wspomnianego już jądrowego czynnika transkrypcyjnego - NFκB czy kinazy proteinowej aktywowanej za pośrednictwem mitogenu p38 (p38 mitogen activated protein kinase – p38 MAPK). Zastosowanie tych inhibitorów in vitro, odpowiednio – MG132 i SB203580, wiąże się z usunięciem efektu aktywującego płytki i monocyty wywołanego przez APA (53). Ponadto wykazano, że agregacja płytek wywołana u myszy przez małe dawki trombiny w obecności APA, może być całkowicie zniesiona właśnie przez SB203580. Istniała przy tym korelacja ze zmniejszeniem rozmiaru skrzepu (53).

Coraz większe uznanie badaczy zyskuje hydroksychlorochina jako potencjalny środek leczniczy w APS. Działanie przeciwzapalne tego leku wykorzystywane jest w grupie chorób układowych tkanki łącznej. U chorych na SLE i z obecnością APA wykazano związek tej terapii ze zmniejszeniem ryzyka zakrzepicy (40). Wcześniejsze badania wykazały znaczące zmniejszenie wielkości i skrócenie czasu utrzymywania się zakrzepu pod wpływem hydroksychlorochiny u myszy po infuzji APA, a także przywrócenie stanu aktywacji płytek sprzed infuzji (40). Wobec przedstawionych faktów, hydroksychlorochina może stanowić alternatywę leczniczą do rozważenia u pacjentów z APS, którzy rozwijają powikłania krwotoczne w okresie doustnej terapii przeciwzakrzepowej albo u których dochodzi do kolejnych epizodów zakrzepowozatorowych, mimo stosowania wtórnej profilaktyki przeciwzakrzepowej. Można też zastanowić się nad jej profilaktycznym zastosowaniem u osób z bezobjawowymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi, utrzymującymi się w wysokich mianach.

Dotychczasowe i uznane działania terapeutyczne w APS koncentrują się na efektach obecności patogennych przeciwciał antyfosfolipidowych, stanowiąc w istocie postępowanie wyłącznie objawowe. Przyczyna takiego podejścia tkwi w bardzo dużym ryzyku nawrotu zakrzepicy po przerwaniu wtórnej profilaktyki przeciwkrzepliwej (sięga 30% rocznie i 78% w ciągu 8 lat) [9]. Dlatego zalecane jest zapobiegawcze stosowanie leków z grupy antagonistów witaminy K (acenokumarolu lub warfaryny) - w dawce generującej INR 2,0-3,0 - u wszystkich chorych z APS do czasu zaniku przeciwciał. Stosowanie tego leczenia rozpoczyna się równocześnie z heparyną [drobnocząsteczkową

(low molecular weight heparin LMWH) albo niefrakcjonowaną] lub fondaparynuksiem. Terapię heparyną lub fondaparynuksiem można zakończyć po co najmniej 5 dniach, jeśli INR utrzymuje się > 2 przez kolejne 2 dni. Po przebyciu zakrzepicy tętniczej wskazane jest rozważenie dołączenia ASA 75-150mg/dobę, taka opcja jest szczególnie zalecana w przypadku niepowodzenia monoterapii za pomocą pochodnych kumaryny - nawrotów zakrzepicy (żylnej lub tętniczej), mimo leczenia. Zasada postępowania leczniczego w przypadku zakrzepicy tętniczej wklajającej przebieg APS nie jest do końca sprecyzowana. Istnieje przekonanie o konieczności wyższego generowania INR - 3-4 w tych przypadkach, podobnie jak i u chorych z nawrotami zakrzepicy mimo stosowanej już profilaktyki przeciwkrzepliwej, z uwagi na większe ryzyko tych nawrotów. Stanowisko to zostało podtrzymane przez ekspertów na ostatnim, międzynarodowym kongresie poświęconym zespołowi antyfosfolipidowemu, który miał miejsce w 2010r. w Teksasie, w Stanach Zjednoczonych (54). Dane z badania APASS, porównującym skuteczność warfaryny (przy uzyskanych wartościach INR 1,4-2,8) z aspiryną w dawce 325mg/d w zapobieganiu nawrotom niedokrwiennych udarów mózgu u chorych z APS, wskazują, że po 2 latach profilaktyki częstość tych nawrotów była porównywalna w przypadku obu leków (55, 9). Podkreślić jednak należy, iż badanie objęło osoby w zaawansowanym wieku – sprzyjającym bezobjawowemu występowaniu APA, u których osiągnięto zbyt małe wartości INR i którym rozpoznano APS wyłącznie na podstawie jednorazowej oceny w kierunku przeciwciał antyfosfolipidowych, co nie spełnia obowiązujących kryteriów diagnostycznych. Kierując się wynikami badania APASS, monoterapia ASA w dawce 325mg/d lub warfaryną (po uzyskaniu wartości INR 1,4-2,8) jest zarezerwowana wyłącznie dla chorych w starszym wieku, po udarze niedokrwiennym mózgu, z potwierdzoną jednorazowo obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych i bez innych wskazań do antykoagulacji (55). W pozostałych przypadkach – zgodnie z wytycznymi ACCP'2012 - zalecane jest stosowanie antagonistów witaminy K wg wskazówek opisanych wyżej.

Innego podejścia terapeutycznego – ze względu na dramatyczny przebieg – wymaga CAPS. Szybkie wdrożenie leczenia [heparynami, glikokortykosteroidami (GKS), plazmaferezą albo dożylnym wlewem immunoglobulin (IVIG)] umożliwia zwiększenie szansy przeżycia o około 60% (9). W niewielkiej grupie chorych na oporną postać CAPS opisano ostatnio skuteczne zastosowanie rytuksymabu – monoklonalnego przeciwciała anty- CD-20 usuwającego limfocyty B z ustroju.

U kobiet w ciąży z potwierdzoną obecnością APA oraz dodatnim wywiadem w kierunku powikłań zakrzepowo-zatorowych obowiązuje profilaktyka przeciwzakrzepowa. Przez cały okres ciąży zalecana jest aspiryna w dawce 75 mg/d oraz podskórnie heparyna drobnocząsteczkowa w dawce terapeutycznej dostosowywanej do masy ciała sprzed ciąży albo heparyna niefrakcjonowana, dawkowana pod kontrolą aPTT. Po porodzie wskazana jest przewlekła profilaktyka wtórna zgodnie z przedstawionymi już wcześniej zasadami dla pozostałych chorych z APS (56, 10). W przypadku współistnienia APA i niepowodzeń ciąży (co najmniej 1 obumarcie morfologicznie prawidłowego płodu > 10 t. c.; co najmniej 1 poród przedwczesny < 34 t.c. z powodu rzucawki, stanu przedrzucawkowego lub niewydolności łożyska; minimum 3 kolejne poronienia samoistne < 10 tyg) - bez powikłań zakrzepowych - wskazane jest skojarzenie aspiryny (75mg/d) z heparyną drobnocząsteczkową albo niefrakcjonowaną w małej lub średniej dawce profilaktycznej, podskórnie, najlepiej pod kontrolą aktywności anty-Xa. W okresie całego połogu obowiązuje wtórna profilaktyka z wykorzystaniem antagonistów witaminy K (z docelową wartością INR 2-3) [56, 10].

Leczenie świeżego epizodu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej oraz zakrzepicy tętniczej nie różni się od postępowania u chorych bez obecności przeciwciał antyfosfolipidowych, zgodnie z VIII wytycznymi opublikowanymi przez ACCP w 2012 roku.

Nieco inaczej kształtuje się kwestia strategii terapeutycznej wobec potwierdzenia bezobjawowej obecności przeciwciał antyfosfolipidowych, czyli w przypadkach spełnienia wyłącznie laboratoryjnego kryterium diagnostycznego APS, bez jakichkolwiek powikłań zakrzepowych (zakrzepicy żyłnej, tętniczej czy też mieszanej – tętniczo-żyłnej) ani niepowodzeń ciąży w wywiadach. U takich osób nie zaleca się pierwotnej profilaktyki przeciwzakrzepowej, z wyjątkiem kobiet w ciąży, u których alternatywnie można stosować aspirynę w monoterapii w dawce 75mg/d (54). Jak już wspomniano, opisano próby zapobiegawczego stosowania hydroksychlorochiny, która zmniejsza ryzyko zakrzepicy u chorych na SLE (40, 57), a także statyn (zwłaszcza fluwastatyny) ze względu na ich korzystne działanie plejotropowe (50, 51, 52). Jednak u chorych z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, skuteczność tych leków w zapobieganiu powikłaniom zakrzepowym nie została udowodniona. Badanie APLASA obejmujące 98 pacjentów z aAPA, którego wyniki opublikowano w 2008 roku (58), również nie przyniosło budujących wniosków. Wykazało ono, że stosowanie aspiryny (w dawce 81mg/dobę) w ramach pierwotnej profilaktyki przeciwzakrzepowej u tych

pacjentów nie przynosi korzyści. W takich przypadkach należy eliminować inne czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej oraz żyłnej – nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemię, palenie tytoniu, hiperglikemię, otyłość, hiperhomocysteinemię. W razie konieczności zabiegów operacyjnych lub unieruchomienia, nawet u młodszych chorych, istnieją wskazania do włączenia profilaktyki przeciwzakrzepowej wg wytycznych American College of Chest Physicians (ACCP) 2012. Kobietom nie powinno zalecać się doustnych środków antykoncepcyjnych ani hormonalnej terapii zastępczej. Przedstawione zasady postępowania, choć bardzo jasno sprecyzowane, nadal nie rozwiązują wszystkich problemów diagnostycznych i terapeutycznych związanych z bezobjawową obecnością APA. Wiele pytań do dziś pozostaje bez odpowiedzi. Nadal nie wiadomo czy stosować pierwotną profilaktykę przeciwzakrzepową, jeśli dodatkowo współistnieją różne postaci wrodzonej trombofilii oraz w przypadku ekspozycji na inne, nabyte czynniki zagrożenia zakrzepowego. Źródłem szczególnie trudnych decyzji terapeutycznych jest ciąża u kobiet z potwierdzoną obecnością aAPA, zwłaszcza tych o dużym potencjale prozakrzepowym (np. współistnienie LA i anti- β_2 -GPI klasy IgG). Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa występuje w ciąży z częstością 0,8/1000 i stanowi główną przyczynę zgonów matek. Dodatkowo nadmienić należy, że już sama ciąża i poród (zwłaszcza zabiegowy) są niezależnymi czynnikami ryzyka zakrzepowego. Czy wobec prawdopodobieństwa rozwoju choroby zakrzepowo-zatorowej albo utraty dziecka decyzja o wyborze aktywnej obserwacji medycznej, brzmi racjonalnie, zwłaszcza dla przyszłej matki?

Wobec nie poznanej do końca genezy powikłań zakrzepowych w zespole antyfosfolipidowym, a co za tym idzie – możliwości stosowania terapii celowanej, idealnie byłoby dysponować metodą badawczą umożliwiającą odpowiednio wczesną ocenę potencjału zakrzepowego pacjenta lub zespołem objawów pozwalających wyłonić grupę chorych obarczonych największym ryzykiem zakrzepowym. Obiecująco przedstawia się wspomniana już wcześniej analiza ilości mikrocząstek/1ml osocza, jako czynnika zagrożenia zakrzepowego u chorego z APS. Nie wiadomo, jakie czynniki przyczyniają się do wystąpienia powikłań zakrzepowych u pacjentów z bezobjawowymi APA. Za pomocą badania DNA metodą mikromacierzy wykazano, że profil ekspresji genów pozwala jednoznacznie oszacować zagrożenie zakrzepowe u pacjenta z APA (59). Analizą objęto 57 chorych z zespołem antyfosfolipidowym i zakrzepicą żylną, 32 chorych na zakrzepicę żylną bez przeciwciał antyfosfolipidowych, 32 pacjentów z przeciwciałami antyfosfolipidowymi bez zakrzepicy oraz 8 osób zdrowych.

W celu zgłębienia biologii zespołu antyfosfolipidowego niezbędne są dalsze badania, najlepiej prospektywne, przeprowadzone u osób z aAPA, umożliwiające bieżącą ocenę pożądaných parametrów, jak np. współistnienie dodatkowych czynników ryzyka, ze szczególnym uwzględnieniem wrodzonej trombofilii, a także analizę poszczególnych elementów układu hemostazy w zaplanowanych punktach czasowych. Być może pozwoliłoby to odpowiedzieć na pytanie, jak zmieniają się warunki prozakrzepowe ustroju przed, w trakcie i po epizodzie zakrzepowo-zatorowym.

CEL PRACY:

Celem pracy było zbadanie korelacji pomiędzy kryteriami laboratoryjnymi APS opublikowanymi w 2006r przez Miyakisa i wsp.(12), ze szczególnym uwzględnieniem miana przeciwciał anty β_2 -GPI, a obrazem klinicznym zakrzepicy w APS z uwzględnieniem m.in. jej lokalizacji (żylna, tętnicza lub mieszana: tętniczo-żylna), tendencji do nawrotów czy też wystąpienia w postaci katastrofalnej - CAPS.

Dodatkowo podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy współistnienie innych czynników ryzyka zakrzepowego oraz wrodzonej trombofilii (w postaci niedoboru naturalnych antykoagulantów i oporności na aktywowane białko C) ma wpływ na przebieg kliniczny zespołu antyfosfolipidowego, a jeśli tak – wyłonienie ich i odpowiednie uszeregowanie, w zależności od ryzyka zakrzepowego.

W oparciu o dane uzyskane z wyżej opisanych analiz postanowiono scharakteryzować grupę populacyjną obarczoną największym ryzykiem zakrzepowo-zatorowym wśród pacjentów z bezobjawowymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi w porównaniu z chorymi na zespół antyfosfolipidowy.

Program badań objął również ocenę zależności pomiędzy rodzajem zastosowanej metody laboratoryjnej a potwierdzeniem przetrwałej obecności przeciwciał antyfosfolipidowych.

MATERIAŁ KLINICZNY

Grupę badaną stanowiło 75 osób w wieku od 19 do 85 lat (śr. 43), liczącą 50 kobiet i 25 mężczyzn, u których dwukrotnie - tj. w momencie rozpoczęcia analizy i co najmniej 12 tyg. później - wykazano obecność APA za pomocą wystandaryzowanych, opisanych poniżej metod laboratoryjnych.

Badania wykonano z powodu podejrzenia trombofilii lub w celu diagnostyki wydłużonego aPTT w okresie 2005 do 2011r. osiągając średni czas obserwacji 47 miesięcy $\pm 14,8$ SD (od 13-tu do 80-u).

Zaznaczono podział badanych na dwie grupy:

grupa I - obejmującą chorych z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, tj. spełniających wyłącznie laboratoryjne kryterium zespołu antyfosfolipidowego

grupa II - rekrutującą pacjentów po epizodzie zakrzepowo-zatorowym, przeżytym nie wcześniej niż 4 tygodnie i nie później niż 5 lat przed wykazaniem obecności APA, jeśli został on potwierdzony obiektywnie uznanymi metodami (np. badaniami obrazowymi, jak: usg-Doppler, usg uciskowe, KT, NMR lub histopatologicznymi – z cechami zakrzepicy bez wykładników procesu zapalnego) [12]. Analizą nie objęto chorych, którzy stosowali doustne leki przeciwkrzepliwe w okresie krótszym niż 8 dni przed włączeniem do badania, u których stwierdzono zanik APA przed upływem 12 tygodni od ich pierwotnego wykrycia oraz kobiety z niepowodzeniami ciąży będącymi kryterium APS.

Grupa II dodatkowo została podzielona na dwie podgrupy:

podgrupa A - gromadziła chorych z przeżytymi, tętniczymi lub tętniczo-żylnymi powikłaniami zakrzepowymi; o przynależności do tej podgrupy decydowała lokalizacja ostatniego epizodu

podgrupa B - zawierała pacjentów z żylnymi powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi w wywiadzie.

Wszyscy chorzy z grupy II byli objęci wtórną profilaktyką przeciwzakrzepową z wykorzystaniem doustnych antagonistów witaminy K pod kontrolą wartości INR (docelowo 2-3). W okresie okołoperacyjnym/okołozabiegowym lub weryfikacji diagnostycznej stosowano u nich LMWH w dawce profilaktycznej większej - wg aktualnych wówczas zaleceń ACCP. U pacjentów bez powikłań zakrzepowych w wywiadzie nie stosowano pierwotnej profilaktyki przeciwkrzepliwej, w sporadycznych

przypadkach w tym celu wykorzystano heparyny drobnocząsteczkowe w dawce profilaktycznej mniejszej w okresie narażenia na dodatkowe, przejściowe czynniki ryzyka, jak np. doustna antykoncepcja.

Grupa I, podgrupa IIA i podgrupa IIB liczyły każda po 25 osób; odpowiednio: 18 kobiet i 7 mężczyzn w wieku od 20 do 75 lat (śr. 46); 19 kobiet i 6 mężczyzn w wieku od 21 do 71 lat (śr. 41); 13 kobiet i 12 mężczyzn w wieku od 19 do 85 lat (śr. 42).

Charakterystykę kliniczną badanych grup zamieszczono w tabeli nr 2.

Tabela 2. Charakterystyka kliniczna badanych grup

Obraz kliniczny	Grupa I	Podgrupa IIA	Podgrupa IIB
Ilość chorych	25	25	25
Wiek (średnia ± SD)	46±19,6	41±14,37	42±17,16
Płeć	18K, 7M	19K, 6M	13K, 12M
Zakrzepica żylna:	-	8:	25:
<u>żył głębokich kk. dolnych</u>	-	5	20
<u>zatorowość płucna</u>	-	1	10
<u>lokalizacja atypowa:</u>	-	2:	5:
- <u>zatoki żyłne mózgu i żyły głębokie kk. dolnych</u>	-	1	-
- <u>ż. szyjna wsp. podob. i pachowa</u>	-	1	-
- <u>ż. środkowa siatkówki</u>	-	-	3
- <u>zakrzepica wielonarządowa,</u>	-	-	1
- <u>zastawka mitralna</u>	-	-	1
Zakrzepica tętnicza:	-	25:	-
<u>udar niedokrwienny mózgu</u>	-	24	-
<u>udar niedokrwienny mózgu i zawał serca (3x <47 r.ż)</u>	-	1	-
Zakrzepica mieszana (tętniczo-żylna)	-	8	-
ŻCHZZ w rodzinie	4	3	7

Obraz kliniczny	Grupa I	Podgrupa IIA	Podgrupa IIB
Tętnicze epizody zakrzepowe w rodzinie	6	11	5
Palenie papierosów	4	10	8
Ch-by ukl. sercowo-naczyniowego:	8:	10:	6:
<i>nadciśnienie tętnicze</i>	5	4	4
<i>nadciśnienie płucne wtórne do zatorowości płucnej</i>	-	-	1
<i>ch-ba niedokrwienność serca</i>	1	3	1
<i>wady zastawkowe</i>	2	1	-
<i>wady zastawkowe i kardiologiczny z-ł X</i>	-	1	-
<i>miażdżyca nn. obwodowych</i>	-	1	-
Dyslipidemia	5	7	7
Cukrzyca	-	-	-
Otyłość	3	5	4
Inna choroba autoimmunologiczna	9	4	2
<i>Reumatoidalne zapalenie stawów</i>	1	-	-
<i>Toczeń rumieniowaty układowy</i>	-	1	-
<i>Zespół toczniopodobny</i>	-	1	-
<i>niedokrwistość autoimmunohemolityczna</i>	2	-	1
<i>niedokrwistość Addisona-Biermera</i>	1	-	-
<i>choroba Hashimoto</i>	1	2	1
<i>Zespół Sjögrena</i>	1	-	-
<i>Mieszana choroba tkanki łącznej</i>	2	-	-
<i>Pierwotna małopłytkowość immunologiczna</i>	1	-	-
Trombofilia	3:	5:	6:
<i>oporność na aktywowane białko C (aPCR)</i>	1	0	2
<i>czynnik V Leiden</i>	-	1	1

<i>polimorfizm G20210A genu protrombiny</i>	-	1	-
<i>niedobór białka C</i>	-	-	1
<i>wrodzony niedobór białka S</i>	1	-	1
<i>niedobór antytrombiny</i>	1	-	-
<i>aPCR + czynnik V Leiden</i>	-	2	1
<i>aPCR + niedobór białka C</i>	-	-	1
<i>aPCR + niedobór białka S</i>	-	1	0

* Podstawą kwalifikacji do danej podgrupy był rodzaj ostatniego epizodu zakrzepowo-zatorowego, tj. stwierdzonego nie później niż 5 lat od czasu wykazania obecności APA; dla uzyskania pełnego obrazu klinicznego w charakterystyce badanych grup uwzględniono również zakrzepice przebyte wcześniej - na podstawie danych z wywiadu i dokumentacji medycznej;

ż. szyjna wsp. - żyła szyjna wspólna, ż. podob. - żyła podobojczykowa

METODYKA

I. Przygotowanie materiału do badań:

Krew pobierano z żyły łokciowej do probówki zawierającej 3,2% cytrynianu sodu jako antykoagulant (9 części krwi + 1 część antykoagulantu). Następnie probówki wirowano z szybkością 2000 g (3333 obr/min). W przypadku oznaczania miana przeciwciał anti- β_2 -GPI w teście QUANTA Lite[®] - pobraną krew żylną uprzednio odstawiano w temperaturze pokojowej na 30 minut w celu wytworzenia skrzepu i uzyskania surowicy. W dalszym etapie odpipetowywano osocze/surowicę przeznaczane do badań i zamrażano w temperaturze -20⁰C (w razie zamiaru przechowywania przez miesiąc) lub w -70⁰C (w przypadku konieczności dłuższego magazynowania) w celu wykonania badań w terminie późniejszym (po zgromadzeniu dostatecznej ilości próbek do oznaczenia całej serii badanej) lub wyjaśnienia wątpliwości diagnostycznych w późniejszym terminie.

W dniu badania osocze/surowicę rozmrażano w temperaturze 37⁰C przez 5-10 minut i następnie wykonywano oznaczenia lub - wyłącznie w przypadku metod koagulologicznych - oznaczeń dokonywano po uprzednim wirowaniu materiału badanego przez 10 minut z prędkością 8400g (140000 obr/min) w celu uzyskania osocza ubogopłytkowego (dla wyeliminowania wpływu fosfolipidów uwolnionych z płytek w procesie rozmrażania na wynik oznaczeń).

Wyniki badań molekularnych w kierunku mutacji Leiden czynnika V oraz polimorfizmu G20210A genu protrombiny były danymi wynikającymi z wywiadu (potwierdzonymi w dokumentacji medycznej)

II. Rozpoznanie APS w oparciu o:

METODY KOAGULOLOGICZNE – wykrywanie antykoagulantu tocznia (LA – lupus anticoagulant):

Wg zaleceń International Society of Thrombosis and Haemostasis z 1995 roku (12-Miyakis, 16 - BrandJT) diagnostyka laboratoryjna LA [przeprowadzona w ubogopłytkowym osoczu cytrynianowym, uzyskanym po natychmiastowym odwirowaniu pobranej krwi w celu zmniejszenia wpływu fosfolipidów (PL) uwalnianych z płytek krwi] powinna przebiegać 3-etapowo. Pierwszy krok, mający status testu przesiewowego, wymaga potwierdzenia wydłużenia minimum jednego z czasów krzepnięcia zależnych od PL. Ponieważ żaden z wymienionych testów nie osiąga 100% czułości, w celu wykluczenia/wykazania obecności LA zaleca się wykonanie co najmniej 2 testów z tej

samej próbki - w badanej grupie oznaczano aPTT z Actinem oraz DRVVT. Przedłużenie w/w czasu/czasów krzepnięcia pozwala na przejście do II etapu - testów mieszania osocza badanego z kontrolnym (odpowiednio - w stosunku 1:1). Ma on charakter dodatkowej kontroli – brak korekcji czasu krzepnięcia mieszaniny wskazuje na zależność zjawiska od PL (wykluczenie rzeczywistego niedoboru czynników krzepnięcia lub stosowania doustnych antykoagulantów). Trzeci etap stanowi test potwierdzenia, który polega na skróceniu przedłużonego wyjściowo czasu krzepnięcia po dodaniu nadmiaru PL pochodzących np. z: liposomów zawierających fosfatydyloserynę, mózgu królika, płytek krwi naprzemiennie zamrażanych i rozmrażanych czy też heksagonalnych PL. Skrócenie to wykazuje zależną od PL swoistość zjawiska i świadczy o obecności LA (17, 18)

Czas częściowej trombotoplastyny po aktywacji (activated partial thromboplastin time - aPTT)

– odczynnik: PATHROMTIN SL firmy SIEMENS – roztwór zawierający cząsteczki dwutlenku glinu, fosfolipidy roślinne, chlorek sodu i bufor stabilizujący

Zasada metody: test aPTT mierzy czas powstania skrzepu w próbówce po dodaniu chlorku wapnia (CaCl_2) do aktywowanego uprzednio za pomocą tzw. częściowej trombotoplastyny (czyli odczynnika aktywującego, niezawierającego czynnika tkankowego) osocza ubogopłytkowego podczas inkubacji w temperaturze 37°C . Wydłużenie czasu aPTT najczęściej związane jest z niedoborem czynników krzepnięcia drogi wewnątrzpochodnej sięgające 40% wartości referencyjnych (cz. VIII, IX, XI, XII, kininogenu wielkocząsteczkowego i prekalikreiny), ale także drogi „wspólnej” (cz. V, X, protrombiny, fibrynogenu).

Oznaczenia wykonywano w aparacie Fibrintimer II firmy Dade-Behring.

Wykonanie: do ogrzanych uprzednio w temperaturze 37°C kuwetek pomiarowych z mieszadłkiem dodawano $50\mu\text{l}$ osocza badanego/wzorcowego oraz $50\mu\text{l}$ odczynnika aktywującego. Całość inkubowano przez 2 min w temperaturze 37°C . Po inkubacji naczynko umieszczano w komorze pomiarowej, dodawano $50\mu\text{l}$ ogrzanego do temperatury 37°C CaCl_2 i dokonywano odczytu po zatrzymaniu czasomierza – urządzenie zatrzymuje się w momencie wykrycia skrzepu.

Dla każdego pacjenta oznaczenie wykonano dwukrotnie w celu kontroli prawidłowości otrzymanego wyniku. Zakres wartości referencyjnych: 28-38”

Wykrywanie antykoagulantu tocznia (lupus anticoagulant) LA₁/LA₂

(uproszczony test DRVVT - Dilute Russell's viper venom time) – firma Dade

Behring

- odczynniki:

LA₁ (liofilizat) – zawiera: rozcieńczony jad żmii Russella jako aktywator cz. X, fosfolipidy, środki antyheparynowe, jony wapnia, bufor, azydek sodu i barwniki; służy do wykrycia obecności LA w teście przesiewowym

LA₂ (liofilizat) – zawiera: rozcieńczony jad żmii Russella jako aktywator cz. X, nadmiar fosfolipidów, środki antyheparynowe, jony wapnia, bufor, azydek sodu i barwniki; służy do potwierdzenia obecności LA

Zasada metody: jad żmii Russella obecny w odczynniku LA₁ (test przesiewowy – screening) inicjuje proces krzepnięcia osocza na drodze aktywacji cz. X. Jeśli w badanym osoczu jest obecny antykoagulant tocznia, z reguły dochodzi do wydłużenia czasu krzepnięcia na skutek zaburzonego w warunkach in vitro wiązania fosfolipidów z czynnikami krzepnięcia. W celu wykazania zależności stwierdzonego w teście LA₁ wydłużenia czasu krzepnięcia od obecności przeciwciał antyfosfolipidowych, przeprowadza się test potwierdzenia (confirm), wykorzystując odczynnik LA₂ – nadmiar fosfolipidów w nim zawarty doprowadza do neutralizacji przeciwciał antyfosfolipidowych obecnych w badanym osoczu, co skutkuje znaczącym skróceniem czasu krzepnięcia tegoż osocza w stosunku do wyniku otrzymanego przy użyciu LA₁.

Wykonanie: odpowiednio przygotowane osocze badano w aparacie Fibrintimer II firmy Dade-Behring. Wyjściowo ogrzewano fiolkę rozpuszczonego w wodzie destylowanej odczynnika LA₁/LA₂ do temp. 37⁰C, następnie przenoszono 0,1ml osocza badanego lub kontrolnego (w celu kontroli prawidłowości oznaczenia w stosunku do normy) do naczynka pomiarowego z mieszadełkiem, które inkubowano w temp. 37⁰C przez 1 min. Po inkubacji naczynko pomiarowe umieszczano w komorze pomiarowej, dodawano do niego 100µl odczynnika LA₁/LA₂ i dokonywano odczytu po zatrzymaniu czasomierza – urządzenie mierzy czas upływający od dodania odczynnika LA₁/LA₂ do wytworzenia skrzepu.

Dla każdego pacjenta oznaczenie wykonano dwukrotnie w celu kontroli prawidłowości otrzymanego wyniku.

Końcowy wynik badania jest przedstawiany w postaci ilorazu czasu krzepnięcia osocza badanego otrzymanego z oznaczeń wykonanych za pomocą odczynników LA₁ i LA₂ (LA ratio):

LA ratio = czas krzepnięcia osocza w teście LA₁/czas krzepnięcia osocza w teście LA₂.

Zakres wartości referencyjnych: LA₁ = 31-45"; LA₂ = 30-38"; LA ratio = 0,8-1,3.

Wartość LA ratio > 1,3 wskazuje na obecność antykoagulanu tocznia i jest słabo, średnio oraz silnie wyrażona, jeśli LA ratio wynosi odpowiednio 1,3-1,5; 1,5-2,0; > 2,0.

Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji z Actinem (aPTT z Actinem)

– odczynnik: DADE ACTIN FSL firmy SIEMENS – w skład wchodzi oczyszczone fosfolipidy (fosfatydy sojowe i fosfatydy mózgu króliczego) zawieszony w kwasie elagowym jako aktywatorze krzepnięcia osocza, z dodatkiem buforu, stabilizatorów i konserwantów.

Zasada metody oraz sposób wykonania są bardzo podobne do opisanego wyżej oznaczania aPTT. Różnica polega na wzbogaceniu odczynnika w fosfolipidy, co w konsekwencji zwiększa wrażliwość testu na inhibitory tocznio-podobne, choć działanie to jest zmienne i dlatego tę metodę badawczą również klasyfikuje się do grupy testów przesiewowych wykrywających zaburzenia krwotoczne, jak i krzepnięcia w stanach opisanych podczas omawiania testu aPTT.

Wykonanie: oznaczenia również przeprowadzono w aparacie Fibrintimer II firmy Dade-Behring wg wcześniej opisanego schematu postępowania.

Dla każdego pacjenta oznaczenie wykonano dwukrotnie w celu kontroli prawidłowości otrzymanego wyniku. Zakres wartości referencyjnych: 25-34"

Wykrywanie krążącego antykoagulantu tocznia w teście korekcji (test mieszania osocza badanego i kontrolnego w stosunku 1:1)

Zasada metody: porównuje się aPTT z Actinem osocza badanego z osoczem prawidłowym i mieszaniny równych części osocza badanego z prawidłowym po półgodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej. W przypadku prostego niedoboru czynników krzepnięcia dochodzi do korekcji wyjściowo wydłużonego aPTT z Actinem, gdyż niedoborowy czynnik zostaje uzupełniony przez prawidłowe osocze. Brak korekcji świadczy o obecności krążącego antykoagulantu.

Wykonanie: do przeprowadzenia oznaczenia użyto odczynniki oraz wyposażenie wykorzystywane w teście aPTT z Actinem, w tym koagulometr - Fibrintimer II firmy

Dade-Behring. Analizie poddawano 200µl osocza wzorcowego, 200µl osocza badanego oraz mieszaninę osocza wzorcowego i badanego w stosunku 1:1 (200:200µl), a w sytuacjach wątpliwych (np. niecałkowitej korekcji) – w stosunku 1:2 (100:200µl). Przygotowane uprzednio w plastikowych probówkach mieszaniny inkubowano przez 1/2 godziny w temperaturze pokojowej, w warunkach zabezpieczających przed parowaniem (korek lub parafilm). Po inkubacji wykonywano pomiar aPTT z Actinem w każdej z ogrzewanych próbek.

O prawidłowej korekcji (czyli o rzeczywistym niedoborze czynników krzepnięcia) należy wnioskować wówczas, gdy różnica między aPTT z Actinem osocza badanego i mieszaniny jest większa niż 50% różnicy między aPTT z Actinem osocza badanego i kontrolnego. W przeciwnym przypadku stwierdza się brak korekcji i rozpoznaje obecność krążącego antykoagulantu.

W sytuacjach wątpliwych (np. niecałkowitej korekcji, która nie upoważnia do jednoznacznego rozpoznania obecności inhibitora) badano aPTT z Actinem mieszaniny zawierającej 1 objętość osocza kontrolnego i 2 objętości osocza badanego. Test interpretowano jako ujemny (prawidłowa korekcja) jeśli różnica między aPTT z Actinem osocza kontrolnego i mieszaniny w stosunku 1:2 była mniejsza niż 10s.

METODY IMMUNOENZYMATYCZNE (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA):

Oznaczanie miana przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG i IgM w surowicy lub osoczu (immunoenzymatyczny test mikroplótkowy firmy BIOSYSTEMS, Hiszpania)

Skład zestawu do przeprowadzenia immunoenzymatycznego testu mikroplótkowego:

- A. bufor płuczący – stężona sól fizjologiczna buforowana fosforanem sodu, azydek sodu
- B. rozcieńczalnik próbek – bufor Tris, azydek sodu
- C+. kontrola dodatnia IgG/IgM – surowica z ACA klasy IgG i IgM, azydek sodu
- C-. kontrola ujemna – surowica ludzka wolna od ACA, azydek sodu
- DG. Koniugat IgG – królicze, poliklonalne immunoglobuliny przeciw ludzkiej IgG znakowane peroksydazą chrzanową
- DM. Koniugat IgM – królicze poliklonalne immunoglobuliny przeciw ludzkiej IgM znakowane peroksydazą chrzanową

E. substrat – 3,3',5,5' tetrametylobenzydyna (TMB)

M. mikro płytki: 12 pasków po 8 celek opłaszczonych kardiolipliną i β_2 -glikoproteiną I S1-S6. standardy ACA IgG/IgM – surowica ludzka z ACA w klasie IgG (w stężeniach 0,7.5, 15, 30, 60, i 120 GPL) oraz IgM (w stężeniach 0, 5, 10, 20, 40 i 80 MPL) azydek sodu. Skalibrowane przy zastosowaniu standardowych jednostek antykardioliplin GPL lub MPL (j/ml; G oznacza IgG, M- IgM, PL – fosfolipidy) wobec uznanych międzynarodowo surowic referencyjnych

Zasada metody: przeciwciała antykardiolipinowe (ACA) w próbie badanej wiążą się (po inkubacji w temperaturze pokojowej) z antygenami opłaszczającymi zagłębienia (celki) mikro płytki. Podczas kolejnej inkubacji zawarte w koniugacie immunoglobuliny skierowane przeciw ludzkiej IgG lub IgM, znakowane peroksydazą chrzanową łączą się z przeciwciałami uprzednio związanymi z podłożem. Po zakończeniu inkubacji i dodaniu do każdej z celek mikro płytki substratu chromogenego (tetrametylobenzydyny z nadtlaniem wodoru), powstaje enzymatyczna reakcja barwna, która następnie zostaje zatrzymana za pomocą chlorowodoru. Natężenie barwy powstałego żółtego kompleksu, mierzone w odniesieniu do jednostek absorbancji przy długości fali λ 450nm, jest proporcjonalne do miana ACA (odpowiednio w klasie IgG lub IgM) w badanej próbce.

Wykonanie: wyjściowo doprowadzano wszystkie odczynniki i mikrostudzienki do temperatury pokojowej. Następnie umieszczano po 100 μ l każdego ze standardów IgG/IgM (S1-S6), kontroli dodatniej i ujemnej oraz rozcieńczonej próbki badanej w osobnych celkach. Całość inkubowano przez 30min w wilgotnej komorze (temperatura pokojowa). W dalszym etapie zawartość celek odciągano w celu ich 3-krotnego przepłukania buforem płuczącym przez minimum 10 sekund za każdym razem. Po przepłukaniu w każdej z celek umieszczano 100 μ l koniugatu - odpowiednio IgG lub IgM, po czym całość ponownie inkubowano w wilgotnej komorze przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po kolejnym przepłukaniu zagłębień mikro płytki do każdego z nich dodawano 100 μ l substratu i całość jeszcze raz inkubowano przez 15 minut w warunkach już opisanych, obserwując zmianę barwy. Po zakończeniu inkubacji do każdej z celek wprowadzano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję i ponownie kontynuowano inkubację jeszcze przez 5 minut. Następnie dokonywano odczytu absorbancji (w okresie nie dłuższym niż 30 minut) w spektrofotometrze przy długości fali λ 450nm, używając ślepej próby do ustawienia zera. W celu oznaczenia ilościowego sporządzano wykres

kalibracyjny dla wartości absorbancji każdego standardu wobec stężeń antykardiolipiny (jednostki GPL lub MPL).

Zakres wartości referencyjnych (wynik ujemny): wg 99 percentyla ustalonego w Pracowni Hemostazy i Genetyki WSM im. J. Strusia w Poznaniu – odpowiednio $\leq 11,3$ GPL i $\leq 10,4$ MPL.

Oznaczenie miana przeciwciał przeciw β_2 -glikoproteinie I (β_2 -GPI) w klasie IgG w surowicy (immunoenzymatyczny test mikroplótkowy QUANTA Lite[®] β_2 -GPI IgG firmy INOVA Diagnostics, Stany Zjednoczone)

Skład zestawu do przeprowadzenia immunoenzymatycznego testu mikroplótkowego:

1. mikroplótka: 12 pasków po 8 celek opłaszczonych β_2 -glikoproteiną-I
2. rozcieńczona kontrola ujemna
3. rozcieńczona kontrola dodatnia
4. rozcieńczony kalibrator A – E – surowica ludzka z przeciwciałami przeciw β_2 -glikoproteinie I (anty- β_2 -GPI) w stężeniach odpowiednio: A - 150, B – 75, C – 37,5, D- 18,8, E – 9,4 SGU (skalibrowane przy użyciu standardowych jednostek anty- β_2 -GPI klasy IgG - SGU)
5. rozcieńczalnik próbek HRP
6. 40-krotnie stężony koncentrat płuczący HRP - sól buforowana buforem Tris, laurynian polioksyorbitolu – Tween20, stabilizatory białkowe i konserwanty
7. koniugat IgG (β_2 HRP) – zawiera kozie immunoglobuliny skierowane przeciw ludzkiej IgG znakowane enzymem
8. substrat chromogeny zawierający tetrametylobenzydynę (TMB)
9. roztwór HRP zatrzymujący reakcję, zawierający 0,344M kwas siarkowy

Zasada metody: jest podobna do oznaczania miana antykardiolipin, tylko w tym przypadku oceniane są ilościowo przeciwciała przeciw β_2 -GPI (anty- β_2 -GPI) klasy IgG. W postaci oczyszczonej antygen β_2 -GPI jest związany z powierzchnią zagłębień poliestyrenowej mikroplótki (w takiej postaci płytki dostarczane są w zestawach przez producenta), co - po wprowadzeniu surowic kontrolnych/badanych do studzienek mikroplótki - umożliwia przyłączenie zawartych w próbkach anty- β_2 -GPI do unieruchomionego antygeny, w wyniku uprzedniej inkubacji w temp. pokojowej. Podczas kolejnej inkubacji immunoglobuliny pochodzące z koniugatu skierowane przeciw ludzkiej IgG, znakowane enzymem łączą się z przeciwciałami uprzednio związanymi z

podłożem. Po zakończeniu inkubacji i dodaniu do każdej z celek mikroplątki chromogenego substratu, powstaje enzymatyczna reakcja barwna, która po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję, wygasa. Natężenie barwy powstałego kompleksu, mierzone w odniesieniu do jednostek absorbancji przy długości fali 450nm, jest proporcjonalne do miana anty- β_2 -GPI w klasie IgG w badanej próbce.

Wykonanie: wyjściowo doprowadzano wszystkie odczynniki i mikrocelki do temperatury pokojowej (20-26⁰C). Następnie rozcieńczano koncentrat płuczący w stosunku 1:40, dodając 975ml wody destylowanej. W dalszym etapie 5 μ l każdej badanej surowicy dodawano do 500 μ l rozcieńczalnika próbek, otrzymując w ten sposób rozcieńczenie w stosunku 1:101. Potem dodawano po 100 μ l każdego z załączonych kalibratorów, kontroli dodatniej i ujemnej oraz rozcieńczonej uprzednio surowicy badanej w osobnych celkach (dla każdego z wymienionych odczynników przeznaczano dwie mikrocelki, a dla próbek badanych – w zależności od ich ilości – od jednego do dwóch zagłębień). Całość przykrywano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30min. W dalszym etapie zawartość studzienek odciągano w celu ich 3-krotnego przepłukania 200 μ l buforu płuczącego. Po przepłukaniu w każdej z celek umieszczano 100 μ l koniugatu IgG, po czym całość ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej. Po kolejnym, 3-krotnym przepłukaniu zagłębień mikroplątki do każdego z nich dodawano 100 μ l substratu chromogenego i całość jeszcze raz inkubowano przez 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej, uzyskując reakcję barwną. Po zakończeniu inkubacji do każdej z celek wprowadzano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję. Następnie dokonywano odczytu absorbancji (w okresie nie dłuższym niż 1h) każdej z próbek w spektrofotometrze, przy długości fali λ 450nm, używając ślepej próby do ustawienia zera. W celu oznaczenia ilościowego sporządzano wykres kalibracyjny dla wartości absorbancji każdego kalibratora wobec stężeń immunoglobulin o swoistości anty- β_2 -GPI (jednostki SGU).

Zakres wartości referencyjnych (wynik ujemny): ≤ 20 SGU; wg 99 percentyla Pracowni Hemostazy i Genetyki WSM im. J. Strusia w Poznaniu – odpowiednio $\leq 19,9$ SGU.

III. Pozostałe badania:

- ocena aktywności antytrombiny (IL TEST™ ANTITHROMBIN) **odczynniki:**

czynnik Xa – postać liofilizowana bydlęcego czynnika Xa, heparyna, bufor i bydlęce

albuminy surowicze

Substrat chromogenny – postać liofilizowana S2765,

N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-p.Na₂HCL oraz środek zwiększający objętość

Zasada metody: antytrombina (AT) jest głównym inhibitorem krzepnięcia krwi, który hamuje wiele proteaz odpowiedzialnych za krzepnięcie krwi, w szczególności trombinę, czynniki Xa i XIa.

Zestaw IL Antithrombin jest zautomatyzowanym oznaczeniem (analiza w urządzeniu IL Coagulation Systems) opartym na syntetycznym substracie chromogennym oraz inaktywacji cz. Xa. W pierwszym etapie dochodzi do związania AT z cz. Xa, w drugim - ma miejsce ocena resztkowej aktywności cz. Xa z wykorzystaniem substratu chromogenego. Poziom antytrombiny w badanym osoczu jest odwrotnie proporcjonalny do resztkowej aktywności cz. Xa, ocena ma charakter pośredni – opiera się na ilości uwalnianej w drugim etapie paranitroaniliny (kontrola kinetyczna, odczyt przy długości fali λ 450nm).

Wykonanie: wyjściowo rozcieńczano zawartość każdej z fiolek zawierających substrat chromogenny za pomocą 2ml wody redestylowanej. Po delikatnym wymieszaniu i całkowitym rozcieńczeniu produktu całość utrzymywano przez kolejnych 30 minut pod kontrolą w temperaturze 15-25⁰C i obracano w celu zmieszania przed użyciem. Następnie rozcieńczano czynnik Xa, dodając 2,5ml wody redestylowanej do każdej z fiolek, dalsze postępowanie było analogiczne – jak po rozcieńczeniu substratu chromogenego. Oznaczenie wykonywano w sposób zautomatyzowany (w urządzeniu IL Coagulation Systems) w dwóch etapach opisanych już przy prezentowaniu zasady metody.

W celu kontroli prawidłowości otrzymanego wyniku dodatkowo oznaczano antytrombinę zawartą w prawidłowym i nieprawidłowym chromogennym osoczu kontrolnym. Takie kontrole przeprowadzano raz na każdą 8-godzinną zmianę.

Końcowy wynik badania podawany jest w % aktywności antytrombiny.

Zakres wartości referencyjnych: 75,6-122,4%

- oznaczenie stężenia białka C (automatyczny test ilościowy w systemie VIDAS z wykorzystaniem metody enzymoimmunofluorescencyjnej [ELFA] - VIDAS[®]Protein C firmy bioMerieux, USA)

- skład zestawu do zautomatyzowanego oznaczenia stężenia białka C (protein C- PC):

1. 30 pasków testowych PC [STR]^{*} – gotowe do użycia
2. 30 pipetek SPR PC [SPR[®]] - gotowe do użycia
3. kontrola PC w formie liofilizatu 1x1ml – [C1]^{**}
(ludzkie osocze rozcieńczone wołowym buforem glicynowo-abuminowym)
4. standard PC w formie liofilizatu 1x1ml - [S1]^{**}
(ludzkie osocze rozcieńczone w wołowym buforem glicynowo-albuminowym)
5. roztwór rozcieńczalnika PC 2x 5,5ml – [R1] - gotowy do użycia
6. karta MLE – arkusz specyfikacji zawierający fabryczne dane kalibracyjne wymagane do skalibrowania testu

* - opis paska testowego:

studzienki	odczynniki
1	próbka badana
2-3-4	puste studzienki
5	Koniugat – mysie monoklonalne przeciwciała anti-PC wyznakowane fosfatazą alkaliczną w buforze TRIS (0,05mol/l pH 6,5) + surowica końska + 0,9g/l azydek sodowy (600μl)
6-7-9	Bufor płuczący: bufor TRIS (0,01mol/l pH 7,3) + chemiczne stabilizatory + 0,9g/l azydek sodowy (600μl)
8	Rozcieńczalnik: bufor TRIS (0,05mol/l pH 7,4) + surowica cielęca + białkowe i chemiczne stabilizatory +0,9g/l azydek sodowy (600μl)
10	Kuweta optyczna z substratem: fosforanem 4-metyloumbeliferylu (0,06mmol/l) + dietanolamina (0,62mol/l lub 6,6%, pH 9,2) + 1g/l azydek sodowy (300μl)

** - rozpuścić w 1ml rozcieńczalnika i odczekać 5-10 min., potem wymieszać

Wprowadzenie i zasada metody: białko C (protein C - PC) - wraz ze swym układem: trombomoduliną (śródbłonkowym białkiem receptorowym dla trombiny), śródbłonkowym receptorem dla białka C i białkiem S - należy do naturalnych inhibitorów układu krzepnięcia, w formie aktywnej wykazując działanie hamujące na proces krzepnięcia przez proteolizę czynników Va i VIIIa. Podstawą testu VIDAS[®]Protein C jest enzymoimmunologiczna, dwuetapowa metoda kanapkowa z końcowym odczytem fluorescencji (ELFA). Odczynniki wymagane do wykonania oznaczenia są gotowe do użycia – nałożone na zapieczętowane paski testowe. Wszystkie etapy badania przeprowadzane są automatycznie przez analizator VIDAS PC. Pipetka SPR (Solid Phase Receptacle) służy jednocześnie jako faza stała z fabrycznie opłaszczonym

monoklonalnymi, mysimi przeciwciałami anti-PC wnętrzem oraz urządzenie pipetujące. Najpierw próbka badana przenoszona jest do studzienki z rozcieńczalnikiem, następnie rozcieńczona próbka jest cyklicznie wprowadzana i pobierana do/z pipetki SPR. Antygen łączy się z przeciwciałami opłaszczającymi ścianki SPR, a niezwiązane składniki są usuwane podczas procesu płukania. W drugim etapie do pipetki SPR kilkakrotnie jest wprowadzany i pobierany naprzemiennie koniugat mnonoklonalnych, mysich przeciwciał anti-PC wyznakowanych alkaliczną fosfatazą; nadmiar substancji czynnej usuwany jest w procesie płukania). W celu oceny ilościowej we wnętrzu SPR jest dynamicznie inkubowany substrat (fosforan 4-metyloumbeliferylu). Enzym zawarty w koniugacie katalizuje hydrolizę substratu do produktu fluorescencyjnego (4-metyloumbeliferonu) - pomiar fluorescencji odbywa się przy długości fali λ 450nm. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia antygeny obecny w próbce. Wynik oznaczenia obliczany jest automatycznie przez aparat w odniesieniu do krzywej kalibracyjnej przechowywanej w pamięci urządzenia, następnie jest on drukowany.

Wykonanie: wyjściowo wyjmowano po jednym pasku testowym STR PC i jednej pipetce SPR PC dla każdej badanej próbki, kontroli i standardu, które pozostawiano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu osiągnięcia stanu równowagi. Po odpowiednim wprowadzeniu parametrów do analizatora (kod badania, dane pacjenta z numerami identyfikacyjnymi, standard oznaczony jako S1, kontrola – jako C1) oraz wymieszaniu próbek lub standardu/kontroli, odpipetowywano 100 μ l każdego z nich do studzienek nr 1 pasków testowych (STR). Przed rozpoczęciem analizy do aparatu wprowadzano kartę MLE w celu odczytu kodu kreskowego (dla każdego oznaczenia innego) i zachowania go w pamięci urządzenia. Następnie umieszczano paski testowe lub kontrole/standardy i pipetki SPR w aparacie, sprawdzano zgodność nalepek zawierających kod testu na pipetkach z analogicznymi na paskach badanych i uruchamiano analizator. Wszystkie opisane etapy badania były wykonywane przez aparat, czas trwania oznaczenia - około 35min.

Każdorazowo po otrzymaniu nowej serii odczynników i uprzednim wprowadzeniu danych krzywej kalibracyjnej przeprowadzano rekaliibrację urządzenia za pomocą załączonego standardu (S1) w celu uzyskania krzywej kalibracyjnej, specyficznej dla danego aparatu. Dla zapewnienia poprawności otrzymywanych wyników, po każdym otwarciu nowego zestawu odczynników przeprowadzano kontrolę (C1) – miała ona

miejsce podczas każdej rekaliibracji (wyników nie zatwierdzano, jeśli nie mieściły się w oczekiwanych przedziałach).

Test VIDAS[®]Protein C skalibrowany jest względem Międzynarodowego Standardu WHO i stężenie białka C wyrażane jest w % lub IU/ml (1 IU/ml =100%).

Zakres wartości referencyjnych: 65-140%; zakres pomiarowy 1-120%. W przypadku stężenia PC > 120% 3-krotnie rozcieńczano osocze badane rozcieńczalnikami.

- wykazanie oporności na aktywowane białko C (przesiewowy, koagulologiczny test czynnościowy Proc[®] AcR firmy Siemens, Niemcy)

- odczynniki:

- aktywator – (liofilizat) – zawiera jad żmii Agkistrodon contortrix contortrix oraz bufor stabilizujący; służy do aktywacji endogennego białka C próbki w procesie inkubacji

- odczynnik PR3V (liofilizat) - zawiera bogaty w fosfolipidy, rozcieńczony jad żmii Russella, fosfolipidy pochodzenia roślinnego, jony wapnia oraz inhibitor heparyny, konserwanty (azydek sodu); jest czuły na zmiany stężenia aktywowanego białka C, pośrednio więc – jego wydłużenie może wiązać się z opornością na aktywowane białko C.

- wprowadzenie i zasada metody: oporność na aktywowane białko C (activated protein C resistance – APCr) najczęściej spowodowana jest punktową mutacją genu czynnika V krzepnięcia, która powoduje zamianę aminokwasu argininy w pozycji 506 cząsteczki cz. V na glutaminę (tzw. cz. V Leiden). Obecność tej mutacji spowalnia proces inaktywacji cz. Va przez aktywowane białko C. Czynniki V Leiden są najczęstszą postacią wrodzonej trombofilii – stanowi ok. 20-50% wszystkich przypadków (60). Oporność na aktywowane białko C może też być wywołana przez inne, bardzo rzadkie mutacje genu cz. V, jak: cz. V Cambridge czy też cz. V Hong Kong. Może też być cechą nabytą, np. u kobiet w ciąży albo stosujących doustne środki antykoncepcyjne.

Test Proc[®] AcR opiera się na aktywacji endogennego białka C przez inkubację badanego osocza z jadem żmii Agkistrodon contortrix contortrix. Następnie dokonywany jest pomiar czasu krzepnięcia tak przygotowanej próbki po dodaniu jadu żmii Russella (DRVVT). U osób zdrowych aktywacja białka C wydłuża ten czas 2-3 razy, w porównaniu do osocza pozbawionego aktywatora. U chorych z mutacją Leiden – jedynie nieznacznie (najczęściej 1,5-krotnie).

Wykonanie: wyjściowo odpowiednio przygotowywano potrzebne odczynniki przez dodanie wody destylowanej, odpowiednio 2ml – do aktywatora i 4ml do PR3V. Po ich delikatnym wymieszaniu, poddawano je 10-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej (+15 do +25⁰C). Przed wykorzystaniem odczynniki ponownie mieszano. Następnie przeprowadzano dwa testy: z osoczem aktywowanym oraz pozbawionym aktywatora. W celu wykonania pierwszego z nich, podgrzewano odpowiednią ilość odczynnika PR3V (0,1ml/test) do temperatury 37⁰C. Następnie wprowadzano 0,05ml osocza badanego lub wzorcowego albo kontroli dodatkowo (w celu nadzoru prawidłowości oznaczenia) do naczynka pomiarowego z mieszadłem i dodawano do niego 0,05ml aktywatora. Całość inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37⁰C. Po zakończeniu procesu dodawano 0,05ml uprzednio podgrzanego odczynnika PR3V, całość następnie umieszczano w komorze pomiarowej, dokonywano odczytu po zatrzymaniu czasomierza – urządzenie mierzy czas upływający od dodania odczynnika PR3V do wytworzenia skrzepu.

Dla każdego pacjenta oznaczenie wykonywano dwukrotnie w celu kontroli prawidłowości otrzymanego wyniku (podawano średnią z dwóch kolejnych oznaczeń).

Test bez aktywatora przeprowadzano analogicznie, tylko zamiast odczynnika zawierającego jad żmii *Agkistrodon contortrix contortrix* dodawano 0,05ml buforu weronalowego Owrena.

Końcowy wynik badania jest przedstawiany w postaci ilorazu czasu krzepnięcia osocza badanego z aktywatorem i bez niego (ProC[®] Ac R ratio):

ProC[®] Ac R ratio = czas krzepnięcia osocza w teście PR3V z aktywatorem / czas krzepnięcia osocza w teście PR3V bez aktywatora.

Zakres wartości referencyjnych: APCr > 2. Czas krzepnięcia osocza wzorcowego po dodaniu aktywatora powinien być 2-3 razy dłuższy niż ten sam parametr uzyskany po zbadaniu osocza wzorcowego bez aktywatora. Bardzo niska wartość ProC[®] Ac R ratio (< 1,5) wskazuje na obecność cz. V Leiden i wymaga potwierdzenia badaniami genetycznymi. Wartość pomiędzy 1,5 i 2,1 może wynikać ze zmniejszonego stężenia białka C i również wymaga dalszego potwierdzenia w badaniach stężenia białka C oraz testach genetycznych.

- Oznaczanie wolnego białka S w osoczu (immunoenzymatyczny test mikroplótkowy firmy HELENA BioSciences Europe, Wielka Brytania)

Skład zestawu do przeprowadzenia immunoenzymatycznego testu mikroplótkowego:

1. mikroplótki ze studzienkami opłaszczonymi przeciwciałami przeciw ludzkiemu białku S (12 pasków po 8 studzienek)
2. ludzkie osocze referencyjne ELISA (3x0,5ml)
3. koniugat białka S (1x12ml): poliklonalne immunoglobuliny skierowane przeciw ludzkiemu białku S, znakowane peroksydazą chrzanową
4. rozcieńczalnik próbek (1x60ml): bufor, sole i azydek sodu jako środek konserwujący
5. roztwór substratu (1x13ml): substrat chromogeny zawierający tetrametylobenzydynę (TMB) i nadtlenek wodoru (H_2O_2)
6. roztwór wstrzymujący reakcję, zawierający 0,36 M kwas siarkowy

- dodatkowe odczynniki i osocza kontrolne (poza zestawem):

1. mianowane normalne osocze kontrolne
2. mianowane patologiczne osocze kontrolne
3. woda destylowana/dejonizowana
4. cylindry miarowe
5. pipety (dozujące pomiędzy 10 i 1000[μ l])
6. spektrofotometr do odczytu plótek (odczyt absorbancji przy długości fali λ 450nm)
7. pipety wielokanałowe, dozujące do 8 studzienek jednocześnie
8. wirówka

- zasada metody i wprowadzenie: białko S (protein S – PS) jest jednołańcuchową glikoproteiną syntetyzowaną w obecności witaminy K w wątrobie, w naczyniach śródbłónka i najprawdopodobniej w megakariocytach. Odgrywa ono ważną rolę fizjologiczną jako element przeciwkrzepliwego układu białka C, w którym pełni funkcję kofaktora białkowego dla aktywnej formy białka C i przy współudziale fosfolipidów oraz jonów wapnia ułatwia proteolityczną degradację czynników Va i VIIIa, o czym wspomniano powyżej. W osoczu prawidłowym około 40% białka S krąży w postaci wolnych cząsteczek, a pozostałe 60% stanowi kompleks ze składową C4b klasycznej

drogi układu dopełniacza. Czynnościowo aktywna i zdolna do połączenia z aktywnym białkiem C jest tylko niezwiązana forma kofaktora.

Opisywana metoda badawcza (test ELISA) pozwala na ilościowe oznaczenie antygenu wolnego białka S.

Zasada metody: jest podobna do opisanych już wcześniej innych testów immunoenzymatycznych. Przeciwciała swoiste dla ludzkiego białka S są związane z powierzchnią studzienek mikropłytki poliestyrenowej. Inkubacja w temp. pokojowej rozcieńczonego osocza badanego, dodanego do każdej ze studzienek, umożliwia – związanie białka S zawartego w próbce z monoklonalnym przeciwciałem przechwytyjącym, swoistym dla ludzkiego białka S. Nadmiar niezwiazanego osocza jest usuwany w procesie płukania. Podczas kolejnej inkubacji zawarte w koniugacie, poliklonalne immunoglobuliny skierowane przeciw ludzkiemu białku S, znakowane enzymem (perkossydazą chrzanową) łączą się z antygenami białka S uprzednio zwiazanego z podłożem. Nadmiar niezwiazanego koniugatu jest usuwany podczas płukania. Po zakończeniu inkubacji i dodaniu do każdej ze studzienek chromogenego substratu (tetrametylobenzydyny – TMB) oraz nadtlenu wodoru (H_2O_2), powstaje enzymatyczna reakcja barwna, która następnie zostaje zatrzymana za pomocą roztworu wstrzymującego ten proces. Natężenie barwy powstałego kompleksu - wprost proporcjonalne do stężenia wolnego białka S - mierzone jest w jednostkach gęstości optycznej (OD) w spektrofotometrze przy długości fali λ 450nm. Względne stężenie procentowe antygenu białka S w osoczu badanym oznaczane jest wobec krzywej standardowej przygotowanej przy pomocy osocza referencyjnego dostarczonego w zestawie.

Wykonanie: wyjściowo doprowadzano wszystkie odczynniki i mikrostudzienki do temperatury pokojowej (18-26⁰C). Następnie przygotowywano roztwór płuczący, rozcieńczając 30ml stężonego PBS w 1000ml wody destylowanej oraz osocze referencyjne, dodając do jego liolilizatu 0,5ml wody destylowanej i po zmieszaniu odstawiając na 10minut. W kolejnym etapie przygotowywano 6 rozcieńczeń referencyjnych osocza referencyjnego dostarczonego w zestawie, wg poniższego opisu:

Objętość osocza referencyjnego	Objętość rozcieńczalnika próbki	Poziom referencyjny
30μl	+ 500μl	= 150%
20μl	+ 500μl	= 100%
250μl z rozcieńczenia 150%	+ 250μl	= 75%
250μl z rozcieńczenia 100%	+ 250μl	= 50%
250μl z rozcieńczenia 50%	+ 250μl	= 25%
250μl z rozcieńczenia 25%	+ 250μl	= 12,5%

Następnie przygotowywano rozcieńczenia próbek badanych i kontroli w stosunku 1:26, dodając do 0,02ml osocza badanego/kontrolnego 0,5ml rozcieńczalnika. Po dokładnym wymieszaniu wszystkich sporządzonych rozcieńczeń (osoczy referencyjnych, kontroli i próbek badanych) wprowadzano po 100μl każdego z nich do odpowiednich studzienek w celu oznaczenia wolnego białka S [do zagłębienia ze ślepą odczynnikową (reagent blank well – RBW) wprowadzano wyłącznie 100μl rozcieńczalnika próbek, a dołek ze ślepą wodną (water blank well - WBW) pozostawiano pustą]. Całość inkubowano przez 40min. w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji zawartość studzienek wylewano i 4-krotnie płukano, dodając za każdym razem do każdej studzienki po 0,2ml buforu płuczącego. Następnie w każdej ze studzienek umieszczano 100μl roztworu koniugatu, po czym całość ponownie inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po kolejnym opróżnieniu i ponownym 4-krotnym przepłukaniu zagłębień mikropłytki, stosując każdorazowo 0,2ml buforu płuczącego, do każdego z nich dodawano 100μl substratu chromogennego i całość jeszcze raz inkubowano przez 10 minut w warunkach już opisanych, obserwując reakcję zmiany koloru na niebieską. W celu zatrzymania tego procesu do wszystkich studzienek dodawano 0,1ml roztworu wstrzymującego reakcję (z wyjątkiem WBW, do której wprowadzano 0,2ml wody destylowanej). Następnie dokonywano odczytu absorbancji (w okresie nie dłuższym niż 30minut) w spektrofotometrze przy długości fali λ 450nm, używając ślepą wodną do ustawienia zera. Dla każdego z rozcieńczeń osoczy referencyjnych, kontroli i próbek badanych oznaczenie stężenia wolnego białka S przeprowadzano w powtórzeniach w celu kontroli poprawności otrzymanych wyników. Aby uzyskać oznaczenie ilościowe sporządzano wykres krzywej standardowej (oś X – średnia OD każdego z rozcieńczeń osocza referencyjnego; oś Y – odpowiadająca wartość poziomu referencyjnego), po czym używając średniej OD, z wykresu określano wartości względne dla każdego pacjenta i kontroli. Wyniki badania

podawano we względnych wartościach procentowych wolnego białka S w porównaniu do puli osocza prawidłowego, które uzyskiwano przez pomnożenie wartości względnych pacjentów i kontroli uzyskanej z krzywej referencyjnej przez odpowiednią wartość przypisaną z osocza referencyjnego.

W celu kontroli jakości, dla każdego oznaczenia sprawdzano średnią OD ślepej odczynnikowej, która powinna być niższa niż 0,25; po uprzednim wyzerowaniu czytnika wobec wodnej ślepej. Nadzorowano również wartości OD dla wszystkich powtórzeń kontroli i próbek pacjentów, które powinny mieścić się w zakresie 20% średniej OD, dla odczytów absorbancji $> 0,2$. Wartości oznaczenia antygeny wolnego białka S uzyskane dla kontroli (i w konsekwencji) odpowiadające im oznaczenia dla próbek badanych, które nie mieściły się w zakresach dla testu ELISA przypisanych przez producenta, nie były akceptowane.

Zakres wartości referencyjnych: 50-150%.

- oznaczenie stężenia fibrynogenu met. koagulologiczną (automatyczny test ilościowy Hemosil™ RecombiPlasTin 2G firmy Instrumentation Laboratory, Stany Zjednoczone)

- skład zestawu RecombiPlasTin 2G:

1. RecombiPlasTin2G (RTF) liofilizowanego, rekombinowanego czynnika tkankowego, syntetyczne fosfolipidy ze stabilizatorami, konserwantami i buforem
2. RecombiPlasTin 2G Diluent (RTF Diluent) wodnego roztworu chlorku wapnia z polibrenem jako konserwantem

- dotatkowe odczynniki i osocza kontrolne (poza zestawem):

1. osocze kalibracyjne
2. prawidłowa kontrola
3. osocze nieprawidłowe – z niskim stężeniem fibrynogenu
4. kontrola fibrynogenu niska

Zasada metody: odczynnik tromboplastyny o wysokiej czułości oparty na ludzkim, rekombinowanym czynnikiem tkankowym (recombinant tissue factor – RTF) umożliwia ilościowe, automatyczne, jednoczesne oznaczenie czasu protrombinowego (PT - w systemie IL Coagulation oraz ELECTRA) i fibrynogenu (w systemie IL Coagulation) w ludzkim osoczu cytrynianowym na aparacie ACL 7000. Test służy do oceny zaburzeń zewnątrzpochodnej oraz wspólnej drogi układu krzepnięcia. RTF jest wolny od

zanieczyszczeń innymi czynnikami krzepnięcia, co zapewnia wysoką czułość testu na niedobory czynników VII, X, V, II oraz fibrynogenu.

Wykonanie: wyjściowo pozostawiano każdą fiolkę rozpuszczalnika oraz odczynnika w temperaturze 15-25⁰C przez minimum 15min. dla osiągnięcia stanu równowagi. Następnie opipetowywano 8ml rozpuszczalnika do fiolki z czynnikiem tkankowym i rozpuszczano delikatnie wirując. Po całkowitym zakończeniu procesu odczynnik przechowywano przez kolejne 15-20min. w temperaturze 15-20⁰C i bezpośrednio przed użyciem ponownie mieszano. Fiolkę z tak przygotowanym odczynnikiem oraz próbkę z badanym osoczem umieszczano na pokładzie aparatu. Po odpowiednim wprowadzeniu parametrów do analizatora (rodzaj badania, dane pacjenta z numerami identyfikacyjnymi) uruchamiano urządzenie. Analiza (do wydrukowania wyniku włącznie) była całkowicie przeprowadzana przez aparat - czas trwania oznaczenia fibrynogenu - około 5min.

W celu nadzorowania prawidłowości otrzymanego wyniku raz na każdą 8-godzinną zmianę przeprowadzano kontrolę jakości z zastosowaniem dodatkowych odczynników: kontroli prawidłowej i nieprawidłowej niskiej dla fibrynogenu.

Końcowy wynik testu podawany jest w g/l.

Zakres wartości referencyjnych: 3-6g/l.

- oznaczenie stężenia dimeru-D (automatyczny test ilościowy w systemie VIDAS z wykorzystaniem metody enzymoimmunofluorescencyjnej [ELFA] - VIDAS[®]D-dimer Exclusion[™](DD2) firmy bioMerieux, USA)

- Skład zestawu do zautomatyzowanego oznaczenia stężenia D-dimerów met. ELFA:

1. 60 pasków testowych DD2 [STR]^{*} – gotowe do użycia
2. 60 pipetek SPR DD2 [SPR][®] - gotowe do użycia
3. kontrole DD2 w formie liofilizatów 3x2ml każda – [C1 i C2]^{**}
(z ludzkiego osocza rozcieńczone wołowym buforem glicynowo - albuminowym)
4. standardy DD2 w formie liofilizatów 2x2ml każdy [S1 i S2]^{**}
(z ludzkiego osocza rozcieńczone wołowym buforem glicynowo- albuminowym)
5. roztwór rozcieńczalnika DD2 – 25ml – [R1] - gotowy do użycia
6. karta MLE – arkusz specyfikacji z fabrycznymi danymi do skalibrowania testu

* - opis paska testowego:

studzienki	odczynniki
1	próbka badana
2-3-4	puste studzienki
5	Koniugat – mysie monoklonalne przeciwciała anti-FbDP wyznakowane fosfatazą alkaliczną w buforze TRIS (0,05mol/l pH 6,5) + surowica końska + 0,9g/l azydek sodu (400µl)
6-7-9	Bufor płuczący: bufor TRIS (0,01mol/l pH 7,3) + chemiczne stabilizatory +0,9g/l azydek sodu (600µl)
8	Rozcieńczalnik: bufor TRIS (0,05mol/l pH 7,4) + surowica cielęca + białkowe i chemiczne stabilizatory +0,9g/l azydek sodu (600µl)
10	Kuweta z substratem: fosforanem 4-metyloumbeliferylu (0,06mmol/l) + dietanolamina (0,62mol/l lub 6,6%, pH 9,2) + 1g/l azydek sodu (300µl)

** - rozpuścić w 2ml rozcieńczalnika i odczekać 20 min., potem wymieszać

- Wprowadzenie i zasada metody: w procesie rozpadu fibryny powstają wysoce heterogenne (wielko- i drobnocząsteczkowe) oraz rozpuszczalne produkty (fibrin degradation products - FbDP) na drodze 2, niezbędnych etapów:

a) – ostatniej fazy procesu krzepnięcia (przejście fibrynogenu w sieć przestrzenną fibryny pod wpływem trombiny z następczą stabilizacją polimeru fibryny za pośrednictwem cz.XIII układu krzepnięcia)

b) – oddziaływania plazminy na stabilny skrzep fibrynowy (fibrynoliza wiodąca do powstania rozpuszczalnych i uwalnianych do krwiobiegu produktów degradacji (w tym D-dimerów, które są jedynymi wskaźnikami potwierdzającymi obecność stabilizowanej fibryny, a więc pośrednio – dowodem na pełne dokonanie procesu krzepnięcia i w przypadku zwiększonego ich stężenia w połączeniu z oceną kliniczną mogą wskazywać na nadmierną aktywację układu krzepnięcia z wtórna aktywacją fibrynolizy

Test VIDAS[®] D-dimer Exclusion[™] opiera się na enzymoimmunologicznej metodzie kanapkowej, przebiegającej w dwóch etapach z końcowym odczytem fluorescencji (ELFA). Odczynniki wymagane do wykonania oznaczenia są gotowe do użycia – nałożone na zapieczętowane paski testowe.

Wszystkie etapy badania przeprowadzane są automatycznie przez analizator VIDAS PC. Pipetka SPR służy jednocześnie jako faza stała z fabrycznie opłaszczonymi monoklonalnymi, mysimi przeciwciałami anti-FbDP wewnątrz oraz urządzenie pipetujące. Najpierw próbka badana przenoszona jest do studzienki zawierającej koniugat mnonoklonalnych, mysich przeciwciał anti-FbDP wyznakowanych alkaliczną fosfatazą. Mieszanka próbki oraz zawartość studzienki jest cyklicznie wprowadzana i pobierana

do/z pipetki SPR. Antygen łączy się z przeciwciałami opłaszczającymi ścianki SPR tworząc układ kanapkowy.

W drugim etapie ma miejsce wysycenie pozostałych, wolnych miejsc antygenowych przez wspomniany koniugat (pipetka SPR ponownie pobiera go i oddaje cyklicznie; nadmiar substancji czynnej usuwany jest w procesie płukania).

W celu oceny ilościowej do SPR jest wprowadzany, a następnie z niego pobierany substrat (fosforan 4-metyloumbeliferylu). Enzym zawarty w koniugacie katalizuje hydrolizę substratu do produktu fluorescencyjnego (4-metyloumbeliferonu) - pomiar fluorescencji odbywa się przy długości fali λ 450nm. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia antygeny obecny w próbce. Wynik oznaczenia obliczany jest automatycznie przez aparat w odniesieniu do dwóch krzywych kalibracyjnych przechowywanych w pamięci urządzenia, odpowiadających dwóm etapom wykrywania. Sygnał progowy decyduje o wyborze krzywej użytej do oceny danej próbki.

Wykonanie: wyjściowo wyjmowano po jednym pasku testowym STR i jednej pipetce SPR dla każdej badanej próbki, kontroli i standardu, które pozostawiano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu osiągnięcia stanu równowagi. Po odpowiednim wprowadzeniu parametrów do analizatora (kod badania, dane pacjenta z numerami identyfikacyjnymi, standard oznaczony jako S1 i S2, kontrola – jako C1 i C2) oraz wymieszaniu próbek lub standardu/kontroli, odpipetowywano 200 μ l każdego z nich do studzienek nr 1 pasków testowych (STR). Przed rozpoczęciem analizy do aparatu wprowadzano kartę MLE w celu odczytu kodu kreskowego (dla każdego oznaczenia innego) i zachowania go w pamięci urządzenia. Następnie umieszczano paski testowe lub kontrole/standardy i pipetki SPR w aparacie (sekcja VIDAS), sprawdzano zgodność nalepek zawierających kod testu na pipetkach z analogicznymi na paskach badanych i uruchamiano analizator. Wszystkie opisane etapy badania były wykonywane przez aparat, czas trwania oznaczenia - około 35min.

Każdorazowo po otrzymaniu nowej serii odczynników i uprzednim wprowadzeniu danych krzywej kalibracyjnej przeprowadzano rekaliibrację urządzenia za pomocą załączonych standardów (S1 i S2) w celu uzyskania krzywej kalibracyjnej, specyficznej dla danego aparatu. Dla zapewnienia poprawności otrzymywanych wyników, po każdym otwarciu nowego zestawu odczynników przeprowadzano dwie kontrole (C1 i C2) – miała ona miejsce podczas każdej rekaliibracji (wyników nie zatwierdzano, jeśli nie mieściły się w oczekiwanych przedziałach).

Zakres wartości referencyjnych (wynik ujemny): < 500ng/ml; zakres pomiarowy 45-10000ng/ml. W przypadku stężenia D-dimerów > 10000ng/ml rozcieńczano osocze badane 5-krotnie rozcieńczalnikiem.

OBLICZENIA STATYSTYCZNE

Zebrane parametry poddano analizie statystycznej w celu wyznaczenia różnic w badanych grupach, bądź określenia siły zależności pomiędzy badanymi cechami. Badane cechy pochodzące ze skali interwałowej porównywano przy pomocy testu-t-Studenta, a w przypadku gdy dane nie spełniały wymaganych założeń [normalności rozkładów (test Shapiro-Wilka) i jednorodności wariancji (test Levene'a)] - wykorzystano testy nieparametryczne.

Do porównania dwóch grup zastosowano test Manna-Whitney'a . Dla porównywania więcej niż dwóch grup wykorzystano test Kruskala – Wallis'a, a w przypadku uzyskania statystycznie istotnej różnicy badane grupy poddano dalszej analizie testami „post hoc” (test Dunn'a) - w celu wyznaczenia grup jednorodnych.

Badając zależności pomiędzy cechami określonymi w skali nominalnej wykorzystano test niezależności chi-kwadrat. W przypadku małych licznosci obserwowanych lub licznosci zerowej w jednej lub więcej podgrup wykorzystano dokładny test Fishera dla tabel 2x2 lub test Fishera-Freemana-Haltona dla tabel większych niż 2x2.

Porównania różnicy procentowej między badanymi grupami dokonano za pomocą testu dla proporcji.

Wszystkie testy były analizowane na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego Statistica 10.0 firmy StatSoft lub programu StatXact 3.0 firmy Cytel Software Corporation.

WYNIKI BADAŃ

(szczegółowe zestawienie wyników przeprowadzonych testów laboratoryjnych zamieszczono w załączniku - w tabelach)

W oparciu o wywiad i sporządzoną dla potrzeb badawczych dokumentację medyczną laboratoryjne kryterium zespołu antyfosfolipidowego stwierdzono u wszystkich 75 osób z grupy badanej. Następnie - w zależności od stwierdzonego lub nie objawu klinicznego - pacjentów zaklasyfikowano do jednej z trzech grup: I - z bezobjawowym występowaniem przeciwciał antyfosfolipidowych; IIA - z zakrzepicą tętniczą w przebiegu APS; IIB - z zakrzepicą żylną wtórną do APS (co szczegółowo omówiono już opisując materiał kliniczny).

Następnie tak przygotowaną grupę badaną analizowano pod względem różnych, dostępnych z wywiadu i dokumentacji medycznej, parametrów klinicznych i laboratoryjnych, szukając różnic pozwalających wyodrębnić cechy typowe dla każdej z grup, tym samym próbując odpowiedzieć na pytanie: czy jest jakiś czynnik determinujący przebieg objawowy (żylny lub tętniczy) albo bezobjawowy.

Badana populacja była jednorodna pod względem płci i wieku - nie wykazano różnic znamienności statystycznej w zakresie obu tych parametrów w żadnej z wymienionych wyżej grup, choć osoby z bezobjawowymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi należały do grupy z największą średnią wieku (46 lat \pm 19,6SD).

Analiza uznanych czynników ryzyka dla zakrzepicy żyłnej (antykoncepcja hormonalna, czynna choroba nowotworowa, niedobór antytrombiny, białka C, białka S, APC-r, obciążający wywiad rodzinny w kierunku ŻCHZZ wśród krewnych ¹⁰, ciąża) oraz tętniczej (nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów, dyslipidemia, otyłość, cukrzyca) nie wskazała na żadną z badanych grup, jako obarczoną istotnie większą ilością tych czynników.

Wymienione wyżej czynniki ryzyka oraz choroby współistniejące poddano ocenie wśród chorych z grupy I oraz grupy II powstałej z połączenia podgrup IIA i IIB. Wykazano istotnie częstsze występowanie chorób autoimmunologicznych wśród osób z aAPA ($p = 0,0283$) - tabela 2.

Podobnie, oceniając występowanie chorób autoimmunologicznych w ujęciu: chorzy z epizodami żylnymi vs pacjenci z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, istotnie częściej stwierdzono obecność tychże chorób u pacjentów z grupy I ($p = 0.0168$) - tabela 2. Chorzy z epizodami tętniczymi i osoby z aAPA nie różnili się istotnie w zakresie częstości występowania chorób autoimmunologicznych.

Choroba współistniejąca	Grupa I (25) n (%)	Grupa II= IIA+IIB (50) n (%)	p
Choroba autoimmunologiczna	9 (36)	7 (14)	0,0283
Choroba współistniejąca	Grupa I (25) n (%)	Grupa IIB (25) n (%)	p
Choroba autoimmunologiczna	9 (36)	2 (8)	0.01680

Tabela 2. Częstość występowania chorób autoimmunologicznych w wybranych grupach badanych

Rozpoczynając udział w badaniu, część pacjentów cechował nawrotowy przebieg epizodów zakrzepowo-zatorowych już w samym wywiadzie. Nie stwierdzono jednak, by w ocenie retrospektywnej nawrotowy charakter choroby występował istotnie częściej w którejś z podgrup objawowych - tj IIA vs IIB (tab. 3).

Podgrupa badana	Chorzy z nawrotowym przebiegiem zakrzepowo-zatorowym w wywiadzie (%)	p
IIA (zakrzepica tętnicza)	14 (58,3)	ns
IIB (zakrzepica żylna)	11 (44,0)	

Tabela 3. Dodatni wywiad w kierunku nawrotów epizodów zakrzepowo-zatorowych u chorych z objawowymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi na początku obserwacji

Testem laboratoryjnym, który najczęściej potwierdzał obecność przeciwciał antyfosfolipidowych był antykoagulant tocznia, jednak znamienność statystyczną częstość ta osiągnęła w grupie chorych z bezobjawowymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi (Tab. 4).

Test laboratoryjny	Grupa I n (%)	Grupa IIA n (%)	Grupa IIB n (%)	p
LA	25(100)	17 (68)	23 (92)	0,0027
ACA-IgG	9(36)	8 (32)	7 (28)	ns
ACA-IgM	5(20)	4(16)	5(20)	ns
ACA-IgG i/lub ACA-IgM	9 (36)	9 (36)	9 (36)	ns
Anty- β_2 -GPI	9 (36)	12 (48)	10 (40)	ns

Tabela 4. Częstość występowania przeciwciał antyfosfolipidowych w poszczególnych grupach badanych

Ograniczając analizę do grupy II, czyli objawowej i porównując badane parametry w podgrupie z zakrzepicą tętniczą (IIA), vs w podgrupie z zakrzepicą żylną (IIB), zjawisko LA występowało istotnie częściej u chorych z żylnymi epizodami zakrzepowymi w wywiadzie ($p = 0,0033$).

Podobnie, oceniając występowanie LA w ujęciu: chorzy z epizodami tętnicznymi vs pacjenci z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, istotnie częściej stwierdzono obecność antykoagulantu tocznia u chorych z grupy I ($p = 0.0040$) - tab. 5. Chorzy z epizodami żylnymi i osoby z aAPA nie różnili się istotnie w zakresie częstości dodatknych testów w kierunku LA.

Test laboratoryjny	Grupa IIA n (%)	Grupa IIB n (%)	p
LA	17 (68)	23 (92)	0,0033
Test laboratoryjny	Grupa IIA n (%)	Grupa I	p
LA	17 (68)	25 (100)	0,0040

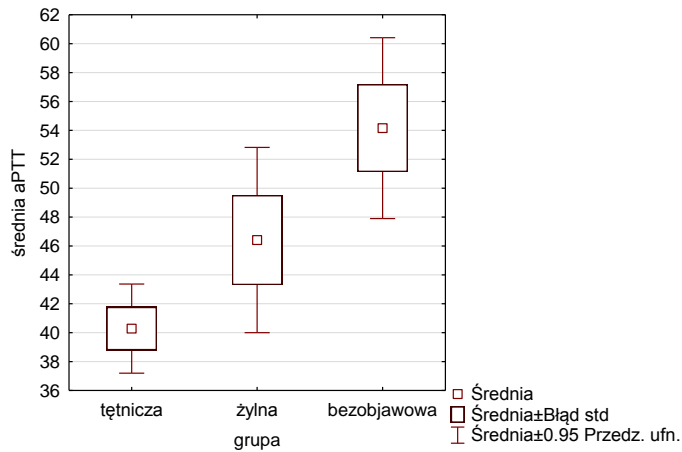
Tabela 5. Częstość występowania LA w wybranych grupach badanych

Nie wykazano znamienności statystycznej dla częstości potwierdzenia APA za pomocą innych testów laboratoryjnych wykorzystanych w badaniu do diagnostyki APS, w różnych ujęciach analitycznych (tj grupa IIA vs IIB; grupa IIA vs I, grupa IIB vs I).

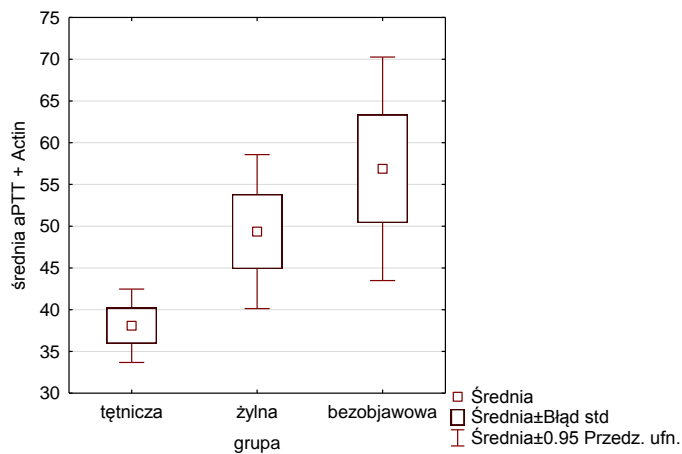
Jak przedstawiono w tabeli 6., wykazano istotne różnice średnich wartości aPTT, aPTT z Actinem oraz wskaźnika LA1/LA2 we wszystkich trzech grupach badanych. Różnic tych nie stwierdzono w odniesieniu do średnich wartości miana ACA-IgG/-IgM i anty- β_2 -GPI

Test laboratoryjny	Grupa I	Grupa IIA	Grupa IIB	p
aPTT (s).	54,15±15,1 ^b	40,28±7,4 ^a	46,41±15,5 ^a	I vs (IIA +IIB): 0,0003
aPTT z Actinem (s)	56,87±32,4 ^b	38,07±10,63 ^a	49,35±22,3 ^{ab}	I vs IIA: 0,0022
LA1/LA2	1,88±0,5 ^b	1,51±0,3 ^a	1,89±0,8 ^{ab}	I vs IIA: 0,0360
ACA-IgG (GPL)	32,11±55,9	18,61±25,6	22,09±29,26	ns
ACA-IgM (MPL)	13,76±20,8	10,06±11,5	13,72±31,9	ns
anty- β_2 -GPI (GU)	32,02±44,7	33,88±46,0	39,04±51,4	ns

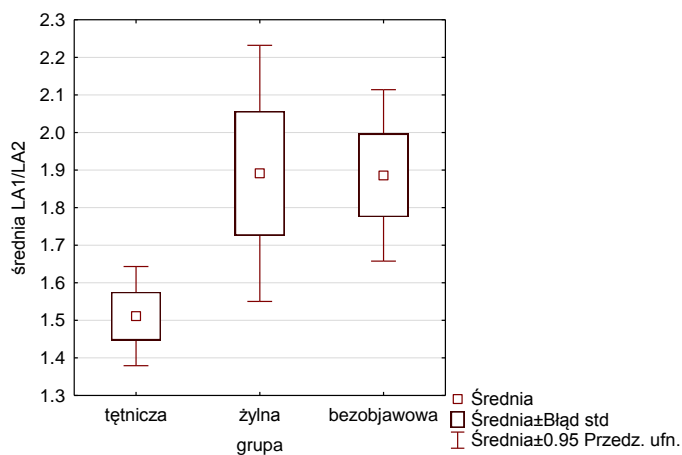
Tabela 6. Średnie wartości aPTT, aPTT z Actinem, wskaźnika LA1/LA2 oraz mian ACA-IgG, ACA-IgM i anty- β_2 -GPI -IgG; grupy oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie



Rys. 1. Średnia aPTT ± SD w poszczególnych grupach badanych



Rys. 2. Średnia aPTT z Actinem ±SD w poszczególnych grupach badanych



Rysunek 3. Średnia LA1/LA2 ± SD w poszczególnych grupach badanych

Dokonano podziału obserwowanych chorych na klasy - wg zalecanych przez Miyakisa i wsp. (12) kryteriów laboratoryjnych w poszczególnych grupach laboratoryjnych - przedstawiono go w tabeli 7.

Klasa przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych	Grupa I n (%)	Grupa IIA n (%)	Grupa IIB n (%)	p
I	10 (40)	9 (36)	10 (40)	ns
IIa	15 (60)	12 (48)	14 (56)	
IIb	0	1 (4)	1 (4)	
IIc	0	3 (12)	0	

Tabela 7. Częstość występowania poszczególnych klas przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych w poszczególnych grupach badanych; klasa I: obecne więcej niż 1 kryterium laboratoryjne w dowolnej kombinacji, klasa IIa: obecny tylko LA, klasa IIb: obecne tylko ACA, klasa IIc: obecne tylko anty- β_2 -GPI; Miyakis i wsp. (12)

Żadna z klas przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych nie występowała istotnie częściej w poszczególnych grupach badanych. Można jedynie zauważyć, iż klasa IIc występowała wyłącznie u chorych z przebytymi, tętnicznymi epizodami zakrzepowymi oraz że klasy IIb nie stwierdzono u chorych bezobjawowych pod względem epizodów zakrzepowozatorowych.

Podobnie, znamienności statystycznej nie uzyskano, rozszerzając analizę częstości klas przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych do grupy objawowej (IIA + IIB) w porównaniu do pacjentów z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych. Wykazano jedynie brak klasy IIb i IIc w grupie chorych bezobjawowych - tabela 8.

Klasa przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych	Grupa I (25) n (%)	Grupa II = IIA+IIB (50) n (%)	p
I	10 (40)	19 (38)	ns
IIa	15 (60)	26 (52)	
IIb	0	2 (4)	
IIc	0	3 (6)	

Tabela 8. Częstość występowania poszczególnych klas przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych w poszczególnych grupach badanych ; klasa I: obecne więcej niż 1 kryterium laboratoryjne w dowolnej kombinacji, klasa IIa: obecny tylko LA, klasa IIb: obecne tylko ACA, grupa IIc: obecne tylko anty- β_2 -GPI; Miyakis i wsp. (12)

W okresie trwania obserwacji prospektywnie oceniono częstość powikłań zakrzepowozatorowych w poszczególnych grupach. Nie zaobserwowano istotnie częstszego ich występowania w którejkolwiek z nich. Do powstania zakrzepicy po rozpoczęciu udziału w badaniu doszło w każdej z grup: I, IIA i IIB - odpowiednio u 2, 7 i

4 pacjentów, po średnim okresie od rozpoczęcia obserwacji odpowiednio $22 \pm 5,66$ SD, $40,8 \pm 10,27$ SD i $40,75 \pm 17,33$ miesięcy - tabela 9. Jeśli dokonać analizy czasu obserwacji, po którym rozwinęły się powikłania zakrzepowe, porównując grupę wcześniej bezobjawową z objawową (czyli z II = IIA+IIB) to można wykazać znamiennej różnicę czasu trwania tego okresu (odpowiednio $22 \pm 5,66$ SD m-cy vs $40,8 \pm 12,38$ SD m-cy; $p = 0,0363$) - tabela 9. Wśród chorych objawowych nawrót przeważnie występował w łożysku naczyniowym pierwotnej lokalizacji z wyjątkiem 4 (2%) osób: 2 z nich doznały udaru mózgu po wyjściowym epizodzie żylnym, kolejne 2 - przebyły zakrzepicę w obrębie tego samego łożyska naczyniowego, ale o odmiennej lokalizacji (w 1 przypadku - naprzemienne nawroty DVD w różnych kończynach dolnych, w 2-im - zatorowość płucna po wcześniejszym epizodzie DVD). U pacjentów z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (aAPA) - w 1 przypadku zakrzepica wystąpiła w łożysku tętniczym (ogniska niedokrwienne mózgu), w 2-im - w naczyniach żylnych (DVT kończyny dolnej).

Zakrzepica po rozpoczęciu obserwacji	Grupa I (25) n (%)	Grupa IIA (25) n (%)	Grupa IIB (25) n (%)	p
TAK	2 (8)	7 (28)	4 (16)	ns
Zakrzepica po rozpoczęciu obserwacji	Czas obserwacji w grupie I (m-ce \pm SD)	Czas obserwacji w grupie II (IIA+IIB) (m-ce \pm SD)		p
TAK	$22 \pm 5,66$	$40,8 \pm 12,38$		0,0363

Tabela 9. Częstość wystąpienia zakrzepicy podczas obserwacji w poszczególnych grupach - najczęściej zjawisko obserwowano u chorych z tętniczymi powikłaniami zakrzepowymi, jednak bez uzyskania różnic znamiennej statystycznej oraz istotnych zależności w odniesieniu do ryzyka nawrotu w poszczególnych grupach (dane nie zaprezentowane) oraz czasu obserwacji, po którym doszło do powikłań zakrzepowych

Następnie sprawdzono czy istnieje korelacja pomiędzy wystąpieniem zakrzepicy po rozpoczęciu obserwacji a klasą przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych, nie uzyskując istotnych statystycznie informacji co do częstości którejś z klas w poszczególnych grupach badanych w przypadku nawrotu zakrzepicy lub jej pierwszego wystąpienia u chorych wcześniej bezobjawowych - tabela 10. Potraktowanie - dla celów analitycznych - grupy IIA i IIB łącznie jako jednej, objawowej ani ocena zjawiska w układach parzystych - tj. grupa IIA vs IIB, IIA vs I i IIB vs I również nie pozwoliło uzyskać różnic znamiennej statystycznej w ocenie tych samych parametrów (tabela 10). Zaobserwowano natomiast, że wśród pacjentów wcześniej bezobjawowych, powikłania zakrzepowe wystąpiły tylko u osób należących do klasy I (9,1 % spośród 25 badanych w

tej podgrupie) oraz że u osób tych stwierdzono dodatkową trombofilię (niedobór białka S u jednej z nich i oporność na aktywowane białko C - u drugiej). Niestety, tendencja ta nie osiągnęła znamienności statystycznej.

Klasa przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych	Grupa I - - zakrzepica (2) n (%)	Grupa IIA - - zakrzepica (7) n (%)	Grupa IIB - - zakrzepica (4) n (%)	p
I	2(100)	2(28,6)	2(50)	ns
Ila	0	3(42,8)	2(50)	
Ilb	0	0	0	
Ilc	0	2 (28,6)	0	

Tabela 10. Częstość wystąpienia zakrzepicy podczas obserwacji w poszczególnych grupach badanych - z uwzględnieniem podziału chorych na klasy wg kryteriów laboratoryjnych - w przypadku nawrotu zakrzepicy lub jej pierwszego wystąpienia u chorych wcześniej bezobjawowych.

W dalszym etapie analizy zbadano czy współistnienie trombofilii, jak: niedobór antytrombiny, niedobór białka C i S, oporność na aktywowane białko C, zwiększa ryzyko nawrotu zakrzepicy po rozpoczęciu obserwacji. Wykazano, że jedynie niedobór białka S zwiększa ryzyko nawrotu powikłań zakrzepowych [ponad 13 - krotnie (OR 13,31; CI 1,093 - 162,631)]

Natomiast po połączeniu kilku rodzajów defektów układu krzepnięcia [niedobór naturalnych inhibitorów (antytrombiny, białka C i S) oraz oporności na aktywowane białko C] w jedną grupę pod nazwą trombofilia, wykazano, że epizody zakrzepicy ocenione prospektywnie występują istotnie częściej wśród chorych z tak zdefiniowanym zaburzeniem i obecnością APA (p = 0,0151) - tabela 11 oraz że ryzyko nawrotu zakrzepicy związane z jego obecnością zwiększa się prawie 5-krotnie u tych chorych (OR 4,911; CI 1,252 - 19,263; p=0.0225) [tabela 11].

Trombofilia (↓ b. C i/lub S i/lub ↓ AT i/lub aPCR)	Zakrzepica w obserwacji (13) n (%)	Bez zakrzepicy w obserwacji (62) n (%)	p
TAK	5(38,4)	7 (11,2)	0,0151

Tabela 11. Częstość występowania epizodów zakrzepicy w ocenie prospektywnej u chorych z trombofilią (↓ b. C i/lub S i/lub ↓ AT i/lub aPCR)

Kolejnym krokiem badawczym była próba zbadania korelacji pomiędzy klasą przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych a chorobami współistniejącymi oraz

czynnikami ryzyka stwierdzonymi na podstawie wywiadu oraz dokumentacji medycznej. Analizowano wiele parametrów, takich jak: nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, wady zastawkowe, cukrzyca, choroby nowotworowe, choroby autoimmunologiczne, niedobór antytrombiny, niedobór białka C i S, oporność na aktywowane białko C, otyłość, dyslipidemię, palenie papierosów, hiperfibrinogenemię > 3,92 g/l, zwiększone stężenia dimeru-D >500ng/ml, dodatni wywiad rodzinny wśród krewnych 1^o w kierunku żylnych i tętniczych powikłań zakrzepowo-zatorowych. Nie znaleziono takiej korelacji.

W trakcie gromadzenia materiału badawczego zaobserwowano, że nie zawsze rodzaj przeciwciał antyfosfolipidowych stwierdzonych po raz drugi - po co najmniej 3 miesiącach od ich pierwszego wykrycia - jest taki sam jak oznaczony wyjściowo. Dlatego elementem kończącym bieżącą analizę była próba odpowiedzi na pytanie, jak często opisane zjawisko występowało podczas diagnostyki badanej grupy pacjentów i czy częstość ta była istotna dla uzyskiwanych oznaczeń.

W całej grupie badanej (75 osób) inny typ APA przy drugim oznaczeniu stwierdzono u ponad 25% chorych (26 osób - 34,6%). Analizując zjawisko w różnych innych układach (grupa objawowa vs bezobjawowa; tętnicza vs żylna i następnie każda z nich vs bezobjawowa) zawsze stwierdzano jego obecność na poziomie nie mniejszym niż 20%, przy czym istotnie pod względem jego występowania różniły się grupy IIA i IIB oraz IIA i I - tabela 12.

Inny rodzaj APA w 2 oznaczeniu	Grupa I (25) n (%)	Grupa IIA (25) n (%)	Grupa IIB (25) n (%)	p
TAK	7 (28)	14 (56)	5(20)	IIA vs IIB: 0,0087 IIA vs I: 0,0448 IIB vs I: ns

Tabela 12. Częstość występowania zjawiska heterogenności rodzaju przeciwciał w kolejnych oznaczeniach podczas diagnostyki APS.

Podczas całego okresu obserwacyjnego u żadnego z badanych nie wystąpiła katastrofalna postać zespołu antyfosfolipidowego. Jej obecność stwierdzono wyłącznie retrospektywnie u jednego mężczyzny w wieku 23 lat.

OMÓWIENIE

Zespół antyfosfolipidowy, wbrew pozorom, jest chorobą bardzo zróżnicowaną. Do jej rozpoznania potrzebne jest wprowadzić tylko jedno kryterium laboratoryjne (antykoagulant toczenia i/lub obecność przeciwciał antyfosfolipidowych: ACA, anti- β_2 -GPI) i jedno - kliniczne (powikłania zakrzepowo-zatorowe i/lub niepowodzenia położnicze), to jednak do dziś stanowi ona wyzwanie dla lekarzy wielu specjalności. Podstawowy objaw choroby - zakrzepica naczyniowa na tle autoimmunologicznym, może powstać w naczyniach każdej wielkości, a w postaci katastrofalnej zamknąć światło naczyń w obrębie kilku narządów (co najmniej trzech) jednocześnie (61). Stąd zespół antyfosfolipidowy może manifestować się całą gamą objawów, będących przedmiotem badań chirurgów naczyniowych, angiologów, neurologów, kardiologów, dermatologów, reumatologów, ginekologów czy wreszcie hematologów. Dlatego zapewne jeden z polskich ekspertów w tej dziedzinie, nazwał tę problematyczną chorobę soczewką medycyny, wskazując na wagę wnikliwego i holistycznego spojrzenia diagnosty na pacjenta z APS (62).

Trudności diagnostyczne pogłębia fakt, że zespół antyfosfolipidowy oraz bezobjawowa obecność przeciwciał antyfosfolipidowych u osób dorosłych mogą wystąpić praktycznie w każdym wieku i niezależnie od płci, co potwierdziła również nasza analiza. Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie płci i wieku pomiędzy ocenianymi grupami (I, IIA i IIB), choć średnia wieku pacjentów spełniających wyłącznie laboratoryjne kryterium APS (tzw. "bezobjawowych") była największa - odpowiednio 46 lat vs 41lat w grupie IIA i 42lat w grupie IIB. Najmłodszy pacjent w grupie bezobjawowej miał 20 lat, najstarszy - 75, wśród chorych objawowych - odpowiednio - 19 i 85, a średnia wieku wśród wszystkich badanych oscylowała pomiędzy 41 - 46 lat - jak w większości prac badawczych opublikowanych na ten temat. Wśród nich trudno jednak znaleźć dane epidemiologiczne dotyczące APS, a tym bardziej aAPA. Bardziej precyzyjne informacje, pochodzące z międzynarodowego rejestru pacjentów założonego w 2000r., dotyczą katastrofalnego zespołu antyfosfolipidowego - postaci bardzo rzadkiej (dotyczącej 1% chorych z APS), o której wiadomo, że występuje od 7 do ponad 70 roku życia, częściej u kobiet. Wśród chorych włączonych do naszego badania przebyty CAPS stwierdzono tylko u jednego mężczyzny w wieku 23 lat (40, 61, 63), a prospektywnie nie obserwowano już tej postaci APS u żadnego z badanych.

W 2007r. Pengo V. i wsp., porównując chorych na APS (z obecnością trzech rodzajów przeciwciał antyfosfolipidowych o podobnym potencjale i mianie: LA, ACA i anty- β_2 -GPI - klasa I) z tętniczymi (28 osób) i żylnymi (29 osób) epizodami zakrzepowozatorowymi, wykazali znamienne większą ilość czynników ryzyka zakrzepicy tętniczej niż żylny w grupie z przebytymi epizodami tętniczymi. Ilość czynników ryzyka zakrzepicy żylny w tej grupie była niska, w czym ostatecznie upatrywano przyczynę braku żylnych epizodów zakrzepowozatorowych u chorych z powikłaniami tętniczymi w wywiadzie [64]. (Wbrew wstępnemu założeniu, autorom nie udało się znaleźć związku pomiędzy występowaniem powikłań tętniczych jako elementu miażdżycy naczyń a podwyższonym mianem przeciwciał p/w kompleksom oxLDL/ β_2 -GPI (oxLDL - oxidized low density lipoprotein - utlenowane lipoproteiny o niskiej gęstości) [64].

W przeciwieństwie do Pengo V. i współpracownicy, w naszej analizie nie wykazano, by któraś z obserwowanych grup badanych istotnie różniła się pod względem żylnych i tętniczych czynników ryzyka epizodów zakrzepowozatorowych. Są to jednak parametry uwarunkowane osobniczo i trudne do porównania w sposób bezpośredni, zwłaszcza, jeśli dotyczą odrębnych populacji badanych. Oznacza to, iż analizowana populacja była jednorodna w zakresie wspomnianych parametrów albo zbyt mało liczna, by wychwycić wspomniane różnice lub też - jedno i drugie. Trzeba też podkreślić, iż naszej obserwacji poddano chorych należących do różnych klas wg kryteriów laboratoryjnych, natomiast w analizie Pengo V. i współpracownicy warunkiem włączenia do badań była przynależność wyłącznie do klasy I (z dodatnimi wynikami 3 testów w kierunku APA: LA, ACA i anty- β_2 -GPI) [64].

Nie wykazano również, aby któraś z ocenianych przez nas grup była obciążona istotnie większą ilością czy konkretnym rodzajem chorób współistniejących (z wyjątkiem chorób autoimmunologicznych). Tym samym nie uzyskano podstaw dla wskazania swego rodzaju wyznacznika klinicznego, pozwalającego wyodrębnić pacjentów z przeciwciałami antyfosfolipidowymi, którym przypisany jest ściśle określony przebieg kliniczny (jak żylny czy tętniczy powikłania zakrzepowozatorowe lub ich brak). Do innych wniosków doszedł Danowski i współpracownicy w 2009r. (65), badając 122 chorych podzielonych na 3 grupy: z pierwotnym APS, z zespołem antyfosfolipidowym współistniejącym z SLE oraz z toczniem rumieniowatym układowym i APA, ale bez przebytej zakrzepicy i niepowodzeń ciąży. Wykazali oni, że powikłania zakrzepowozatorowe występują częściej u chorych z APS współistniejącym z SLE, niż z pierwotną

postacią tego schorzenia oraz że czynniki ryzyka zakrzepicy różnią się u chorych z epizodami żylnymi i tętniczymi w wywiadzie. Te pierwsze wiązały się z hipertrójglicydemią, wrodzoną trombofilią, mianem IgG > 40 GPL i obecnością LA, te drugie - z nadciśnieniem tętniczym oraz hyperhomocytinemią. W analizie tej uwzględniono jednak inne kryterium podziału na grupy badane - postać APS, a nie - lokalizację zakrzepicy w łożysku naczyniowym (tętnicza vs żylna).

Wśród badanych przez nas chorych jedynie osoby z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych wykazywały znamienne częstsze występowanie chorób autoimmunologicznych, w porównaniu do chorych z powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi w przebiegu APS. Obserwowano nie tylko zaburzenia z grupy kolagenoz, jak: reumatoidalne zapalenie stawów, zespół Sjögrena, mieszaną chorobą tkanki łącznej, ale też spoza kręgu schorzeń reumatoidalnych: niedokrwistość Addisona-Biermera, chorobę Hashimoto, pierwotną małopłytkowość immunologiczną, niedokrwistość autoimmunohemolityczną. Wskazuje to na większą predyspozycję pacjentów z grupy I do pierwotnego generowania autoprzeciwciał, o szerokim zakresie patofizjologicznym, zaś immunoglobuliny komplementarne do kompleksów fosfolipidowo-białkowych mogą być tylko jednym z objawów takiej predyspozycji i wcale nie muszą wiązać się z występowaniem powikłań zakrzepowo-zatorowych, zwłaszcza, jeśli nie są one zależne od β_2 -GPI, a ściślej - od fragmentu gly-40-arg-43 domeny I tej glikoproteiny lub też jeśli cechuje je niska awidność (13, 17, 33, 62, 66, 67 68).

Wszystkie badane grupy nie różniły się istotnie pod względem częstości nawrotu epizodów zakrzepowo-zatorowych ocenionych retrospektywnie w momencie wejścia do badania (co dotyczy tylko pacjentów objawowych), jak i powikłań zakrzepowych w analizie prospektywnej (co dotyczy już wszystkich obserwowanych osób). Biorąc pod uwagę częstość nawrotów powikłań zakrzepowo-zatorowych ocenioną retrospektywnie, trzeba przyznać, że w obu grupach (IIA i IIB) - poddanych profilaktyce wtórnej z wykorzystaniem antagonistów witaminy K lub LMWH w okresie okołoperacyjnym/okołozabiegowym albo weryfikacji diagnostycznej wg aktualnych wówczas wytycznych ACCP - nawroty te zdarzały się podobnie często (58 vs 44%), więc nie mogły być one przedmiotem istotnej różnicy. Trudno ustalić czy w okresie przed włączeniem do badania chorzy ci ściśle przestrzegali zaleceń związanych z wtórną profilaktyką w celu jak najlepszej efektywności tego leczenia. Najprawdopodobniej, powikłania zakrzepowe występują równie często w obu grupach, niezależnie od

przepisanej im wyjściowo lokalizacji, innymi słowy - wyjściowa lokalizacja nie powinna być oceniana jako czynnik przepowiadający rodzaj i częstość nawrotów. Argumentem popierającym tę tezę niech będzie fakt, że już w chwili rozpoczęcia obserwacji wyodrębniono grupę 8 (4%) chorych z tętniczo-żylnymi epizodami zakrzepowymi w wywiadzie. Zaklasyfikowano ich do grupy IIA, ponieważ ostatni epizod, będący podstawą do potwierdzenia obecności APA w sekwencjach czasowych narzuconych przez kryteria diagnostyczne (12), był zlokalizowany w łożysku tętniczym (załącznik nr 4,5 i 6). Dodatkowo przeanalizowano kwestię powstania zakrzepicy po rozpoczęciu udziału w badaniu. U wszystkich chorych z przebytymi powikłaniami zakrzepowymi kontynuowano wtórną profilaktykę przeciwzakrzepową wg zasad już opisanych. Prospektywnie zakrzepicę stwierdzono w każdej z grup: I, IIA i IIB - odpowiednio u 2, 7 i 4 pacjentów, po średnim okresie obserwacji odpowiednio 22, 40,8 i 40,75 miesięcy. Wśród chorych objawowych powikłania zakrzepowe występowały z reguły podczas nieefektywnego leczenia przeciwkrzepliwego (kiedy INR osiągał wartość $< 2,0$) lub samowolnego jego zaprzestawiania albo w momencie przejścia na terapię profilaktyczną heparynami drobnocząsteczkowymi czy ponownego powrotu do leków doustnych. W większości chorych tzw. "objawowych" do nawrotu dochodziło w łożysku naczyniowym pierwotnej lokalizacji, jednak ta prawidłowość nie potwierdziła się u 4 (2%) z nich: u 2 pacjentów wystąpił udar mózgu po wyjściowym epizodzie żylnym (wykluczono u nich ASD i i PFO) u kolejnych 2 - w obrębie tego samego łożyska naczyniowego, ale o odmiennej lokalizacji (w 1 przypadku - naprzemienne nawroty DVD w różnych kończynach dolnych, w 2-im - zatorowość płucna po wcześniejszym epizodzie DVD). Do podobnych wniosków na temat lokalizacji epizodów nawrotowych nie zawsze tożsamej z umiejscowieniem wyjściowych powikłań zakrzepowo-zatorowymi doszli Pengo V. i współbadacze, oceniając prospektywnie grupę chorych na APS z obecnością wszystkich trzech rodzajów APA (LA, ACA i anty- β_2 -GPI) [69].

U osób z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (aAPA) w 1 przypadku epizod zakrzepowy miał miejsce w łożysku tętniczym (ogniska niedokrwienne mózgu), w 2-im - w naczyniach żylnych (DVT kończyny dolnej). Podkreślić należy, że obaj ci pacjenci wykazywali obecność wszystkich trzech rodzajów przeciwciał antyfosfolipidowych (LA, ACA i anty- β_2 -GPI) - należeli do klasy I wg kryteriów laboratoryjnych oraz że u osób tych stwierdzono dodatkową trombofilię (niedobór białka

S u jednej z nich i oporność na aktywowane białko C - u drugiej). Niestety, tendencja ta nie osiągnęła znamienności statystycznej.

Natomiast czas do wystąpienia powikłań zakrzepowo-zatorowych po rozpoczęciu obserwacji był zdecydowanie krótszy u chorych wcześniej bezobjawowych (22 m-ce $\pm 5,66SD$ vs 40,8 m-cy $\pm 12,38SD$; $p = 0,0363$), nie stosujących przewlekłe żadnego, przeciwkrzepliwego leczenia zapobiegawczego (tylko 4 z 25 pacjentów okresowo stosowało aspirynę w dawce 75mg dziennie, a u innych 4 przejściowo stosowano heparynę drobnocząsteczkową w okresie okołooperacyjnym). Jak już wspomniano, wszyscy ci chorzy należeli do klasy I wg kryteriów laboratoryjnych. Niesie to za sobą pewne implikacje kliniczne, jak rozważenie przewlekłej, pierwotnej profilaktyki u tzw. "bezobjawowych" pacjentów wykazujących obecność trzech rodzajów przeciwciał antyfosfolipidowych (LA, ACA i anty- β_2 -GPI) albo przejściowej - u chorych z klasy IIa, IIb i IIc - w sytuacji zwiększonego ryzyka zakrzepowo-zatorowego. Pierwotna profilaktyka przeciwkrzepliwa u chorych z aAPA do dziś jest kwestią sporną. W piśmiennictwie istnieje niewiele doniesień na temat bezobjawowych przeciwciał antyfosfolipidowych, najprawdopodobniej z powodu rzadkiego występowania tego zjawiska u osób zdrowych, o czym już wspomniano we wstępie. W 2009 r. Metijan A. i Lim L. dokonali przeglądu piśmiennictwa, znajdując tylko 7 prób badawczych dotyczących pierwotnej profilaktyki u pacjentów z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (70). Wśród nich tylko 1 miało charakter prospektywny - APLASA, które przybliżono już we wstępie. Wynika z niego, że po roku obserwacji tylko u 3 osób (na 98 wszystkich włączonych do badania) doszło do rozwoju powikłań zakrzepowo-zatorowych i to w grupie zażywającej aspirynę w dawce 81mg/d. Paradoksalnie, pacjenci z grupy placebo nie mieli żadnych epizodów zakrzepowych w tym okresie (58). Jednak przeważająca ilość chorych rozwijających powikłania zakrzepowe w czasie obserwacji miała dodatkowe czynniki ryzyka prozakrzepowego czy sercowo-naczyniowego. Podkreślić też należy, że większość ze wspomnianych 7 prób badawczych obejmowała pacjentów chorych na SLE - jednostkę chorobową wiążącą się niezależnie z wystąpieniem zakrzepicy - żyłnej czy tętniczej (21, 65, 71, 72).

Nadal kwestią otwartą pozostaje wybór środków przeciwkrzepliwych do stosowania profilaktycznego u chorych z aAPA. Wykazano, że u chorych z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych profilaktyczne leczenie przeciwkrzepliwe z wykorzystaniem aspiryny albo heparyn drobnocząsteczkowych w okresie zwiększonego

ryzyka zakrzepowo-zatorowego (jak unieruchomienie, zabieg operacyjny) ma sens - wiąże się ze zmniejszeniem tego ryzyka (73). Z kolei u pacjentów chorych na SLE z dodatnimi testami w kierunku APA uzasadnione wydaje się zastosowanie aspiryny oraz hydroksychlorochiny w pierwotnej profilaktyce, co wiąże się ze zmniejszeniem częstości epizodów zakrzepowych (40, 71, 54).

Ostatecznie jednak do dziś nie poznano efektów wyprzedzającego, przeciwkrzepliwego leczenia zapobiegawczego u pacjentów z aAPA i przedstawione koncepcje terapeutyczne nie mają rangi zaleceń opartych na dowodach medycznych (74). W chwili obecnej rekomendowana jest indywidualizacja w ocenie ryzyka prozakrzepowego u takich pacjentów i stosowanie profilaktyki przeciwkrzepliwej w okresach jego przejściowego zwiększenia, a także postępowanie ukierunkowane na eliminację sercowo-naczyniowych czynników ryzyka, jak np. palenia tytoniu czy dyslipidemii (70). Może właśnie uwzględnienie profilu stwierdzonych aAPA (np. klasy I wg kryteriów laboratoryjnych), jest jednym z kluczowych elementów w indywidualizacji postępowania medycznego u takich chorych?

Badaną populację oceniano również pod kątem potencjalnego wpływu trombofilii, potwierdzonej w momencie rozpoczęcia obserwacji, na przebieg kliniczny. W analizie prospektywnej, u chorych z APA obecnymi co najmniej 3 miesiące wykazano ponad 13-krotne zwiększenie ryzyka nawrotu epizodów zakrzepowo-zatorowych wynikające ze współistnienia niedoboru białka S (OR 13,31; CI 1,093 - 162,631), które w porównaniu do ogólnej populacji Europy z izolowanym, heterozygotycznym niedoborem białka S jest dodatkowo 3-krotnie większe, jeśli pod uwagę wziąć zakrzepicę żylną (75, 76). Jednak biorąc pod uwagę fakt, że niedobór taki stwierdzono tylko u 2 spośród wszystkich badanych oraz bardzo szeroki przedział ufności, należy liczyć się z dużym błędem tego oszacowania i koniecznością jego weryfikacji w grupie bardziej licznej.

Podczas zbierania wywiadu i gromadzenia danych z dokumentacji medycznej badanych zaobserwowano, że istnieją chorzy ze skojarzonym niedoborem naturalnych antykoagulantów, co jako defekt wrodzony należy do rzadkości. Wykazano, że współistnienie przeciwciał antyfosfolipidowych i trombofilii, zdefiniowanej jako: skojarzony niedobór naturalnych antykoagulantów (antytrombiny i/lub białka C i/lub S) i/lub oporność na aktywowane białko C, prawie 5-krotnie zwiększa ryzyko nawrotu zakrzepicy (OR 4,911; CI 1,252 - 19,263) w okresie obserwacji - śr. 47 miesięcy. Nie wykazano, aby którekolwiek z tych zaburzeń analizowanych osobno w ocenie prospektywnej, istotnie zwiększało ryzyko nawrotu zakrzepicy w tej populacji chorych,

co sugerowałyby raczej nieznaczny wpływ wrodzonej trombofilii na przebieg kliniczny zespołu antyfosfolipidowego.

Do odmiennych wniosków doszli Danowski i współbadacze. Stwierdzili oni ponad 7-krotny wzrost ryzyka wystąpienia zakrzepicy żyłnej u chorych na APS z wrodzoną trombofilią, ale nie sprecyzowali dokładnie jej rodzaju (65). Trzeba więc przyznać, że w przypadku przeciwciał antyfosfolipidowych obecnych ponad 3 miesiące, przebieg kliniczny jest bardzo indywidualny, uzależniony być może od wrodzonych i nabytych czynników ryzyka, stylu życia, zwyczajów żywieniowych, które łącznie (wspólnie z klasą stwierdzanych APA) warunkują profil ryzyka danej jednostki. Z tego powodu najpewniej APA, wiążąc się z kompleksami fosfolipidowo-białkowymi układu krzepnięcia (niejednokrotnie zmienionymi patologicznie przez zaburzenia genetyczne lub nabyte), biorą udział w różnych procesach hemostatycznych, angażujących substancje osoczone, śródbłonek, komórki krwi i mikrocząstki, dając w efekcie ściśle określony obraz kliniczny, nałożony niejako na biologiczny stan wyjściowy ustroju, którego namiastką tylko jest próbówka laboratoryjna (77).

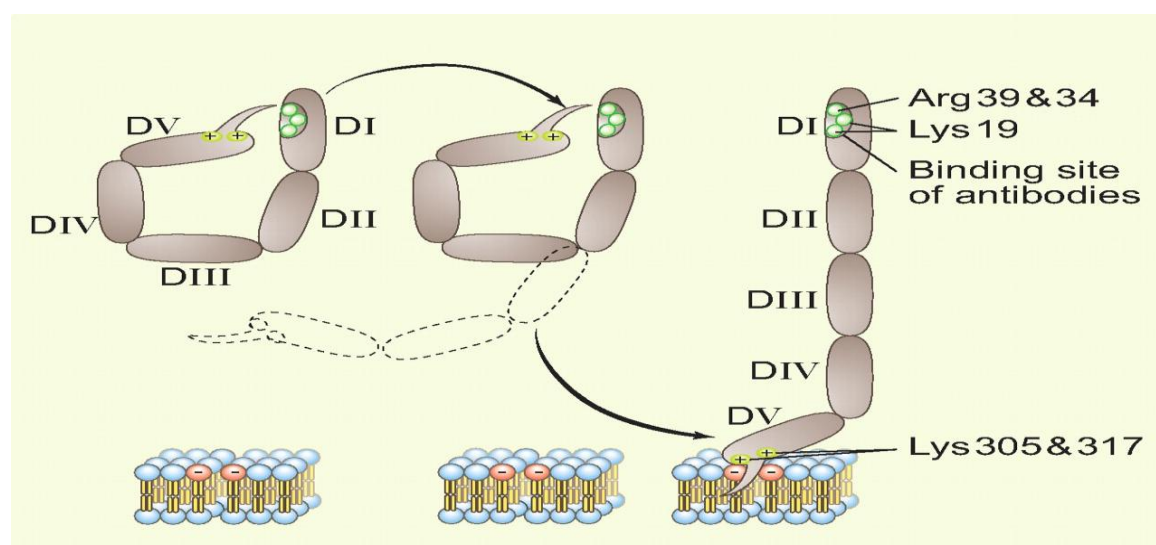
Testem najczęściej potwierdzającym obecność przeciwciał antyfosfolipidowych był antykoagulant tocznia (LA). Częstość ta uzyskała znamienność statystyczną w grupie chorych z bezobjawowymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi [grupa I: 25 osób - 100% - $p = 0,0027$; grupa IIA: 17 osób - 68%; grupa IIB: 23 osoby - 92%], co najprawdopodobniej wynika z metody doboru tych chorych - powodem skierowania ich na dalsze badania diagnostyczne było wydłużenie aPTT bez skazy krwotocznej w wywiadzie.

Chorzy z żylnymi epizodami zakrzepowymi i z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych nie różnili się znamienne pod względem częstości dodatnich testów w kierunku "lupus anticoagulant", gdyż w rzeczywistości za istotną różnicę w tym zakresie - w porównaniu do grupy "bezobjawowej" - była odpowiedzialna grupa IIA. Oznacza to, że zjawisko LA wiąże się raczej z ryzykiem wystąpienia zakrzepicy żyłnej, co jest zbieżne ze spostrzeżeniem Danowskiego i współbadaczy (65) i paradoksalnie - bezobjawowym przebiegiem klinicznym. Wbrew pozorom paradoks ten można wytłumaczyć. Przede wszystkim należy wziąć pod uwagę wyniki fałszywie dodatnie, zwłaszcza u osób starszych oraz w przypadku istnienia LA o małej potencji (66) - dochodzi wówczas do nieistotnego wydłużenia czasów krzepnięcia, co może być źródłem niewłaściwej interpretacji. Stąd krytyczne spojrzenie na otrzymane wyniki, z zachowaniem zasad 3-etapowego przeprowadzania testu (16, 17, 18, 19), ma duże

znaczenie dla wiarygodności oznaczeń. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę możliwość powstania tzw. niepatogennych, często przejściowych APA, najczęściej wtórnych do różnych infekcji (tzw. β_2 -GPI-niezależnych, zdolnych do bezpośredniego łączenia się kardioliną albo skierowanych przeciw domenie V - a nie I - β_2 -glikoproteiny I, jak w przypadku trądu czy dziecięcego atopowego zapalenia skóry) (58, 78, 79), które jednocześnie mogą generować zjawisko LA. W takim przypadku, mimo zastosowania wszystkich 3 rodzajów testów wykrywających APA (LA, ACA i anty- β_2 -GPI), ich obecność można potwierdzić jedynie za pośrednictwem zjawiska LA. Testy ELISA stosowane w diagnostyce APS wykorzystują zupełnie inne epitopy: w obrębie domeny I (nie V) β_2 -glikoproteiny I oraz - kompleksu kardiolipiny z białkowym kofaktorem w postaci β_2 -GPI, gdyż to one właśnie zaangażowane są w genezę patogennych przeciwciał antyfosfolipidowych. Wg Pengo i współpracaczy (66, 80, 81), izolowana obecność LA nie wiąże się z zakrzepicą czy niepowodzeniami ciąży, co tłumaczyłoby największą częstość występowania dodatnich wyników tego testu wśród naszych tzw. "bezobjawowych" pacjentów. Do podobnych wniosków doszli de Groot i współpracacze po zakończeniu badania kliniczno-kontrolnego w Leiden. Wykazali oni, że ryzyko zakrzepicy u pacjentów z dodatnim testem w kierunku LA - po wykluczeniu obecności anty- β_2 -GPI i przeciwciał przeciw protrombinie - nie jest duże (odds ratio: 1,3; 95% przedział ufności: 0,3 - 6,0) [64, 82]. Pengo V i współpracacze sugerują nawet wyodrębnienie innej jednostki chorobowej, w której odmienne niż anty- β_2 -GPI inhibitory są odpowiedzialne za zjawisko LA i która może, ale nie musi, być powiązana z ryzykiem zakrzepicy (66).

Z drugiej jednak strony, w grupie chorych z żylnymi epizodami zakrzepowo-zatorowymi w wywiadzie, lupus anticoagulant wykrywaliśmy podobnie często. Poza tym Galli M. w swej metaanalizie dowodzi, że w przeciwieństwie do ACA, zjawisko LA ma związek z powikłaniami zakrzepowymi (83) i że jest ono czynnikiem ryzyka zakrzepicy, niezależnie od jej typu i lokalizacji. Jednak trzeba wziąć pod uwagę, że ta analiza objęła doniesienia w piśmiennictwie z okresu 1988 - 2000r., kiedy to oznaczenia anty- β_2 -GPI nie były stosowane rutynowo w celu rozpoznania APS, gdyż dopiero od 2006r. zostały wprowadzone do kryteriów diagnostycznych tej jednostki chorobowej (12). Nie ma więc pewności, iż u chorych poddanych metaanalizie, obecność LA miała rzeczywiście charakter izolowany, zwłaszcza, że z dostępnych danych jasno nie wynika czy wszyscy chorzy z dodatnim testem w kierunku LA mieli jednocześnie ujemne wyniki badań potwierdzających obecność ACA (66). Powstałe rozbieżności można spróbować

wyjaśnić, śledząc profil APA w analizowanych przez nas grupach. Jak wynika z tabeli 6, odsetek izolowanej obecności LA był największy u chorych tzw. bezobjawowych (aż 60%), u których w ogóle nie wykazano wyłącznej obecności ACA czy anty- β_2 -GPI - zawsze występowały one w skojarzeniu z LA tworząc wspólnie klasę I przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych (40% w grupie I). U 2 pacjentów z tą klasą w ocenie prospektywnej wystąpiły powikłania zakrzepowe po średnim okresie 22 miesiący od rozpoczęcia obserwacji, pozostałych 8 z nich - miało dalej bezobjawowy przebieg do czasu zakończenia udziału w badaniu (śr. 47 m-cy). Trudno odpowiedzieć na pytanie: dlaczego? W piśmiennictwie ostatnich lat pojawiły się doniesienia o 2 odmianach konformacyjnych β_2 -glikoproteiny I - zamkniętej i otwartej, wykrytych na podstawie badań z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej (84). Pierwsza z nich (inaczej nie związana) występuje w roztworze jako kolistą strukturą, w której dwie domeny - V i I - połączone są wiązaniami niekowalencyjnymi, czyniąc epitopy domeny I niedostępnymi dla przeciwciał antyfosfolipidowych. Pod wpływem zmiany warunków biologicznych (in vitro dializa w buforze zasadowym o wysokim stężeniu soli) - np. w sąsiedztwie fosfolipidów o dużej ekspresji, pochodzących z błon komórek i mikrocząstek wkraczających w fazę apoptozy - cząsteczka ulega zmianom konformacyjnym. W wyniku oddziaływania z fosfolipidami dochodzi do rozerwania wiązań niekowalencyjnych, zakotwiczenia dodatnio naładowanej, hydrofobowej pętli domeny V w podwójnej warstwie fosfolipidowej, a tym samym przejścia w postać otwartą, przypominającą haczyk do wędki, w której dochodzi do odsłonięcia prozakrzepowych epitopów domeny I (84, 15).



Ryc 4. Przejście między 2-ma odmianami konformacyjnymi β_2 -GPI; Rand JH. Blood 2010;116:1193-1194 [16]

Agar i współbadacze wykazali, że APA rozpoznają tylko otwartą, ale nie zamkniętą formę β_2 -GPI. Posługując się mikroskopią elektronową dowiedli oni, że powinowactwo ludzkich anty- β_2 -GPI jest zbyt słabe, by konkurować z domeną V o wiązanie domeny I. Dopiero gdy anionowe fosfolipidy współzawodniczą o to wiązanie, powinowactwo ludzkich przeciwciał jest wystarczające dla połączenia z domeną I i w konsekwencji dochodzi do uruchomienia mechanizmów prozakrzepowych indukowanych przez APA. Wśród nich można wymienić np. uszkodzenie śródbłonna (najczęściej nabyte) i ekspresję czynnika tkankowego (84, 15). W warunkach laboratoryjnych występowanie β_2 -GPI w konkretnej odmianie konformacyjnej jest uzależnione także od metody oczyszczania tej glikoproteiny, co może ostatecznie wywrzeć wpływ na wyniki badań w kierunku APS (84). W przypadku przeprowadzenia testu z zamkniętą postacią dojdzie do otrzymania fałszywie ujemnych wyników i w konsekwencji np. do błędnego potwierdzenia izolowanej obecności LA u danego chorego. Oczywiście osobną kwestią jest przyczyna powstania autoprzeciwciał skierowanych przeciw domenie I - sugeruje się skłonność dziedziczną (15). Może właśnie dlatego wśród naszych, "tzw." bezobjawowych" pacjentów, wykazano większą predyspozycję do pierwotnego generowania autoprzeciwciał, nie tylko antyfosfolipidowych? Można przypuszczać, że właśnie dlatego do objawowego przebiegu doszło tylko u osób z genetycznie uwarunkowaną skłonnością do wytworzenia prozakrzepowych immunoglobulin, komplementarnych do fragmentu gly-40-arg-43 domeny I tej glikoproteiny.

Wracając do obserwowanej przez nas grupy badanej i profilu APA u chorych tzw. "objawowych", trzeba zaznaczyć, że był on bardzo zbliżony zarówno w grupie IIA, jak i IIB, poza wyłączną obecnością anty- β_2 -GPI u chorych z przebytymi, tętnicznymi epizodami zakrzepowymi (12%). Izolowane zjawisko LA występowało u nich w nieco mniejszym odsetku, niż u pacjentów z grupy I, zaś częstość skojarzonej obecności APA (klasa I wg kryteriów laboratoryjnych) była porównywalna do chorych "tzw." bezobjawowych. Częściej stwierdzono natomiast dodatnie miano ACA (4% zarówno w grupie IIA i IIB). Można zauważyć, iż profil APA był bardziej heterogenny u chorych z tętnicznymi i żylnymi powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi w wywiadzie i że nie był on swoisty dla żadnej z nich (może poza izolowaną obecnością anty- β_2 -GPI w grupie IIA). Oznaczałoby to brak związku pomiędzy rodzajem stwierdzonych APA, a lokalizacją zakrzepicy w łożysku naczyniowym (tętnicznym, żylnym lub w obrębie drobnych naczyń), czego odzwierciedleniem mogą być sprzeczne doniesienia w piśmiennictwie na temat LA

jako czynnika ryzyka zakrzepicy. Danowski i współbadacze wiążą to zjawisko raczej z żylnymi powikłaniami zakrzepowymi (65), zaś Urbanus i współautorzy oraz Linnemann i współbadacze - z tętniczymi (85, 86). Takie podejście uzależniałoby przebieg kliniczny APS od indywidualnych (wrodzonych i nabytych) uwarunkowań biologicznych pacjenta, czego poparciem mógłby być wspomniany już fakt wyodrębnienia grupy 8 osób (4%) wśród naszych chorych z przebytymi zarówno tętniczymi jak i żylnymi epizodami zakrzepowymi w chwili rozpoczęcia obserwacji. Nie wszyscy z nich należeli do tej samej klasy wg kryteriów laboratoryjnych - u pięciu z nich stwierdzono wyłącznie LA, a u trzech pozostałych - więcej niż jeden dodatni test w kierunku APA, w dowolnej kombinacji. Dodatkowo trzeba podkreślić, że nie wykazano różnic znamienności statystycznej w zakresie częstości występowania klas przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych pomiędzy badanymi przez nas grupami.

Z kolei potencjał inhibitorowy antykoagulantu tocznia różnił się istotnie wśród badanych pacjentów. Średnie wartości aPTT, aPTT z Actinem i LA1/LA2 - były najdłuższe u chorych z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, zaś najkrótsze - u pacjentów z tętniczymi epizodami zakrzepowymi. Grupa IIB nie różniła się istotnie od grupy I w zakresie średnich aPTT z Actinem i LA1/LA2, a różnice średnich aPTT były znamienne tylko w porównaniu grupy I w stosunku do wszystkich chorych objawowych (bez podziału na grupy z żylnymi i tętniczymi epizodami zakrzepowymi). Mogłoby to oznaczać, że zjawisko LA jest bardziej nasilone, a biorąc jednocześnie pod uwagę omówioną już częstość jego występowania w ocenianej populacji - bardziej swoiste dla pacjentów "bezobjawowych", u których klasę IIA stwierdzono aż w 60%, co wówczas byłoby zbieżne ze spostrzeżeniami Pengo V (66) na temat izolowanej obecności LA i jej bezobjawowego przebiegu. Zgodnie ze spostrzeżeniami Danowskiego i współbadaczy (65), swoistość ta w równym stopniu mogłaby dotyczyć chorych z powikłaniami żylnymi, czego nie można już powiedzieć o grupie osób z tętniczymi epizodami zakrzepowymi w wywiadzie ani o teście aPTT z odczynnikiem o małej swoistości w stosunku do APA, który w tym świetle nie ma swoistości porównywalnej do aPTT z Actinem i DRVVT.

Grupa objęta obserwacją jest jednak zbyt mało liczna dla sformułowania ogólnych wniosków dla populacji chorych z przeciwciałami antyfosfolipidowymi obecnymi co najmniej 3 miesiące.

Najprawdopodobniej ta niska liczebność nie pozwoliła wykazać też, by którakolwiek z klas przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych (I, IIA, IIB, i IIC)

zalecanych przez Miyakisa i współautorów występowała istotnie częściej w grupach I, IIA czy IIB, mimo wyłącznej obecności klasy IIc u chorych z przebytymi, tętnicznymi epizodami zakrzepowymi oraz braku klasy IIB i IIc u pacjentów z bezobjawową obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (tabela 10). U tych ostatnich zjawisko LA występowało zawsze czy to w sposób izolowany, czy też w skojarzeniu z innym kryterium laboratoryjnym w dowolnej kombinacji. Żadna ze wspomnianych klas przeciwciał w sposób istotny nie predysponowała do powikłań zakrzepowo-zatorowych wśród badanych chorych w ocenie prospektywnej, choć w grupie wcześniej "bezobjawowej" powikłania te wystąpiły wyłącznie u pacjentów z klasą I. Nie znaleziono też korelacji pomiędzy klasą przeciwciał wg kryteriów laboratoryjnych a chorobami współistniejącymi oraz czynnikami ryzyka stwierdzonymi w wywiadzie i na podstawie dokumentacji medycznej w badanych grupach.

Wbrew otrzymanym wynikom, coraz więcej doniesień ostatnich lat wskazuje na związek profilu wykrytych APA (LA i/lub ACA i/lub anty- β_2 -GPI - klasa I wg kryteriów laboratoryjnych) z ryzykiem zakrzepicy. Jak dowodzi Swadźba i współbadacze (co sygnalizowano już we wstępie) każde z tych przeciwciał istotnie wiąże się z takim ryzykiem, ale jest ono największe w przypadku współistnienia wszystkich trzech ich typów, tj. LA i ACA i β_2 -GPI (OR 5,63; CI 2,82 - 11,24 - tab. 1.) [21]. Warto podkreślić, że te wnioski dotyczą w głównej mierze populacji chorych z APS współistniejącym z inną jednostką chorobową (tzw. PAPS stwierdzono u ok. 10% badanych). Nasza analiza objęła głównie pacjentów z pierwotną obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (osoby z dodatkową chorobą autoimmunologiczną stanowiły 20% wszystkich badanych i ok. 12% pacjentów tzw. objawowych).

Ruffatti i współbadacze podobnie twierdzą, że współistnienie dodatnich wyników wszystkich trzech testów wykrywających APA u jednej osoby koreluje z większym ryzykiem zakrzepicy i niepowodzeń ciąży, niż w przypadku nieprawidłowych wyników dwóch lub jednego z nich (87). Wykazali oni, że chorzy z takim profilem przeciwciał antyfosfolipidowych mają tendencję do uzyskiwania wyższych mian anty- β_2 -GPI w klasie IgG, co wskazuje na rolę tych właśnie immunoglobulin w patogenezie APS i jego objawów klinicznych (78, 87), co jest zbieżne z teorią Pengo V (66, 69, 80). Wg tych autorów, największym zagrożeniem powikłań zakrzepowo-zatorowych oraz niepowodzeń ciąży obarczeni są chorzy wykazujący jednocześnie obecność przeciwciał antyfosfolipidowych we wszystkich trzech testach, w odpowiednio wysokich mianach

(LA i ACA-IgM > 40 MPL lub ACA-IgG > 40 GPL i anti- β_2 -GPI > 99 percentyla) (66, 69, 80). Twierdzą oni, że taki profil APA u chorych "objawowych" daje podstawy do pewnego rozpoznania APS, jako choroby autoimmunologicznej indukowanej w gruncie rzeczy jednym rodzajem autoprzeciwciał - przeciw β_2 -glikoproteinie I - dającym dodatkowo wyniki wszystkich trzech wymienionych testów laboratoryjnych. Dowodzą oni, że anti- β_2 -GPI, pozyskane drogą chromatografii powinowactwa z osocza chorych na APS, generują zjawisko LA po dodaniu do osocza osób zdrowych (88) oraz dodatkowo wyniki testów ELISA w kierunku obecności ACA (66). Wg autorów, pacjenci z izolowaną obecnością LA, ACA lub anti- β_2 -GPI i spełnionym kryterium klinicznym zespołu antyfosfolipidowego nie są chorymi na APS, ponieważ wykryte u nich autoprzeciwciała różnią się od wyżej opisanych, patogennych anti- β_2 -GPI (66, 69).

W przeciwieństwie do Pengo i współautorów naszą obserwacją objęto chorych z często niższym niż 40 MPL/GPL mianem ACA, kierując się wartością 99 percentyla populacji zdrowej (12) wyznaczonego w Pracowni Hemostazy i Genetyki Szpitala im. J. Strusia w Poznaniu - odpowiednio $\leq 11,3$ GPL i $\leq 10,4$ MPL i $\leq 19,9$ SGU dla anti- β_2 -GPI. Może to być źródłem znacznych rozbieżności pomiędzy otrzymanymi wynikami, a doniesieniami z piśmiennictwa. Z drugiej jednak strony, naszym założeniem była obiektywna ocena wszystkich chorych z ≥ 3 miesięczną obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, nie tylko tych z wysokim ryzykiem prozakrzepowym w przebiegu APS.

Warto podkreślić, że profil przeciwciał antyfosfolipidowych z czasem może ulec zmianie, co w konsekwencji wiąże się z prawdopodobieństwem błędów interpretacyjnych. W naszej obserwacji, u prawie 35% (26 osób - 34,6%) wszystkich badanych pacjentów (75 osób) wykazano, że rodzaj APA stwierdzonych ≥ 3 miesiące od ich pierwszego wykrycia nie pokrywa się z oznaczeniem wyjściowym. Analizując zjawisko w trzech wcześniej sprecyzowanych grupach (I, IIA i IIB), zawsze wykazywano jego obecność na poziomie nie mniejszym niż 20%. Zmienności wyników raczej nie można wiązać z małą wiarygodnością oznaczeń, gdyż Pracownia Hemostazy i Genetyki Szpitala im. J. Strusia w Poznaniu posiada aktualny certyfikat Fundacji ECAT, realizującej program międzynarodowej, zewnętrznej kontroli jakości badań z dziedziny zakrzepicy i hemostazy, do którego laboratorium przystępuje co roku. Tak więc, w przypadku ograniczenia 2-go oznaczenia APA tylko do testów dodatnich 3 miesiące wcześniej, można błędnie stwierdzić przejściową obecność przeciwciał

antyfosfolipidowych, nie rozpoznać APS i zaniechać leczenia przeciwzakrzepowego. Stąd powstaje konieczność wykonania pełnego panelu badań, obejmującego każdorazowo wszystkie trzy wspomniane już wielokrotnie rodzaje testów, co stwarza możliwość analizy całego profilu testów w czasie.

Poparciem tezy o dynamicznym charakterze przeciwciał antyfosfolipidowych wykrywanych u tej samej osoby jest ich zanik, jaki stwierdzono po śr. 34 miesiącach od rozpoczęcia obserwacji - łącznie u 6 pacjentów (3 z grupy IIA, 1 z - IIB oraz 2 z - I; dane nie zaprezentowane). Zjawisko to rodzi kolejne pytania: jak postępować z takimi chorymi, jak często i czy w ogóle powtarzać u nich testy w kierunku APA i czy można zaniechać u nich profilaktyki przeciwkrzepliwej?

Problem ten jest tylko jednym z wielu przykładów wątpliwości indukowanych obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, dlatego - w celu objęcia kontrolą pacjentów nie do końca spełniających kryteria diagnostyczne APS - sformułowano pojęcie tzw. „wątpliwego lub seronegatywnego APS”(12). Termin ten obejmuje m. in. przypadki obecności przeciwciał antyfosfolipidowych innych, niż wymienione w kryteriach diagnostycznych (np. przeciw protrombinie, fosfatydyloserynie, fosfatydyloetanolaminie), jak i nietypowych dla APS objawów klinicznych (np. wad zastawkowych serca, sinicy siatkowatej, małopłytkowości, objawu Raynauda) [12]. W takich sytuacjach, decyzja terapeutyczna jest bardzo trudna, zaś zastosowanie profilaktyki przeciwkrzepliwej wiąże się z narażeniem na jej powikłania osób nie wymagających żadnej interwencji leczniczej. Z drugiej strony, zaniechanie leczenia na przykład z tytułu błędnego zakwalifikowania pacjentów do grupy tzw. "bezobjawowej", może przynieść tragiczne skutki (89). W badaniach własnych we współpracy z Kliniką Chirurgii Ogólnej i Naczyń U.M. w Poznaniu stwierdziliśmy występowanie APA u 5, spośród 15-tu, chorych z obwodowymi zaburzeniami w tętnicach kończyn dolnych lub górnych (90). Zmiany te – o charakterze niedokrwiennym, potwierdzone obiektywnie uznanymi metodami obrazowymi (USG-Doppler, angio-KT, angio-NMR) pierwotnie wiązano z zarostowym zapaleniem tętnic (TAO), zwłaszcza u palących, młodych chorych. Zapewne, ostatecznej odpowiedzi na pytanie czy w takich przypadkach można rozpoznać pierwotny APS, mogliby udzielić histopatolodzy, wykazując obecność zakrzepicy bez ewidentnych cech zapalenia w ścianie naczyń (12).

Podsumowując, patogeneza APS i w konsekwencji przebieg kliniczny (z zakrzepicą żylną, tętniczą, lub tętniczo-żylną, powikłaniami położniczymi lub bez nich) wciąż jest tajemnicą. Wynika to najprawdopodobniej z nieograniczonej ilości

mechanizmów prozakrzepowych oraz struktur subkomórkowych, komórkowych i tkankowych, jakie ta jednostka chorobowa angażuje. Wśród nich wymienić można chociażby aktywację komórek i zwiększenie ekspresji czynnika tkankowego, krystalizację aneksyny 5, aktywację układu białka C, fibrylizę z wykorzystaniem aneksyny A2 jako mediatora oraz stymulację prozakrzepowego fenotypu i oddziaływań adhezyjnych, aktywację komplementu (15). Doniesienia ostatnich lat odkrywają coraz więcej faktów ułatwiających zrozumienie tej choroby, zwłaszcza na wczesnym etapie jej patogenezы. Nabyty charakter APS oraz odmienny przebieg w grupie chorych zbliżonych pod względem płci, wieku i rasy sugeruje zależność pełnego obrazu klinicznego od indywidualnych (wrodzonych i nabytych) uwarunkowań biologicznych pacjenta, determinujących (wspólnie z klasą stwierdzanych APA) profil ryzyka jednostki.

Podkreślić należy, że wyniki przeprowadzonych analiz nie mogą służyć do odzwierciedlenia ocenianych zależności w populacji ogólnej. Sposób rekrutacji pacjentów - ograniczający ich do osób z zaburzeniami krzepnięcia potwierdzonymi klinicznie i/lub laboratoryjnie, wynikający ze znacznej trudności gromadzenia materiału badawczego - wiąże się niewątpliwie z typowym błędem doboru.

Potrzebne są dalsze badania, najlepiej prospektywne, przeprowadzone u pacjentów zaklasyfikowanych do przedstawionych grup i dodatkowo podzielonych na klasy przeciwnał wg kryteriów laboratoryjnych (a w obrębie I - z uwzględnieniem ilości dodatnich testów w kierunku APA), ale o znacznie większej liczebności. Z uwagi na bardzo dużą trudność doboru (zwłaszcza chorych z aAPA) i co za tym idzie, bardzo długi czas rekrutacji, należałoby w tym celu nawiązać współpracę międzyośrodkową w skali ogólnokrajowej, a może nawet międzynarodowej.

Pozwoliłoby to na sformułowanie uniwersalnych wniosków, odzwierciedlających trendy populacyjne wśród chorych z APA.

WNIOSKI

1. Najbardziej czułym testem laboratoryjnym potwierdzającym obecność APA wśród wszystkich badanych był antykoagulant tocznia (LA).
2. Wśród pacjentów z wcześniej bezobjawowymi APA wystąpiła tendencja do powikłań zakrzepowych tylko w przypadku ich przynależności do klasy I wg aktualnych kryteriów diagnostycznych. W związku z tym rozważenia wymaga wdrożenie leczenia chlorochiną i/lub pierwotnej profilaktyki przeciwzakrzepowej u takich pacjentów.
3. Choroby autoimmunologiczne występowały istotnie częściej u osób z bezobjawowymi APA w porównaniu do chorych z APS, przy braku różnic w zakresie częstości innych chorób współistniejących oraz czynników ryzyka zakrzepicy żyłnej i tętniczej.
4. Skojarzone występowanie APA i wrodzonej trombofilii może dodatkowo zwiększyć ryzyko prozakrzepowe wynikające z obecności pojedynczego defektu, co wykazano w odniesieniu do niedoboru naturalnych antykoagulantów i/lub oporności na aktywowane białko C.
5. Status przeciwciał antyfosfolipidowych może zmieniać się osobniczo z upływem czasu, co stwierdzono u 1/3 wszystkich badanych, dlatego kolejne oznaczenie APA po 12 tyg. powinno objąć cały panel badań zalecanych w diagnostyce APS. U części pacjentów doszło do samoistnego zaniku APA.
6. Potrzebne są dalsze badania, najlepiej prospektywne, przeprowadzone w grupie pacjentów z bezobjawową obecnością APA o znacznie większej liczebności. Z uwagi na trudność doboru i długi czas rekrutacji takich pacjentów, należałoby w tym celu nawiązać współpracę międzyośrodkową.

STRESZCZENIE

Zespół antyfosfolipidowy (APS), definiowany jako współistnienie żylnych i/lub tętnicznych powikłań zakrzepowych i/lub niepowodzeń ciąży z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych, jest przykładem nabytej trombofilii. Epizody zakrzepowe w przebiegu APS mają charakter nawracający, a częstość ich nawrotu po zaniechaniu wtórnej profilaktyki przeciwzakrzepowej, wzrasta z upływem lat.

Celem pracy było zbadanie korelacji między aktualnymi wytycznymi diagnostyki APS (kryteria z Sydney, 2006 r.), a obrazem klinicznym zakrzepicy w tym zespole, z uwzględnieniem współistnienia wrodzonej trombofilii i uznanych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Ponadto wśród klinicznie bezobjawowych pacjentów, u których wykryto przeciwciała antyfosfolipidowe (APA) postanowiono wyodrębnić grupę obciążoną największym ryzykiem zakrzepowo-zatorowym, w porównaniu z chorymi na APS. Analizowano też zależność między rodzajem testu lub testów laboratoryjnych potwierdzających długotrwałą obecność APA, a ryzykiem zakrzepowym.

Obserwacja trwająca średnio 47 miesięcy objęła 75 osób (50 kobiet i 25 mężczyzn), w średnim wieku 43 lat, podzielonych na trzy grupy (po 25 pacjentów każda): I - z bezobjawową obecnością APA, IIA - z powikłaniami tętnicznymi oraz IIB - z epizodami żylnymi w przebiegu APS. Większość badanych stanowili chorzy z pierwotnym zespołem antyfosfolipidowym oraz pacjenci z bezobjawowymi APA, bez innych chorób autoimmunologicznych w wywiadzie.

Badania objęły: antykoagulant tocznia (LA) zgodnie z trójstopniową procedurą zalecaną przez ISTH, przeciwciała antykardiolipinowe (ACA) w klasie IgM i IgG oraz przeciw β_2 -glikoproteinie I (anty- β_2 -GPI) w klasie IgG. W oznaczeniach ACA i anty- β_2 -GPI za wynik dodatni przyjmowano miano > 99 percentyla. Ocenie poddano ponadto aktywność antytrombiny, białka C, oporność na aktywowane białko C, stężenie wolnego białka S, a także stężenie fibrynogenu i dimeru-D.

Spośród chorób współistniejących oraz czynników ryzyka zakrzepicy żylny i tętniczej, stwierdzono jedynie istotnie większą częstość występowania schorzeń autoimmunologicznych u osób z bezobjawową obecnością APA, w porównaniu do chorych z przebytymi powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi.

Testem najczęściej potwierdzającym obecność przeciwciał antyfosfolipidowych był antykoagulant tocznia (LA) - najczęściej dawał on wyniki dodatnie u pacjentów z

przebiegiem bezobjawowym i przebytymi epizodami żylnymi, najrzadziej – w grupie z powikłaniami tętniczymi w wywiadzie.

W badanych grupach nie wykazano znamiennych różnic pod względem częstości epizodów zakrzepowych w ocenie retrospektywnej - u chorych objawowych i prospektywnej - u wszystkich pacjentów, mimo, że czas do ich wystąpienia po rozpoczęciu obserwacji był prawie 2-krotnie krótszy u osób wcześniej bezobjawowych, w porównaniu do chorych z przebytymi epizodami zakrzepowo-zatorowymi.

Analiza prospektywna wykazała ponad 5-krotny wzrost ryzyka nawrotu powikłań zakrzepowo-zatorowych u chorych z APA, wynikający ze współistnienia wrodzonej trombofilii, definiowanej jako zespół niedoboru naturalnych antykoagulantów i/lub oporności na aktywowane białko C.

Żadna z klas przeciwciał wg kryteriów diagnostycznych z 2006r. nie występowała znamienne częściej w poszczególnych grupach badanych, nie korelowała z chorobami współistniejącymi oraz czynnikami ryzyka sercowo naczyniowego ani nie predysponowała do powikłań zakrzepowo-zatorowych w ocenie prospektywnej - wskazując na zależność pełnego obrazu klinicznego APS od indywidualnych cech biologicznych pacjenta. W grupie wcześniej "bezobjawowej" powikłania te wystąpiły wyłącznie u pacjentów należących do klasy I wg aktualnych kryteriów diagnostycznych (9,1 % pacjentów - po średnio 22 miesiącach od włączenia do badania). Mimo, że nie uzyskano poziomu istotności $\alpha = 0,05$ w odniesieniu do częstości tego zjawiska, co może wynikać ze stosunkowo małej liczebności grupy badanej, należałoby u takich pacjentów rozważyć zastosowanie leczenia chlorochiną i/lub pierwotnej profilaktyki przeciwzakrzepowej.

Profil przeciwciał antyfosfolipidowych zmieniał się osobniczo z upływem czasu, co wykazano u 1/3 wszystkich badanych; u 6 spośród tych pacjentów doszło do ich samoistnego zaniku po ok. 34 miesiącach od rozpoczęcia obserwacji. Stąd, w celu potwierdzenia APS, kolejne oznaczenie APA winno objąć cały panel, wykorzystany do ich pierwotnego wykrycia.

Potrzebne są dalsze badania, najlepiej prospektywne, przeprowadzone w grupie pacjentów z bezobjawową obecnością APA o znacznie większej liczebności. Z uwagi na trudność doboru i długi czas rekrutacji takich pacjentów, należałoby w tym celu nawiązać współpracę międzyośrodkową.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik nr 1 - wyniki oznaczeń antykoagulantu tocznia w grupie pacjentów z aAPA
→ str. 80

Załącznik nr 2 - wyniki oznaczeń miana ACA (klasa IgG i IgM) oraz anty β_2 -GPI (klasa IgG) w grupie pacjentów z aAPA
→ str.81

Załącznik nr 3 - wyniki analizy dodatkowego ryzyka prozakrzepowego w grupie pacjentów z aAPA
→ str. 82

Załącznik nr 4 - wyniki oznaczeń antykoagulantu tocznia w podgrupie chorych z przebytymi tętniczymi lub tętniczo-żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS
→ str.83

Załącznik nr 5 - wyniki oznaczeń miana ACA (klasa IgG i IgM) oraz anty β_2 -GPI (klasa IgG) w podgrupie pacjentów przebytymi tętniczymi lub tętniczo-żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS
→ str. 84

Załącznik nr 6 - wyniki analizy dodatkowego ryzyka prozakrzepowego w podgrupie chorych z przebytymi tętniczymi lub tętniczo-żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS
→ str. 85

Załącznik nr 7 - wyniki oznaczeń antykoagulantu tocznia w podgrupie chorych z przebytymi żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS
→ str. 86

Załącznik nr 8 - wyniki oznaczeń miana ACA (klasa IgG i IgM) oraz anty β_2 -GPI (klasa IgG) w podgrupie chorych z przebytymi żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS
→ str. 87

Załącznik nr 9 - wyniki analizy dodatkowego ryzyka prozakrzepowego w podgrupie chorych z przebytymi żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS
→ str. 88

Załącznik nr 1. Wyniki oznaczeń antykoagulantu toczenia w grupie pacjentów z aAPA

N	Inicjały	aPTT 1 ⁰ n 28-38* (s)	aPTT 2 ⁰ n 28-38* (s)	aPTT-Actin 1 ⁰ n 25-34s* (s)	aPTT-Actin 2 ⁰ n 25-34s* (s)	Test mieszania osocza 1 ⁰	Test mieszania osocza 2 ⁰	LA ₁ /LA ₂ 1 ⁰ n < 1,3	LA ₁ /LA ₂ 2 ⁰ n < 1,3
1	BB	43,2	48,9	43,8	33,4	dodatni	-	1,95	1,98
2	RB	48,1	53,1	39,9	39,6	dodatni	dodatni	0,97	-
3	KD	53,6	51,8	41,3	39,8	dodatni	dodatni	2,12	2,14
4	DD	48,2	47	39,6	43,1	dodatni	dodatni	1,49	1,08
5	DDz	86,2	111,77	223,1	94,3	dodatni	dodatni	1,64	2,0
6	WG	50,46	52,8	58,6	50,2	dodatni	dodatni	1,76	1,88
7	RG	39,6	46,7	42,8	47,1	ujemny	dodatni	2,75	3,06
8	JG	54,1	48,3	36,1	36,1	ujemny	dodatni	1,37	1,5
9	AGJ	47,4	35,8	32	25,6	-	-	1,96	1,93
10	ŁG	44,7	35,8	55,7	42,2	dodatni	ujemny	2,46	2,56
11	KH	53,8	50,5	49,8	49,1	dodatni	dodatni	1,64	1,9
12	AK	47,2	47,1	39,6	43,4	ujemny	ujemny	2,01	1,33
13	BK	82,6	53,2	88,1	88,6	dodatni	dodatni	3,8	2,3
14	EŁ	76,9	80,1	110	118	dodatni	dodatni	1,96	2,79
15	KM	55,3	48,2	68,9	44,7	dodatni	dodatni	2,35	1,46
16	MM	45,7	41,6	34,6	35,2	dodatni	dodatni	1,55	1,39
17	AN	57,4	96,4	48,3	41	dodatni	dodatni	1,94	2,81
18	SN	88,5	75,2	150,4	110	dodatni	dodatni	1,49	1,33
19	JS	41,6	38,6	39,7	37,7	dodatni	dodatni	1,34	1,25
20	HS	64,3	47,3	87,1	53	dodatni	dodatni	1,36	1,36
21	IS	42,1	62,7	52,5	64,8	dodatni	dodatni	2,59	2,33
22	DS	54,1	42,2	42	33,2	dodatni	-	1,14	1,48
23	JSz	49,9	54,5	52,8	51,7	dodatni	dodatni	1,44	1,86
24	BT	37,5	41,5	32,8	31,2	-	ujemny	2,5	2,9
25	JW	39,9	33,1	44,8	29,2	dodatni	dodatni	1,7	1,36

aAPA – bezobjawowe przeciwciała antyfosfolipidowe

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych

1⁰/2⁰ - odpowiednio: oznaczenie wyjściowe i po ≥ 12 tygodniach

* w celu uwzględnienia wpływu warunków lokalnych na pomiar (np. temperatura czy wilgotność otoczenia) wartość prawidłową oznaczano codziennie w oparciu o badanie osocza standardowego dostarczonego przez producenta testu

Zal. nr 2. Oznaczenie miana ACA (klasa IgG i IgM) oraz anty β_2 -GPI (klasa IgG) w grupie pacjentów z aAPA

N	Inicjały	ACA-IgG 1 ⁰ n < 11,5 GPL (99 percentyl)	ACA-IgG 2 ⁰ n < 11,5 GPL (99 percentyl)	ACA-IgM 1 ⁰ n < 10,4 MPL (99 percentyl)	ACA-IgM 2 ⁰ n < 10,4 MPL (99 percentyl)	anty- β_2 -GPI 1 ⁰ n < 13,1 GU (99 percentyl)	anty- β_2 -GPI 2 ⁰ n < 13,1 GU (99 percentyl)
1	BB	4,2	7,1	2,1	1,8	2,4	4,8
2	RB	2,3	4,1	6	0,1	1,7	1,2
3	KD	9,5	8,3	10,3	10,1	21,5	24,3
4	DD	19,7	2,6	9,2	0,3	1	5
5	DDz	8,9	4,5	6,7	2,4	0,4	1,53
6	WG	23,1	15	25,3	17,7	75	25,7
7	RG	123,3	97,7	53,5	40,8	54,5	70,4
8	JG	0,1	< 2,0	2,2	< 2,0	1,2	< 0,5
9	AGJ	126	111	84	79	74	70
10	ŁG	< 2,0	< 2,0	5,4	< 2,0	14,6	1,8
11	KH	14,9	8,1	14,7	7,4	6,9	3,45
12	AK	23,7	2,2	0,4	2,0	16	12,5
13	BK	331,6	151,3	3,1	5,1	-	149,1
14	EŁ	124	102,2	35,7	33,3	142	118,93
15	KM	19,1	26,8	45,6	81,7	8	4,8
16	MM	4,3	7,6	4,7	2,6	2,7	3,1
17	AN	22,8	21	8,7	5,5	101,6	84,5
18	SN	1,0	5,7	1,0	2,0	3,9	1,47
19	JS	5,7	8,2	3,3	4,8	4,6	13,9
20	HS	4,5	6,2	2,3	2,5	2,8	13,96
21	IS	14,3	15,6	10,2	9,1	28,4	17,2
22	DS	6,5	7,1	8	2	2,5	3,8
23	JSz	-	34,3	-	4,3	107,8	114
24	BT	8,1	7,3	8,3	4,1	1,8	2,9
25	JW	7,8	6,0	6,2	4,2	7,8	4,2

aAPA – bezobjawowe przeciwciała antyfosfolipidowe

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych

1⁰/2⁰ - odpowiednio: oznaczenie wyjściowe i po \geq 12 tygodniach

GPL/MPL - skalibrowane wg standardowych jednostek miano antykardiolipin (j/ml: odpowiednio G oznacza IgG; M - IgM) wobec uznanych międzynarodowo surowic referencyjnych

GU - skalibrowane wobec stężeń immunoglobulin o swoistości anty- β_2 -GPI miano przeciwciał

* w celu uwzględnienia wpływu warunków lokalnych na pomiar (np. temperatura czy wilgotność otoczenia) wartość prawidłową oznaczano codziennie w oparciu o badanie osocza standardowego dostarczonego przez producenta testu

Załącznik nr 3. Analiza dodatkowego ryzyka prozakrzepowego w grupie pacjentów z aAPA

N	Inicjały	białko C n: 65-140%	aPCR n < 2,0	białko S n > 50%	Antytrombina n: 75,6-122%	Fibrynogen n: 1,69-3,92g/l	Dimer-D n < 500ng/ml
1	BB	90,37	3,42	93,7	92,25	5,22	585,73
2	RB	69	2,62	51,1	77	4,77	318,18
3	KD	105,65	3,21	123,2	92	3,82	111,43
4	DD	102,83	2,91	90,5	109,0	3,34	176,12
5	DDz	94,14	2,07	88,1	89	3,31	140,77
6	WG	79,48	2,43	71,1	77	5,85	1224,26
7	RG	108,4	3,27	106,3	94	4,64	230
8	JG	83,8	2,54	98,4	106	2,23	161
9	AGJ	81,5	2,74	49,8	118	2,76	577
10	ŁG	133	3,73	84,1	105	2,98	171
11	KH	81,4	2,36	93,1	114	4,14	195,53
12	AK	78,7	4,04	82,4	96,3	2,06	135
13	BK	87,8	2,12	61,8	87	4,58	89,07
14	EŁ	88,38	88,38	82	124,6	3,7	226,49
15	KM	83	2,07	73,1	80	4,2	4375
16	MM	132,81	2,57	93,3	112	3,77	300,14
17	AN	107,8	2,46	59	103,1	3,45	211,81
18	SN	104,32	2,65	116	79	4,96	538
19	JS	84,42	2,94	100,2	87	2,83	392,88
20	HS	98,2	2,47	110,9	91,2		417,5
21	IS	120,96	2,88	87	97	2,95	-
22	DS	97,78	2,94	80	86	6,94	1632,3
23	JSz	76,87	2,66	54,3	95	3,73	729,19
24	BT	158,53	2,48	78	136	5,65	1282,96
25	JW	123,4	2,1	95,4	110	5,29	122,74

aAPA – bezobjawowe przeciwciała antyfosfolipidowe

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych

* w celu uwzględnienia wpływu warunków lokalnych na pomiar (np. temperatura czy wilgotność otoczenia) wartość prawidłową oznaczano codziennie w oparciu o badanie osocza standardowego dostarczonego przez producenta testu

Załącznik nr 4. Oznaczenie antykoagulantu toczenia w podgrupie chorych z przebytymi tętniczymi lub tętniczo-żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS

N	Inicjały	aPTT 1 ⁰ n 28-38* (s)	aPTT 2 ⁰ n 28-38* (s)	aPTT-Actin 1 ⁰ n 25-33,8* (s)	aPTT-Actin 2 ⁰ n 25-33,8* (s)	Test mieszania osocza 1 ⁰	Test mieszania osocza 2 ⁰	LA ₁ /LA ₂ 1 ⁰ n < 1,3	LA ₁ /LA ₂ 2 ⁰ n < 1,3
1	KA	42,4	30,3	31,1	27,1	ujemny	ujemny	1,1,23	1,23
2	SB	36,6	40,8	26,6	37,2	ujemny	ujemny	1,11	1,33
3	LB	36,9	31,8	35,8	30,7	dodatni	ujemny	-	1,12
4	DB	39,4	33,7	38,3	26,3	dodatni	ujemny	1,58	1,11
5	WB-M	55,5	42,3	53,2	39,1	-	dodatni	1,72	1,18
6	JC	35	39,1	47,5	37,8	dodatni	dodatni	1,05	1,05
7	AG	38,4	40,9	30,6	34,2	dodatni	ujemny	1,27	1,17
8	AH	34	32,9	30,4	32,6	-	-	1,67	2,0
9	JJ	44,4	49,9	60,2	65,5	dodatni	dodatni	2,27	2,5
10	TK	37,5	36,3	33,4	32,6	dodatni	ujemny	2,14	1,27
11	EK	38,3	43,8	30,8	34,3	ujemny	dodatni	1,11	1,9
12	RK	35,2	33,7	34	32,7	ujemny	ujemny	1,46	1,6
13	KK	56,3	59,6	64,7	43,5	dodatni	dodatni	1,5	1,4
14	WK	40,4	36,8	29,0	30,9	-	ujemny	2,31	1,13
15	KM	30,3	32	32,7	35,7	-	dodatni	1,58	1,45
16	SM	43,3	37,8	34,2	35,2	dodatni	ujemny	1,48	1,39
17	GO	36,3	35,7	31,6	30,4	ujemny	ujemny	1,59	1,17
18	JO	46,5	42,8	64,6	29	ujemny	ujemny	1,51	1,17
19	JP	37,2	29,2	29,7	41,1	-	dodatni	1,3	1,24
20	JS	61,1	47,9	81,2	43,5	dodatni	dodatni	1,87	2,81
21	ZS	41,2	45,3	37,1	39,0	-	dodatni	1,46	1,25
22	RŚ	38,9	32,7	29,9	29,0	ujemny	ujemny	1,32	1,5
23	PŚ	39	32,3	34,8	31,1	dodatni	-	1,66	1,32
24	EZ	50,5	48,3	57,4	53,5	-	dodatni	1,63	1,48
25	KZ	44,9	33,3	33,1	30,2	-	-	1,77	1,59

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych

1⁰/2⁰ - odpowiednio: oznaczenie wyjściowe i po ≥ 12 tygodniach

* w celu uwzględnienia wpływu warunków lokalnych na pomiar (np. temperatury czy wilgotności otoczenia) wartość prawidłową oznaczano codziennie w oparciu o badanie osocza standardowego dostarczonego przez producenta testu

 - chorzy z mieszanymi (tętniczo-żylnymi) powikłaniami zakrzepowymi

Zal. nr 5. Oznaczenie miana ACA (klasa IgG i IgM) oraz anty β_2 -GPI (klasa IgG) w podgrupie pacjentów przebytymi tętniczymi lub tętniczo-żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS

N	Inicjały	ACA-IgG 1 ⁰ n < 11,5 GPL (99 percentyl)	ACA-IgG 2 ⁰ n < 11,5 GPL (99 percentyl)	ACA-IgM 1 ⁰ n < 10,4 MPL (99 percentyl)	ACA-IgM 2 ⁰ n < 10,4 MPL (99 percentyl)	anty- β_2 -GPI 1 ⁰ n < 13,1 GU (99 percentyl)	anty- β_2 -GPI 2 ⁰ n < 13,1 GU (99 percentyl)
1	KA	17,8	11,9	4,6	4,1	43,7	32,1
2	SB	9	4,6	4,2	1,9	20,7	4,5
3	LB	2,5	6,8	7,1	2,1	43,4	42,3
4	DB	13,5	6,3	6,4	4,1	0,6	22,7
5	WBM	4,8	5,2	3,2	4,2	12,9	4,3
6	JC	5,7	4,5	2,7	3,3	2,7	4,1
7	AG	5,7	7,5	4	4,1	15,9	15,2
8	AH	4,0	1,0	0,1	1,0	5,6	3,3
9	JJ	142,7	37,6	39,7	20,6	145,1	136,3
10	TK	10,7	15,7	15,6	10,1	2,0	6,7
11	EK	23,5	49,7	6,3	7,2	70,7	48
12	RK	11,6	12	4,0	7,9	12,2	4,5
13	KK	51	30	-?	5,4	-	54,6
14	WK	5	6,6	3,2	3,6	29,3	29,8
15	KM	1,0	4,3	2,4	4,5	5,2	2,7
16	SM	0,1	8,5	7,9	3,0	2,9	5,6
17	GO	8,4	7,3	61,6	18,2	13,9	4,1
18	JO	45,9	68,6	42,3	38,2	>148	>148,2
19	JP	10,85	1,0	7,35	9,4	-	8,9
20	JS	112,3	71,4	6,5	4,6	118,93	101,3
21	ZS	1,0	-	5,9	-	4,8	-
22	RŚ	5,8	6,2	7,6	3,5	2,49	18,0
23	PŚ	5,9	6,5	1,9	2,5	2,58	2,7
24	EZ	20	26	16	15	124,3	118,6
25	KZ	7,8	3,9	3,3	3,9	5	4,6

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych

1⁰/2⁰ - odpowiednio: oznaczenie wyjściowe i po ≥ 12 tygodniach

GPL/MPL - skalibrowane wg standardowych jednostek miano antykardiolipin (j/ml: odpowiednio G oznacza IgG; M - IgM) wobec uznanych międzynarodowo surowic referencyjnych

GU - skalibrowane wobec stężeń immunoglobulin o swoistości anty- β_2 -GPI miano przeciwciał

- chorzy z mieszanymi (tętniczo-żylnymi) powikłaniami zakrzepowymi

**Załącznik nr 6. Analiza dodatkowego ryzyka prozakrzepowego
w podgrupie chorych z przebytymi tętniczymi lub tętniczo-żylnymi
powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS**

N	Inicjały	b.C (%)	aPCR	b.S (%)	AT (%)	Fbgn (g/l)	Dimer-D (ng/ml)	↑ Plt
1	KA	72,6	2,94	100,4	103	4,01	91,7	nie
2	SB	116	3,15	97,7	81	3,9	174	nie
3	LB	79,1	2,67	85,4	79	3,02	316,45	nie
4	DB	108,01	2,26	84,4	92,6	5,59	217,94	nie
5	WBM	119,09	2,94	85,5	92	3,81	310,46	tak
6	JC	105,8	2,82	96,9	103	3,5	191,95	nie
7	AG	147,9	2,42	114,3	108,3	3,65	156,2	nie
8	AH	106,5	2,64	119	92	4,26	340,75	nie
9	JJ	110	2,41	133	80	3,09	81,39	nie
10	TK	145,6	2,14	92,3	112	5,94	956,17	nie
11	EK	107,4	1,42	27,8	88	4,33	1090	nie
12	RK	109,1	2,93	64	81	-	409,99	nie
13	KK	95	2,51	101,4	95	3,93	210,52	nie
14	WK	134,5	2,42	108,4	90	4,28	166,85	nie
15	KM	98,33	2,61	73	127	4,76	229,61	nie
16	SM	146,1	2,56	132,7	80	3,7	153,57	nie
17	GO	127	3,27	67,2	92	3,64	166,23	nie
18	JO	109,5	2,28	107,8	123	3,45	595,55	nie
19	JP	77,01	1,54	95	75	4,09	75,6	nie
20	JS	88,4	2,64	100,2	80	4,4	188	nie
21	ZS	96,35	2,7	74,8	78	3,71	<500	600
22	RŚ	77,29	2,71	76,6	83	5,49	393,18	nie
23	PŚ	117	2,68	84,2	87	4,23	137,1	nie
24	EZ	112,2	1,25	86,2	91	3,31	1939,22	nie
25	KZ	108,5	3,27	117,6	122	4,63	75,88	nie

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych odpowiednio - białko C (b. C) : 65-140%; oporność na aktywowane białko C (aPCR):

< 2,0; białko S (b. S): >50%; antytrombina (AT): 75,6-122%; fibrynogen (fbgn): 1,69-3,92g/l); dimer-D: > 500ng/ml; nadpłytkowość (↑ Plt): > 450G/l

1⁰/2⁰ - odpowiednio: oznaczenie wyjściowe i po ≥ 12 tygodniach;

■ - chorzy z mieszanymi (tętniczo-żylnymi) powikłaniami zakrzepowymi

Załącznik nr 7. Oznaczenie antykoagulantu tocznia w podgrupie chorych z przebytymi żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS

N	Inicjały	aPTT ₁ ⁰ n 28-38* (s)	aPTT ₂ ⁰ n 28-38* (s)	aPTT-Actin ₁ ⁰ n 25-33,8 (s)	aPTT-Actin ₂ ⁰ n 25-33,8 (s)	Test mieszania osocza ₁ ⁰	Test mieszania osocza ₂ ⁰	LA ₁ /LA ₂ ₁ ⁰ n < 1,3	LA ₁ /LA ₂ ₂ ⁰ n < 1,3
1	BA	43,6	40,9	41,7	48	-	dodatni	2,68	2,57
2	JC	35,7	37,7	46,5	48,3	dodatni	dodatni	2,03	1,8
3	EF	35,3	32,7	30,8	29,5	-	-		
4	ZG	33,9	42,5	35,1	37,2	dodatni	dodatni	1,23	1,46
5	LH	39,1	29,6	33,4	28,3	dodatni	-	1,44	2,63
6	MJ	37,9	44,2	43,5	60,8	-	dodatni	1,57	1,41
7	AJ	69,3	54,2	77,5	65,7	dodatni	dodatni	2,15	1,37
8	AJur.	54	60,2	66,1	74,5	dodatni	dodatni	2,13	1,86
9	KK	30,1	30,6	31,2	32,4	-	ujemny	1,77	1,2
10	PK	65,7	60,9	89,2	97,4	dodatni	dodatni	5,7	3,0
11	SK	38,2	37,7	42,0	36,7	dodatni	dodatni	1,1	1,07
12	MK	33,4	48,8	31,6	36,3	-	dodatni	1,32	1,46
13	KM	72,9	117,5	83,05	87,8	dodatni	dodatni	3,25	3,19
14	MMę	40,3	36,5	39,5	28,4	dodatni	ujemny	6,3	5,2
15	MM	40,3	36,5	39,5	28,4	dodatni	ujemny	1,03	2,09
16	CM	48,4	56,1	38,6	43,7	dodatni	dodatni	1,37	1,67
17	MN	56,9	64,8	109,5	110,5	dodatni	dodatni	4,05	3,51
18	WP	30,6	35,3	28,9	28,8	-	-	1,65	1,5
19	JPL	39,5	34,8	43,0	37,4	dodatni	dodatni	1,33	1,83
20	BP	49,2	39,6	50,9	39,4	-	dodatni	1,65	1,12
21	SR	31,9	30,4	30,4	29,4	-	-	1,39	1,37
22	AS	38,5	39,1	39,0	38,2	dodatni	dodatni	1,16	1,15
23	MS	78,0	76,0	62,7	93,0	dodatni	dodatni	2,09	2,91
24	DŚ	48,6	44,2	34,4	34,9	dodatni	dodatni	1,13	1,13
25	MZ	57,3	43,7	60,2	43,2	dodatni	dodatni	1,77	2,3

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych

1⁰/2⁰ - odpowiednio: oznaczenie wyjściowe i po ≥ 12 tygodniach

* w celu uwzględnienia wpływu warunków lokalnych na pomiar (np. temperatury czy wilgotności otoczenia) wartość prawidłową oznaczano codziennie w oparciu o badanie osocza standardowego dostarczonego przez producenta testu

Zal. nr 8. Oznaczenie miana ACA (klasa IgG i IgM) oraz anty β_2 -GPI (klasa IgG) w podgrupie chorych z przebytymi żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS

N	Inicjały	ACA-IgG 1 ⁰ n < 11,5 GPL (99 percentyl)	ACA-IgG 2 ⁰ n < 11,5 GPL (99 percentyl)	ACA-IgM 1 ⁰ n < 10,4 MPL (99 percentyl)	ACA-IgM 2 ⁰ n < 10,4 MPL (99 percentyl)	anty- β_2 -GPI 1 ⁰ n < 13,1 GU (99 percentyl)	anty- β_2 -GPI 2 ⁰ n < 13,1 GU (99 percentyl)
1	BA	26,3	58,3	31,1	40,6	110,4	120,5
2	JC	1,0	7,2	0,9	3,0	2,8	2,8
3	EF	85,16	39,2	6,1	7,9	112,0	116,3
4	ZG	1,8	0,1	4,5	6,2	2,9	18,9
5	LH	7,3	5,8	2,5	2,9	2,93	2,3
6	MJ	9,4	0,1	3,4	0,5	1,3	3,0
7	AJ	11,5	2,4	0,1	0,1	22	7,4
8	AJur.	47	35	8	7,4	<148	135
9	KK	14,75	3	17,19	37,7	8,8	3,3
10	PK	135,4	54,3	10,6	8,6	128,1	118,1
11	SK	7,8	5,1	2,9	3,5	2,81	1,4
12	MK	6,0	9,3	3,4	4,1	14,5	4,2
13	KM	142	64,8	289	35,6	-	120,5
14	MMę	6,3	5,2	5,0	3,1	2,6	16,8
15	MM	6,3	5,2	5,0	3,1	2,6	16,8
16	CM	6,4	5,5	6,1	7,8	2,85	1,9
17	MN	68,9	57,4	3,1	8,4	90,7	99
18	WP	8,8	6,16	7,4	4,2	0,4	2,62
19	JPI	0,3	4,4	6,7	2,7	3,5	16,6
20	BP	13,85	9,02	1,4	5,4	4,2	-
21	SR	11,4	6,8	5,7	5,2	14,3	14,29
22	AS	5,8	4,8	4,4	3,9	2,3	4,1
23	MS	26,6	33,2	3,0	3,8	111,28	126,5
24	DŚ	6,9	5,2	7,2	3,2	0,8	1,9
25	MZ	9,8	15,0	4,1	4,6	52,9	19,9

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych

1⁰/2⁰ - odpowiednio: oznaczenie wyjściowe i po \geq 12 tygodniach

Zał. nr 9. Analiza dodatkowego ryzyka prozakrzepowego w podgrupie chorych z przebytymi żylnymi powikłaniami zakrzepowymi w przebiegu APS

N	Inicjały	b.C (%)	aPCR	b.S (%)	AT (%)	Fbgn (g/l)	Dimer-D (ng/ml)	↑ Plt
1	BA	113,7	1,91	97	104	6,25	3278,07	nie
2	JC	11,13	2,73	101	81	3,44	110,65	nie
3	EF	99,89	2,44	61,5	89	4,13	144	nie
4	ZG?	>120	3,18	116	93	3,55	173,06	nie
5	LH	86,9	1,82	67,6	81	5,18	368,6	
6	MJ	91,9	3,09	2%	72	2,99	211,66	nie
7	AJ	63,43	1,06	83	88	3,84	471,9	
8	AJur.	45,6	1,95	107,3	84	5,7	1361	nie
9	KK	92	2,61	72,6	108	5,47	144,23	nie
10	PK	67,86	2,34	96,5	85	1106	1106,4	nie
11	SK	96,01	2,67	95,7	95,5	3,17	174,99	nie
12	MK	108	2,96	112,9	83,5	3,31	83,0	nie
13	KM	96	2,44	96	81	6,61	555,03	nie
14	MMę	107,67	2,44	78,5	97	5,22	163,66	nie
15	MM	107,7	2,44	78,5	97	5,22	163,66	nie
16	CM	94,9	2,73	84,2	99	4,06	720,87	nie
17	MN	62,09	2,79	77	75	3,92	367,68	nie
18	WP	136,3	2,26	108,3	97	-	208,85	nie
19	JPl	131,8	2,75	88	77	4,41	171,42	nie
20	BP	87,09	2,62	59,8	100	3,12	366,81	nie
21	SR	126,4	2,21	121,3	88	3,94	76,34	nie
22	AS	95,58	2,44	88,1	83	2,53	97,61	nie
23	MS	89,92	2,45	114	93	4,03	128,79	nie
24	DŚ	71,6	2,84	92,6	98	5,25	282,0	nie
25	MZ	85,58	2,83	141,8	102	5,41	3448,0	nie

N - liczba kolejna

n- zakres wartości referencyjnych odpowiednio - białko C (b. C) : 65-140%; oporność na aktywowane białko C (aPCR):

< 2,0; białko S (b.S): >50%; antytrombina (AT): 75,6-122%; fibrynogen (Fbgn): 1,69-3,92g/l; dimer-D: > 500ng/ml; nadpłytkowość (↑ Plt): > 450G/l

PIŚMIENNICTWO:

1. Niżankowski R, Pruszczyk P, Torbicki A i wsp. Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa, Interna Szczeklika, Medycyna Praktyczna, Kraków 2012, 486-495.
2. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBO Study Group. Groupe d'Etudes de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost* 2000; 83: 657-660.
3. Nordstrom M, Lindblat B, Berqvist D i wsp. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med* 1992; 232: 155-160.
4. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA i wsp. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007; 98: 756-764.
5. Nainggolan L, Barclay L. World needs to ENDORSE better VTE prevention. *Medscape Medical News*; 06.02.2008: art.569795.
6. Heit JA, Cohen AT, Anderson FA Jr. On behalf of the VTE Impact Assessment Group. Estimated annual number of incident and recurrent, non-fatal and fatal venous thromboembolism (VTE) events in the US. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005; 106: Abstr. 910.
7. Rand JH. The antiphospholipid syndrome. Pathogenic mechanisms, diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003: 510-519.
8. Musiał J, Zespół antyfosfolipidowy., Interna Szczeklika, Medycyna Praktyczna, Kraków 2012, 1812-1816.
9. Zawilska K. Przeciwciała antyfosfolipidowe – czynnik zagrożenia żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i zakrzepicą tętniczą. *PoL. Arch Med Wew.* 2007; 117 (suppl.): 41-45.

10. Zawilska K. Zaburzenia hemostazy w zespole antyfosfolipidowym w świetle nowych badań. *Pol Arch Med Wewn.* 2006; 115 (5): 491-499.
11. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi Ros J i wsp. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: A European Multicenter Study of 114 patients. *Am J Med.* 1994; 96 (1): 3-9.
12. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T i wsp. International Consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 295-306.
13. Erkan D, Lockshin MD. What is antiphospholipid syndrome? *Curr Rheum Reports.* 2004; 6: 451-457.
14. Galli M, Borelli, Jacobsen EM. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood* 2007; 110: 1178-1183.
15. Rand JH. A snappy new concept for APS. *Blood* 2010; 116 (8): 1193-1194.
16. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant: an update . *Thromb Haemost.* 1995; 74, 1185-1190.
17. Arnout J, Jankowski M. Antiphospholipid syndrome. *Hematol J.* 2004; 5 (suppl 3): S1-S5
18. Undas A. Badania laboratoryjne w ocenie układu krzepnięcia i fibrynolizy. *Leczenie przeciwzakrzepowe.* 2007: 93-95.
19. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P i wsp. Participating Centers of Italian Federation of Thrombosis Centers (FCSA). Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 925-930.
20. De Groot PG, Lutters B, Derksen RHW i wsp. Lupus anticoagulant and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1993-1997.

21. Swadźba J, Iwaniec T, Szczeklik A. Revised classification criteria for antiphospholipid syndrome and the thrombotic risk in patients with autoimmune diseases. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1883-1889.
22. Galli M, Luciani D, Bertolini G i wsp. Anti-beta 2 glycoprotein I, antiprothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102: 2717-2723.
23. Ortel TL. Thrombosis and the antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005: 462-468.
24. Atsumi T, Bertolaccini ML, Koike T. Genetics of antiphospholipid syndrome. *Rheum DIS Clin North am* 2001, 27: 565-572.
25. Rand JH. Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Circ Res* 2002, 90: 29-37.
26. Hudson M, Herr Al, Rauch J i wsp. The presence of multiple prothrombotic risk factors is associated with a higher risk of thrombosis in individuals with anticardiolipin antibodies. *J Rheumatol* 2003, 30: 2385-2391.
27. Cugno M, Cabibbe M, Galli M. Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients. *Blood* 2004; 103: 2121-2126.
28. Yasuda s. Atsumi T, Ieko M. Nicked beta₂-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* 2004; 103: 3766-3772.
29. Korbach DA, van Oort E, Lisman T. β₂-glycoprotein I is proteolytically cleaved in vivo upon activation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 87-95.
30. Guerin J, Sheng Y, Reddel S. Heparin inhibits the binding of β₂-glycoprotein I to phospholipids and promotes the plasmin-mediated inactivation of this blood protein:

elucidation of the consequences of two biological events in patients with antiphospholipid syndrome. *J. Biol Chem* 2002; 277: 2644-2649.

31. Lutens BC, Meiers JC, Derksen RH. Dimers of β_2 -glycoprotein I mimic the in vitro effects of β_2 -glycoprotein I-anti- β_2 -glycoprotein I antibody complexes. *J Biol Chem* 2001; 276:3060-3067.

33. Sikara MP, Routsias JG, Samiotaki M i wsp. β_2 Glycoprotein I (β_2 GPI) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 115(3):713-23.

33 - De Laat B, Derksen RHW, Urbanus RT i wsp. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β_2 -glycoprotein I cause LAC and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005; 105: 1540-1545.

34. Groot PG, Derksen RHW. Antiphospholipid antibodies: update on detection, pathophysiology and treatment. *Curr Opin Hemat* 2004; 11:165-169.

35. Lutens BC, Derksen RH, Tekelenburg WL. Dimers of β_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.

36. Vega Ostertag ME, Pierangeli SS. Mechanisms of aPL – mediated thrombosis: effects of aPL on endothelium and platelets. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9: 190-197.

37. Forastiero R. Antiphospholipid syndrome: new light comes from in vivo studies. *J Tromb Haemost* 2007; 5: 1825-1827.

38. de Groot G, Derksen RHW. New concepts concerning the antiphospholipid syndrome. *Hematology EU Hematol Association Educ Prgram* 2006; 2(1): 212-215.

39. Raschi E, Testoni C, Bosisio D. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Immunobiology* 2003; 207: 29-36.

40. Pierangeli SS, Chen PP, Gonzalez EB. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: an update on treatment and pathogenic mechanisms. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 366-375.
41. Meroni PL, Riboldi P. Pathogenic mechanisms mediating antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheum* 2001; 113: 37-82.
42. Greer IA. Endothelial cell microparticles and antiphospholipid syndrome: pathologic explanations and diagnostic opportunities. *Thromb Haemost*. 2004; 91:636-638.
43. Holers VM, Girardi G, Mo L i wsp. C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002; 195: 211-220.
44. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag ME i wsp. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2120-2124.
45. Girardi G, Berman J, Redecha P i wsp. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003; 112: 1644-1654.
46. Fischetti F, Durigutto P, Pelis V i wsp. Thrombus formation induced by antibodies to β_2 -glycoprotein I is complement-dependent and requires a priming factor. *Blood* 2005; 106: 2340-2346.
47. Morel O, Toti F, Hugel B i wsp. Cellular microparticles : a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 156-164.
48. Cockrell E, Espinola R, McCrae KR. Microparticles as a predictor of acute deep venous thrombosis in a patient with antiphospholipid antibody syndrome. *Blood*. 2007; 110 (11): abstr. 3984.
49. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F i wsp. Endothelial microparticles and antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*; 2004; 91: 667-673.

50. Meroni PL, Raschi E, Testoni C i wsp. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid antibodies (anti β_2 glycoprotein I):effect of the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2870-2878.
51. Ferrara DE, Swerlick R, Casper K i wsp. Fluvastatin inhibits upregulation of tissue factor expression by antiphospholipid antibodies on endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1558-1563.
52. Musial J, Rys D, Brozek J i wsp. Thrombin generation and statin therapy in patients with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 614-615.
53. Vega-Ostertag ME, Ferrara DE, Romay-Penabad Z i wsp. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1828-1834.
54. Ruiz-Irastorza G., Crowther M., Branch W, Kamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376: 1498-1509.
55. Lim W, Crowther MA. Antiphospholipid antibodies: a critical review of the literature. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 494-499.
56. Skrzypczak J. Leczenie zespołu antyfosfolipidowego w ciąży. *Pol Arch Med Wew.* 2007; 117 (suppl.): 50-53.
57. Ho KT, Ahn W, Alarcon GS i wsp. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort (LUMINA): XXVIII. Factors predictive of thrombosis events. *Rheumatology*.2005; 44: 1303-1307.
58. Erkan D, Harrison MJ, Levy R. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008; 4: 14-15.

59. Potti A, Bild A, Dressman HK i wsp. Gene-expression patterns predict phenotypes of immune-mediated thrombosis. *Blood*. 2006; 107:1391-1396.
60. Dahlback B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J. Clin Invest* 1994; 94: 923-7.
61. Asherson RA, Carvera R, de Groot PGI i wsp. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12: 530-534.
62. Musiał J. Zespół antyfosfolipidowy - soczewka medycyny. *Pol Arch Med Wewn.* 2007; 117 (1-2): 41-43.
63. Cervera R, Font J, Gómez-Puerta JA i wsp. Validation of the preliminary criteria for the classification of catastrophic antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1205-1209.
64. Pengo V, Bison E, Ruffati A, Iliceto S. Antibodies to oxidized LDL/ β_2 -glycoprotein I in antiphospholipid syndrome patients with venous and arterial thromboembolism. *Thromb Res* 2008; 122 (4): 556-559.
65. Danowski A, de Azevedo MN, de Souza Papi JA, Petri M. Determinations of risk for venous and arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and in antiphospholipid syndrome with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol* 2009; 36 (6) 1195 - 1199.
66. Pengo V. Antiphospholipid syndrome: interpretation of laboratory data. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 402-403.
67. Reddel SW, Krillis SA. Testing for and clinical significance of anticardiolipin antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 775-782
68. Čučnik S, Kveder T, Artenjak A i wsp. Avidity of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012 Jun; 21: 764-765.

69. Pengo V, Ruffati A, Legnani C i wsp. Clinical course of high risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 237-242.
70. Metjian A, Lim W. ASH evidence-based guidelines: should asymptomatic patients with antiphospholipid antibodies receive primary prophylaxis to prevent thrombosis? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:247-249.
71. Bruce IN. "Not only...but also": factors that contribute to accelerated atherosclerosis and premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2005; 44: 1492-1502.
72. Calvo Alen J, Toloza SM, Fernandez M i wsp. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXV. Smoking, older age, disease activity, lupus anticoagulant and glucocorticoid dose as risk factors for the occurrence of venous thrombosis in lupus patients. *Arthritis Rheum*. 2005; 44: 1492 - 1502.
73. Giron-Gonzales JA, Garcia del Rio E, Rodriguez C i wsp. Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals. *J Rheumatol*. 2004; 31: 1560 - 1567.
74. Tufano A, Guida A, Di Minno MN i wsp. Cardiovascular events in patients with antiphospholipid antibodies: strategies of prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*; 2010; 20: 217 - 223.
75. Goodnight SH, Griffin JH. Hereditary thrombophilia. *Williams Haematology*, 2001; 1697-1714
76. van der Meer FJ, Koster T, Vandenbroucke JP i wsp. The Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):631-5.
77. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW i wsp. 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.

78. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krillis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood*; 2009; 113: 985-994.
79. Ambrozic A, Avicin T, Ichikawa K i wsp. Anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Int Immunol*. 2002; 14: 832 - 830.
80. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C i wsp. Antibody profiles for the diagnosis of anriphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 93: 1147 - 1152.
81. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P i wsp. A comparison of lupus anticoagulant-positive patients with clinical picture of antiphospholipid syndrome and those without. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: e309 - 310.
82. de Groot PG, Lutters B, Derksen RH i wsp. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1993 - 1997.
83. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulant are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systemic review of the literature. *Blood* 2003; 101: 1540- 1545.
84. Agar C, van Os GM, Mörgelin M i wsp. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116: 1336-1343.
85. Urbanus RT, Siegierink B, Rosest M i wsp. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol* 2009; 8: 998 - 1005.
86. Linnemann B, Schindewolf M, Zgouras D i wsp. Are patients with thrombophilia and previous venous thromboembolism at higher risk to arterial thrombosis? *Thromb Res* 2008; 121: 743-745.

87. Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T i wsp. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost.* 2006; 96: 337 - 341
88. Pengo V, Biasiolo A, Rampazzo P, Brocco T. dRVVT is more sensitive than KCT or TTI for detecting lupus anticoagulant activity of anti- β_2 -Glycoprotein I autoantibodies. *Thromb Haemost* 1999; 81: 256 - 258.
89. Galli M, Reber G, de Moerloose P. Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 399-401.
90. Wachal K, Majewski W, Kopydłowska A. Częstość występowania pierwotnego zespołu antyfosfolipidowego u chorych z obwodowymi zaburzeniami w tętnicach kończyn dolnych lub górnych. *Acta Angiologia* 2008; 14 (Suppl A): abstr. 16.