

Ocena przydatności różnych przeciwciał antyfosfolipidowych w diagnostyce wtórnego zespołu antyfosfolipidowego w przebiegu toczenia rumieniowatego układuowego – przegląd literatury i obserwacje własne

Usefulness different antiphospholipid antibodies in the assessment of the secondary antiphospholipid syndrome in lupus erythematosus patients – review and own experiences

Lidia Ostanek, Marek Brzosko, Katarzyna Fischer

Klinika Reumatologii Pomorskiej Akademii Medycznej, kierownik Kliniki dr hab. med. Marek Brzosko

Słowa kluczowe: zespół antyfosfolipidowy, toczeń rumieniowaty układuowy, przeciwciała przeciwkardioli-pinowe, przeciw protrombinie, przeciw β 2GPI.

Key words: antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus, anticardiolipin antibodies, antiprothrombin antibodies, anti- β 2GPI antibodies.

Streszczenie

W kryteriach diagnostycznych zespołu antyfosfolipidowego (APS) uwzględnia się obecność przeciwciał antykardioli-pinowych (aCL) i antykoagulantu toczenia (LA). Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie wykazały, że przeciwciałami antyfosfolipidowymi (aPLs) o istotnym znaczeniu patogenetycznym w rozwoju APS są również inne przeciwciała, z czego największe znaczenie mają przeciwciała przeciw protrombinie (aPT) i przeciw β_2 -glikoproteinie I (a β 2GPI). Autorzy przedstawiają przegląd literatury dotyczącej występowania i klinicznego znaczenia tych przeciwciał oraz własne doświadczenia.

Zespół antyfosfolipidowy (APS) jest niezapalną układową chorobą tkanki łącznej, charakteryzującą się skojarzeniem żyłnej lub tętniczej zakrzepicy i/lub powtarzającej się utraty ciąży z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (aPLs) w surowicy. Może występować jako postać wtórna, najczęściej w przebiegu innej choroby układowej tkanki łącznej, głównie toczenia

Summary

The presence of anticardiolipin antibodies (aCL) and lupus anticoagulant (LA) is considered among diagnostic criteria of antiphospholipid syndrome (APS). Studies during the last decade revealed that also other antibodies, mainly antiprothrombin antibodies and anti- β_2 -glycoprotein I (a β 2GPI), belong to antiphospholipid antibodies, which play significant role in the developing of APS. The review of papers on incidence and clinical significance of the antibodies, as well as own experiences are presented.

rumieniowatego układuowego (TRU), przewlekłych chorób zapalnych, infekcji oraz nowotworów, lub jako postać pierwotna, gdy nie towarzyszy żadnej innej chorobie. Warunkiem niezbędnym do rozpoznania APS jest spełnienie przynajmniej jednego kryterium klinicznego oraz stwierdzenie obecności aPLs, co zgodnie z kryteriami oznacza występowanie przeciw-

Adres do korespondencji:

dr med. Lidia Ostanek, Klinika Reumatologii, Pomorska Akademia Medyczna, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin, tel. +48 91 425 33 37, faks +48 91 425 33 44, e-mail: lidia-55@go2.pl

ciał antykardiolipinowych (aCL) i/lub antykoagulantu toczniowego (LA) [1].

Przeciwciała antyfosfolipidowe są heterogenną grupą przeciwciał wiążących fosfolipidy, białka lub kompleksy fosfolipidowo-białkowe. Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie wykazały, że pojęcie aPLs jest szersze niż to pierwotnie oceniano, a LA obejmuje gamę przeciwciał wiążących się z fosfolipidami uczestniczącymi w procesie krzepnięcia [2].

Kardiolipina (CL) jest historycznym antygenem do oznaczania aPLs. Obecnie wiemy, że autoprzeciwciała obecne u chorych na APS i wykrywane rutynowymi testami skierowane są przeciwko innym wiążącym fosfolipidy białkom osocza, głównie β_2 -glikoproteinie I (β_2 GPI) i protrombinie (PT). Istnieje wiele innych przeciwciał, niewykrywanych konwencjonalnymi testami, które również mają związek z występowaniem APS.

Kardiolipina jest syntetyzowana w mitochondriach, następnie remodelowana i przemieszczana na zewnętrzną powierzchnię błony mitochondrialnej. Wykazano, że CL jest eksponowana na błonie plazmatycznej komórek ulegających apoptozie indukowanej przez Fas lub TNF α . Podczas apoptozy dochodzi do wczesnej degradacji mitochondrialnej CL, w wyniku czego powstaje jej bezpośredni metabolit – monolysokardiolipina (MCL) [3]. Zaobserwowano wysoką reaktywność surowic pacjentów z APS i TRU w stosunku do MCL. Jest więc możliwe, że apoptoza lub proces zapalny wzmagają hydrolizę CL do jej metabolitu – MCL i, zwiększając dostępność do powierzchni komórki, prowadzą w konsekwencji do produkcji autoprzeciwciał [4].

W 1990 r. 3 niezależne grupy badaczy zasygnalizowały istnienie kofaktora niezbędnego dla wiązania aCL z fosfolipidami [5]. Zidentyfikowano go jako β_2 GPI lub inaczej apolipoproteinę H. Wykazano, że β_2 GPI występuje w normalnej ludzkiej surowicy i osoczu, pełni rolę fizjologicznego antykoagulantu oraz opsonin, m.in. w stosunku do liposomów, oraz podtrzymuje funkcje życiowe komórek endotelialnych. W chorobach autoimmunologicznych, w przeciwieństwie do infekcji, jest niezbędna jako kofaktor dla aCL [6]. Wieloośrodkowe badania kliniczne 574 chorych na TRU wykazały, że aCL klasy IgG, IgM i IgA występują odpowiednio u 22,8%, 14% i 13,9% chorych, a przeciwciała przeciw β_2 GPI (a β_2 GPI) u 20% chorych na TRU. Występował ścisły związek pomiędzy jednoczesnym występowaniem obu grup przeciwciał, przy czym aCL-IgG i a β_2 GPI-IgG wyraźnie korelowały z występowaniem zakrzepicy, aCL-IgG z małopłytkowością, aCL-IgM z niedokrwistością hemolityczną i objawami mózgowo-naczyniowymi, a aCL-IgA z *livedo reticularis* i objawem Raynauda [7]. Bruce i wsp. [8] stwierdzili obecność a β_2 GPI u 36,8% chorych na TRU, u 40,4% chorych na TRU z klinicznymi objawami APS i u 34,9% chorych na TRU bez objawów APS. Hashimoto i wsp. [9] wy-

kazali, że a β_2 GPI występują u 20% chorych na TRU. W tej grupie istotnie częściej występowały napady padaczki, powikłania zakrzepowe żyłne i tętnicze oraz częściej obserwowano więcej niż jeden objaw APS. Związek obecności a β_2 GPI z zakrzepicą u chorych na TRU potwierdzają również inni autorzy i są one uznawane za czynnik ryzyka rozwoju zakrzepicy w tej grupie chorych [10]. Inni badacze [11] podkreślają, że u chorych na TRU i inne choroby tkanki łącznej obecność a β_2 GPI w klasie IgG wyraźnie korelowała z zamknięciem światła naczyń tętniczych i/lub żylnych, natomiast a β_2 GPI-IgM z małopłytkowością. San Marco i wsp. [12] wykazali, że a β_2 GPI istotnie częściej występują w APS (76%) niż w TRU (15%), a β_2 GPI-IgG są wysoce swoiste dla APS (92%), podczas gdy swoistość aCL dla APS wynosi tylko 68%. Jednocześnie stwierdzono wysoką korelację występowania obu grup tych przeciwciał u chorych na APS (OR: 29; 95%CI 10–76). Interesujące jest, że w APS dominują izotypy IgG obu grup przeciwciał, podczas gdy w TRU nie obserwuje się takiego różnicowania izotypów przeciwciał.

Lopez i wsp. [13], na podstawie badań 100 chorych na APS i 90 na TRU, wykazali wyraźny związek obecności a β_2 GPI i przeciwciał przeciw fosfatydyloserynie z zakrzepicą naczyń tętniczych. Te przeciwciała cechowały się najwyższą swoistością w diagnostyce APS. Galli i wsp. [14] wykazali związek aCL-IgG z zakrzepicą tętniczą, a a β_2 GPI-IgM z zakrzepicą żylną. Zgodnie z badaniami Lakos G. i wsp. [15], największe znaczenie kliniczne i diagnostyczne dla APS mają izotypy IgG i IgA a β_2 GPI, przy czym obecność a β_2 GPI klasy IgA wiązała się z występowaniem zakrzepicy żyłnej, małopłytkowości, zmian w aparacie zastawkowym serca, *livedo reticularis* i padaczki, a a β_2 GPI klasy IgG z obecnością LA i większości objawów APS. Obecność przeciwciał klasy IgM wiązała się z małopłytkowością i nieprawidłowościami w aparacie zastawkowym serca. Również Tubach i wsp. [16], tak jak większość badaczy, podkreślają znaczenie a β_2 GPI i LA w diagnostyce APS. W badaniach Koskenmisa i wsp. [17] aCL klasy IgG samodzielnie lub w kombinacji z a β_2 GPI i przeciwciałami przeciw ox-LDL okazały się czułym i specyficznym testem wysokiego ryzyka powikłań zakrzepowych u chorych na TRU, przy czym obecność aCL-IgG, a β_2 GPI i przeciwciał przeciw protrombinie (aPT) wiązała się z ryzykiem rozwoju zakrzepicy tętniczej.

Mimo częstego współistnienia aCL i a β_2 GPI manifestacje kliniczne APS mogą się różnić w zależności od występowania poszczególnych grup przeciwciał. Wykazano np., że powikłania połoźnicze, związane z rozwojem nadciśnienia i rzucawką występują tylko u pacjentów z obecnością a β_2 GPI [18].

Protrombina, podobnie jak β_2 GPI, jest jednym z wielu białek wiążących fosfolipidy. Jako prawdopodobny kofaktor o aktywności LA została po raz pierwszy opisana w 1959 r. Jest glikoproteiną zależną od witaminy K, synte-

tyzowaną w komórce wątrobowej. Posiada γ -karboksylglutaminową resztę, często określaną jako Gla-domena, która jest niezbędna do wiązania fosfatydyloseryny w obecności jonów wapnia. Protrombina jest aktywowana przez kompleks protrombinazy zawierający czynnik Va, Xa, fosfolipidy i jony wapnia. *In vivo* jest rozszczepiana na fragmenty: 1+2 oraz trombinę α . Trombina wiąże trombomodulinę na powierzchni komórki endotelialnej i aktywuje białko C. Wykazano, że przeciwciała przeciw fosfolipidom wiążącym PT, jak też przeciw B2GPI, należą do składowych odpowiedzialnych za aktywność LA [19].

Przeciwciała przeciw PT są grupą heterogenną, a ich znaczenie diagnostyczne jest uzależnione od stosowanych metod badawczych [14, 19, 20]. Najczęściej oznaczane są w kompleksie z fosfatydyloseryną (PS). Obecność przeciwciał przeciw kompleksowi PT/PS ściśle koreluje z występowaniem LA [21]. Amengual i wsp. [22] wykazali, że występowanie przeciwciał przeciw kompleksowi PT/PS, a nie przeciw PT, istotnie koreluje z klinicznymi objawami APS (OR: 8,29; 95%CI: 3,03–22,71, vs OR: 1,89; 95%CI: 0,71–55,06). Ponadto przeciwciała przeciw PT/PS, w przeciwieństwie do aPT, ściśle współistniały z LA. Przeciwciała przeciw PT są silnym markerem APS, a w powiązaniu z innymi aPLs wyraźnie zwiększają czułość diagnostyczną dla APS [21].

Proponuje się następujące hipotezy dotyczące patogenetycznej roli aPT [20]:

- aPT hamują modulujący wpływ trombiny na komórki endotelium, co może upośledzać uwalnianie prostacykliny i hamować aktywację białka C,
- aPT rozpoznają kompleks PT/anion fosfolipidowy na powierzchni komórek endotelialnych, co indukuje reakcje prozakrzepowe przy udziale protrombiny,
- aPT mogą zwiększać powinowactwo protrombiny do fosfolipidów i dzięki temu indukować mechanizmy zakrzepowe.

Te hipotezy potwierdzają także wyniki badań Simmelink i wsp. [23]. Guerin i wsp. [24] opisali występowanie aPT w różnych chorobach zapalnych, włączając APS i TRU, przy czym nie potwierdzili ich swoistości dla APS. Podkreślają jednocześnie współistnienie tych przeciwciał z innymi niż zakrzepica objawami APS, takimi jak utraty ciąży i małopłytkowość. Puurunen i wsp. [25] wykazali obecność aPT u 34 proc. chorych na TRU. Potwierdzili pozytywną korelację tych przeciwciał i a β 2GPI z zakrzepicą żylną w tej populacji. Inni badacze [26] wykazali, że aPT istotnie częściej występują w grupie chorych z rozpoznaniem APS w porównaniu z tymi, u których kryteriów APS nie stwierdzano. Żylne i tętnicze powikłania zakrzepowe istotnie częściej występowały w grupie chorych z obecnością aPT i przeciwciał przeciw aneksynie V (aANV). Obie grupy przeciwciał charakteryzowały się wysoką swoistością w odniesieniu do APS. Na tej

podstawie autorzy wyciągnęli wniosek, że oznaczanie aPT i aANV może potwierdzać rozpoznanie APS i oceniać ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowych u chorych.

Nojima i wsp. [27] potwierdzili, że współistnienie aPT-IgG i LA stanowi czynnik ryzyka dla rozwoju żylnych epizodów zakrzepowo-zatorowych u chorych na TRU (OR: 19,1; 95%CI: 4,7–77,1). W badaniach Ishikury i wsp. [28] wykazano, że aPT stwierdzane u 18,2% chorych na TRU cechowała umiarkowana korelacja z powikłaniami zakrzepowymi u chorych na TRU i APS, natomiast LA występujący u 23,3% chorych na TRU okazał się najbardziej czułym, choć mało swoistym markerem dla APS. Był istotnym czynnikiem ryzyka dla zakrzepicy żyłnej i zatorowości płucnej w TRU. Przeciwciała przeciw B2GPI występowały u 45,5% chorych na TRU i były wysoce specyficzne dla udarów niedokrwiennych mózgu w tej grupie chorych. Stanowiły istotny czynnik ryzyka wystąpienia powikłań zakrzepowych, zwłaszcza tętniczych.

W badaniach własnych autorzy poddali analizie grupę 129 chorych na TRU. W badanej grupie było 114 kobiet i 15 mężczyzn, w wieku 15–74 lat (średnio 42 lata). Czas trwania choroby wynosił 0,5–27 lat (średnio 6 lat). U wszystkich chorych oznaczono: aCL, a β 2GPI, aPT, LA, jak również przeciwciała przeciwjądrowe i przeciw rozpuszczalnym antygenom jądrowym (ENA), przeciw ziarnistościom cytoplazmy granulocytów (ANCA), przeciw-endotelialne. Obecność przeciwciał odniesiono do objawów wtórnego zespołu antyfosfolipidowego (SAPS) i manifestacji klinicznych w przebiegu TRU. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testów χ^2 Pearsona, χ^2 Yatesa, korelacji rang Spearmana i analizy regresji logistycznej.

Najwyższą czułością w diagnostyce SAPS w przebiegu TRU cechowały się aCL w klasie IgG (82,61%) i a β 2GPI w teście *screen* (63,64%), a swoistością: a β 2GPI klasy IgG (100,0%) i aPT-IgG (95,12%).

Serologicznymi czynnikami ryzyka dla rozwoju SAPS w przebiegu TRU okazały się prawie wszystkie oznaczone aPLs, z wyjątkiem aPT-IgA, ale najwyższe wartości OR uzyskano dla a β 2GPI-IgG (51,72), aCL-Ig (44,53) i aCL-IgM (12,3).

Przeciwciała przeciwkardiolipinowe w klasie IgG ponad 3-krotnie zwiększały ryzyko zakrzepicy i ponad 6-krotnie ryzyko niepowodzeń położniczych. Przeciwciała przeciw PT klasy IgM istotnie zwiększały ryzyko powikłań kardiologicznych i mononeuropatii, aPT-IgG korelowały z obecnością objawów ze strony ośrodkowego układu nerwowego (w tym padaczki), a aPT-IgA z leukopenią i zapaleniem opłucnej. Przeciwciała przeciw β 2GPI w klasie IgG ponad 7-krotnie zwiększały ryzyko niepowodzeń położniczych (obecność LA ryzyko niepowodzeń położniczych zwiększała 4-krotnie), były istotnym czynnikiem ryzyka małopłytkowości oraz wy-

stępowania objawów ze strony ośrodkowego układu nerwowego (ból głowy i zespoły *SM-like*).

W opinii autorów oznaczanie przeciwciał przeciw B2GPI i przeciw protrombinie istotnie zwiększa możliwości diagnostyczne w grupie chorych z podejrzeniem wtórnego zespołu antyfosfolipidowego w przebiegu TRU i powinno być stosowane jako marker diagnostyczny w praktyce klinicznej.

Piśmiennictwo

1. Wilson WA. Classification criteria for antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27: 499-505.
2. Galli M, Barbui T. Prevalence of different anti-phospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and their relationship with the antiphospholipid syndrome. *Clin Chem* 2001; 47: 985-7.
3. Sorice M, Circella A, Misasi R, et al. Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipids antibodies. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 277-84.
4. Pittoni V, Valesini G. The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2002; 1 (3): 154-61.
5. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990; 87: 4120-4.
6. Tincani A, Balestrieri G, Spatola L, et al. Anticardiolipin and anti-beta 2glycoprotein I immunoassays in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 396-402.
7. Sebastiani GD, Galeazzi M, Tincani A, et al. Anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. Prevalence and clinical associations. European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. *Scand J Rheumatol* 1999; 28: 344-51.
8. Bruce IN, Clark-Soloninka CA, Spitzer KA, et al. Prevalence of antibodies to beta2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and their association with antiphospholipid antibody syndrome criteria: a single center study and literature review. *J Rheumatol* 2000; 27: 2833-7.
9. Hashimoto H, Yamanaka K, Tokano Y, et al. HLA-DRB1 alleles and beta 2 glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 423-7.
10. Gomez-Pacheco L, Villa AR, Drenkard C, et al. Serum anti-beta2-glycoprotein-I and anticardiolipin antibodies during thrombosis in systemic lupus erythematosus patients. *Am J Med* 1999; 106: 417-23.
11. Voss A, Jacobsen S, Heegaard NH. Association of beta2-glycoprotein I IgG and IgM antibodies with thrombosis and thrombocytopenia. *Lupus* 2001; 10: 533-8.
12. Sanmarco M, Roll P, Gayet S, et al. Combined search for anti-beta2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in antiphospholipid syndrome: contribution to diagnosis. *J Lab Clin Med* 2004; 144: 141-7.
13. Lopez LR, Dier KJ, Lopez D, et al. Anti-beta 2-glycoprotein I and antiphosphatidylserine antibodies are predictors of arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 142-9.
14. Galli M, Barbui T. Antiphospholipid syndrome: clinical and diagnostic utility of laboratory tests. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 17-24.
15. Lakos G, Kiss E, Regeczy N, et al. Isotype distribution and clinical relevance of anti-beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) antibodies: importance of IgA isotype. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 574-9.
16. Tubach F, Hayem G, Marchand JL, et al. IgG anti-beta2-glycoprotein I antibodies in adult patients with systemic lupus erythematosus: prevalence and diagnostic value for the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 2000; 27: 1437-43.
17. Koskenmies S, Vaarala O, Widen E, et al. The association of antibodies to cardiolipin, beta 2-glycoprotein I, prothrombin, and oxidized low-density lipoprotein with thrombosis in 292 patients with familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2004; 33: 246-52.
18. Faden D, Tincani A, Tanzi P, et al. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in a general obstetric population: preliminary results on the prevalence and correlation with pregnancy outcome. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies are associated with some obstetrical complications, mainly preeclampsia-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 73: 37-42.
19. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 886-95.
20. Galli M, Barbui T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 1999; 93: 2149-57.
21. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1982-93.
22. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 2004; 112: 144-9.
23. Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, et al. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol* 2001; 113: 621-9.
24. Guerin J, Smith O, White B, et al. Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. *Br J Haematol* 1998; 102: 896-902.
25. Puurunen M, Vaarala O, Julkunen H, et al. Antibodies to phospholipid-binding plasma proteins and occurrence of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: 16-22.
26. Lakos G, Kiss E, Regeczy N, et al. Antiprothrombin and antianxin V antibodies imply risk of thrombosis in patients with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* 2000; 27: 924-9.
27. Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, et al. Anti-prothrombin antibodies combined with lupus anti-coagulant activity is an essential risk factor for venous thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 2001; 114: 647-54.
28. Ishikura K, Wada H, Kamikura Y, et al. High prevalence of anti-prothrombin antibody in patients with deep vein thrombosis. *Am J Hematol* 2004; 76: 338-42.