

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
I. lékařská fakulta

MUDr. Oliver Kuchař

Antifosfolipidové protilátky a jejich avidita u vybraných skupin onemocnění

Antiphospholipid antibodies and their avidity in selected groups of diseases

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 27.1.2022

Oliver Kuchař

Identifikační záznam:

Kuchař Oliver. Antifosfolipidové protilátky a jejich avidita u vybraných skupin onemocnění [Antiphospholipid antibodies and their avidity in selected groups of diseases]. Praha, 2022, 132 s., 2 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK 2022. Školitel Fialová, Lenka.

Poděkování

Na tomto místě bych především rád poděkoval své školitelce MUDr. Lence Fialové, CSc. z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za odborné vedení, věcné připomínky, podněty a neutuchající vstřícnost, jak během celého mého postgraduálního studia, tak při sepisování této dizertační práce.

Zároveň bych chtěl moc poděkovat za výbornou spolupráci celému kolektivu Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, obzvláště paní laborantce Miladě Petráčkové.

Za klinickou část své práce děkuji především kolektivu Oddělení klinické biochemie Fakultní Thomayerovy nemocnice v Praze.

V neposlední řadě děkuji své rodině a zejména pak své přítelkyni MUDr. Marianně Klembarové za nedocenitelnou podporu.

Obsah	
Abstrakt.....	9
Abstract.....	11
Teoretická část	13
1. Úvod.....	13
2. Tromboembolická nemoc – TEN.....	15
2.1. Hluboká žilní trombóza – flebotrombóza – HŽT	16
2.1.1. Patogeneze HŽT	17
2.1.2. Diagnostika HŽT	17
2.1.3. Posttrombotický syndrom – PTS	18
2.1.4. Léčba HŽT	18
2.1.4.1. Antikoagulační léčba HŽT.....	19
2.1.4.2. Intervenční léčba HŽT	21
2.2. Plicní embolie – PE	22
2.2.1. Patogeneze PE.....	22
2.2.2. Diagnostika PE.....	22
2.2.3. Akutní masivní PE	24
2.2.4. Chronická tromboembolická plicní hypertenze	24
2.2.5. Léčba PE	24
3. Antifosfolipidový syndrom – APS	25
3.1. Etiopatogeneze APS.....	25
3.2. Diagnostika APS	26
3.3. Klinické projevy APS	28
3.4. Léčebná doporučení APS.....	29

3.5. Katastrofický APS – CAPS	30
4. Antifosfolipidové protilátky – APA	32
4.1. Historie APA.....	32
4.2. Charakteristika APA	33
4.3. Autoprotilátky u APS.....	33
4.3.1. Kriteriaální protilátky APS	34
4.3.1.1. Protilátky proti beta2-glykoproteinu I – anti-beta2GPI.....	34
4.3.1.2. Antikardiolipinové protilátky – ACLA	35
4.3.1.3. Lupus antikoagulans – LA.....	36
4.3.2. Vybrané nekriteriaální protilátky.....	36
4.3.2.1. Antitrombinové protilátky	37
4.3.2.2. Protilátky proti fosfatidyletanolaminu – aPE.....	37
4.3.2.3. Protilátky proti annexinu A5 a annexinu 2	37
5. Úloha APA při vzniku trombózy	38
5.1. Mechanismy vzniku trombózy prostřednictvím APA	39
5.1.1 Přímý vliv APA na funkci buněk.....	39
5.1.2 Vliv APA na hemostatickou rovnováhu	40
5.1.3. Vznik neutrofilních extracelulárních pastí vlivem APA.....	41
5.1.4. Indukce arteriální trombózy působením APA	41
5.2. Mechanismy endoteliální dysfunkce u trombotického APS	42
5.2.1. Zhoršená syntéza antitrombotických faktorů při APS	42
5.2.2. Zvýšená interakce mezi monocyty a endotelem při APS	43
5.2.3. Protrombotické endoteliální mikročástice uvolněné při APS	44
5.2.4. Komplement-dependentní aktivace endotelu při APS	44
6. Vyšetřování APA	46

6.1. Imunochemické stanovení	46
6.2. Avidita.....	48
6.2.1. Termín afinita a avidita	49
6.2.2. Metody stanovení avidity protilátek	49
6.2.3. Avidita APA.....	50
Experimentální část.....	52
7. Úvod.....	52
8. Studie 1 – Porovnání různých metod ELISA pro stanovení avidity APA	53
8.1. Úvod.....	53
8.2. Cíle studie	54
8.3. Materiály a metody	54
8.3.1. Soubor pacientů	54
8.3.2. Metody.....	55
8.3.2.1. Stanovení hladin ACLA.....	55
8.3.2.2. Stanovení avidity IgG ACLA	55
8.3.2.3. Vyjádření výsledků avidity	57
8.3.2.3.1. Metoda 1: jediné ředění séra, jediná koncentrace chaotropu.....	57
8.3.2.3.2. Metoda 2: různá ředění séra, jediná koncentrace chaotropu.....	57
8.3.3. Statistická analýza.....	59
8.4. Výsledky	59
8.4.1. Metoda 1: jediné ředění séra, jediná koncentrace chaotropů.....	59
8.4.2. Metody 2: různá ředění séra, jediná koncentrace chaotropů.....	60
8.4.3 . Vztah mezi AI při použití močoviny nebo NaCl	65
8.4.4. Avidita IgG u pacientů s vysokými hladinami ACLA.....	68
8.5. Diskuze	70

9. Studie 2 – Avidita APA ve vztahu k jejich hladinám.....	72
9.1. Úvod.....	72
9.2. Cíle studie	72
9.3. Materiál a metody	73
9.3.1. Soubor pacientů	73
9.3.2. Metody	73
9.3.2.1. Hladiny různých typů APA.....	73
9.3.2.2. Avidita ACLA IgG	74
9.3.3. Statistická analýza.....	75
9.4. Výsledky	75
9.4.1. Srovnání avidit ACLA IgG podle hladin ACLA IgG	75
9.4.2. Longitudinální hodnocení avidity ACLA IgG	76
9.4.3. Korelační analýzy	82
9.5. Diskuze	83
10. Studie 3 – Hladiny a avidita aPE protilátek u pacientů s trombotickými příhodami a imunologicky zprostředkovanými onemocněními.....	86
10.1. Úvod.....	86
10.2. Cíle studie	87
10.3. Materiál a metody	87
10.3.1. Soubor pacientů	87
10.3.2. Metody.....	89
10.3.2.1. Hladiny různých typů APA.....	89
10.3.2.2. Avidita aPE IgG.....	89
10.3.3. Statistická analýza.....	90
10.4. Výsledky	90

10.4.1. Mezní hodnoty (horní hranice) pro aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM	90
10.4.2. Hladiny testovaných APA u pacientů s TEN.....	91
10.4.3. Hladiny testovaných APA u pacientů s imunologicky zprostředkovanými poruchami	98
10.4.4. Avidita aPE IgG.....	99
10.4.5. Vztah mezi aPE a dalšími APA	102
10.5. Diskuze	102
11. Závěr z provedených studií.....	105
11.1. Studie 1: Porovnání různých metod ELISA pro stanovení avidity APA.....	105
11.2. Studie 2: Avidita APA ve vztahu k jejich hladinám	105
11.3. Studie 3: Hladiny a avidita aPE u pacientů s trombotickými příhodami a imunologicky zprostředkovanými onemocněními.....	106
12. Seznam zkratk	107
13. Literatura.....	110
14. Seznam publikací autora	131
15. Přílohy.....	132

Abstrakt

Heterogenita antifosfolipidových protilátek (APA) se může projevovat nejen v různé antigenní specifitě, ale také v jejich aviditě. Avidita APA se zdá být klinicky využitelná jako cenná doplňková charakteristika. U pacientů se séronegativním antifosfolipidovým syndromem (APS) byly zjištěny APA, které nejsou zahrnuty mezi laboratorní kritéria antifosfolipidového syndromu, tzv. nekriteriální protilátky. Antifosfatidylethanolaminové protilátky (aPE) představují jeden typ APA namířený proti neutrálním fosfolipidům - fosfatidylethanolaminům.

Hlavní cíle dizertační práce byly:

- 1) porovnat několik modifikací ELISA s různými chaotropními činidly pro stanovení avidity antikardiolipinových protilátek (ACLA),
- 2) prozkoumat vztah mezi aviditou ACLA IgG a jejich hladinami,
- 3) vyhodnotit hladiny a aviditu aPE jako příkladu nekriteriálních protilátek u několika skupin pacientů a porovnat je s konvenčními APA.

Pro srovnání různých metod pro stanovení avidity ACLA IgG jsme testovali upravenou metodou ELISA s použitím různých koncentrací močoviny a chloridu sodného jako chaotropních činidel a různého ředění sér. Hladiny a aviditu ACLA a aPE jsme analyzovali v séru pacientů s trombózami a imunologicky podmíněnými onemocněními. U části pacientů byly změny hladin APA a avidity dlouhodobě sledovány.

V metodické části práce jsme prokázali, že metoda ELISA pro stanovení avidity s využitím jednoho ředění séra v přítomnosti fixní koncentrace chaotropní látky je vhodná pro stanovení avidity protilátek ACLA IgG a je v dobré shodě s náročnějšími postupy.

Výsledky z klinické části práce ukázaly, že avidity ACLA se ve skupinách pacientů klasifikovaných podle hladin ACLA nelišily. aPE IgG/IgM byly signifikantně vyšší ve skupině pacientů s žilním tromboembolismem než u pacientů s netrombotickými interními poruchami. aPE IgG/IgM zvýšené nad námi stanovenými hraničními hodnotami byly zjištěny u 10,8 % pacientů s žilním tromboembolismem a jako jediná APA u 6,5 % těchto pacientů. Hladiny aPE IgG vyšší než naše mezní hodnoty byly zjištěny u 29 % pacientů s

imunologicky zprostředkovanými onemocněními s dalšími pozitivními APA. U pacientů obou kohort byly nalezeny avidity aPE IgG v rozmezí od nízkých až po vysoké hodnoty. Avidity aPE IgG se lišily od avidit ACLA IgG. Hladiny a avidity ACLA a aPE IgG se během sledování významně neměnily.

Výsledky našeho zkoumání rozšířily poznatky o aviditě APA a některých nekriteriálních APA po stránce metodologické i klinické. Zdá se, že avidita ACLA nemá žádný vztah k hladinám ACLA, ale patří ke stabilním charakteristikám. Dále jsme zjistili, že aPE může souviset s žilním tromboembolismem a může být součástí repertoáru APA u imunologicky zprostředkovaných onemocnění.

Klíčová slova: antifosfolipidové protilátky, antikardiolipinové protilátky, protilátky proti fosfatidyletanolaminu, antifosfolipidový syndrom, ELISA, avidita, chaotropní látky, močovina, chlorid sodný, tromboembolie, imunologicky zprostředkovaná onemocnění.

Abstract

The heterogeneity of antiphospholipid antibodies (APA) may be reflected not only in the specificity of different antigens but also in their avidity. APA avidity appears to be clinically useful as a valuable additional characteristic. APAs that are not included in the laboratory criteria for antiphospholipid syndrome (APS), the, so-called non-criteria antibodies, have been detected in patients with seronegative antiphospholipid syndrome. Antiphosphatidylethanolamine (aPE) antibodies represent one type of APA directed against neutral phospholipids, phosphatidylethanolamines.

The main objectives of this dissertation were:

- 1) to compare several modifications of ELISA with different chaotropic reagents for the determination of avidity of anticardiolipin antibodies (ACLA),
- 2) to investigate the relationship between ACLA IgG avidity and their levels,
- 3) to evaluate the levels and avidity of aPE as an example of non-criteria antibodies in several groups of patients and compare them with conventional APAs.

To compare different methods for determining the avidity of ACLA IgG, we tested a modified ELISA method using different concentrations of urea and sodium chloride as chaotropic reagents and different serum dilutions. We analyzed the levels and avidity of ACLA and aPE in the serum of patients with thrombosis and immunologically related diseases. In some patients, changes in APA and avidity levels were long-term monitored.

In the methodological part of the study, we demonstrated that the ELISA method for determination of avidity using a single dilution of serum in the presence of a fixed concentration of the chaotropic agent is suitable for determination of ACLA IgG avidity and is in good agreement with more challenging procedures.

The results of the clinical part of the study showed that the ACLA avidities did not differ between the groups of patients classified according to the ACLA levels. IgG/IgM aPEs were significantly higher in the group of patients with venous thromboembolism than in patients with nonthrombotic internal disorders. IgG/IgM aPEs elevated above our cutoff values were found in 10.8% of patients with venous thromboembolism and as the only APA in 6.5%.

Levels of aPE IgG levels higher than our cutoff values were found in 29% of patients with immunologically mediated diseases with other positive APAs. Avidities of aPE IgG ranging from low to high levels were found in patients from both cohorts. The avidities of aPE IgG differed from those of ACLA IgG. ACLA and aPE IgG levels and avidities did not change significantly during follow-up.

The results of our investigation extended the knowledge of the avidity of APA and some non-criteria APAs both methodologically and clinically. ACLA avidity does not seem to be related to ACLA levels, but is one of the stable characteristics. Furthermore, we found that aPE may be related to venous thromboembolism and may be part of the APA repertoire in immunologically mediated diseases.

Keywords: Antiphospholipid antibodies, anticardiolipin antibodies, antiphosphatidylethanolamine antibodies, antiphospholipid syndrome, ELISA, avidity, chaotropic agents, urea, sodium chloride, thromboembolism, immunologically mediated diseases.

Teoretická část

1. Úvod

Antifosfolipidové protilátky (APA) zahrnují velmi heterogenní skupinu autoprotilátek, namířených proti různým antigenním cílům (Misasi R. et al., 2015; Alessandri C. et al., 2011). Trvale zvýšené APA představují důležitý laboratorní nález u pacientů s antifosfolipidovým syndromem (APS), autoimunitním onemocněním, klinicky se manifestujícím především cévní trombózou a/nebo těhotenskými komplikacemi (Hughes G.R.V., 1983; Hughes G.R.V., 2014; Nikolova-Vlahova M.K. et al., 2015). Ty z APA, které mají vztah k APS jsou autoprotilátkami, které jsou ve skutečnosti zaměřeny proti makromolekulárním látkám vázaným většinou na negativně nabitě fosfolipidové povrchy. Tyto jsou obvykle funkční strukturou v systému krevního srážení (Bulíková A. a Penka M., 2006). Nejčastější klinickou manifestací APS je hluboká žilní trombóza (Cervera R. et al., 2009). Mezinárodní klasifikační kritéria pro APS zahrnují protilátky proti kardiolipinu (ACLA) IgG/IgM (imunoglobuliny izotypů G/M), proti beta2-glykoproteinu I (anti-beta2GPI) IgG/IgM a lupusové antikoagulanty (LA) (Miyakis S. et al., 2006). Protože ne všichni pacienti, kteří vykazují klinické známky APS, produkují kritériální APA, jsou intenzivně studovány a vyšetřovány tzv. nekriteriální APA. Mezi nekriteriální APA řadíme např. protilátky proti protrombinu (aPT), protilátky proti komplexu fosfatidylserin/protrombin (aPS/PT) nebo anti-beta2GPI proti doméně 1(anti-beta2GPI-D1) (Nayfe R. et al., 2013; Forastiero R., 2014; Sciascia S. et al., 2017; Bertolaccini M.L. et al., 2011).

Je známo, že hladina a avidita prezentují klíčové charakteristiky APA (Steward M.W., 1979). Avidita (funkční afinita) je důležitou vlastností protilátky související s její specifitou (Pohanka M., 2009). Je vyjádřena jako síla interakce mezi antigenem a odpovídající protilátkou, která je nezávislá na mechanismech řídících hladiny protilátek (Steward M.W. et al., 1979). Avidita autoprotilátek může hrát rozhodující roli v určitých orgánově specifických onemocněních spojených s autoprotilátkami (Gharavi A. a Reiber H., 1996). Čučník a kol.

potvrdili (2011, 2012), že vysokoavidní anti-beta2GPI protilátky jsou klinicky významnější než protilátky s nízkou aviditou. Přítomnost anti-beta2GPI s vysokou aviditou nebyla vzácná u pacientů s APS. Hlavní klinickou manifestací anti-beta2GPI s vysokou aviditou byla žilní trombóza, která naopak byla vzácná ve skupině pacientů s vysokým titrem protilátek, ale s nízkoavidními anti-beta2GPI.

S ohledem na výše uvedené poznatky se budu v dizertační práci zabírat problematikou APA především u pacientů s tromboembolismem (hluboká žilní trombóza, plicní embolie) a imunologicky podmíněnými nemocemi.

2. Tromboembolická nemoc – TEN

Definice TEN

Žilní tromboembolická nemoc je multifaktoriální onemocnění charakterizované vznikem krevní sraženiny (trombu) v určité části žilního řečiště a jeho následným vmetením (embolizací) do plic. TEN je jednou z hlavních příčin úmrtí v průmyslových zemích. Přitom u zdravé bílé populace jde o velmi vzácné onemocnění, které postihuje ve věku do 40 let méně než 0,01 % a ve věku od 40 do 60 let se vyskytuje pouze asi v 0,1–0,2% (Musil D., 2009). TEN klinicky zahrnuje dvě nozologické jednotky, a to hlubokou žilní trombózu (HŽT) a plicní embolii (PE).

Rizikové faktory vzniku TEN:

1. **vrozené rizikové faktory** – rezistence k aktivovanému proteinu C – nejčastěji vznikající v důsledku mutace koagulačního faktoru V - Leidenská mutace, mutace protrombinu, deficit antitrombinu, proteinu C, proteinu S, hyperhomocysteinémie, dysfibrinogémie, zvýšená hladina faktoru VIII, snížená hladina plazminogenu nebo aktivátoru plazminogenu,
2. **získané neovlivnitelné rizikové faktory** – věk, rodinná anamnéza, získaná rezistence k aktivovanému proteinu C, získaný deficit antitrombinu III, deficit proteinu C a proteinu S, zvýšení fibrinogenu, zvýšená aktivita faktoru VIII, IX, XI, APA,
3. **získané ovlivnitelné rizikové faktory** – sepse, obezita, maligní proces, myeloproliferativní choroby, nefrotický syndrom, těhotenství a postpartální období, varixy, akutní a chronické onemocnění,
4. **vlivy prostředí** – invazivní vstupy, operace, trauma, sádrová fixace, cestovní trombózy, imobilita, antikoncepce, kouření cigaret, neobvyklá fyzická zátěž.

Každý z uvedených rizikových faktorů je spojen s relativním rizikem vzniku trombózy. Relativní riziko vypovídá o tom, kolikrát určitý rizikový faktor zvyšuje nebezpečí vzniku

TEN ve srovnání se zdravými kontrolami stejného věku a pohlaví (Musil D., 2009). Z tohoto pohledu lze rizikové faktory rozdělit do dvou skupin (British Thoracic Society guidelines for the management of suspected acute pulmonary embolism, 2003; Lindhoff E. a Luxembourg B., 2008).

1. **Závažné rizikové faktory (relativní riziko 5–20)** – stavy po operaci (větší operace břicha a pánve, umělé náhrady kyčelních a kolenních kloubů), porodnictví (pozdní těhotenství, císařský řez, šestinedělí), fraktury dolních končetin, maligní onemocnění (břicho, pánev, metastázy), imobilizace na lůžku, TEN v osobní anamnéze, trombofilie (mutace faktoru V Leiden homozygot/heterozygot, deficit antitrombinu III, deficit proteinu C a proteinu S, APA),
2. **méně závažné rizikové faktory (relativní riziko 2–4)** – kardiovaskulární onemocnění, estrogény (hormonální antikoncepce a substituce), CHOPN, nefrotický syndrom, chronická zánětlivá onemocnění, obezita, dlouhé cesty vsedě, trombofilie (mutace protrombinu heterozygot).

Základním rizikovým faktorem vzniku TEN je věk (Kniffin W.D. et al., 1994). U populace nad 75 let věku je ve srovnání s populací do 40 let věku 100 x vyšší relativní riziko vzniku TEN.

2.1. Hluboká žilní trombóza – flebotrombóza – HŽT

Definice HŽT

HŽT je onemocnění definované vznikem krevní sraženiny v určité části hlubokého žilního systému. Nejčastěji postihuje hluboké žily dolních končetin a pánevního řečiště. Vzniklá krevní sraženina zcela či částečně obliteruje lumen žíly. Nejzávažnějšími komplikacemi HŽT jsou akutní PE, posttrombotický syndrom (PTS) a chronická tromboembolická plicní hypertenze. Ročně onemocní HŽT v ČR 15 - 20 tisíc pacientů.

2.1.1. Patogeneze HŽT

Trombóza vzniká nerovnováhou mezi protromboticky a antitromboticky působícími mechanismy.

Základní patofyziologické mechanismy vzniku HŽT jsou známy pod označením Virchowova-Rokitanského trias.

- 1. hyperkoagulační stav**
- 2. stáza krve**
- 3. porušení žilního endotelu a intimy**

Ad 1.) Zvýšená tendence k tvorbě krevních sraženin může být vrozená nebo získaná (viz výše, kapitola 2 – rizikové faktory vzniku TEN).

Ad 2.) K stagnaci krve v žilách vedou především následující okolnosti - imobilizace na lůžku, dlouhodobé stání, sezení, ležení, sádrová fixace, srdeční selhání, omezený žilní průtok v těhotenství.

Ad 3.) K porušení žilního endotelu dochází zejména z následujících příčin – cigaretový kouř, hypoxie, zánět, imunologické poruchy, po katetrizacích a kanylacích žilního řečiště, po operacích, po zhmoždění či po úrazech.

2.1.2. Diagnostika HŽT

1. Anamnéza, klinické příznaky

Klinickými příznaky HŽT jsou především bolest, otok a lividní zbarvení končetiny. Nedílnou součástí správné diagnózy je provedení podrobné anamnézy (tromboembolické příhody u pacienta a rodinných příslušníků, přítomnost maligního onemocnění, imobilizace, atd.).

2. Vyšetřovací metody

Metodou volby ke stanovení HŽT je ultrazvukové vyšetření – duplexní sonografie. Při akutní žilní okluzi je žíla vyplněna anechogenním trombem, žíla je dilatovaná a nekompresibilní.

Dalšími metodami jsou CT vyšetření (spirální CT, CT flebografie) a nukleární magnetická rezonance.

3. Biochemická diagnostika

K diagnostice TEN slouží stanovení D-dimerů. Plazmatické D-dimery jsou konečným produktem degradace fibrinu plazminem, Jedná se o marker s vysoce negativní predikční hodnotou, tzn. že při negativním stanovení D-dimerů je TEN vysoce nepravděpodobná. Pozitivita D-dimerů je kromě TEN pozorována i v těhotenství a u řady jiných patologických stavů – infekce, diseminovaná intravaskulární koagulace, nádorová onemocnění.

2.1.3. Posttrombotický syndrom – PTS

PTS představuje jednu z hlavních komplikací akutní žilní trombózy, která se klinicky manifestuje různým stupněm chronické žilní insuficience až vznikem bércového vředu. Hlavní příčinou je kombinace nedostatečnosti žilního chlopenního aparátu a přetrvávající žilní obstrukce. Současné léčebné postupy jsou provázeny různě vysokým výskytem PTS. Nejnižší výskyt PTS se udává při použití trombolytické léčby.

Standardní diagnostika PTS prozatím neexistuje. Potvrdit PTS můžeme na základě klinických známek sekundárního chronického žilního onemocnění a současného ultrazvukového průkazu refluxu a/nebo obstrukce.

2.1.4. Léčba HŽT

Cílem léčby HŽT je především zabránění progresi vzniklé trombózy, dislokace trombu (PE, chronická tromboembolická plicní hypertenze), rekanalizace postiženého žilního systému a

zábrana recidivy.

HŽT lze léčit konzervativně či intervenčně. Konzervativní léčba je zcela zásadní a spočívá v podání antikoagulační terapie a v zavedení režimových opatření. Intervenční terapie se zakládá na podání trombolýzy s případnou kombinací s jinými léčebnými postupy (farmakomechanická disoluce, aspirace, balónková angioplastika, stenting). K zabránění PE lze preventivně zavést kavální filtr. Chirurgická léčba je určena pro nemocné, kteří jsou kontraindikováni k podání antitrombotické léčby.

2.1.4.1. Antikoagulační léčba HŽT

K antikoagulační léčbě HŽT řadíme nefrakcionovaný heparin, nízkomolekulární hepariny neboli LMWH (enoxaparin, nadroparin, bemiparin), pentasacharid (fondaparinux), antivitamin K (Warfarin) a nová dostupná perorální antikoagulancia.

Nová perorálně dostupná antikoagulancia - NOAC

NOAC nazývaná též direktivní orální antikoagulancia (DOAC) zažívají v posledních letech velký rozmach. Mezi NOAC řadíme přímé inhibitory faktoru Xa – xabany (rivaroxaban, apixaban a edoxaban) a přímé inhibitory faktoru IIa – gatrany (dabigatran) (tabulka 1).

Tabulka 1: Farmakologické vlastnosti NOAC

NOAC	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban	Edoxaban
Mechanismus účinku	Inhibitor f. IIa	Inhibitor f. Xa	Inhibitor f. Xa	Inhibitor f. Xa
Nástup účinku (h)	1-2	2-4	2-4	1-2
Biologická dostupnost (%)	3-7	66 (bez jídla)	50	62

Poločas (h)	12-17	5-9	12	9-11
Vylučování ledvinami (%)	80	66	25	50
Metabolismus přes CYP3A4	Ne	Ano	Ano	Ne
Metabolismus glykoprotein P	Ano	Ano	Ano	Ano
Absorbce s potravou	Žádný efekt	Plus 39 %	Žádný efekt	Plus 6 až 22 %
Doporučeno užívání jídla	Ne	Ano	Ne	Ne
Gastrointestinální tolerance	Dyspepsie 5-10%	Ne	Ne	Ne
Antidotum	Ano	Ne	Ne	Ne

NOAC se vyznačují rychlým nástupem účinku, rychlou eliminací z organismu v závislosti na renální clearance, nevyžadují rutinní monitoraci, mají fixní dávkování a minimální lékové a potravinové interakce (Weitz J.I. et al., 2017).

Tato přímá antikoagulantia jsou minimálně tak efektivní jako kumariny, ale jsou spojena s nižším výskytem závažného až život ohrožujícího, zejména intrakraniálního, krvácení (Ruff C.T. et al., 2014).

Jednotlivá NOAC se v léčbě TEN a v rámci prolongované sekundární profylaxe vyznačují odlišnostmi v režimu dávkování (1x denně, nebo 2x denně), velikostí podávaných dávek a způsobem zahájení antikoagulační terapie (Burnett A.E. et al., 2016) (tabulka 2).

Současná 10. doporučení American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (ACCP) navrhuje NOAC jako léčbu první volby při akutní TEN.

Tabulka 2: Porovnání NOAC v léčbě TEN (upraveno dle Burnett A.E. et al., 2016)

NOAC	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban	Edoxaban
Akutní TEN	150 mg 2x denně po > či = 5 dnech LMWH/UFH	15 mg 2x denně 3 týdny, poté 20 mg 1x denně s jídlem	10 mg 2x denně 7 dní, poté 5 mg 2x denně	60 mg 1x denně po > či = 5 dnech LMWH/UFH
Prevence rekurence	150 mg 2x denně	20 mg 1x denně	2,5 mg 2x denně	60 mg 1x denně
Úpravy dávkování	110 mg 2x denně (věk nad 80 let, ren. isuf., riziko krvácení)	15 mg 1x denně při vyšším riziku krvácení	-	30 mg 1x denně při Ckrea 15-50 ml/min. a/nebo váze pod 60 kg
Limitace/kontraindikace	Inhibitory P-gp s Ckrea < 50 ml/min Ckrea < 30 ml/min: nepodávat	Silné CYP3A4 a P-gp inhibitory nebo induktory (současně) Ckrea < 30 ml/min Ckrea < 15 ml/min: nepodávat	Silné CYP3A4 a P-gp inhibitory nebo induktory (současně) Ckrea < 15 ml/min: nepodávat	Současné podávání inhibitorů P-gp Ckrea < 15ml/min: nepodávat

Ckrea – clearance kreatininu dle Cockcroft-Gaulta, P-gp – glykoprotein P, LMWH – nízkomolekulární hepariny, UFH – nefrakcionovaný heparin, CYP3A4 – cytochrom P450 3A4.

2.1.4.2. Intervenční léčba HŽT

Lokální trombolýza je využívána u nemocných s rozsáhlou ilickou trombózou. Nejběžněji využívaným trombololytikem je rekombinantní aktivátor plazminogenu (rt-PA), jehož vlivem dochází k aktivaci plazminogenu vázaného fibrinem a jeho přeměně v účinný plazmin. Technický úspěch intervenční léčby HŽT (většinou za přispění jiných léčebných technik) se uvádí mezi 80-90 %, dlouhodobá průchodnost cévy je vyšší po implantaci stentu – cca 70 %. Velké krvácení po podání lokálního trombololytika se vyskytuje do 4 %.

2.2. Plicní embolie – PE

Definice PE

PE je třetím nejčastějším kardiovaskulárním onemocněním s vysokou časnou mortalitou – asi 11 % pacientů s PE končí náhlou smrtí. Ročně onemocní PE v ČR okolo 10 tisíc pacientů, většina ve věkové skupině 60-80 let. Zdrojem PE bývá nejčastěji HŽT (až 85 %). Mimořádnými příčinami PE je embolizace vzduchu, nádorových hmot, tukových látek, plodové vody a infikovaných trombů. Dle hemodynamického dopadu klasifikujeme PE na akutní masivní PE, akutní submasivní PE, akutní malou PE, subakutní masivní PE a chronickou tromboembolickou plicní hypertenzi.

2.2.1. Patogeneze PE

Závažnost PE je závislá na rozsahu obstrukce plicního cévního řečiště a stavu kardiovaskulárního systému postiženého jedince. Akutně vzniklá plicní hypertenze při PE může způsobit přetížení pravé komory (PK) a její dilataci s následným pravostranným srdečním selháním. Dochází k poklesu minutového srdečního výdeje PK, což vede k poklesu plnění levé komory (LK). Dilatace PK s přetlačením interventrikulárního septa se projevuje zhoršením diastolické funkce LK. Projevem vzniklé hypotenze může být synkopa či kardiogenní šok. PE se může rovněž projevit náhlou smrtí, a to v případě, kdy plicní vaskulární hypertenze stoupne na úroveň, kterou již není PK schopná tolerovat. U pacientů, kteří překonali úvodní ataku pravostranného srdečního selhání, dochází k rozvoji kompenzačních mechanismů aktivací sympatického systému. Dominantním projevem PE je respirační insuficience, která je dána desaturací žilní krve, ventilačně-perfuzním nepoměrem a možným pravolevým zkratem otevřením patentního foramen ovale.

2.2.2. Diagnostika PE

1. Anamnéza, klinické příznaky

Dominantními klinickými příznaky PE jsou dušnost a bolest na hrudi. Pro PE je charakteristická náhle vzniklá dušnost různé intenzity. Bolest na hrudi je velice často vázaná

na dechové exkurze (pleurální iritace) a/nebo bývá projevem ischemie PK při pravostranném přetížení.

Anamnestická data a klinické příznaky jsou součástí explicitních skórovacích systémů (revidované ženevské skóre a Wellsovo skóre), které využíváme pro stanovení klinické pravděpodobnosti PE.

2. Vyšetřovací metody

Na elektrokardiografickém vyšetření pozorujeme známky přetížení PK (inverze vlny T V1-V4, klasický obraz SI, QIII a inkompletní či kompletní blokádu pravého raménka Tawarova).

CT-angiografie plic je zlatým standardem u pacientů s podezřením na PE. Kromě vyloučení či potvrzení trombů v plicním řečišti lze z tohoto vyšetření zjistit např. velikost PK. Dilatace PK je jedním z markerů pro stratifikaci rizika nemocného s PE.

Plicní angiografie byla v diagnostice PE již téměř nahrazena CT-angiografií. Její nespornou výhodou však zůstává možnost invazivního měření tlakových poměrů v plicnici a v pravostranných srdečních oddílech, včetně možnosti intervenční léčby PE (selektivní trombolýza, fragmentace trombu).

Plicní scintigrafie detekuje distribuci intravenózně podané látky označené radioizotopem. Negativní prediktivní hodnota dosahuje téměř 100 %. V optimálním případě se provádí jako ventilačně-perfuzní scan.

Echokardiografické vyšetření považujeme za klíčovou pomocnou vyšetřovací metodu u PE. Umožňuje komplexní neinvazivní zhodnocení hemodynamického stavu nemocného. Dominantní úlohu hraje u pacientů s akutní masivní PE.

3. Biochemická diagnostika

Jak již bylo uvedeno, k laboratorní diagnostice TEN slouží stanovení hladiny D-dimerů (viz výše, podkapitola 2.1.2. – laboratorní diagnostika HŽT).

Další biochemické ukazatele PE jsou markery myokardiálního poškození (troponiny) a myokardiálního přetížení (natriuretické peptidy). Elevace hladiny srdečních troponinů odráží závažnost PE a je využívána ke stratifikaci rizika u hemodynamicky stabilních pacientů.

Zvýšení natriuretických peptidů je spojeno s přetížením/dysfunkcí PK.

2.2.3. Akutní masivní PE

Jedná se o nejzávažnější formu PE. Je definována hemodynamicky významnou nestabilitou, vznikem akutního cor pulmonale, což je stav odpovídající selhání PK. Letalita je udávána okolo 20 %.

2.2.4. Chronická tromboembolická plicní hypertenze

Jedná se o závažné onemocnění s nevalnou prognózou. Klinicky se projevuje progredující námahovou dušností až pravostranným srdečním selháním. Fyzikálně jsou přítomny známky hypertrofie PK. Pro diagnózu musejí být přítomny angiografické známky obstrukce plicního řečiště a hodnota středního tlaku v plicnici ≥ 25 mmHg při normálním tlaku v zaklínění.

2.2.5. Léčba PE

Léčba plicní embolie se odvíjí od její závažnosti. Základem terapie je antitrombotická a podpurná léčba (hemodynamická a ventilační podpora).

Antikoagulační terapie je indikována téměř u všech nemocných s PE. K zahájení antikoagulační léčby volíme vždy parenterální přípravky (LMWH, UFH, případně fondaparinux). NOAC jsou hlavními antikoagulancii v dlouhodobé terapii. Je důležité zmínit, že u jedinců s aktivním nádorovým onemocněním je doporučena dlouhodobá až doživotní léčba LMWH.

Standardní antikoagulační terapie je 6 měsíců. U pacientů s přetrvávajícím hyperkoagulačním stavem či život ohrožující PE se léčba může prodloužit.

Systémová trombolýza je zahájena u nemocných s projevy šoku, nebo u kterých je předpoklad jeho rozvinutí za hospitalizace.

Při selhání či kontraindikaci trombolýzy je indikována reperfuční léčba chirurgickou embolektomií nebo perkutánní intervencí.

3. Antifosfolipidový syndrom – APS

APS syndrom, též Hughesův syndrom, patří mezi trombofilní stavy. Jedná se o klinicko laboratorní jednotku, která je charakterizovaná klinickými projevy ve formě trombózy a/nebo přesně definované reprodukční ztráty a současně přítomností APA.

APS lze rozdělit na dvě základní formy: sekundární, která je podmíněna přítomností jiného onemocnění (zvláště u systémového lupus erythematoses – SLE), a formu primární při neprokazatelné jiné příčině tvorby APA (Hluší A. a Krčová V., 2003). Nejzávažnější manifestací tohoto syndromu je katastrofický APS. Diagnóza APS je potvrzena naplněním mezinárodních kritérií. Syndrom může být provázen i řadou tzv. “ne-kritéria” manifestací. Hlavním léčebným postupem je antitrombotická léčba.

3.1. Etiopatogeneze APS

Etiopatogeneze je velice komplexní a složitý proces. Významnou úlohu v etiopatogenních mechanismech hrají APA, které jsou heterogenní skupinou autoprotilátok s odlišným cílovým antigenem a různým klinickým významem. Některé z nich se účastní přirozených pochodů v organismu, jiné se nepochybně podílejí na klinických projevech APS (Buliková A., 2016).

Nejvíce akceptovatelným patofyziologickým mechanismem působení APA je navození protrombotického a prozánětlivého stavu (Giannakopoulos B. a Krilis S.A., 2013; Du V.X. et al., 2013). Část změn v organismu při působení APA vzniká přímým ovlivněním funkčního stavu buněk či tkání. Tento mechanismus účinku je považován za jeden z hlavních patofyziologických dějů při neurologických projevech syndromu či u těhotenských komplikací (Buliková A., 2016). Některé klinické projevy mohou být spjaty s rozvojem vaskulopatie spojené s intimální hyperplázií, jež je indukovaná cestou signálních drah AKT/mTORC (proteinkináza B/savčí komplex zasahovaný rapamycinem), což je následováno proliferací hladké svaloviny cév (Canaud G. et al., 2015).

3.2. Diagnostika APS

Diagnóza APS je stanovena splněním diagnostických kritérií, která byla naposledy revidována na jedenáctém Mezinárodním kongresu o APA v Sydney v roce 2004 (Miyakis S. et al., 2006). K uznání diagnózy APS je nezbytný průkaz jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria. Časové rozhraní mezi klinickou manifestací a průkazem protilátek je nejméně 12 týdnů a nejvíce 5 let. Rovněž je doporučeno rozlišovat případy u nichž je další rizikový faktor klinické manifestace a ty, u nichž takový faktor nalezen nebyl.

Přídavné rizikové faktory pro klinickou manifestaci APS (upraveno podle Sydney 2004)

Přídavnými rizikovými faktory jsou:

- věk (muži nad 55 let, ženy nad 65 let),
- kardiovaskulární rizikové faktory (hypertenze, diabetes mellitus, zvýšený LDL nebo snížený HDL cholesterol, kouření cigaret, rodinná anamnéza předčasného výskytu kardiovaskulárních chorob, mikroalbuminurie, glomerulární filtrace < 60 ml/min., body mass index ≥ 30 kg/m²),
- vrozené trombofilie (především Leidenská mutace faktoru V),
- získané rizikové faktory trombózy (hormonální antikoncepce, nefrotický syndrom, maligní onemocnění, imobilizace, operace).

Klasifikační kritéria nezahrnují netrombotické (“ne-kritéria”) manifestace APA. Dále kritéria např. nezohledňují skutečnost, že zejména u SLE dochází v průběhu času ke kolísání hladiny APA (Out H.J. et al. 1989).

Revidovaná kritéria APS (upraveno podle Sydney 2004)

Klinická kritéria

1. trombóza

– jedna či více klinických manifestací venózní či arteriální trombózy, případně trombózy malé cévy v kterékoli tkáni či orgánu; je prokázána objektivními validovanými kritérii, v případě histopatologického průkazu bez známek zánětu v cévní stěně

2. porucha těhotenství

– jedno či více nevysvětlitelných úmrtí morfologicky normálního plodu v 10. týdnu těhotenství nebo po něm s potvrzením normální morfologie plodu ultrasonograficky či přímým vyšetřením

– jedno či více předčasných narození morfologicky normálního novorozence před 34. týdnem těhotenství z důvodu eklampsie či těžké preeklampsie podle standardní definice nebo při prokázaných známkách placentární insuficience

– tři a více nevysvětlitelných následných spontánních potratů před 10. týdnem těhotenství po vyloučení anatomických či hormonálních abnormalit matky a po vyloučení chromozomálních abnormalit rodičů

Laboratorní kritéria

1. LA

– je prokázán v plazmě dvakrát a vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů

– je detekován podle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu

2. ACLA

– jsou prokázány v séru či plazmě, IgG či IgM izotypu, ve středním a vysokém titru (tj. 40 GPL (fosfolipidové jednotky ve třídě IgG) či MPL (fosfolipidové jednotky ve třídě IgM), nebo větší než 99. percentil), jsou detekovány dvakrát a vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů, jsou měřeny standardizovaným typem enzymové imunoanalýzy (ELISA)

3. anti-beta2GPI

– jsou prokázány v séru či plazmě, IgG či IgM izotypu, titer větší než 99. percentil, jsou detekovány dvakrát a vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů, jsou měřeny standardizovaným typem ELISA metody

3.3. Klinické projevy APS

APS skýtá nejrůznější klinické projevy. Přítomnost APA se může projevat trombotizací ve venózním a arteriálním řečišti, mikrotrombotizací parenchymových orgánů, ovlivněním procesu normální reprodukce, krvácivými projevy, tzv. “ne-kritéria” manifestacemi, katastrofickým APS a v neposlední řadě zcela asymptomaticky.

Nejčastější klinickou manifestací APS je HŽT. Postižení tepenného povodí se nejčastěji projevuje ve formě cévní mozkové příhody (Cervera R. et al., 2009). Mikrotrombotizace může postihnout jakýkoli orgán či tkáň a může být příčinou komplikací kardiálních (syndrom X), kožních (vaskulitida, akrální ischemie), endokrinních a reprodukčních (selhání nadledvin, infarkty varlete, nadvarlete či prostaty), gastrointestinálních (mezenterální ischemie, infarkt sleziny), neurologických (multiinfarktová demence), očních (trombóza retinální tepny či žíly) a mnohých dalších.

Poruchy reprodukce jsou další skupinou klinických projevů asociovaných s přítomností APA. Frekvence živě narozených dětí je ve studiích s léčeným porodnickým APS 70-80 % (Liu L. a Sun D., 2019).

Přítomnost APA může mít za následek i projevy krvácivé. Důvodem může být trombocytopenie, trombocytopenie, sekundární hypoprotrombinémie či současný výskyt specifických inhibitorů krevního srážení (Bulíková A. a Penka M., 2006).

Kromě klinických projevů vysvětlitelných vznikem trombotických příhod se u pacientů s APS setkáváme se širokým spektrem manifestací, které tímto uspokojivě vysvětlit nelze. Mezi “ne-kritéria” manifestace řadíme projevy kardiologické (kardiomyopatie, postižení chlopní), kožní (livedoreticularis), neurologické (migréna, epilepsie, psychóza, transversální myelitida, porucha kognitivních funkcí), hematologické (autoimunitní hemolytická anémie, trombocytopenie), nefrologické (nefropatie asociovaná s APA, která je vyjádřena ve formě hypertenze a/nebo proteinurie) a jiné.

3.4. Léčebná doporučení APS

Preventivní léčba

- preventivní opatření bez farmakoterapie - snaha o eliminaci rizikových faktorů (kouření, obezita, COX 2-inhibitory a mnohé další)
- profylaxe LMWH v případě krátkodobého rizika trombofilního stavu (operace, úrazy, imobilita)
- kyselina acetylsalicylová (ASA) - nízká dávka aspirinu (75-100 mg) je nejčastěji používaná léčba v této indikaci. Analýza 5 kohortových studií zjistila ochranný účinek pouze proti arteriální trombóze (Arnaud L. et al., 2015).
- antimalarika – hydroxychlorochin – u pacientů se SLE snižuje riziko trombotizace (Petri M., 2011). Vzhledem k riziku retinopatie je nutné provádět pravidelné screeningové vyšetření stavu sítnice.
- vitamin D – je potenciálním preventivním lékem proti trombóze. Vitamin D snižuje aktivaci tkáňového faktoru (TF) APA (Agmon-Levin N. et al., 2011).
- statiny – u pacientů s APA vlivem statinů dochází ke snížení TF a řady zánětlivých mediátorů (Erkan D. et al., 2014)

Léčba akutní trombotické příhody

- iniciální terapie se neodlišuje od trombózy vzniklé z jiných příčin
- preferovanou antikoagulační léčbou je warfarin, dostatečná cílová hodnota INR (International Normalized Ratio) je 2-3 (Finazzi G. et al., 1996; Crowther M.A. et al., 2003)
- pro vysoké riziko rekurence u nemocných s APS se doporučuje dlouhodobá antikoagulační terapie (min. 12 měsíců, v indikovaných případech i celoživotně)
- při selhání terapie dikumarolovými preparáty je indikováno přidání ASA, eventuálně podání imunomodulační léčby či LMWH

Léčba v těhotenství

- nízká dávka aspirinu je doporučena u žen s APA, které prodělaly normální těhotenství, žádné těhotenství či jeden časný potrat
- profylaktická dávka LMWH společně s nízkou dávkou aspirinu je doporučena u žen, které prodělaly jeden pozdní zánik plodu, více časných ztrát, nebo mají v anamnéze těžkou preeklampsii (Liu X. et al., 2020)
- pokud žena v minulosti prodělala trombotickou příhodu, pak se doporučuje plná dávka LMWH a nízká dávka aspirinu

3.5. Katastrofický APS – CAPS

Definice

Jde o život ohrožující onemocnění s velmi vysokou mortalitou (cca 37 % nemocných), které postihuje okolo 1 % nemocných s APS. Až polovina nemocných může mít CAPS jako první klinickou manifestaci APS.

Etiopatogeneze

Z patofyziologického pohledu není vznik CAPS zcela objasněn. Hlavní úloha je přisuzována

silnému trombogennímu potenciálu APA. Dále se předpokládá vliv aktivace cytokinové kaskády s rozvojem syndromu systémové zánětlivé odpovědi. Spouštěcí momenty rozvoje CAPS jsou infekce, malignity, těhotenství, trauma, vysazení antikogulační terapie, vzplanutí SLE.

Diagnostika

Diagnostický algoritmus se opírá o Mezinárodní diagnostická kritéria CAPS, která byla stanovena na 10. mezinárodním kongresu o APA (Itálie, 2002). Tato kritéria zahrnují současné postižení tří orgánů/tkání; vývoj klinické manifestace v intervalu jednoho týdne a méně; histologický průkaz okluze malé cévy nejméně v jednom z těchto orgánů/tkání; laboratorní průkaz alespoň jedné z kritériálních APA (tato pozitivita musí být ověřena opakovaným stanovením v časovém odstupu 12 a více týdnů).

Klinické projevy

CAPS se manifestuje zejména mikrotrombotizací orgánů vedoucí k multiorgánovému selhání. Trombóza velkých cév je spíše vzácná.

Léčba

Léčba CAPS se opírá o antikoagulační terapii (UFH, LMWH, následně kumariny), případně fibrinolytika a o terapii vysokodávkovými kortikosteroidy.

V případě nedobré odpovědi na standardní léčbu se doporučuje provedení plazmaferézy či podávání vysokodávkovaných imunoglobulinů (Ig).

V refrakterních případech lze využít monoklonální protilátky anti-CD 20 či monoklonální protilátky proti TNF-alfa (tumor necrosis factor), eventuálně proti složkám komplementu.

U sekundárního CAPS při SLE je preferována léčba cyklofosfamidem.

4. Antifosfolipidové protilátky – APA

APA jsou nedílnou součástí diagnostiky APS. Diagnostika a znalosti o APA se neustále prohlubují a nabývají na významu.

4.1. Historie APA

APS se začal definovat jako entita v 50. letech 20. století s rozpoznáním dvou neobvyklých laboratorních jevů - falešně pozitivní test na syfilis a výskyt tzv. nespecifického inhibitoru koagulace (Moore J.E. a Lutz W.B., 1955; Conley M.R. a Hartmann R.C., 1952). APA byly již dříve detekovány imunologickými testy při diagnostice syfilis. V roce 1907 Wasserman a kol. (1906) vyvinuli komplement fixační test pro diagnostiku syfilis za použití antigenu (reagin), který byl izolován z jater plodu s vrozenou syfilidou. V roce 1941 Pangborn (1941) prokázal, že reagin je aniontový fosfolipid. Posléze byl přejmenován na kardiolipin, protože byl izolován z hovězího srdečního svalu. V roce 1952 Moore a Mohr identifikovali jedince, kteří měli pozitivní test na syfilis, ale nevykazovali žádné příznaky onemocnění. Zjistili, že přechodně falešně pozitivní testy byly spojeny s řadou dalších infekčních chorob (Moore J.E. a Mohr C.F., 1952). Téměř současně, Conley a Hartmann (1952) pozorovali získaný cirkulující inhibitor, který prodlužoval dobu koagulace *in vitro* u dvou pacientů se SLE. V roce 1963 Bowie a kol. (1963) poprvé popsali souvislost této antikoagulační látky s trombózou namísto krvácení. Teprve v roce 1972 Feinstein a Rapaport (1972) zavedli termín "lupus antikoagulans" pro inhibitor namířený proti fosfolipidům koagulační kaskády. V roce 1983 Harris a kol. vyvinuli radioimunoanalýzu pro detekci antikardiolipinových protilátek (Harris E.N. et al., 1983) a o dva roky později první ELISA metodu (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Pomocí tohoto testu bylo na velké populaci SLE pacientů pozorováno, že podskupina se zvýšeným výskytem ACLA měla vyšší výskyt trombózy a těhotenské morbidity (Hughes G.R., 1984). To vedlo k prvnímu popisu tzv. antikardiolipinového syndromu, označovaného také jako antifosfolipidový syndrom (Hughes G.R.V., 1983). Jedním z nejvýznamnějších zjištění v počátcích devadesátých let minulého století bylo, že aktivita protilátek ACLA u většiny APS pacientů závisí na přítomnosti proteinového kofaktoru, plazmatického apolipoproteinu beta2-glykoproteinu I (beta2GPI)

(Galli M. et al., 1990). Protilátky závislé na beta2GPI byly nalezeny pouze v případě pacientů s autoimunitním onemocněním, zatímco u pacientů s infekčními chorobami byly APA na beta2GPI nezávislé (Matsuura E. et al., 1990).

4.2. Charakteristika APA

APA jsou velice různorodou skupinou protilátek, které jsou namířeny zejména proti negativně nabitým fosfolipidům a/nebo jejich komplexům s různými plazmatickými bílkoviny (Ruiz-Irastorza G. et al., 2010). Mezi laboratorní kritéria diagnózy APS řadíme anti-beta2GPI, ACLA a LA v izotypu IgM a IgG. U pacientů, kteří vykazují pozitivitu těchto tří protilátek je vyšší riziko TEN nebo těhotenských komplikací ve srovnání s pacienty u nichž je pozitivní jeden nebo dva typy kritériálních APA. Testování dalších APA, jako součást laboratorních kritérií APS, zatím nebylo navrženo (Devreese K.M.J. et al., 2018).

V praxi se ale setkáváme i s pacienty, kteří mají manifestní APS, ale normální hodnoty doporučených APA. U této skupiny pacientů hovoříme o séronegativním APS (Hughes G.R. a Khamashta M.A., 2003). U pacientů se séronegativním APS byly zjištěny APA, které nejsou zahrnuty mezi laboratorní kritéria APS, tzv. nekriteriální protilátky (Bradacova P. et al., 2021). Jedná se o protilátky namířené zejména proti jiným negativně nabitým fosfolipidům, jako je fosfatidylserin, kyselina fosfatidová, fosfatidylinositol či proti komplexu fosfatidylserin-prothrombin. Kromě APS se APA vyskytují i v séru pacientů s malignitami, infekcemi či jinými autoimunitními chorobami (Ostrowski R.A. a Robinson J.A., 2008; Sene D. et al., 2008; Tincani A. et al., 2010). APA se mohou vyskytovat i u 1-5 % asymptomatických zdánlivě zdravých osob (Biggioggero M. a Meroni P.L., 2010).

4.3. Autoprotilátky u APS

Autoprotilátky u APS jsou heterogenní skupinou protilátek třídy IgG, IgM nebo IgA (imunoglobulin izotypu A), které jsou namířeny proti antigenům vlastního těla (Kašparová V., 2019). Nejčastěji se vyskytujícími potencionálními autoantigeny u APS jsou beta2GPI, kardiolipin, protrombin, protein C, protein S, annexin V, vysokomolekulární a nízkomolekulární kininogen, komplementový faktor H a tkáňový aktivátor plazminogenu (Hořejší V., 2013). Tvorba autoprotilátek může být navozená různými patogenetickými

mechanismy, nebo je součástí přirozené obrany organismu (Esther A. et al., 2017). Přirozené protilátky jsou převážně IgM a vykazují slabou afinitu k vlastním antigenům. Naproti tomu IgG autoprotilátky s vysokou afinitou odrážejí patologický proces, při němž jsou narušeny homeostatické mechanismy (Kašparová V., 2019).

Zcela zásadní krok představuje vytvoření komplexu APA-beta2GPI. Po navázání beta2GPI na fosfolipidové povrchy (zejména monocyty, trombocyty, endoteliální buňky) dochází k odhalení ukrytého antigenního neoepitopu. Následuje vazba autoprotilátky a dimerizace molekuly beta2GPI (Kašparová V., 2019). Vzniklý trimolekulární komplex může interagovat s buněčnými receptory a ovlivňovat hemostatické reakce (Espinosa G. a Cervera R., 2008).

4.3.1. Kriteriaální protilátky APS

4.3.1.1. Protilátky proti beta2-glykoproteinu I – anti-beta2GPI

U pacientů s klinickými projevy APS jsou anti-beta2GPI protilátky jen zřídka jedinými detekovanými protilátkami (Pengo V. et al., 2011). Hlavní epitop, který byl zjištěn v souvislosti s APS, zahrnuje oblast D1. Pacienti s mnohočetnými APA mají vyšší výskyt a titer anti-beta2GPI-D1 (Pengo V. et al., 2015). Anti-beta2GPI-D1 nepatří mezi kriteriaální protilátky APS. Meroni a kol. (2014) provedli mezinárodní multicentrickou studii, která potvrdila asociaci mezi trombózou v anamnéze (většinou žilní) a anti-beta2GPI-D1.

Beta2GPI

Beta2GPI je plazmatický kofaktor (dříve nazýván apolipoprotein H), pomocí něhož se APA váží na fosfolipidy. Jeho produkce je nejvíce zastoupena v jaterní tkáni. Jeho funkce *in vivo* spočívá v antikoagulačním efektu. Svojí vazbou na různé negativně nabitě substance inhibuje aktivitu protrombinázy a ADP - dependentní agregaci destiček. Molekula beta2GPI o velikosti 50 kDa obsahuje 326 aminokyselin uspořádaných do pěti homologních domén (Koike T. 1994; Kato H. a Enjyoji K., 1991). Každá z prvních čtyř domén je složena z 60 aminokyselin s vysokým obsahem tryptofanu, prolinu, cysteinu. Pátá doména obsahuje sekvenci KNKEKK, která je odpovědná za vazby na fosfolipidy. Po vazbě beta2GPI na

fosfolipidy dojde k odhalení kryptického antigenního neoepitopu (Hunt J.E. a Krilis S.A., 1994; Matsuura E. et al., 1995). Protilátky proti tomuto epitopu označujeme jako skutečné APA, na rozdíl od protilátek, které se vyskytují například při některých infekčních onemocněních a které reagují se samotným fosfolipidem a po odeznění infekce obvykle vymizí.

Vývoj anti-beta2GPI imunoanalýz následoval po zjištění, že mnoho ACLA je zaměřeno na epitop na beta2GPI.

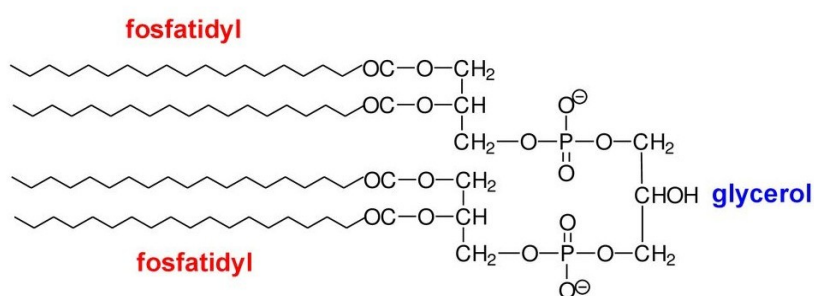
4.3.1.2. Antikardiolipinové protilátky – ACLA

ACLA se obvykle detekují metodou ELISA, přičemž se jako antigen na pevné fázi používá kardiolipin. Koncentrace izotypů IgG, IgM a/nebo IgA se vyjadřuje v GPL, MPL a/nebo IgA jednotkách (1 jednotka představuje vazebnou aktivitu 1 mg/ml afinitně purifikované protilátky ACLA). Obecně platí, že pozitivní LA testy jsou specifitější pro APS, zatímco ACLA jsou citlivější (de Groot P.G. et al., 2005). Specifitnost ACLA pro APS se zvyšuje s hladinou a je vyšší pro izotyp IgG než pro izotyp IgM.

Kardiolipin

Kardiolipin (obrázek 1) patří mezi glycerofosfolipidy. Je uložený zejména ve vnitřní mitochondriální membráně a ve struktuře obsahuje dvě molekuly kyseliny fosfatidové spojené glycerolem. Je nepostradatelný pro optimální funkci řady enzymů a funguje jako ústřední mediátor mitochondriálního metabolismu (Houtkooper R. H. a Vaz F. M., 2008).

Obrázek 1: Vzorec kardiolipinu – převzato z Biochemického ústavu LF MU (Dostál J., 2013).



1,3-bisfosfatidylglycerol

4.3.1.3. Lupus antikoagulans – LA

LA byl pojmenován podle pozitivitu u pacientů se SLE. Jedná se o nejdůležitější APA, protože se nejvýznamněji váže s trombotickými komplikacemi (Petri M. et al., 1987; Wahl D. et al., 1997). Vyskytuje se i u jiných autoimunitních onemocněních, infekčních chorob, či výjimečně i u zdravých jedinců (Pengo V. et al., 2007). Kritéria Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu pro stanovení lupusového antikoagulantu zahrnují tři kroky (Pengo V. et al., 2009). Prvním krokem je senzitivní screeningový test (zředěný Russellův jed a citlivý parciální trombotoplastinový čas (APTT)). Dalším krokem je směsná studie, která má dospět k závěru, že prolongace screeningového času není způsobená nedostatkem koagulačních faktorů. Poslední fází je průkaz, že inhibitor je fosfolipidově závislý. Zjednodušeně lze říci, že LA je zjišťován na základě jeho schopnosti ovlivňovat na fosfolipidech závislé reakce krevního srážení.

4.3.2. Vybrané nekriteriální protilátky

Stanovení nekriteriálních protilátek je stále předmětem mnoha diskuzí a studií. Jejich klinický význam není zdaleka plně prozkoumán, ale přítomnost těchto protilátek by mohla představovat nový nástroj pro stratifikaci trombotického rizika (Tonello M. et al., 2019).

4.3.2.1. Antitrombinové protilátky

Jedná se o heterogenní skupinu protilátek namířených proti protrombinu a/nebo proti komplexu fosfatidylserin/protrombin. aPT lze detekovat přímým nanesením protrombinu na ozařované destičky ELISA nebo použitím komplexu fosfatidylserin/protrombin jako antigenu (Bertolaccini M.L. et al., 2013). aPS/PT pomáhají stanovit diagnózu APS (spíše než samotné aPT) a související riziko arteriální a/nebo žilní trombózy či těhotenských komplikací (Sciascia S. et al., 2014).

4.3.2.2. Protilátky proti fosfatidyletanolaminu – aPE

V roce 1989 byl popsán první případ primárního APS, kdy LA nebyl doprovázen ACLA, ale aPE. Fosfatidyletanolamin je jedním z hlavních lipidů buněčné membrány, přičemž se většinou nachází jako součást vnitřní vrstvy (Staub H.L. et al., 2012). V multicentrické studii zahrnující 270 pacientů s trombotickým onemocněním a 236 kontrolních pacientů byly aPE spojeny s vyšším rizikem trombózy (Sanmarco M. et al., 2007). Screening izotypů IgG, IgM a IgA aPE zřejmě zvyšuje diagnostickou výtěžnost u APS (Bertolaccini M.L. et al., 1998), zejména pokud tradiční laboratorní kritéria pro APS chybí (Sanmarco M. a Boffa M-C., 2009).

4.3.2.3. Protilátky proti annexinu A5 a annexinu 2

U pacientů s APS byly rovněž popsány protilátky proti annexinu A5 (aAnxA5). De Laat a kol. neprokázali žádnou souvislost mezi aAnxA5 a anamnesticky prodělanou trombózou (de Laat B. et al., 2006). Annexin 2 je kofaktorem pro tvorbu plazminu a fibrinolytickou aktivitu na buněčném povrchu (hlavně monocytů, placentárních syncytiotrofoblastů a endotelu) (Hajjar K.A. et al., 1994). Protilátky proti annexinu 2 v rámci APS např. indukují expresi TF na endoteliálních buňkách, zabraňují placentárnímu annexinu 2 působit jako kofaktor při tvorbě plazminu (Alessandri C. et al., 2011).

5. Úloha APA při vzniku trombózy

Vysoce rizikovní pacienti s APS mají vysokou míru recidivy trombózy bez ohledu na antitrombotickou léčbu (Gebhart J. et al., 2015). Proto dle doporučení Evropské ligy proti revmatismu, by měl být APA pozitivním jedincům proveden screening kardiovaskulárních rizikových faktorů (kouření, diabetes, hypertenze a dyslipidémie).

APA zvyšují tvorbu trombů v žilní a arteriální cirkulaci (Pierangeli S.S. et al., 1996; Jankowski M. et al., 2003; Vreys I. et al., 2003; Ramesh S. et al., 2011). Prevalence žilních a arteriálních příhod u pacientů s APS se liší v různých etnických skupinách. Například nižší výskyt HŽT a vyšší výskyt arteriální trombózy byl zjištěn u Japonců ve srovnání s evropskými kohortami (Fujieda Y. et al., 2012).

Ze systematického přehledu a metaanalýzy (Reynaud Q. et al., 2014) vyplynulo, že LA a ACLA jsou spojeny se zvýšeným rizikem žilní TEN [OR = 6,14 (CI 2,74; 13,8) a OR = 1,46 (CI 1,06; 2,03)]. Dále byla popsána významná souvislost kriteriálních protilátek s arteriální trombózou: OR pro LA, ACLA a anti-beta2GPI byly 3,58 (CI 1,29-9,92), 2,65 (CI 1,75-4,00) a 3,12 (CI 1,51-6,44). Anti-beta2GPI protilátky jsou známy jako jedna z hlavních příčin trombotických příhod u APS (de Groot P.G. a de Laat B., 2017). Bylo prokázáno, že především podskupina anti-beta2GPI protilátek, které vážou epitop obsahující Gly40-Arg43 (G40-R43) v doméně 1, působí jako LA a silně korelují s trombózou (Pengo V. et al., 2015).

Epizody akutní trombózy mají multifaktoriální patogenezi. Inhibice faktorů antikoagulačního systému, poškození fibrinolytické aktivity, interference s koagulačními faktory a komplementem a přímý vliv APA na funkci buněk byly navrženy jako vysvětlení trombotické tendence zjištěné u pacientů s APS (Giannakopoulos B. et al., 2007).

Vzhledem k vzácným trombotickým příhodám při trvalé přítomnosti APA byla vyslovena hypotéza dvou zásahů. Podle této hypotézy APA vyvolávají trombofilní stav, ale vyžadují druhou podmínku (např. infekci), aby došlo ke srážení krve (Shoenfeld Y. et al., 2009).

5.1. Mechanismy vzniku trombózy prostřednictvím APA

V následujícím textu se budu zabývat vybranými mechanismy vzniku trombózy prostřednictvím APA. Problematice endoteliální dysfunkce u trombotického APS se budu věnovat v samostatné podkapitole.

5.1.1 Přímý vliv APA na funkci buněk

APA jsou patogenní protilátky, které se zaměřují zejména na poškozené endotelové buňky, monocyty a trombocyty (obrázek 2). Tyto protilátky se vážou na buněčné membrány s plazmatickými proteiny vázajícími fosfolipidy, jako např. beta2GPI nebo protrombin. Následně APA indukují fosforylaci p38 MAPK (mitogenem aktivovaná proteinová kináza), což vede k produkci prokoagulačních látek a adhezivních molekul, které podporují tvorbu trombu (Amengual O. a Atsumi T., 2018).

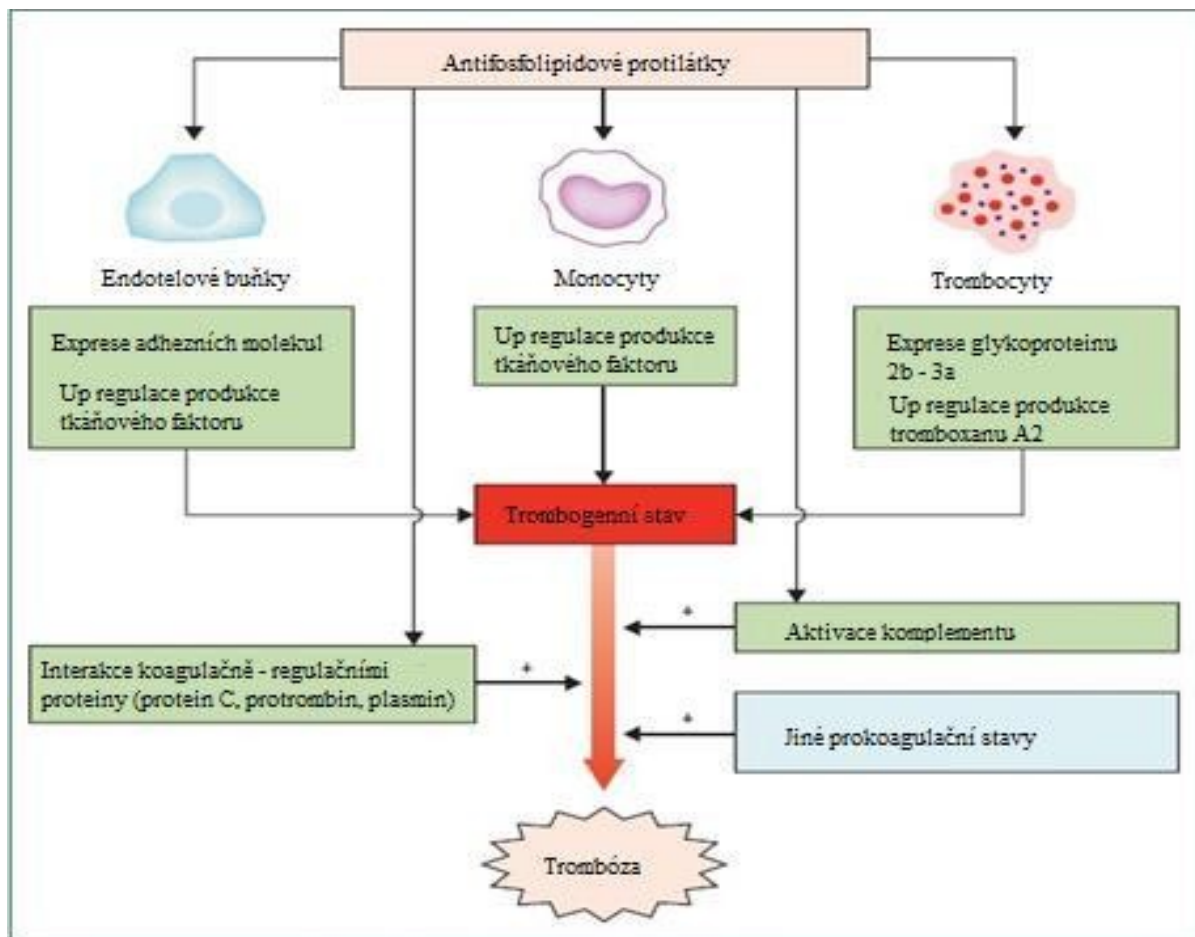
Pro vazbu APA bylo identifikováno několik receptorů, jmenovitě receptor pro apolipoprotein E 2 (ApoER2), glykoprotein Ib/IX/V, destičkový faktor 4, annexin A2, lipoproteiny s nízkou hustotou, lipoproteiny s velmi nízkou hustotou, P-selektin a rodina receptorů TLR (Toll like receptor), zejména TLR-2 a TLR-4 (Vreede A.P. et al., 2017).

Jako signální platformy pro receptory mohou fungovat endozomy. Endozom poskytuje ideální prostředí pro trvalou signalizaci, protože malý objem endozomu podporuje asociaci mezi ligandem a receptorem a časový úsek dostupný pro trvalou signalizaci je dlouhý (Sorkin A. a von Zastrow M., 2009). Transport komplexu protilátek a receptorů do jádra přes endozomy by mohl být zásadním krokem v indukci protrombotické buněčné odpovědi. Aktivace buněk je klíčovým mechanismem vzniku trombózy prostřednictvím APA (de Groot P.G. a de Laat B., 2017).

Aktivace krevních destiček APA má významný vliv na tvorbu trombů. Vazbou anti-beta2GPI protilátek na receptory pro beta2GPI dochází ke zvýšené produkci glykoproteinu 2b-3a a tromboxanu A₂, což může mít za následek arteriální či žilní trombózu (Cavazzana I. et al.,

2017). Aktivace endotelu a monocytů prostřednictvím APA je podrobněji uvedena v podkapitole endoteliální dysfunkce u trombotického APS (viz níže).

Obrázek 2: Patogeneze trombózy u APS – převzato a upraveno (Devreese K. a Hoylaerts M.F., 2010).



5.1.2 Vliv APA na hemostatickou rovnováhu

Regulace kontaktní aktivace koagulace byla první fyziologickou funkcí, která byla pro beta2GPI navržena (Schousboe I., 1985). Později se ukázalo, že za určitých podmínek se beta2GPI váže na faktor XI (Sugi T. a McIntyre J.A., 2001; Shi T. et. al., 2004). Navíc se beta2GPI váže na trombin, čímž inhibuje další aktivaci faktoru XI (Rahgozar S. et. al., 2007). Zdá se, že protilátky APA mají vliv na koagulaci prostřednictvím faktoru XI, ale není jasné, zda tyto aktivity mohou být spojeny se zvýšeným rizikem trombózy. *In vitro* APA indukují

získanou rezistenci na protein C a je pravděpodobné, že rezistence na protein C přispívá k protrombotickému fenotypu (Wahl D. et al., 2009). Několik zpráv naznačovalo, že k patogenezi APS může přispívat nedostatečná fibrinolytická aktivita (Krone K.A. et al., 2010). Nedostatky fibrinolytického potenciálu však téměř nepřispěly ke zvýšení rizika trombózy (Meltzer M.E. et al., 2010).

5.1.3. Vznik neutrofilních extracelulárních pastí vlivem APA

APA a beta2GPI indukují vznik neutrofilních extracelulárních pastí (NETs) a zvyšují tím tak riziko trombózy. NETs slouží jako obranný mechanismus hostitele k zachycení a usmrcení mikrobů uvolňováním chromatinových vláken a antimikrobiálních intracytoplazmatických látek (Brinkmann V. et al., 2004; Yalavarthi S. et al., 2015). NETs v krevním řečišti vytvářejí protrombotický povrch. Neutrofilů od pacientů s APS vykazovaly zvýšený sklon ke spontánnímu uvolňování NETs, který byl závislý jak na aktivaci TLR4, tak na tvorbě reaktivních forem kyslíku (Wirestam L. et al., 2019).

5.1.4. Indukce arteriální trombózy působením APA

Ateroskleróza a T buněčná odpověď zprostředkovaná APA jsou považovány za příčiny vzniku arteriální trombózy. Primárním spouštěčem arteriální trombózy je ruptura aterosklerotického plátu, který se vyvíjí v arteriální stěně v důsledku hromadění lipidových deposit a makrofágů s lipidy (pěnových buněk) (Mackman N., 2008). Aktivované krevní destičky uvolňují obsah granulí, které vedou k náboru, adhezi, agregaci a aktivaci destiček. Souvislost mezi aterosklerózou a antigenně specifickou imunoreakcí u pacientů s APS byla objasněna zaměřením se na roli APA při tvorbě plátu a abnormální tloušťku arteriální stěny (Benagiano M. et al., 2017). CD4⁺ T-lymfocyty odvozené z plátů rozpoznávaly beta2GPI v aterotrombotických lézích. Kromě toho beta2GPI indukoval proliferaci T buněk a expresi interferonu γ v klonech T buněk odvozených z plátů, což naznačuje, že v plátech pacientů s APS existují specifické T buňky pro beta2GPI. Beta2GPI specifické T buňky podporují produkci monocytární matrix metaloproteinázy-9, TF a cytotoxicitu zprostředkovanou perforinem nebo ligandem Fas/Fas a mohli by potenciálně pomáhat autoantigenně specifickým B buňkám, které zachytily a zpracovaly apoptické buňky (Rauch J. et al., 2018).

V plátu jsou odpovědi T buněk proti beta2GPI, zejména proti doméně I, spojeny s nestabilitou plátu. Dále se beta2GPI váže na oxidované lipoproteiny o nízké hustotě a pravděpodobně podporuje prozánětlivé a proaterogenní účinky oxidovaného lipoproteinu o nízké hustotě. Komplex oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě a beta2GPI se stává imunogenním spouštěčem autoimunitní odpovědi (Matsuura E. et al., 2012).

Pacienti s APS mají zvýšené sérové hladiny komplexu lipoproteinu o nízké hustotě a beta2GPI (Matsuura E. et al., 2006), které vedou k aktivaci monocytů a expresi TF (Otomo K. et al., 2016).

5.2. Mechanismy endoteliální dysfunkce u trombotického APS

Pacienti s APS vykazují endoteliální dysfunkci. Cévní změny včetně arteriální/žilní hyperplázie s okluzí a stenózami začínají vazbou APA na endotel. Tato vazba zahrnuje účast membránových receptorů, které mohou v některých případech vyžadovat přítomnost sérového beta2GPI (Mineo C., 2013).

K aktivaci endoteliálních buněk dochází uvolněním extracelulárních vezikul z endoteliálních buněk působením anti-beta2GPI. Extracelulární vezikuly obsahují interleukin 1 a mikroRNA a aktivují endoteliální buňky prostřednictvím mechanismu, který je závislý na jednovláknové RNA signální dráze TLR-7 (Wu M. et al., 2015). APS prezentující se trombózou a ztrátou těhotenství současně vyvolává silnější škodlivé účinky na funkci endotelu, jako je cévní remodelace a angiogeneze, než sérum od pacientek se samotnými těhotenskými komplikacemi (Velásquez M. et al., 2016).

5.2.1. Zhoršená syntéza antitrombotických faktorů při APS

U pacientů s APS byla popsána porucha syntézy vazodilatačního faktoru oxidu dusnatého (NO). Pacienti s APS projevující se trombózou vykazovali nízké plazmatické hladiny nitritů a nitrátů – stabilní metabolity odbourávání NO. Klinicky byly tyto nízké hladiny spojeny s cévními okluzemi, což naznačuje zvýšené riziko trombotických a zánětlivých příhod (Ames P., 2010). APA mohou působit jako endogenní antagonisty endoteliální NO syntetázy

(eNOS) prostřednictvím beta2GPI, čímž dochází ke snížené tvorbě NO. Útlum eNOS byl zprostředkován sníženou fosforylací serinu 1179 ENOs. Tato inhibice fosforylace eNOS je závislá na proteinové fosfatáze 2A (PP2A), beta2GPI a ApoER2 (obrázek 3) (Ramesh S. et al., 2011; Sacharidou A. et al., 2018a). Inhibice aktivity eNOS APA navíc přispívá k tvorbě trombů, zvýšené adhezi leukocytů a změnám cévního tonu. Jeví se, že protrombotický fenotyp krevních destiček a monocytů je rovněž spouštěn APA prostřednictvím ApoER2 (Sacharidou A. et al., 2018b). APA může vyvolat nerovnováhu v produkci tromboxanu a prostacyklinu, která podporuje aktivaci krevních destiček (Lellouche F. et al., 1991).

Další potenciální faktor, který přispívá k tvorbě trombózy u pacientů s APS je heparan sulfát. Tento lineární polysacharid je nezbytný pro adekvátní antikoagulační aktivitu antitrombinu (Moon J.J. et al., 2005). Beta2GPI se váže na heparan sulfát prostřednictvím anionicko-kationtové vazby a nabízí tak epitopy pro cirkulující APA (Meroni P.L. et al., 1998).

5.2.2. Zvýšená interakce mezi monocyty a endotelem při APS

Zvýšená interakce mezi monocyty a endoteliálními buňkami u pacientů s APS je spojena s trombózou (Clemens N. et al., 2009). APA můžou přímo aktivovat monocyty, ty pak interagují s endotelem, což vede k protrombotickým dějům jako je produkce TF (Kinev A.V. a Roubey R.A., 2008). Naopak expozice endoteliálních buněk APA zvyšuje endoteliální expresi monocytárního chemoatraktivního proteinu 1 (MCP-1), který následně podporuje syntézu TF monocyty (obrázek 3) (Cho C.S. et al., 2002). V přítomnosti beta2GPI APA přímo indukují aktivaci dráhy MAPK v monocytech. Tyto APA stimulují fosforylací p38 MAPK, translokaci jaderného faktoru κ B (NF- κ B) do jádra a upregulaci TF. Anti-beta2GPI vykazují vysokou afinitu k vazbě na další molekuly, jako je annexin A2, který je exprimován na povrchu endoteliálních buněk. Annexin A2 slouží jako kotva pro vazbu fosfolipidů a APA, zejména anti-beta2GPI, jak bylo popsáno u skupiny LA pozitivních pacientů s žilní trombózou. Po navázání anti-beta2GPI/annexin A2 byla pozorována aktivace endotelu s následnou zvýšenou adhezí monocytů (obrázek 3) (Zhang J. a McCrae K.R., 2005).

Adheze monocytů k endotelu je zásadní při produkci TF a tvorbě krevních sraženin prostřednictvím APA.

5.2.3. Protrombotické endoteliální mikročástice uvolněné při APS

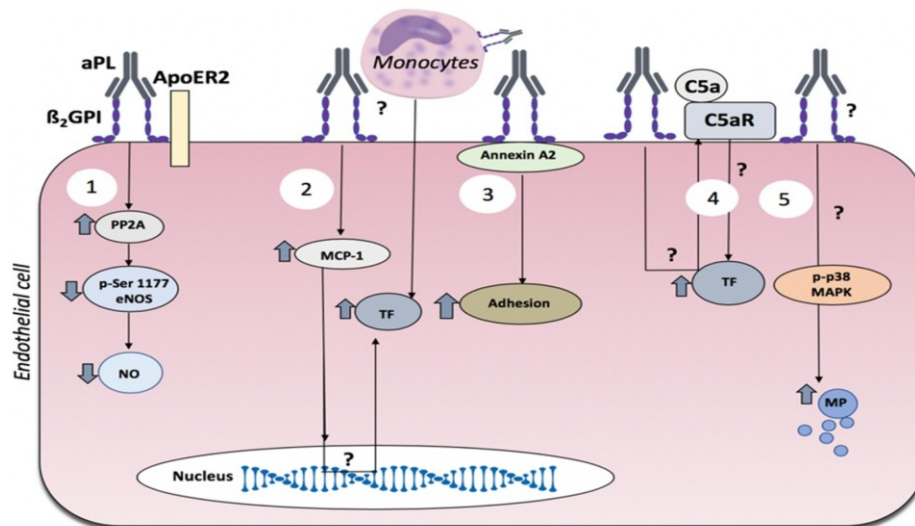
Endoteliální dysfunkce je spojena se syntézou endoteliálních extracelulárních částic, jako jsou mikrovezikuly (Morel O. et al., 2006). Studie *in vitro* prokázaly výrazné zvýšení uvolňování mikročástic z endoteliálních buněk v přítomnosti IgG od pacientů s APS a diagnózou trombózy (Pericleous C. et al., 2013). Tvorba mikročástic je pravděpodobně závislá na aktivaci p38 MAPK (obrázek 3) (Curtis A.M. et al., 2009).

5.2.4. Komplement-dependentní aktivace endotelu při APS

Komplementový systém je součástí našeho vrozeného imunitního systému. Skládá se ze skupiny bílkovin v krvi, které po aktivaci stimulují uvolňování cytokinů a vytvářejí membránový útočný komplex, který zprostředkovává fagocytózu a lýzu buněk.

Vztah APA a komplementu při vzniku trombózy je zcela zřejmý. Poškození tkání zprostředkované APA indukovalo aktivaci komplementu vedoucí k trombóze nebo ztrátě plodu (Chaturvedi S. et al., 2019). APA spouští aktivaci komplementové kaskády generující aktivní komponenty C3a, C3b a C5a. C5a je silný anafylatoxin, který může vyvolat trombózu prostřednictvím chemotaktických účinků (Erkan D. a Salmon J.E., 2016). U pacientů s APS byla pozorována hypokomplementémie odrážející aktivaci komplementu (Oku K. et al., 2009). Vazba C5a na endoteliální receptor C5aR indukuje tvorbu TF (obrázek 3) (Wojta J. et al., 2002). APA indukovaná endoteliální dysfunkce a trombóza je závislá na komplementu (Pierangeli S.S. et al., 2005). Komplementové proteiny s beta2GPI a IgG byly lokalizovány ve stěně arterie u pacientů s APS. Rekurenci trombózy lze zabránit inhibicí komplementu monoklonální protilátkou anti-C5 (Meroni P.L. et al., 2016).

Obrázek 3: Mechanismy endoteliální dysfunkce u trombotického APS (Velásquez M. et al., 2018). ApoER2 – receptor pro apolipoprotein E 2; PP2A – proteinová fosfatáza 2A; NO – oxid dusnatý; eNOS – endoteliální NO syntetáza; MCP-1 – monocytární chemoatraktivní protein 1; TF – tkáňový faktor; C5aR – endoteliální receptor pro C5 složku komplementu; MP – mikrovezikuly; MAPK – mitogenem aktivovaná proteinová kináza.



6. Vyšetřování APA

V šesté kapitole se zaměřím na základy moderních metod stanovení hladin APA a na problematiku jejich avidity. Stanovení lupus antikoagulans bylo stručně popsáno v kapitole o antifosfolipidových protilátkách.

6.1. Imunochemické stanovení

V poslední době je pozorován velký pokrok v laboratorní diagnostice autoimunitních onemocnění. Pro stanovení autoprotilátek jsou zaváděny moderní imunochemické testy. Manuální metody jsou nahrazovány sofistikovanějšími rychlými testy (Tozzoli R. et al., 2013; Bizzaro N. et al., 2015; Cinquanta L. et al., 2017). Kromě enzymů se pro detekci signálu využívají i další molekuly, jako jsou luminofory, případně fluorofory, které se používají pro nové chemiluminiscenční (CLIA) a fluorescenční enzymové imunoanalýzy (EliA). Trendem v oblasti stanovení protilátek se stávají automatizované systémy. Vývoj technologií a přístrojového vybavení umožňuje zavést nová monoplexní i multiplexní měření autoprotilátek. Tyto progresivní inovace se uplatňují i při stanovení APA (Tozzoli R. a Villalta D., 2014; Mahler M. et al., 2016).

ELISA je zlatým standardem pro vyšetření APA. Principem této sendvičové metody je vazba APA ze vzorků séra/plazmy na povrch jamek mikrotitrační destičky, které jsou potažené antigenem. Tímto se vytváří komplex antigen/protilátka. Na tento komplex se váže konjugát protilátky proti lidskému Ig a enzymu (peroxidáza). Peroxidáza štěpí specifický chromogenní substrát, čímž vzniká barevná změna, jejíž intenzita je detekována fotometrií pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Aydin S., 2015; Kohl T.O. a Ascoli C.A., 2017; Tebo A.E. et al., 2008). Výsledky APA se získají odečtením naměřené optické hustoty z kalibrační křivky a obvykle se udávají v arbitrárních jednotkách IU/ml nebo v jednotkách GPL/MPL. Mezní hodnota je pro jednotlivé APA rozdílná. Výsledky testů různých souprav v různých laboratořích vykazují poměrně velkou variabilitu. Z tohoto důvodu vzniká potřeba metody více standardizovat (Chayoua W. et al., 2018; Decavele A.S. et al., 2011; Gebhart J. et al.,

2019; Pierangeli S.S. et al., 2012).

Jednou z novějších metod pro stanovení APA je CLIA, citlivá imunochemická metoda, která je založená na detekci luminiscence (produkt luminiscenčních látek). Jedná se o velmi dobře standardizovanou metodu. Provádí se pomocí automatického analyzátoru, který umožňuje zpracování většího množství vzorků. Pomocí CLIA se kvantitativně stanovují ACLA IgG, IgM, anti-beta2GPI IgG, IgM a anti-beta2GPI-D1 (Zhou J. et al., 2018). Na rozdíl od techniky ELISA používají chemiluminiscenční imunoanalýzy pro stanovení protilátek často jako pevnou fázi paramagnetické kuličky. Množství emitovaného světla se vyjadřuje jako číselná hodnota v relativních světelných jednotkách. Světelné jednotky jsou úměrné množství autoprotilátek navázaných na antigen na povrchu kuliček (Mahler M. et al., 2016; Capozzi A. et al., 2012). Porovnání CLIA a ELISA prokázalo podobnou citlivost obou metod pro ACLA IgG a IgM a anti-beta2GPI IgM. Pro anti-beta2GPI IgG měla vyšší citlivost CLIA než ELISA (Salma N. et al., 2018).

Testy EliA jsou plně automatizované fluorescenční enzymové imunoanalýzy (Villalta D. et al., 2009). Antigeny (hovězí kardiolipin a hovězí beta2GPI jako kofaktor pro ACLA protilátky a purifikovaný lidský beta2GPI pro anti-beta2GPI) potažené na polystyrenových kalíšcích zachycují specifické protilátky ze vzorků od pacientů. Navázané APA protilátky se detekují fluorimetricky pomocí antihumánních protilátek IgG/IgM/IgA konjugovaných s enzymem (galaktosidáza). Galaktosidáza přeměňuje substrát 4-methylumbelliferyl-beta-D galaktosidázu na fluorescenční produkt. GPL-U/ml a MPL-U/ml jsou jednotky pro vyjádření výsledků ACLA a AU/ml pro anti-beta2GPI.

Multiplexní průtokové imunoanalýzy představují plně automatizované systémy, které umožňují analyzovat komplexní řadu protilátek v jediném vzorku. Pro stanovení APA byly vyvinuty platformy s mikrosférami (paramagnetickými kuličkami) jako pevná fáze v tomto systému. Mikrosféry jsou vnitřně označeny jedinečnou kombinací fluoroforů, které slouží jako diskriminační signál (Ayoglu B. et al., 2016). Povrch kuliček je potažen různými antigeny, které zachycují specifické autoprotilátky ze vzorků séra/plazmy. Fluorochromem

konjugované antihumánní imunoglobuliny detekují protilátky navázané na antigeny na mikrosférách. Fluorescence je analyzována analyzátozem podobným průtokovému cytometru, který je vybaven dvěma lasery. Jeden laser vyhodnocuje fluorescenci kuliček (identifikaci mikrosféry) a druhý laser excitací fluorochromu konjugátu určuje množství autoprotilátek zachycených antigenem na paramagnetických kuličkách. Fluorescence se počítá v relativní intenzitě fluorescence (Fritzler M.J., 2006; Tozzoli R. a Villalta D., 2014). Ve srovnání s ELISA mají multiplexní testy založené na mikrosférách výhodu menší spotřeby objemu vzorku, rychlejšího provedení, aniž by se snížila analytická citlivost a přesnost.

MLDA (multi-line dot assay) je semikvantitativní metoda pro detekci více APA současně, která je prováděná na polyvinyliden difluoridových (PVDF) membránách. Na PVDF jsou v prouzcích imobilizovány různé fosfolipidy, na které se vážou příslušné APA ze zkoumaného vzorku. Hodnocení se provádí pomocí denzitometrie a výsledky se označují jako pozitivní/negativní (Bever E.M. et al., 2004). Ve srovnání s ELISA hydrofobní PVDF membrány napodobují vazbu APA *in vivo*, jsou poréznější a mohou skrývat velkou část hydrofobní části fosfolipidu, což může mít za následek hustší expresi hydrofilní části fosfolipidu na povrchu PVDF a intenzivnější interakci se zkoumanými APA.

6.2. Avidita

Humorální imunitní odpověď na specifický antigen zahrnuje jak kvantitativní aspekt stanovený jako koncentrace Ig, tak kvalitativní hledisko citlivosti, zkřížené reaktivity nebo specifity - funkce avidity (Pohanka M., 2009). Nepřítomnost klinických projevů u APA pozitivních pacientů může být dána přítomností APA s nízkou aviditou. Protilátky s vyšší aviditou mají vyšší prediktivní hodnotu ke klinickým projevům.

6.2.1. Termín afinita a avidita

Afinita popisuje sílu vazby mezi paratopem Ig s jeho příslušným antigenním epitopem (Božič B. et al., 2007; Gharavi A. a Reiber H., 1996). Afinita vzniká součtem přitažlivých a odpudivých sil. Mezimolekulární síly přítomné mezi paratopem a epitopem zahrnují relativně slabé nekovalentní interakce, hydrofobní síly, elektrostatické síly nebo Van der Waalsovy síly. Přirozeně se vyskytující Ig mají nejméně dvě vazebná místa pro antigen, která jsou schopná reagovat s více antigenními epitopy. Celková síla vazby mezi multivalentní protilátkou a multivalentním antigenem se nazývá avidita nebo funkční afinita (Gharavi A. a Reiber H., 1996; Lappalainen M. a Hedman K., 2004). Avidita závisí na afinitě jednotlivých vazebných míst Ig k příslušným epitopům antigenu, jejich hustotě, rozestupu a polyreaktivitě protilátek.

Afinita je multigeneticky podmíněná vlastnost protilátek, která je nezávislá na hladině protilátek (Steward M.W., 1979). V případě infekčních chorob mají Ig produkované při sekundární odpovědi vyšší aviditu než ty, které se vyskytují v imunitním systému při odpovědi primární. U autoimunitních onemocnění není otázka tzv. somatické hypermutace doposud objasněna (Božič B. et al., 2007). Zrání protilátek spojené s progresí od nízké k vysoké aviditě není vždy rovnoměrné a může být ovlivněno mnoha faktory (Shepherd S.J. et al., 2013). Stanovení avidity autoprotilátek ukázalo, že jejich rozdílná avidita může přispívat k různým klinickým projevům (Cui Z. a Zhao M.H., 2005).

6.2.2. Metody stanovení avidity protilátek

Pro stanovení avidity protilátek lze užít různé metody. Avidita se obvykle měří pomocí metody ELISA v prostředí, kde chaotropní látky narušují interakce mezi protilátkou a antigenem. Zpravidla se porovnává počáteční vazba protilátek na příslušný antigen při fyziologické koncentraci soli s vazbou za chaotropnějších podmínek v simultánních analýzách (Cucnik S. et al., 2011). Tímto způsobem se hodnotí relativní avidita. Pro stanovení avidity protilátek jsou v literatuře dobře popsány dva postupy. Při tzv. preventivním principu se chaotropní látky přidávají do ředícího roztoku séra, aby se zabránilo vazbě protilátek s nízkou aviditou k antigenům na pevné fázi (ředící princip) (Inouye S. et al.,

1984). Běžně se uplatňuje další disociační princip, kde imunitní komplexy specifických protilátek a antigenů (potažených na mikrotitračních jamkách) jsou vystaveny chaotropním látkám v promývacím pufru (eluční princip). Interakce protilátek s nízkou aviditou s antigeny jsou snadno přerušeny, naopak vysokoavidní protilátky zůstávají navázány (Fialova L. et al., 2011; Woznicová V., 2004). Uvolněné protilátky s nízkou aviditou se vymyjí z jamek před kvantifikací protilátek vázaných na antigeny.

Obecně se hodnota avidity protilátek vyjadřuje jako index avidity (AI), jehož výpočet je založen na poměru navázaných protilátek v mikrotitračních jamkách v přítomnosti nebo nepřítomnosti chaotropů. Různé chaotropní látky mají rozdílné schopnosti při disociaci imunitních komplexů (Dimitrov J.D. et al., 2011). Intenzita přerušování spojení protilátka-antigen je závislá na druhu zkoumaného antigenu a jeho specifických protilátkách.

Testy ELISA s použitím chaotropních látek byly rovněž využity v klinických studiích zaměřených na aviditu APA. Močovina nebo chlorid sodný byly použity jako chaotropní činidla (Zachou K. et al., 2006; Cucnik S. et al., 2004). V případě močoviny byla séra testována současně v sériových ředěních s přítomností močoviny a bez ní. V této souvislosti byl zaveden termín reziduální aktivita, která je definovaná jako ředění séra po ošetření močovinou vyjádřené jako procento zředění séra bez ošetření a odpovídající stejné absorbanci (Zachou K. et al., 2006). Vyšší reziduální aktivita znamená vyšší aviditu ACLA.

Výsledky avidity ELISA dobře korespondují s výsledky získanými prostřednictvím přesnějšího měření, například pomocí analýzy biospecifických interakcí nebo rovnovážné dialýzy (McCloskey N. et al., 1997; Macdonald R.A. et al., 1988).

6.2.3. Avidita APA

Dosavadní klinické studie hodnotily převážně aviditu APA u izotypu IgG na pevné fázi. První klinické studie avidity APA používaly k disociaci imunitních komplexů močovinu (Vlachoyiannopoulos P.G. et al., 1998). Zjistily, že protilátky buď proti beta2GPI nebo

komplexu kardiolipin/beta2GPI od pacientů s APS vykazují vysokou rezistenci vůči močovině na rozdíl od sér pacientů s jinými autoimunitními chorobami. U 30 % pacientů s APS a SLE byly zjištěny protilátky s vysokou aviditou (Celli C.M. et al., 1999). Naopak u pacientů s malárií, syfilis či syndromem získané imunodeficience byly zjištěny protilátky nízkoavidní (Dueymes M. et al., 1995).

Čučník a kol. analyzovali (2011, 2004) séra v přítomnosti zvyšující se koncentrace NaCl (0,15, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 a 6 mol/l). Rozdíl mezi vysokou a nízkou aviditou anti-beta2GPI protilátek byl stanoven arbitrárně porovnáním počáteční vazby protilátek při koncentraci 0,15 mol/l s vazbou při koncentraci 0,5 mol/l NaCl. Když vazba protilátek při koncentraci 0,5 mol/l NaCl zůstala vyšší než 65 % počáteční hodnoty, byla deklarována vysoká avidita anti-beta2GPI. Když vazba při koncentraci 0,5 mol/l NaCl klesla na 25 % nebo pod tuto hodnotu původní vazby, byly stanoveny protilátky s nízkou aviditou. Protilátky, které nesplňovaly tato kritéria, byly považovány za protilátky s heterogenní aviditou. Výsledky naznačily, že vysokoavidní anti-beta2GPI protilátky jsou klinicky významnější než protilátky s nízkou aviditou. Přítomnost anti-beta2GPI s vysokou aviditou nebyla vzácná u pacientů s APS. Hlavní klinickou manifestací anti-beta2GPI s vysokou aviditou byla žilní trombóza. Trombóza byla vzácná ve skupině pacientů s vysokým titrem protilátek, ale s nízkoavidními anti-beta2GPI. Avidita anti-beta2GPI může být spolehlivějším laboratorním ukazatelem než titr APA pro hodnocení dlouhodobého trombotického rizika (Cucnik S. et al., 2005). Výše zmíněná tvrzení byla potvrzena v multicentrických studiích téhož vědeckého týmu (Cucnik S. et al., 2011; Cucnik S. et al., 2012). Multicentrické studie rovněž objasnily jasnou souvislost mezi anti-beta2GPI s vysokou aviditou a porodnickými komplikacemi. Statisticky významný rozdíl byl pozorován u pacientek s porodnickými obtížemi ve skupině s vysokou aviditou protilátek oproti protilátkám s nízkou aviditou.

Závěry klinických studií naznačují, že avidita APA je klinicky velmi užitečná. APA s vysokou aviditou jsou spojeny především s HŽT a APS. Avidita by se v blízké budoucnosti mohla stát součástí klasifikačních kritérií APS.

Experimentální část

7. Úvod

Experimentální část je rozdělena na část metodickou (studie 1) a část klinickou (studie 2 a 3).

Metodická část práce se zaměřuje na testování různých modifikací ELISA pro nalezení optimálních podmínek vhodných pro rutinní stanovení avidity APA.

Klinická část je věnována zejména stanovení avidity APA u vybraných skupin onemocnění a zjištění souvislosti mezi aviditou a titrem kriteriálních a nekriteriálních APA.

Hlavními cíli experimentální práce bylo:

- 1.) porovnat několik modifikací ELISA s různými chaotropními činidly pro stanovení avidity antikardiolipinových protilátek (ACLA),
- 2.) prozkoumat vztah mezi aviditou ACLA IgG a jejich hladinami,
- 3.) vyhodnotit hladiny a aviditu aPE jako příklad nekriteriálních protilátek u několika skupin pacientů a porovnat je s konvenčními APA.

Uvedené hlavní cíle jsou detailněji rozvedeny u jednotlivých studií.

8. Studie 1 – Porovnání různých metod ELISA pro stanovení avidity APA

8.1. Úvod

Patogenní potenciál autoprotilátek závisí nejen na jejich hladině, ale také na kvalitativních charakteristikách, jako jsou afinita a avidita, které mohou přispívat k závažnosti příslušného onemocnění (Fialova L., 2014). Cucnik a kol. (2005) předpokládají, že avidita anti-beta2GPI může být spolehlivějším laboratorním ukazatelem než titr APA pro hodnocení dlouhodobého trombotického rizika. Byly popsány různé metody stanovení avidity protilátek (Lynch H.E. et al., 2014; Dimitrov J.D. et al., 2011). V klinických laboratořích se běžně využívají imunoanalytické metody na pevné fázi (převážně ELISA) v přítomnosti chaotropních látek. V průběhu ELISA jsou vzniklé imunitní komplexy dočasně vystaveny chaotropním látkám (Dimitrov J.D. et al., 2011; Cucnik S. et al., 2011; Dauner J.G. et al., 2012; Almanzar G. et al., 2013; Vlachoyiannopoulos P.G. et al., 1998). Interakce nízkoavidních protilátek s antigeny jsou chaotropními činidly snadno přerušeny, zatímco vysokoavidní protilátky zůstávají navázané na antigeny. Nízkoavidní protilátky uvolněné po inkubaci s chaotropními činidly jsou odstraněny z příslušných jamek. Protilátky s vyšší aviditou vázané v imunitních komplexech na povrchu jamek se kvantifikují a porovnávají s množstvím protilátek detekovaných v jamkách bez chaotropů. Několik modifikací ELISA metod pro stanovení avidity se liší ředěním analyzovaného séra nebo koncentrací chaotropních látek (Dimitrov J.D. et al., 2011; Dauner J.G. et al., 2012; Perciani C.T. et al., 2007). Nejjednodušší metoda používá jedno ředění séra s fixní koncentrací chaotropní látky. Jiný přístup stanovení avidity je založen na využití sériově ředěného séra při konstantní koncentraci chaotropní látky (Zachou K. et al., 2006; Perciani C.T. et al., 2007; Jenum P.A. et al., 1997). Alternativně je konstantně naředěné sérum vystaveno zvyšující se koncentraci chaotropní látky (Polanec J. et al., 1994). Přerušování interakcí mezi protilátkou a antigenem se zdá být vysoce závislé na druhu zkoumaného antigenu a jeho specifické protilátky s ohledem na odlišný typ a počet vazeb, které se podílejí na tvorbě imunitních komplexů (Dimitrov J.D. et al., 2011; Almanzar G. et al., 2013). Na základě toho různé chaotropy přerušují imunitní komplexy tvořené určitým antigenem a odpovídající protilátkou odlišně (Dauner J.G. et al., 2012).

8.2. Cíle studie

Otestovat různé možnosti stanovení avidity ACLA postupem ELISA za přítomnosti chaotropů a vybrat optimální modifikaci, která je vhodná k rutinnímu použití.

- 1.) Porovnávali jsme dvě různé chaotropní látky (močovinu a chlorid sodný), které již byly dříve použity pro stanovení avidity APA (Cucnik S. et al., 2012; Vlachoyiannopoulos P.G. et al., 1998; Fialova L. et al., 2014).
- 2.) Srovnávali jsme několik modifikací ELISA s použitím různých koncentrací chaotropních látek a různého ředění vzorků séra.
- 3.) Porovnávali jsme různé způsoby výpočtu AI.

8.3. Materiály a metody

8.3.1. Soubor pacientů

Analyzovali jsme 28 vzorků séra od pacientů sledovaných na Imunologickém oddělení Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze (věk: 40 ± 17 let, průměr \pm SD; pohlaví: ženy 22, muži 6). Hladiny IgG ACLA byly stanoveny v séru metodou ELISA (ELISA Anti-cardiolipin antibodies; Orgentec, Mainz, Německo) v rámci imunologického vyšetření pacientů. Hladiny IgG ACLA byly u pacientů vyšší než 10 GPL. Převažující diagnózy pacientů zařazených do studie byly následující: SLE (n=9), glomerulonefritida a nefritida (n=5), imunodeficience (n=3), neplodnost (n=2) a poruchy koagulace (n=2).

Všechny subjekty poskytly písemný informovaný souhlas s účastí ve studii. Etická komise Všeobecné fakultní nemocnice v Praze studii schválila.

8.3.2. Metody

8.3.2.1. Stanovení hladin ACLA

Jako východisko pro stanovení avidity jsme vycházeli z metody ELISA podle protokolu pro stanovení IgG ACLA (Pierangeli S.S. a Harris E.N., 2008). 10 % hovězí sérum (ABS) ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrům (PBS) bylo použito jako blokovací roztok a pro ředění vzorků od pacientů. Tento postup ELISA poskytuje dostatečné množství beta2GPI pro validní stanovení a splňuje požadavky doporučené mezinárodními konsenzuálními pokyny pro testování antikardiolipinu a anti-beta2GPI (Lakos G. et al., 2012).

8.3.2.2. Stanovení avidity IgG ACLA

Chemikálie (neuvedené v popisu metody):

Hovězí sérum: Bovine Serum Franc Origin (Biosera, Francie)

Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a. (Penta, ČR)

Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát p.a. (Penta, ČR)

Chlorid draselný, p.a. (Penta, ČR)

Chlorid sodný, p.a. (Penta, ČR)

Kyselina sírová 96%, p.a. (Penta, ČR)

Močovina, p.a., (Penta, ČR)

Přístroje:

pH-metr UB-10 (Denver Instrument, Německo)

Analytické váhy SI-234 (Denver Instrument, Německo)

Třepačka s termostatem Mixing Block MB-102 (Bioer, Čína)

Destičkový spektrofotometr Sunrise (TECAN, Švýcarsko) se softwarem Magellan

Pro vyšetření avidity IgG ACLA byl použit postup popsany Vlachoyiannopoulosem a kol. (1998) v naší modifikaci.

Hovězí kardiolipin (difosfatidylglycerol) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) byl použit jako antigen pro potažení jamek mikrotitračních destiček. Jamky mikrotitračních proužků (Polysorp, NUNC, Roskilde, Dánsko) byly potaženy 50 μ l roztoku hovězího kardiolipinu v absolutním ethanolu (50 μ g/ml). Mikrotitrační proužky byly inkubovány přes noc při teplotě 4 st. C. Po inkubaci byly jamky promyty pomocí PBS. Jamky byly blokovány 150 μ l 10% ABS v PBS po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a poté byly jamky promyty. 100 μ l každého naředěného séra a pro každou koncentraci chaotropního činidla (viz níže) bylo přidáno vždy do dvou jamek potažených kardiolipinem a následovala inkubace po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po promytí se do jamek přidalo 100 μ l roztoků chaotropního činidla o zvolených koncentracích (viz níže) nebo 100 μ l PBS. Po 10 minutách inkubace, při pokojové teplotě, byly jamky promyty. V dalším kroku bylo do všech jamek přidáno 100 μ l kozího anti-humánního IgG konjugovaného s křenovou peroxidasou (SouthernBiotech, Birmingham, USA), zředěného 1:5000 v 10% ABS v PBS a destičky byly inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci byly destičky promyty a poté přidáno 100 μ l substrátu (tetrametylbenzidin s H_2O_2) (TEST-LINE, Brno, Česká republika). Následovala inkubace 20 minut při pokojové teplotě. Enzymatická reakce byla zastavena přidáním 2 mol/l H_2SO_4 . Absorbance v každé jamce byla odečtena při 450 nm s korekcí při 620 nm pomocí destičkového spektrofotometru Sunrise (Sunrise, TECAN, Švýcarsko) (Fialova L. et al., 2014).

Vyšetřovali jsme séra sériově ředěná 10% ABS v PBS (pH 7,2) 1:50, 1:100, 1:200 a 1:400. V každém naředěném séru se zjišťovala avidita protilátek pomocí zvyšujících se koncentrací roztoků močoviny (2,0, 4,0, 6,0 a 8,0 mol/l) nebo chloridu sodného (0,25, 0,5, 1,0 a 2,0 mol/l). S ohledem na nedostatečné množství séra u některých pacientů nebyly všechny modifikace ELISA provedeny u každého séra.

8.3.2.3. Vyjádření výsledků avidity

Pro stanovení avidity a vyjádření výsledků avidity jsme použili několik modifikací.

8.3.2.3.1. Metoda 1: jediné ředění séra, jediná koncentrace chaotropu

Stanovení avidity touto metodou je založeno na analýze jednoho ředění séra vystaveného jedné koncentraci chaotropu. AI použitý pro vyjádření hodnoty avidity představuje poměr (nebo procento) zbytkových protilátek navázaných v jamkách v přítomnosti chaotropu k celkovému množství protilátek navázaných v jamkách bez přítomnosti chaotropu.

AI se vypočítá vydělením hodnot absorbance získaných měřením z jamek s přidavkem chaotropu (močovina 6 nebo 8 mol/l; NaCl 1 nebo 2 mol/l) a hodnotami absorbance získanými měřením z jamek bez přidavku chaotropu.

AI = absorbance v jamkách s chaotropem/absorbance v jamkách bez chaotropu.

8.3.2.3.2. Metoda 2: různá ředění séra, jediná koncentrace chaotropu

Na rozdíl od předchozího přístupu, tato modifikace pro aviditu používá několik různých ředění séra vystavených jedné koncentraci chaotropu (Zachou K. et al., 2006; Jenum P.A. et al., 1997). V našich experimentech byla séra naředěna v poměru 1:50, 1:100, 1:200 a 1:400. AI byl vyjádřen jako poměr (nebo procento) hodnoty ředění séra (titru protilátek) po ošetření chaotropem v souladu s určitou mezní hodnotou absorbance k hodnotě ředění séra bez ošetření chaotropem odpovídající stejné mezní hodnotě absorbance (obrázek 4 A).

AI = ředění séra po ošetření chaotropem k mezní absorbanci/ředění séra bez ošetření chaotropem k mezní absorbanci.

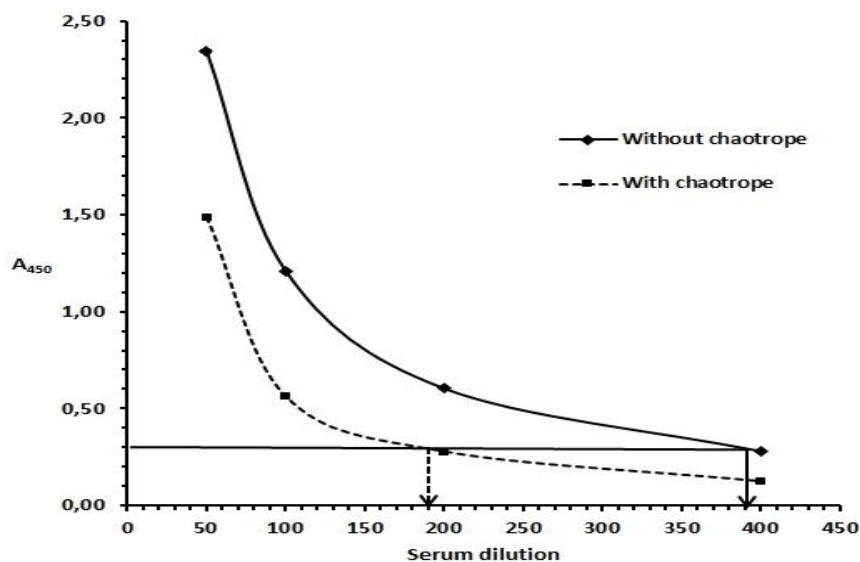
Přesnější způsob výpočtu AI je založen na poměru ploch odvozených z hodnoty titrační

křivky protilátek získané i) po ošetření chaotropním činidlem a ii) bez ošetření chaotropním činidlem (obrázek 4 B). Použili jsme zjednodušený vzorec navržený Percianim a kol. (2007), kteří hodnotili poměr ploch křivek bez použití integrálních funkcí. Relativně jednoduchý matematický vzorec byl užit pro výpočet obou ploch. AI lze vypočítat jako poměr dvojnásobku sumace absorbancí získaných v grafu ELISA v chaotropních podmínkách minus absorbance prvního a posledního ředění séra dělený dvojnásobkem sumace absorbancí získaných v grafu ELISA bez chaotropu minus absorbance prvního a posledního ředění séra (Perciani C.T. et al., 2007).

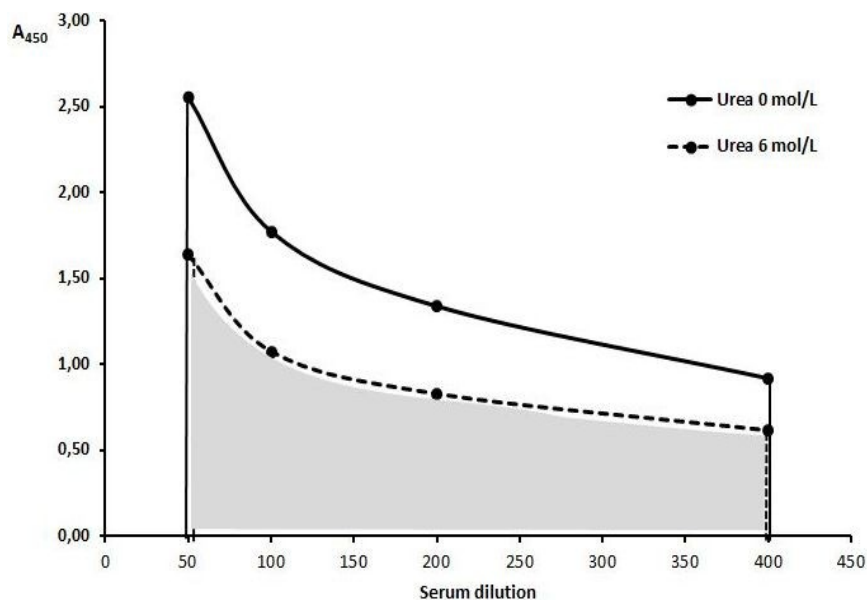
Tuto metodu jsme modifikovali použitím pouze dvou optimálních ředění séra 1:50 a 1:100 s cílem ušetřit práci spojenou s postupem ELISA.

Obrázek 4:

A.) Stanovení avidity pomocí ELISA s použitím několika různě ředěných sér vystavených jedné koncentraci chaotropní látky. Šipka přerušované čáry na ose x znázorňuje ředění séra vystavené působení chaotropní látky odpovídající určité mezní absorbanci; šipka plné čáry na ose x ukazuje zředění séra bez expozice chaotropní látce odpovídající určité mezní absorbanci.



B.) Stanovení AI na základě poměru ploch získaných z titrační křivky protilátek. Plná čára ohraničuje oblast bez chaotropu a přerušovaná čára ohraničuje oblast s chaotropem.



8.3.3. Statistická analýza

Statistické analýzy byly provedeny parametrickými testy po vyhodnocení normálního rozdělení pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. Vztah mezi AI vypočtenými různými způsoby byl vyhodnocen pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Byl použit párový t test pro statistickou analýzu rozdílů v párových měřeních avidity ACLA v séru nebo různých vyjádření AI. Hladina významnosti pro všechny testy byla $P < 0,05$. Porovnání dvou různých technik měření bylo provedeno pomocí Bland-Altmanových grafů (Bland J.M. a Altman D.G., 1999). Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistica 12 (StatSoft, ČR) a MedCalc (Ostende, Belgie).

8.4. Výsledky

8.4.1. Metoda 1: jediné ředění séra, jediná koncentrace chaotropů

Koncentrace močoviny 2 a 4 mol/l nebo NaCl 0,25 a 0,5 mol/l nevedly k účinné disociaci imunitních komplexů. Pokud byl použit roztok chaotropu v jedné koncentraci, tak tyto

koncentrace byly méně vhodné pro rozlišení mezi vysoceavidními a nízkoavidními protilátkami.

Pro vyhodnocení výpočtu AI tímto přístupem jsme porovnali získané hodnoty:

- (1) při různé koncentraci chaotropů (močovina 6 a 8 mol/l; NaCl 1 a 2 mol/l) a
- (2) při různém ředění séra (1:50 a 1:100).

1.) Byla zjištěna vysoká korelace mezi AI na základě různých koncentrací močoviny nebo NaCl nezávisle na ředění séra (sérum ředění 1:50: močovina 6 vs 8 mol/l, $r=0,94$; NaCl 1 vs 2 mol/l $r=0,89$; ředění séra 1:100: močovina 6 vs 8 mol/l, $r=0,88$; NaCl 1 vs 2 mol/l, $r=0,88$; $P<0,0001$ pro každé srovnání). AI byl významně nižší u vyšší koncentrace močoviny (močovina 6 vs 8 mol/l – $P<0,001$ pro ředění séra 1:50 a $P=0.0008$ pro ředění séra 1:100), zatímco nedošlo k významnému poklesu hodnot AI stanovených v přítomnosti NaCl 2 mol/l ve srovnání s NaCl 1 mol/l.

2.) Ředění vzorků sér (1:50 a 1:100) ovlivnilo AI více než koncentrace chaotropů, ale korelace byla stále vysoká pro močovinu v obou koncentracích (močovina 6 mol/l: sérum 1:50 vs 1:100 $r=0,85$; močovina 8 mol/l: sérum 1:50 vs 1:100 $r=0,87$; $P<0,0001$ pro každé porovnání) a méně pro NaCl, ale stále statisticky významná (NaCl 1 mol/l: sérum 1:50 vs 1:100 $r=0,55$, $P=,01$; NaCl 2 mol/l: sérum 1:50 vs 1:100 $r=0,65$, $P=0,002$). Působení močoviny bylo účinnější ve více zředěných sérech. AI pro séra ředěná 1:100 byla významně nižší než pro séra ředěná 1:50 (sérum ředěné 1:50 vs. sérum ředěné 1:100, $P<0,05$ pro každou koncentraci močoviny). Vliv NaCl na disociaci imunokomplexu byl podobný u sér zředěných 1:100 i 1:50 a AI se nelišil (sérum ředěné 1:50 vs. sérum ředěné 1:100 n.s. pro každou koncentraci NaCl).

8.4.2. Metody 2: různá ředění séra, jediná koncentrace chaotropů

Tuto modifikaci ELISA jsme porovnávali v podmínkách různých koncentrací chaotropů. Byly pozorovány významné korelace mezi AI stanovenými ke stejné mezní hodnotě

absorbance 0,3 při použití koncentrace 6 nebo 8 mol/l pro močovinu a 1 nebo 2 mol/l pro NaCl (močovina 6 vs 8 mol/l $r=0,96$, $P<0,0001$; NaCl 1 vs 2 mol/l $r=0,85$, $P=0,002$). Podobně jako u předchozí metody byla AI významně nižší, když byla k disociaci imunitních komplexů použita močovina 8 mol/l ve srovnání s močovinou 6 mol/l ($P=0,047$). Žádný rozdíl nebyl pozorován v přítomnosti různých koncentrací NaCl jako chaotropního činidla. Bohužel bez dodatečného ředění séra, nebylo možné vyhodnotit AI ve vzorcích s příliš vysokým obsahem sérové koncentrace ACLA, které poskytovaly příliš vysokou absorbanci přesahující mezní hodnotu.

Kromě toho jsme AI analyzovali také na základě poměru ploch pod vlivem chaotropu a ploch bez vlivu chaotropu vypočteného podle vzorce navrženého Percianim a kol. (2007) a v naší modifikaci. Korelace mezi AI vypočteným původním vzorcem a naší modifikací je vysoká, a to zejména při použití močoviny (tabulka 3). Toto tvrzení bylo potvrzeno také Bland-Altmanovými grafy (obrázek 5A). Na rozdíl od použití AI založeném na mezní absorbanci, umožnila tato změna stanovit AI nezávisle na hodnotě absorbance. Srovnání testovaných modifikací je uvedeno v tabulce 4. Korelační koeficienty a Blandovy-Altmanovy grafy (obrázek 5B) také ukázaly dobrou shodu mezi stanovením AI pomocí různých ředění sér s jednou koncentrací chaotropu a s jedním ředěním séra.

Tabulka 3. Srovnání AI stanovených metodou ELISA s použitím séra naředěného vícekrát s jednou koncentrací chaotropu vypočtenou podle vzorce Percianiho a kol. (2007) (plocha 6 mol/l nebo plocha 8 mol/l) a AI stanovených naší modifikovanou metodou zahrnující pouze sérum ředěné 1:50 a 1:100 (modifikovaná plocha 6 mol/l nebo modifikovaná plocha 8 mol/l).

Comparison	n	r	p	Comparison	n	r	p
area as chaotrope				NaCl as chaotrope			
area 6 mol/L vs. area 8 mol/L	18	0,95	< 0.0001	area 1 mol/L vs. area 2 mol/L	20	0,93	< 0.0001
area 6 mol/L vs. area 6 mol/L modified	18	0,96	< 0.0001	area 1 mol/L vs. area 1 mol/L modified	20	0,92	< 0.0001
area 8 mol/L vs. area 8 mol/L modified	18	0,98	< 0.0001	area 2 mol/L vs. area 2 mol/L modified	20	0,92	< 0.0001
area 6 mol/L modified vs. area 8 mol/L modified	24	0,95	< 0.0001	area 1 mol/L modified vs. area 2 mol/L modified	20	0,89	< 0.0001

n=number of samples; r=Pearson's correlation coefficient; p=level of significance; vs.=versus

Tabulka 4: Srovnání AI stanovených metodou ELISA s použitím jednoho ředění séra (1:50 nebo 1:100) s fixní koncentrací chaotropu (močovina nebo NaCl) a AI stanovených metodou ELISA s použitím vícekrát naředěného séra.

Urea concentration	Comparisons	n	r	p	NaCl concentration	Comparisons	n	r	p
Urea 6 mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum	18	0, 88	< 0.0001	NaCl 1 mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum	20	0,7 4	0.0002
	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	18	0, 97	< 0.0001		single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	20	0,9 4	< 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	18	0, 97	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	20	0,9 1	< 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple	24	0, 94	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	20	0,8 0	< 0.0001

	diluted serum modified					modified			
Urea mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum	18	0,91	< 0.0001	NaCl 2 mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum	20	0,81	< 0.0001
	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	24	0,97	< 0.0001		single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	20	0,95	< 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	18	0,97	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	20	0,87	< 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum modified	24	0,95	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum modified	20	0,84	< 0.0001

n=number of samples; r=Pearson's correlation coefficient; p=level of significance; vs.=versus

8.4.3 . Vztah mezi AI při použití močoviny nebo NaCl

AI vypočtené z absorbancí získaných v přítomnosti NaCl nekorelovaly s hodnotami získanými v přítomnosti močoviny při použití sér zředěných v poměru 1:50. Při více naředěném séru (1:100) se korelace mezi provedenými testy ELISA s různými chaotropy zvýšila (tabulka 5). Shoda však byla méně vyjádřena v porovnání s různými postupy pro stanovení AI pomocí stejného chaotropního činidla. Podobné korelace byly pozorovány při srovnání metod popsaných Percianim a kol. (2007) včetně naší modifikace (tabulka 6). Byla zjištěna dobrá korelace mezi metodami používajícími čtyři ředění séra a mezi metodami používajícími pouze dvě ředění séra pro močovinu a NaCl. Bland-Altmanovy grafy také ukázaly shodu mezi AI stanovenou pomocí různých chaotropních látek (obrázek 5 C).

Tabulka 5: Porovnání AI stanovených metodou ELISA s použitím jednoho ředění séra (1:50 nebo 1:100) v přítomnosti různých chaotropů (koncentrace močoviny 6 mol/l nebo 8 mol/l; NaCl 1 mol/l nebo 2 mol/l).

Serum dilution	Comparisons	n	r	p
1:50	urea: 6 mol/L vs. NaCl 1 mol/L	16	0.32	n.s.
	urea: 6 mol/L vs. NaCl 2 mol/L	16	0.25	n.s.
	urea: 8 mol/L vs. NaCl 1 mol/L	16	0.34	n.s.
	urea: 8 mol/L vs. NaCl 2 mol/L	16	0.35	n.s.
1:100	urea: 6 mol/L vs. NaCl 1 mol/L	16	0.67	0.004
	urea 6 mol/L vs. NaCl 2 mol/L	16	0.62	0.01

	urea: 8 mol/L vs. NaCl 1 mol/L	16	0.81	0.0001
	urea: 8 mol/L vs. NaCl 2 mol/L	16	0,57	0.02

n=number of samples; r=Pearson's correlation coefficient; p=level of significance; vs.=versus

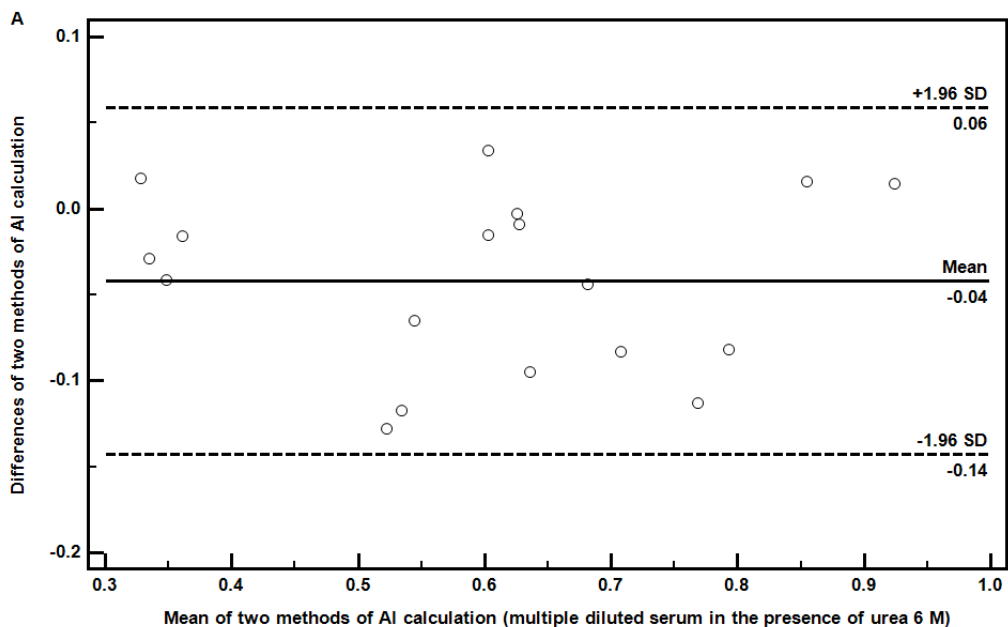
Tabulka 6: Srovnání AI stanovených metodou ELISA s použitím několika různých ředění sér s fixní koncentrací různých chaotropů (močovina vs. NaCl).

Comparisons		r	p
area urea 6 mol/L vs. area NaCl 1 mol/L	16	0.57	0.022
area urea 6 mol/L vs. area NaCl 2 mol/L	16	0.56	0.025
area urea 8 mol/L vs. area NaCl 1 mol/L	16	0.68	0.004
area urea 8 mol/L vs. area NaCl 2 mol/L	16	0.64	0.008
area urea 6 mol/L modified vs. area NaCl 1 mol/L modified	16	0.49	0.053
area urea 6 mol/L modified vs. area NaCl 2 mol/L modified	16	0.45	0.081
area urea 8 mol/L modified vs. area NaCl 1 mol/L modified	16	0.54	0.032
area urea 8 mol/L modified vs. area NaCl 2 mol/L modified	16	0.48	0.057

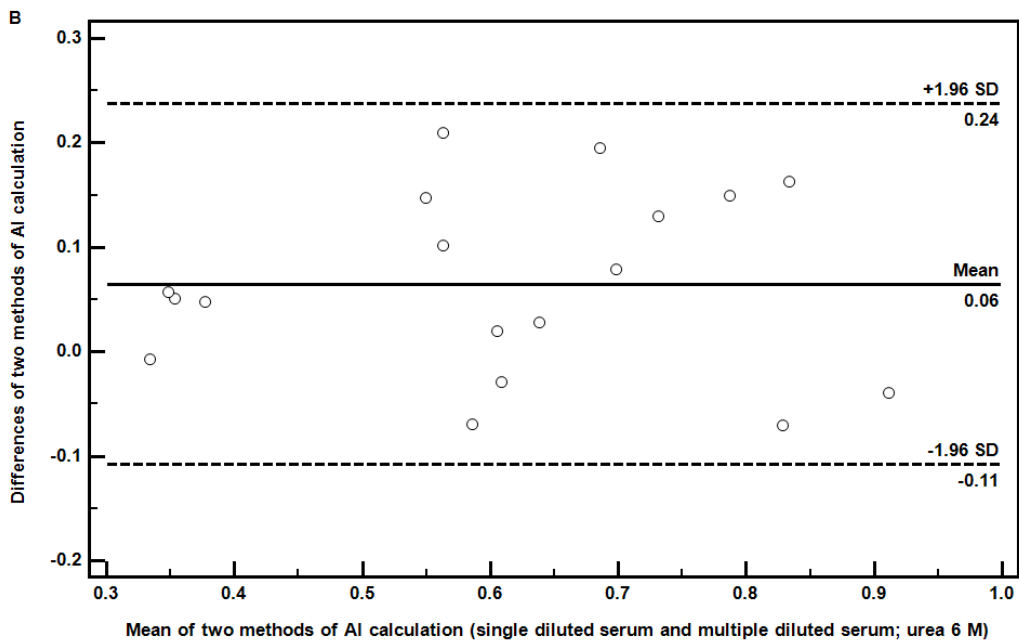
n=number of samples; r=Pearson's correlation coefficient; p=level of significance; vs.=versus

Obrázek 5:

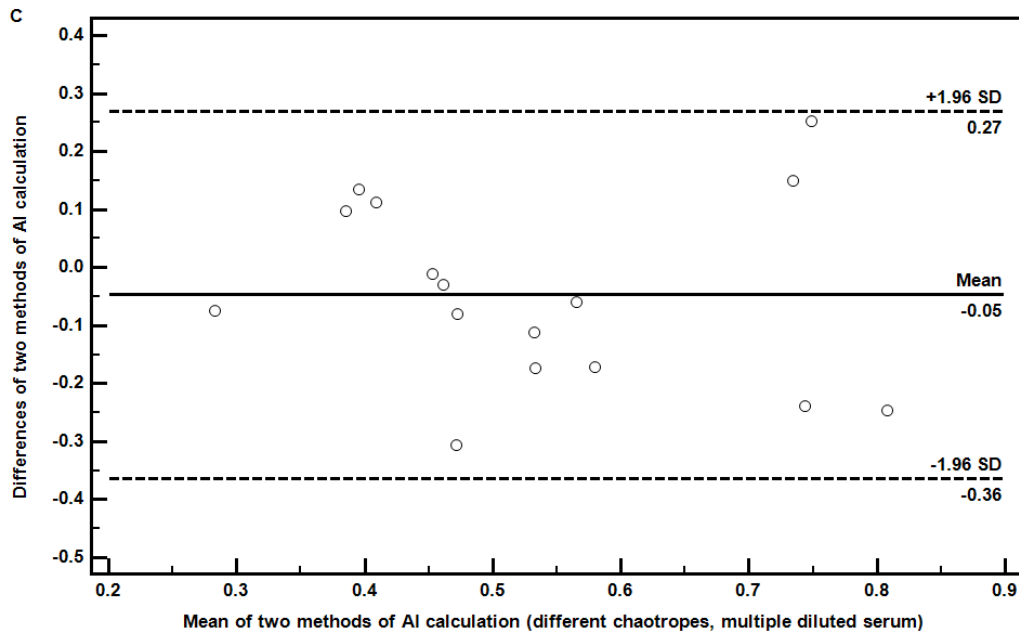
(A) Reprezentativní Bland-Altmanův graf porovnávající AI stanovené metodou ELISA s použitím několika různě ředěných sér v přítomnosti močoviny 6 mol/l vypočteného podle vzorce Percianiho a kol. (2007) a naší modifikované metody.



(B) Reprezentativní Bland-Altmanův graf porovnávající AI založené na ELISA s použitím různě ředěných sér a jednoho ředění séra (1:50) v přítomnosti močoviny 6 mol/l.



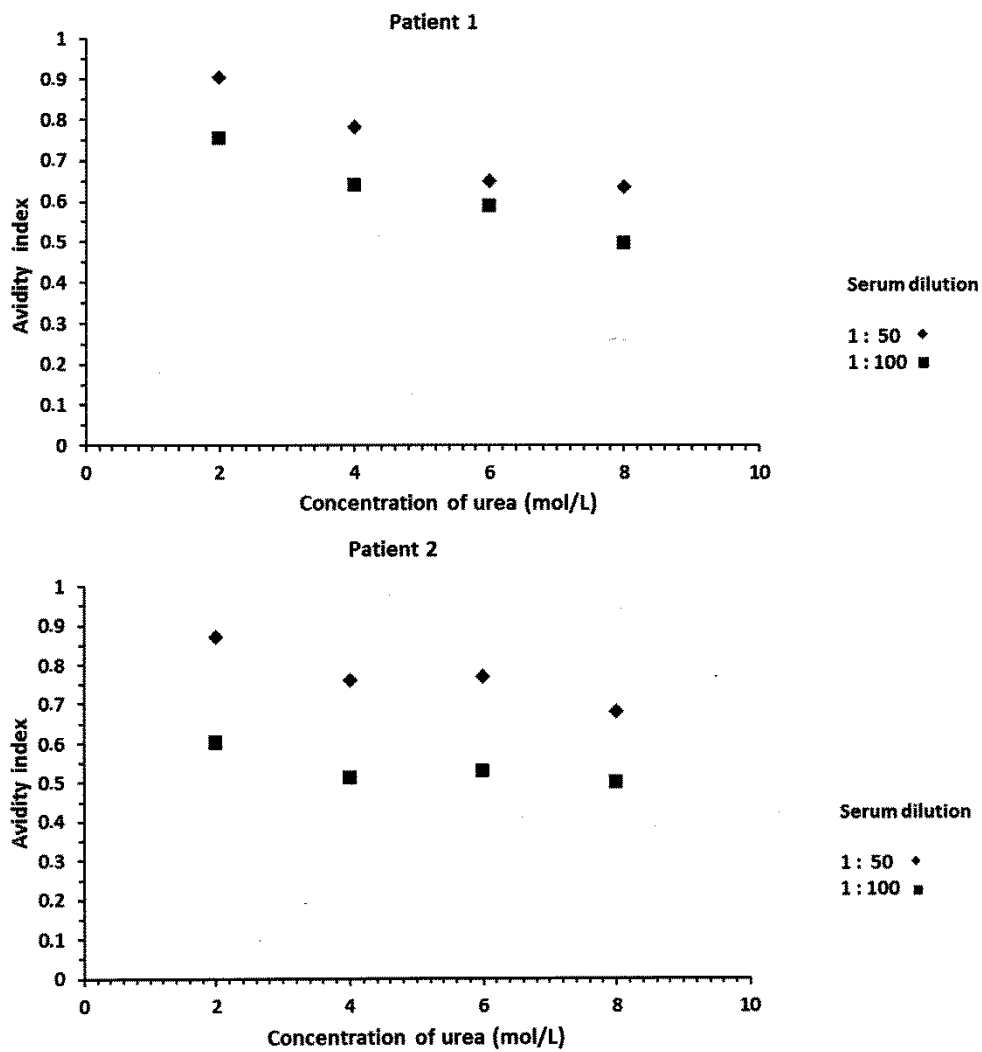
(C) Reprezentativní Bland-Altmanův graf porovnávající AI založené na metodě ELISA při použití různých chaotropů (plocha výpočet: močovina 6 mol/l a NaCl 1 mol/l).



8.4.4. Avidita IgG u pacientů s vysokými hladinami ACLA

Čtyři pacienti z naší skupiny měli hladiny ACLA vyšší než 100 GPL. Žádná z hodnot avidity stanovená při jediném ředění séra s koncentrací močoviny 6 nebo 8 mol/l a NaCl 1 nebo 2 mol/l nebyla vyšší než příslušné průměrné hodnoty+SD (směrodatná odchylka). Reprezentativní hodnoty AI jsou uvedeny v různých koncentracích močoviny na obrázku 6.

Obrázek 6: AI u dvou reprezentativních pacientů s vysokými hladinami ACLA ($\geq 100\text{GPL}$) stanovené metodou ELISA v přítomnosti různých koncentrací močoviny.



8.5. Diskuze

Porovnali jsme dvě chaotropní látky močovinu a chlorid sodný popsané v literatuře pro stanovení avidity APA a testovali jsme několik možností výpočtu AI. Zkoumané koncentrace chaotropních látek (2-8 mol/l pro močovinu a 0,25-2 mol/l pro NaCl) byly zvoleny s ohledem na zkušenosti z předchozích studií zabývajících se aviditou APA (Cucnik S. et al., 2012; Vlachoyiannopoulos P.G. et al., 1998; Fialova L. et al., 2014). Z chemického principu je zřejmé, že močovina a NaCl nedisociují imunitní komplexy vytvořené během ELISA stejným způsobem. Zatímco močovina narušuje vodíkové vazby a Van der Waalsovy síly (Dimitrov J.D. et al., 2011), NaCl jako iontová sloučenina může také disociovat elektrostatické interakce. Proto výsledky získané metodami využívajícími různé chaotropy nemohou být stejné.

Nicméně se jeví, že oba testované chaotropy mohou být využity, a za situace kdy je vhodná koncentrace chaotropů a patřičné ředění séra, mohou být hodnoty avidity vzájemně srovnatelné. Korelační koeficienty a Bland-Altmanovy grafy prokázaly, za předpokladu vhodných podmínek, dobrý vztah mezi AI určenými prostřednictvím různých chaotropních látek. Omezená srovnatelnost mezi AI v přítomnosti různých chaotropních látek byla pozorována u metody při použití jednoho ředění séra 1:50 při fixní koncentraci chaotropní látky, zatímco stanovení AI založené na vyšším ředění séra 1:100 nebo na vícenásobném ředění séra vykazovalo lepší shodu (tabulky 5 a 6).

Protože spolehlivý odhad avidity protilátek vyžaduje 50 % snížení vazby protilátek (Pullen G.R. et al., 1986), byly nižší testované koncentrace močoviny (2 a 4 mol/l) a NaCl (0,25 a 0,5 mol/l) považovány za nevhodné pro metody používající pevnou koncentraci disociačních činidel. Koncentrace 6 a 8 mol/l močoviny a 1 a 2 mol/l NaCl byly vhodné pro dostatečnou disociaci imunitních komplexů při ředění sér 1:50 a 1:100. Obě ředění sér a koncentrace chaotropů ovlivnily intenzitu disociace imunitních komplexů během dalšího kroku ELISA. Vyšší koncentrace močoviny a více naředěná séra vedly k účinnější disrupci imunitních komplexů a k významnému snížení AI. Nejjednodušší způsob stanovení avidity je analýza jednoho ředění séra vystaveného pouze jedné koncentraci chaotropních látek. Výpočet AI

vyjádřený jako poměr hodnot absorbance získaných v přítomnosti chaotropní látky k hodnotám absorbance získaných bez chaotropních látek je nekomplikovaný.

Dimitrov a kol. (2011) zmiňují, že test pro stanovení avidity není dostatečně citlivý na mírné poklesy vazby při vysokých koncentracích IgG. Na základě našich výsledků se zdá, že stanovení avidity IgG ACLA není ovlivněno jejich hladinami podobně jako v případě IgG protilátek proti pertusovému toxinu a filamentóznímu hemaglutininu (Almanzar G. et al., 2013). Naše metoda stanovení avidity pro ACLA s jedním ředěním séra a ta, která používala sériově ředěné sérum, jež není ovlivněné hladinami protilátek, vykazovaly dobrou korelaci. Hodnoty AI u našich pacientů s velmi vysokými hladinami IgG ACLA nepřekročily průměrné hodnoty + směrodatnou odchylku odpovídající celkové testované skupině pacientů. Můžeme tedy předpokládat, že používané koncentrace chaotropů byly dostačující i pro vyšší hladiny ACLA. Nicméně, hladiny protilátek mohou být důležité, pokud se hodnoty očekávaného titru protilátek v jednotlivých vzorcích lišily ve velkém rozsahu (Almanzar G. et al., 2013).

Stanovení AI pomocí sériově ředěného séra pacienta je považováno za zlatou standardní metodu pro stanovení avidity metodou ELISA (Hedman K. et al., 1989). Výsledky avidity nejsou ovlivněny koncentrací testovaných specifických protilátek (Dimitrov J.D. et al., 2011). Hlavní nevýhoda tohoto metodického přístupu spočívá v nutnosti čtyř nebo více ředění vzorku (Prince H.E a Wilson M., 2001). Tento postup zvyšuje nároky na čas a spotřebu činidel. Pro tyto nedostatky jsme tuto metodu modifikovali redukcí počtu ředění séra pouze na dvě, která se ukázala jako vhodná v rámci testování metody s jedním ředěním.

Tato metodická část práce je zpracována v publikaci Fialová L, Petráčková M, Kuchař O. Comparison of different enzyme-linked immunosorbent assay methods for avidity determination of antiphospholipid antibodies. J Clin Lab Anal. 2017 Nov;31(6):e22121.

9. Studie 2 – Avidita APA ve vztahu k jejich hladinám

9.1. Úvod

Heterogenita APA může být vyjádřena nejen v různé antigenní specifitě, ale také v jejich aviditě. Jedná se o důležitou charakteristiku protilátek, která popisuje celkovou vazebnou sílu mezi protilátkou a antigenem (Božič B. et al., 2007).

U autoimunitních onemocnění se vyskytují protilátky s nízkou, střední a vysokou aviditou (Fialová L., 2015; Fialová L., 2016).

9.2. Cíle studie

V této studii jsme se zaměřili na získání podrobnějších informací o aviditě ACLA IgG. Zajímala nás nejen avidita ACLA pozitivních jedinců, ale také jsme analyzovali, zda avidita u pacientů souvisí s nízkými hladinami ACLA.

Stanovili jsme si tyto hlavní cíle:

1.) Vyhodnotit vztah mezi aviditou ACLA IgG a jejich hladinami v rozmezí od velmi nízkých až po vysoké.

Hypotéza 1: Velmi nízké hladiny ACLA by mohly být charakterizovány vyšší aviditou.

Hypotéza 2: ACLA s vysokou aviditou mohou být přítomny u symptomatických pacientů.

2.) Hodnotit změny hladin ACLA a avidity ve skupině pacientů během dlouhodobého sledování.

Hypotéza: Hladiny ACLA a avidity se v průběhu sledování mění.

3.) Prozkoumat, zda avidita ACLA souvisí s hladinami převážně nekriteriálních APA.

Hypotéza: Avidita ACLA souvisí s hladinami převážně nekriteriálních APA.

9.3. Materiál a metody

9.3.1. Soubor pacientů

Retrospektivně jsme analyzovali 78 vzorků séra od 60 pacientů (věk 48 ± 19 let; průměr \pm SD; pohlaví 36 žen, 24 mužů). Sběr vzorků byl proveden na Imunologickém oddělení Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze (Česká republika) v období let 2011 až 2015 a v Thomayerově nemocnici v Praze v letech 2015 až 2016.

Pacienti byli vyšetřeni nebo hospitalizováni pro systémová imunologická onemocnění ($n = 14$, převážně se SLE) a žilní trombózy ($n = 18$). Diagnóza HŽT byla stanovena na základě anamnézy, fyzikálního vyšetření a zejména dopplerovské sonografie. Ostatní pacienty ($n = 28$) tvořili především pacienti s různými onemocněními, jako jsou onemocnění ledvin (glomerulonefritida nebo tubulointerstiální nefritida), gastrointestinální poruchy (převážně pankreatitida a onemocnění žlučových cest), imunodeficience, ženská neplodnost a diabetes mellitus. Žádný ze zařazených pacientů neměl maligní onemocnění.

Diagnózy pacientů stanovili zkušení internisté na základě platných diagnostických kritérií. Všechny subjekty poskytly písemný informovaný souhlas s účastí ve studii. Etické komise Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Thomayerovy nemocnice v Praze studii schválily.

9.3.2. Metody

9.3.2.1. Hladiny různých typů APA

Hladiny ACLA IgG byly stanoveny v séru metodou ELISA (Orgentec, Mainz, Německo). Další typy APA namířené proti jiným strukturám (anti-beta2GPI, anti-fosfatidylserin (aPS), anti-fosfatidylinositol (aPI), anti-fosfatidová kyselina (aPA)) byly také analyzovány

pomocí ELISA (Orgentec, Mainz, Německo). Podle doporučení výrobce byly hraniční hodnoty pro APA 10 GPL. Obecně je rozsah měření pro soupravu ACLA ELISA od 0 do 120 GPL s funkční citlivostí 1 GPL.

9.3.2.2. Avidita ACLA IgG

Avidita ACLA IgG byla stanovena pomocí modifikované ELISA, kterou publikovali Vlachoyiannopoulos a kol. (1998). V předchozí studii (viz výše, kapitola 8) jsme zkoumali možnosti stanovení avidity ACLA pomocí chaotropních látek podrobněji. Zjistili jsme, že jak močovina v koncentracích 6 mol/l nebo 8 mol/l, tak chlorid sodný v koncentracích 1 mol/l nebo 2 mol/l byly vhodné pro dostatečnou disociaci imunitních komplexů během dalšího kroku ELISA.

Pro účely této studie jsme použili séra ředěná v poměru 1:50 a močovinu v koncentraci 6 mol/l a 8 mol/l jako chaotropní látku. Výsledky avidity ACLA IgG byly vyjádřeny jako AI.

absorbance v jamkách s chaotropem

AI = -----

absorbance v jamkách bez chaotropu

Protilátky byly klasifikovány jako vysokoavidní, když byl AI vyšší než 0,6, a nízkoavidní, když byl AI nižší než 0,4. Hodnoty AI protilátek od 0,4 do 0,6 byly obvykle označeny jako "šedá zóna".

9.3.3. Statistická analýza

Vzhledem k tomu, že data nevykazovala normální rozdělení, byly použity neparametrické statistické testy. Srovnání skupin bylo provedeno pomocí Kruskal-Wallisova testu. Spearmanův korelační koeficient byl použit pro korelační analýzu. Párová měření byla vyhodnocena Wilcoxonovým párovým testem. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p = 0,05$. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programů MedCalc (Ostende, Belgie) a Statistica (TIBCO Software Inc., ArcIT Consulting s.r.o., Czech Republic).

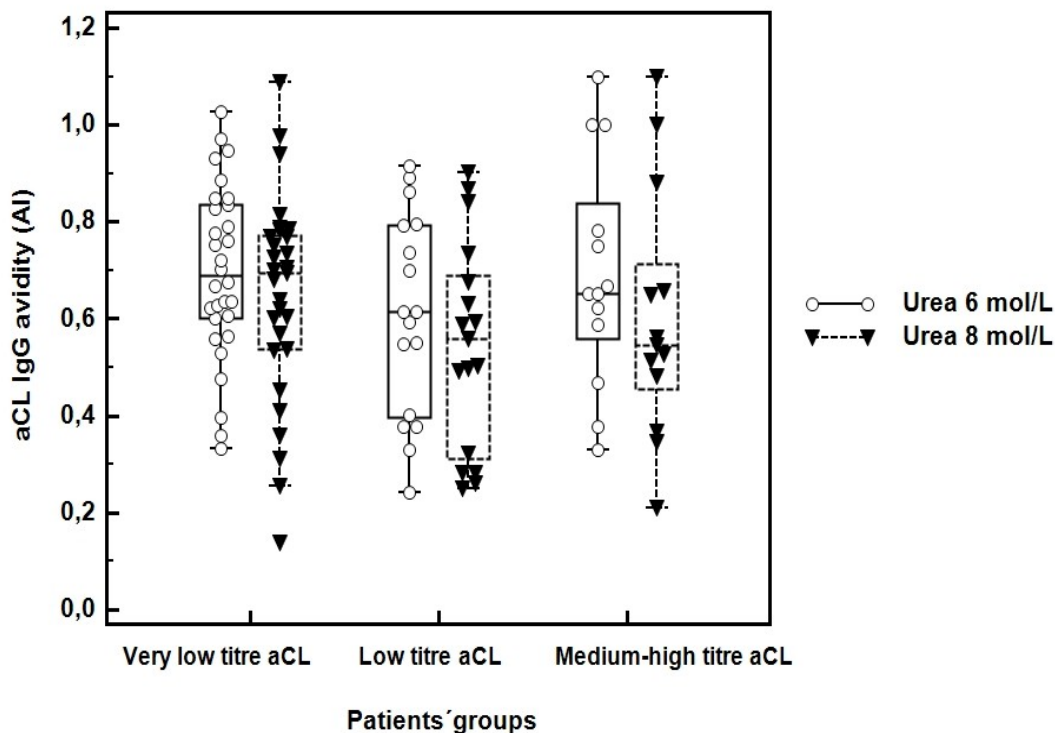
9.4. Výsledky

9.4.1. Srovnání avidit ACLA IgG podle hladin ACLA IgG

Pacienti byli rozděleni podle hladin ACLA IgG na tři skupiny: i) velmi nízké hladiny (< 10 GPL; $n = 30$), ii) nízké hladiny (10-40 GPL; $n = 17$) a iii) středně vysoké hladiny (> 40 GPL; $n = 13$). Hodnota ACLA IgG vyšší než 40 GPL je v laboratorních kritériích pro APS označena jako mezní hodnota pro střední až vysokou hladinu (titr) (Miyakis S. et al., 2006; Lackner K.J. a MullerCalleja N., 2018) a hodnota 10 GPL je mezní hodnotou pro pozitivní a negativní výsledek.

Pouze u jednoho pacienta s trombózou byla hladina ACLA > 10 GPL. SLE nebo systémové onemocnění pojivové tkáně byly diagnostikovány u 11 pacientů s hladinou ACLA vyšší než 40 GPL. Na obrázku 7 jsou uvedeny hodnoty avidity testované v přítomnosti močoviny o koncentraci 6 mol/l a 8 mol/l. Avidita ACLA se mezi jednotlivými skupinami významně nelišila bez ohledu na koncentraci močoviny. Mediány AI byly u všech skupin vyšší než 0,6 při použití močoviny 6 mol/l. Zvýšení koncentrace močoviny pro stanovení avidity vedlo k mírnému poklesu mediánů AI, ale nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi skupinami pacientů.

Obrázek 7: Avidity ACLA IgG ve skupinách pacientů klasifikovaných podle titru ACLA (velmi nízký titr ACLA < 10 GPL, n = 30; nízký titr ACLA 10 – 40 GPL, n = 17; středně vysoký titr ACLA > 40 GPL, n = 13). Středový rámeček představuje hodnoty od dolního po horní kvartil (25 až 75 percentil). Medián je znázorněn jako střední čára. Svislá čára se táhne od minimální po maximální hodnotu s vyloučením vybočujících hodnot, které jsou zobrazeny jako samostatné body.



9.4.2. Longitudinální hodnocení avidity ACLA IgG

Opakovaný odběr krve byl proveden u 14 pacientů v intervalu 315 dní (rozmezí 98-392 dní; medián 25.-75. percentil). Charakteristika longitudinálně hodnocených pacientů (věk 43 ± 15 let; průměr \pm SD) je uvedena v tabulce 7. V této skupině převažují pacienti s imunologickým onemocněním. Párové vzorky séra byly získány od většiny pacientů, s výjimkou tří pacientů, kterým byl proveden odběr krve třikrát nebo čtyřikrát. Podíl pacientů s nízkými nebo středně vysokými hladinami ACLA byl mezi pacienty podobný. Hodnota AI ACLA přesahovala 0,6 u většiny pacientů. Hladiny ACLA ani jejich avidita se během sledování významně neměnily

(obrázek 8). Doba vývoje hladin a avidit ACLA u tří pacientů, kterým byly vzorky odebrány více než dvakrát, jsou na obrázku 9. Je zřejmé, že změny v hladinách ACLA nebyly jednotně doprovázeny podobnými změnami jejich avidit. Nicméně pozorované změny v hladinách ACLA nepřesáhly rozmezí typická pro kategorie hladin ACLA, jako jsou nízké nebo středně vysoké hladiny. Stejně tak změny v aviditě ACLA, s výjimkou pacienta A (viz obrázek 9), byly irelevantní.

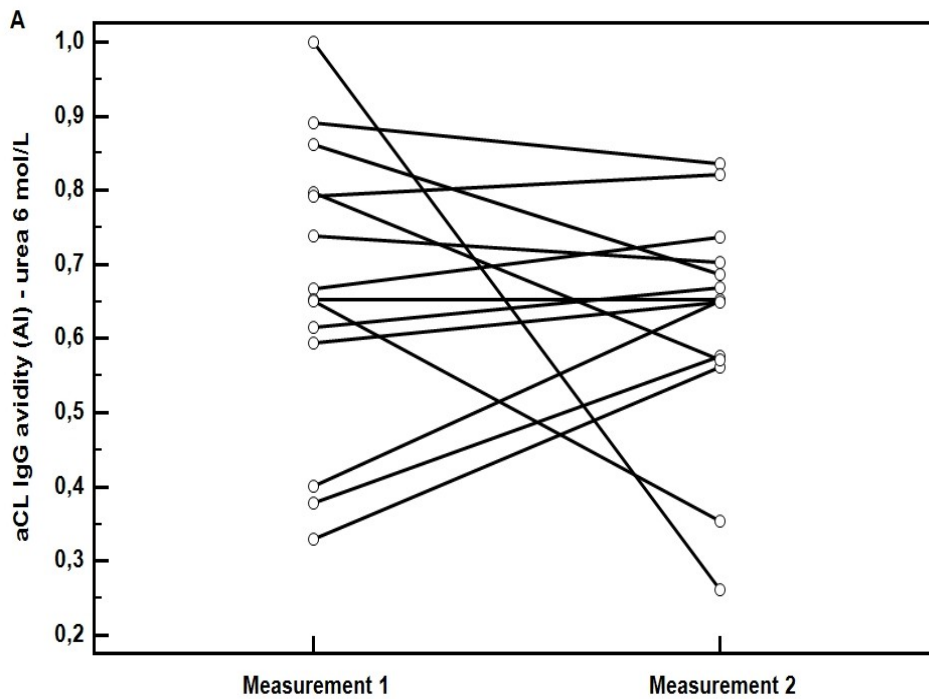
Tabulka 7: Klinické charakteristiky opakovaně vyšetřovaných pacientů. AI – index avidity; GPL – fosfolipidové jednotky ve třídě IgG; LFA-1 – antigen 1 asociovaný s funkcí lymfocytů; n.a. – není k dispozici; SLE – systémový lupus erythematodes.

Basic characteristics of patients				ACLA IgG follow-up change		
Patient No.	Diagnosis	Age (years), sex	Number of repeated aCL examinations	ACLA levels (GPL) follow-up change	ACLA IgG avidity (urea 6 mol/L) in AI follow-up change	ACLA IgG avidity (urea 8 mol/L) in AI follow-up change
1	Sjögren syndrome	71, female	2	14.3 – 10.7	0.74 – 0.70	0.67 – 0.63
2	SLE	46, male	3	100 – 81 – 100	0.67 – 0.73 – 0.58	0.53 – 0.64 – 0.3
3	SLE	41, male	3	16 – 15.2 – 18.1	0.61 – 0.66 – 0.63	0.59 – 0.69 – 0.56
4	SLE	41, female	2	16.7 – 22.8	0.4 – 0.65	0.32 – 0.56

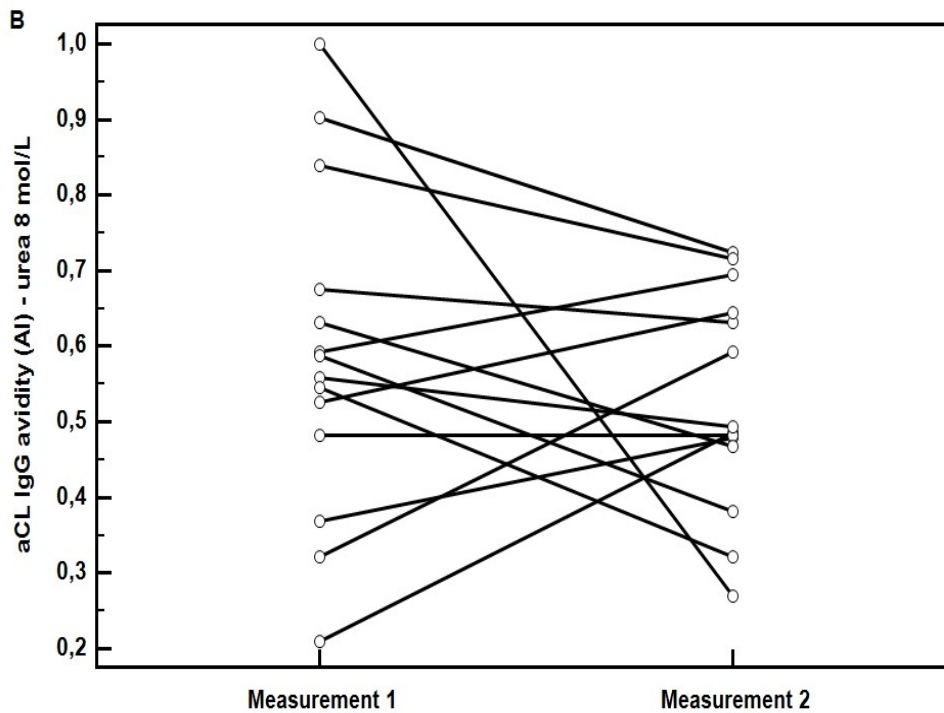
5	SLE	38, female	2	41.9 24.8	–	0.65 – 0.34	0.54 – 0.32
6	Systemic connective tissue disease	35, female	2	75.7 53.6	–	0.37 – 0.57	0.21 – 0.481
7	Systemic connective tissue disease	33, female	2	100 – 43.4		1.0 – 0.26	1.0 – 0.27
8	Coagulation disorder	64, female	2	n.a. – 10.7		0.79 – 0.82	0.84 – 0.72
9	Coagulation disorder	15, male	2	100 – 100		0.64 – 0.65	0.64 – 0.48
10	Immunodeficiency	30, female	2	28.9 12.8	–	0.86 – 0.68	0.58 – 0.38
11	Immunodeficiency	30, female	4	39.7 68.2 – 100 – 100	–	0.33 – 0.56 – 0.64 – 0.47	0.37 – 0.48 – 0.44 – 0.36
12	Female infertility	33, female	2	31.3 21.3	–	0.89 – 0.84	0.90 – 0.72
13	Defect of LFA-1	62, female	2	18.6 22.4	–	0.79 – 0.57	0.63 – 0.47
14	Glomerular abnormality	56, female	2	22.8 – n.a.		0.59 – 0.65	0.56 – 0.49

Obrázek 8: Dynamika hladin ACLA IgG a avidit u 14 pacientů v průběhu sledování:

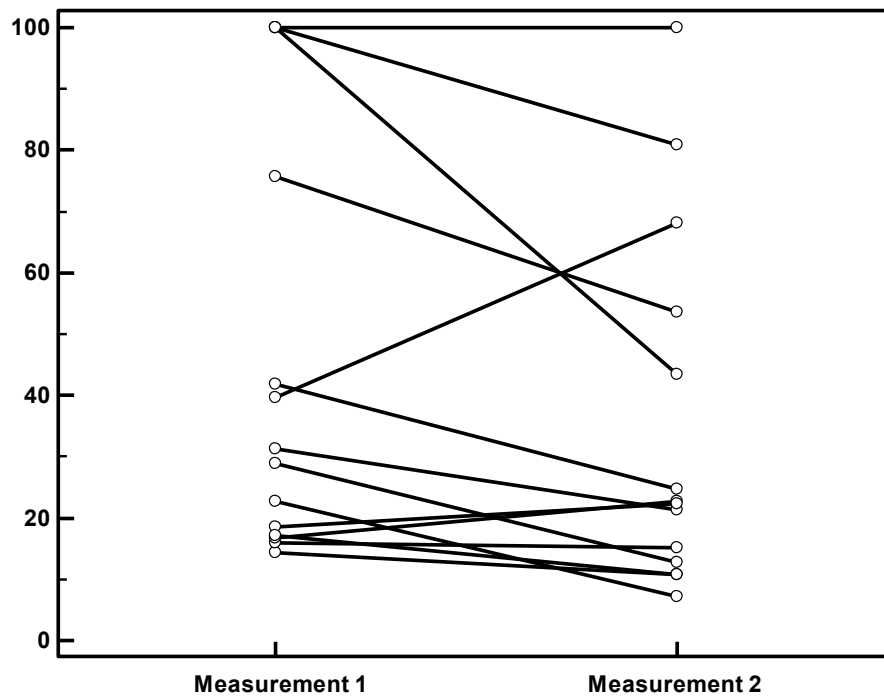
(A) změny hladin ACLA IgG;



(B) změny avidit ACLA IgG při použití močoviny 6 mol/l pro stanovení avidity;



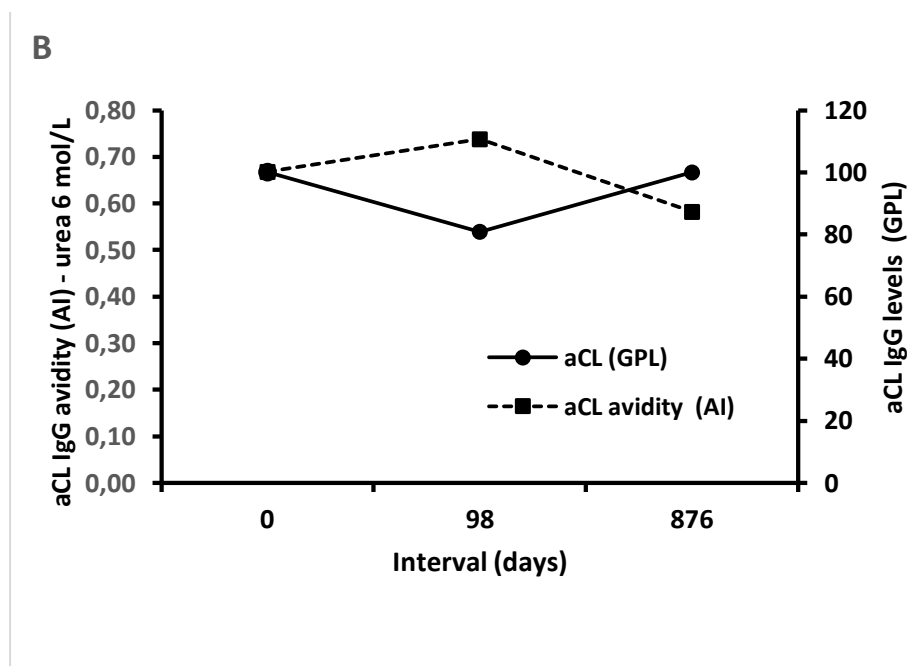
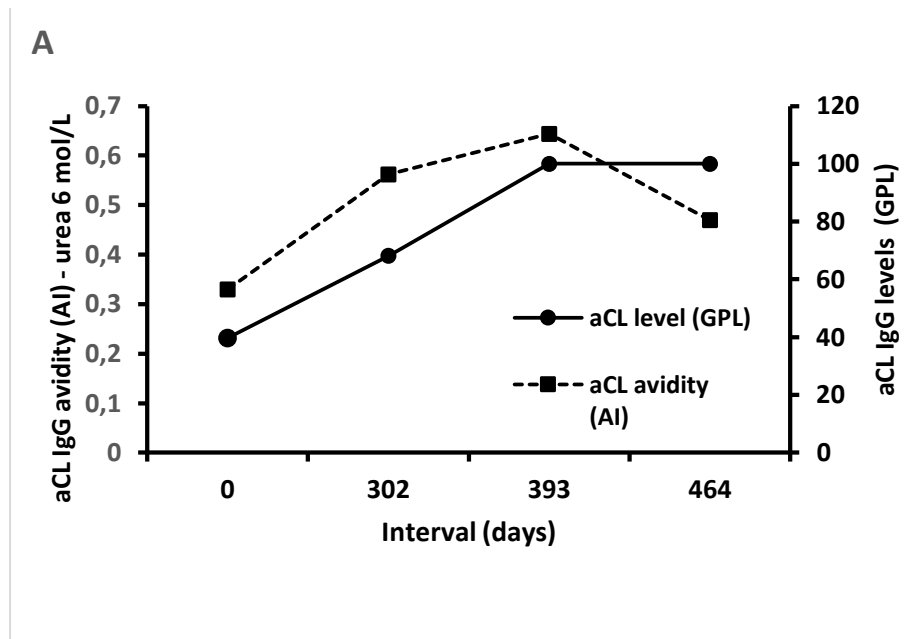
(C) změny avidit ACLA IgG při použití močoviny 8 mol/l pro stanovení avidity.

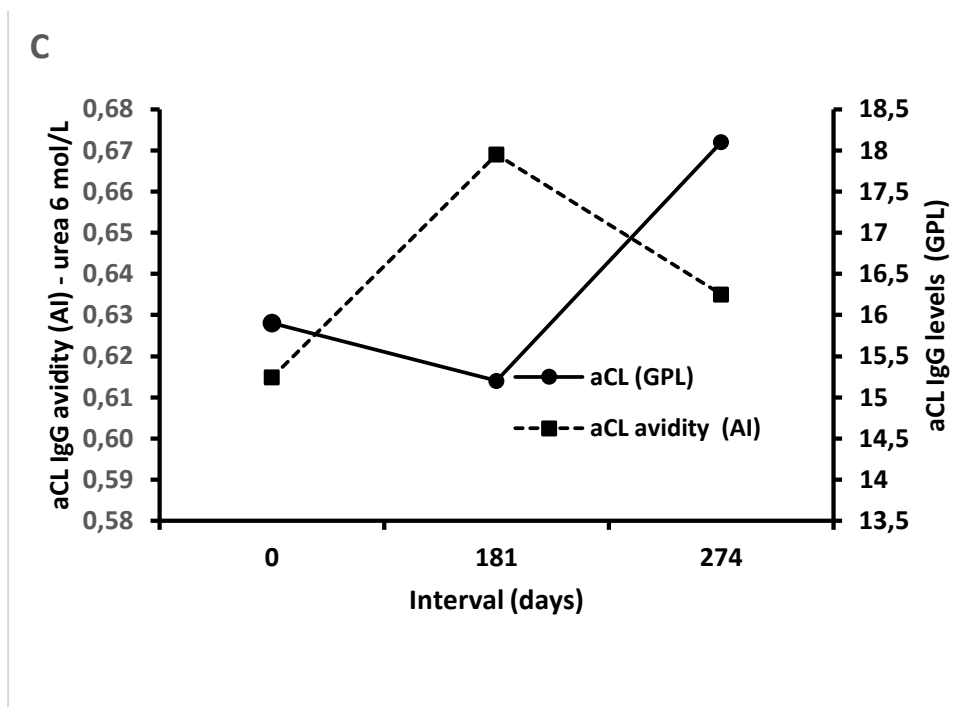


Obrázek 9: Avidity a hladiny ALCA IgG u tří pacientů při longitudinálním sledování.

Pacient A (žena, 30 let při prvním odběru krve) byl sledován pro imunodeficit, další dva pacienti byli léčeni pro SLE (B muž, 46 let při prvním odběru krve; C muž, 41 let při prvním odběru krve).

aCL – antikardiolinové protilátky; AI – index avidity; GPL – fosfolipidové jednotky ve třídě IgG.





9.4.3. Korelační analýzy

Avidity ACLA stanovené pomocí močoviny 6 mol/l nebo 8 mol/l nekorelovaly s jejich hladinami v žádné skupině pacientů klasifikovaných podle hladin ACLA (velmi nízké, nízké a středně vysoké hladiny ACLA). Naopak hladiny ACLA významně korelovaly s hladinami APA naměřených proti beta2GPI a dalším fosfolipidům, ale tyto hladiny nekorelovaly s aviditou ACLA (tabulka 8).

Tabulka 8: Korelace mezi hladinami a aviditou ACLA IgG a především nekriteriálními APA. AI – index avidity; aPI – protilátky proti fosfatidylinositolu; aPS – protilátky proti fosfatidylserinu.

Correlation versus	Anti-beta2GPI levels	aPS levels	aPI levels	Anti-phosphatidic acid
ACLA IgG levels (GPL)	r = 0.77 p <0.0001	r = 0.91 p <0.0001	r = 0.89 p < 0.0001	r = 0.92 p <0.0001
ACLA IgG avidity (AI – urea 6 or 8 mol/L)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

9.5. Diskuze

Pro stanovení avidity byly již popsány různé metody a jejich modifikace (Božič B. et al., 2007; Fialová L., 2014). V roce 2017 jsme podrobně zkoumali metody pro vyšetření avidity ACLA IgG na principu ELISA s chaotropy, které přerušují interakce nízkoavidních protilátek s antigeny (Fialová L. et al., 2017). Vyšší koncentrace chaotropních látek způsobila účinnější rozrušení imunitních komplexů. V této studii jsme aplikovali jednoduchou modifikaci metody - jednou ředěné sérum vystavené působení roztoku močoviny. Zjistili jsme dobrou korelaci mezi výsledky získanými při koncentraci močoviny 6 nebo 8 mol/l. Nicméně s ohledem na zahrnutí vzorků séra s velmi vysokými hladinami ACLA jsme provedli analýzy avidity v podmínkách obou koncentrací močoviny. Nezávisle na použité koncentraci močoviny nebyly zjištěny významné rozdíly v mediánech AI mezi testovanými skupinami pacientů (hladiny ACLA od velmi nízkých až po vysoké). U našich pacientů převažovaly ACLA s vyšší aviditou, protože mediány AI ve všech skupinách byly vyšší než hodnota 0,6 při použití močoviny 6 mol/l jako chaotropu. Není to překvapivé, protože do testování nebyly zahrnuty zdravé osoby.

Je dobře známo, že protilátky syntetizované v časně fázi imunitní odpovědi se vyznačují nízkou afinitou, a že proces maturace afinity závisí na mnoha okolnostech (Eisen H.N., 2014). Iniciační autoimunitního procesu není přesně známa a může jí předcházet mnoho let bez klinických projevů. Během období, kdy je autoimunitní humorální odpověď zesílená, může docházet ke zvyšování hladin a avidity autoprotilátek (Dellavance A. a Coelho Andrade L.E., 2014). Avidity autoprotilátek u autoimunitních chorob, které byly dosud studovány, dosahují většinou vyšších hodnot a mohou se podílet na závažnosti onemocnění (Cui Z. a Zhao M.H., 2005; Suwannalai P. et al., 2012; Krause S. et al., 2014). Jeví se, že povaha antigenu ovlivňuje zrání avidity protilátek. Například avidita protilátek proti amyloidu- β u Alzheimerovy nemoci byla charakterizována nižšími aviditami (Jianping L. et al., 2006). Zajímavé srovnání avidit protilátek proti vyvolávacím antigenům a autoantigenům naznačuje, že regulace imunitní B buněčné odpovědi se může lišit (Suwannalai P. et al., 2011; Gelderman K.A. et al., 2014; van Delft M.A.M. et al., 2018). Zatímco avidity autoprotilátek proti citrulinovaným a karbamylovaným proteinům nebo transglutamináze-2 bývají nízké, avidita proti antigenům jako je tetanový toxoid, difterický toxoid nebo gliadin, může být vysoká navzdory jejich nízkému titru. Van Delft a kol. (2018) vysvětlují nízkou aviditu autoprotilátek jako důsledek chronického přetížení antigenem a chronické protilátkové odpovědi. Bohužel jsme neměli možnost současně stanovit aviditu jak ACLA, tak protilátek proti infekčnímu antigenu. Suwannalai a kol. (2011) uvádějí, že protilátková odpověď proti autoantigenům nevykazuje aviditu zrání, což bylo pozorováno jak na začátku, tak při následném sledování. Longitudinální vyšetření v naší studii ukázalo, že avidita ACLA zůstala během sledování konstantní. Naše pozorování se shoduje se zjištěními, která byla prokázána u několika jiných autoprotilátek. Cucnik a kol. (2005), kteří testovali aviditu anti-beta2GPI, nezjistili žádné významné změny v průběhu trombotických příhod a těhotenských komplikací. Fluktuace avidity byla ale také popsána. Avidita anti-Hu a anti-Yo onkoneurálních protilátek se v průběhu onkologických onemocnění zvyšovala nebo zůstávala neměnná (Totland C. et al., 2007).

Avidita ACLA a/nebo anti-beta2GPI protilátek byla studována u pacientů s APS i bez APS, včetně pacientů s projevy trombózy a porodnickými komplikacemi (Cucnik S. et al., 2005; Petrovas C. et al., 1999; Vlachoyiannopoulos P.G. et al., 1998; Cucnik S. et al., 2012).

Vlachoyiannopoulos a kol. (1998) zjistili, že většina pacientů s APS produkovala APA s vyšší aviditou než pacienti bez APS. Převážně se jednalo o žilní trombózu spojenou s vyšší aviditou protilátek anti-beta2GPI (Cucnik S. et al., 2011). Tyto studie hodnotily pouze pacienty s pozitivními APA. Cucnik a kol. (2011) pozorovali, že ne všechny vzorky s vysokými hladinami anti-beta2GPI vykazovaly vysokou aviditu. Nedostatek vztahu mezi ACLA IgG hladinami a aviditou dokládá i naše studie.

Prokázali jsme silnou pozitivní korelaci mezi hladinami ACLA a APA namířených proti anti-beta2GPI a dalším fosfolipidům. Naše zjištění jsou v souladu se závěry studie systematického přehledu, který uvádí, že prevalence všech nekriteriálních APA byla u pacientů s APS významně zvýšená ve srovnání s pacienty bez APS (Rodriguez-Garcia V. et al., 2015).

Tato studie byla zpracována v publikaci Fialová L, Kuchař O, Petráčková M, Malbohan I, Zima T. Avidity of anti-phospholipid antibodies in relation to their levels. *Cent Eur J Immunol.* 2020;45(2):136-143.

10. Studie 3 – Hladiny a avidita aPE protilátek u pacientů s trombotickými příhodami a imunologicky zprostředkovanými onemocněními

10.1. Úvod

Kromě "klasických" APA se v klinické praxi vyskytují také protilátky proti jiným fosfolipidům nebo jejich komplexům s proteiny (Devreese K.M.J. et al., 2018). Pacienti s klinickými příznaky APS, ale bez zvýšení některé z doporučených APA byli klasifikováni jako jedinci se séronegativním APS (Hughes G.R. a Khamashta M.A., 2003). U pacientů se séronegativním APS byly zjištěny APA na jiné negativně nabitě fosfolipidy, jako je fosfatidylserin, kyselina fosfatidová nebo fosfatidylinositol, známé jako nekriteriální APA (Bradacova P. et al., 2021). Podrobněji byly studovány aPS/PT. Nedávné studie naznačují, že přidání vyšetření aPS/PT k doporučeným APA by mohlo zlepšit odhad trombotického rizika (Zigon P. et al., 2019; Tonello M. et al., 2019).

Mezi nekriteriální APA testované u pacientů s APS patří např. aPE (Staub H.L. et al., 2012). Fosfatidyletanolaminy představují druhé nejhojnější fosfolipidy savčích membrán (tvoří 20-50% všech fosfolipidů v membránách savčích buněk) (Vance J.E., 2008). Fosfatidyletanolaminy detekované na lumenální povrchu endotelu mohou být náchylné k vazbě aPE, což odpovídá souvislosti mezi přítomností aPE a idiopatickou trombózou (Zhixin L. et al., 2011).

Ačkoli aPE byly studovány v řadě klinických studií u pacientů s trombózou a morbiditou v těhotenství a jinými onemocněními, jejich diagnostický přínos zůstává sporný (Staub H.L. et al., 2012; Butkiewicz F. et al., 2014; Dima A. et al., 2015; Caraiola S. et al., 2018). Patogenita autoprotiátek však závisí na různých faktorech. Jedním z nich je jejich avidita. Předpokládá se, že avidita autoprotiátek může přispívat k různým klinickým projevům. Existují studie zabývající se aviditou běžných APA, ale pokud je nám známo, avidita aPE dosud nebyla zkoumána (Fialova L., 2014).

10.2. Cíle studie

Cílem studie bylo zkoumat aPE ve skupinách pacientů s tromboembolickými, netrombotickými interními a imunologicky zprostředkovanými onemocněními.

Stanovili jsme si tyto hlavní cíle:

1.) Vyšetřit a porovnat hladiny aPE u výše uvedených skupin pacientů a v této souvislosti stanovit horní hraniční hodnoty pro aPE IgG a IgM vyšetřením zdravých osob.

Hypotéza 1: Hladiny aPE IgG a IgM jsou vyšší ve skupině pacientů s žilní TEN ve srovnání s pacienty s jinými interními onemocněními.

Hypotéza 2: Hladiny aPE IgG a IgM ve skupině imunologicky zprostředkovaných onemocnění jsou vyšší ve srovnání se zdravými jedinci.

2.) Zavést metodu ELISA pro stanovení avidity aPE IgG pomocí chaotropních látek a vyhodnotit aviditu aPE IgG u vybraných skupin pacientů.

Hypotéza: U symptomatických pacientů (skupina pacientů s žilní TEN a s imunologicky zprostředkovanými onemocněními) převládá vysoká avidita aPE IgG.

Vedlejší cíle studie:

1.) Sledovat dynamiku změn hladin a avidit aPE IgG.

2.) Určit vztah mezi aPE a kriteriálními APA.

10.3. Materiál a metody

10.3.1. Soubor pacientů

Analyzovali jsme vzorky ze dvou kohort pacientů. Jednu kohortu tvořilo 68 pacientů

hospitalizovaných v Thomayerově nemocnici v Praze (TH kohorta; věk: 58 ± 18 let, meanSD; pohlaví: 32 žen, 36 mužů) a druhou kohortu 22 pacientů vyšetřených na imunologickém oddělení Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky v Praze (ID kohorta; n = 22; 38 ± 15 let, meanSD; pohlaví: 17 žen, 5 mužů).

V TH kohortě byli pacienti vybíráni zcela náhodně po dobu 3 let. Pacienty z kohorty TH jsme rozdělili do dvou skupin. První skupinu tvořili pacienti, kteří byli hospitalizováni pro žilní TEN (n = 46; 59 ± 19 let; pohlaví: 22 žen, 24 mužů). Převažovali pacienti s žilní trombózou dolních končetin (n=42) a kromě trombózy dolních končetin byla u 10 pacientů současně diagnostikována oboustranná PE. Čtyři pacienti byli hospitalizováni pro ischemickou cévní mozkovou příhodu. Diagnózy pacientů stanovovali zkušené internisté na základě platných diagnostických kritérií s využitím anamnézy, klinického vyšetření a zejména dopplerovské sonografie. Druhou skupinu netrombotických pacientů s různými interními onemocněními tvořili především pacienti hospitalizovaní s gastrointestinálními či kardiometabolickými poruchami (n=22; 56 ± 16 let; pohlaví: 10 žen, 12 mužů).

Skupinu ID pacientů s imunologicky zprostředkovanými onemocněními tvořili pacienti s ACLA IgG pozitivními systémovými imunologickými onemocněními převážně se SLE nebo systémovým onemocněním pojivové tkáně a neplodností nebo poruchami ledvin.

Stanovili jsme hladiny ACLA, aPE a avidity aPE ve vzorcích séra pacientů. Vyšetřili jsme také hladiny aPS/PT u pacientů ze souboru TH. U některých pacientů nebylo možné stanovit všechny parametry z důvodu nedostatku séra.

Kromě těchto dvou kohort pacientů jsme vyšetřili kontrolní skupinu 20 zdravých osob s cílem stanovit hraniční hodnoty pro hladiny aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM (věk: 50 ± 7 let, průměrSD; pohlaví: 10 žen, 10 mužů).

Všechny subjekty poskytly písemný informovaný souhlas s účastí ve studii. Studii schválily etické komise Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Thomayerovy nemocnice v Praze.

10.3.2. Metody

10.3.2.1. Hladiny různých typů APA

Hladiny aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM byly stanoveny pomocí ELISA souprav (AESKULISA Ethanolamin-GM a AESKULISA Serine-Prothrombin-GM, AESKU.DIAGNOSTICS, Wendelsheim, Německo). ACLA IgG/IgM a anti-beta2GPI IgG byly stanoveny pomocí ELISA souprav (ELISA Anti-cardiolipin antibodies, Orgentec, Mainz, Německo). Použité soupravy ELISA mají certifikaci CE IVD (In Vitro Diagnostic Medical Devices). Testy ELISA byly prováděny podle pokynů výrobce. Vzorčky séra byly ředěny v poměru 1:101 a 1:100 pro analýzy aPE IgG/IgM nebo aPS/PT IgG/IgM a ACLA nebo anti-beta2GPI.

Fosfatidylethanolamin nebo kardiolipin plus nativní lidský beta2GPI a nativní fosfatidylserin plus lidský nativní protrombin byly použity k potažení mikrodestiček v aPE nebo ACLA ELISA a aPS/PT ELISA. Soupravy ELISA pro ACLA IgG/IgM a anti-beta2GPI IgG (Orgentec) jsou kalibrovány podle mezinárodně uznávaných referenčních sér od E.N. Harris, Louisville a specifického referenčního materiálu IRP 97/656 (IgG) a HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM). Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách GPL (ACLA IgG) a MPL (ACLA IgM) nebo v libovolných jednotkách U/ml (anti-beta2GPI IgG). Standardy v soupravách ELISA pro aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM (AESKU.DIAGNOSTICS) obsahovaly lidské sérum. Hladiny aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM byly vyjádřeny v U/ml.

10.3.2.2. Avidita aPE IgG

Avidita aPE IgG byla stanovena modifikovanou metodou ELISA s použitím chaotropních látek, která byla podrobně popsána v předchozích studiích (Fialova L. et al., 2017; Fialova L. et al., 2014). Jamky mikrotitračních proužků byly potaženy 50 μ l fosfatidyletanolaminu v absolutním ethanolu (50 μ g/ml) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Jako chaotropní činidlo jsme použili močovinu, podobně jako v našem testu avidity pro ACLA IgG. Zpočátku jsme testovali různé koncentrace močoviny 2 mol/l, 4 mol/l, 6 mol/l a 8 mol/l v sérech ředěných v poměru 1:50, 1:100 a 1:200, abychom našli optimální podmínky pro stanovení avidity aPE IgG. Výsledky avidity aPE IgG byly vyjádřeny jako poměr protilátek vázaných v jamkách s chaotropem k celkovému množství protilátek vázaných v nepřítomnosti chaotropu.

absorbance v jamkách s chaotropem

AI =

absorbance v jamkách bez chaotropu

Protilátky s $AI > 0,6$ jsme klasifikovali jako vysoceavidní, zatímco protilátky charakterizované $AI < 0,4$ byly nízkoavidní. Rozmezí AI od 0,4 do 0,6 označovalo středněavidní protilátky (Almanzar G. et al., 2013; Prince H.E. a Lape-Nixon M., 2014).

10.3.3. Statistická analýza

Ke zkoumání normálního rozdělení proměnných byl použit Shapiro-Wilkův test. Protože většina sledovaných parametrů nevykazovala normální rozdělení, byly pro statistickou analýzu použity neparametrické testy. Porovnání skupin bylo provedeno pomocí Mannova-Whitneyho testu. K analýze vztahu proměnných byl použit Spearmanův korelační koeficient nebo Passing-Bablokova regrese. Párová měření byla vyhodnocena Wilcoxonovým párovým testem. Pro porovnání kvalitativních údajů byl použit Fischerův přesný test. Hladina statistické významnosti byla stanovena na 0,05. Statistické analýzy byly provedeny v programu Medcalc (MedCalc, Ostende, Belgie). K vyjádření referenčních mezí pro aPE IgG/IgM a PS IgG/IgM jsme použili robustní metodu podle dokumentu Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A3 doporučeného pro hodnocení menšího počtu referenčních subjektů (Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem Med (Zagreb)* 2016;26:5-16) s využitím softwaru MedCalc.

10.4. Výsledky

10.4.1. Mezní hodnoty (horní hranice) pro aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM

Stanovili jsme horní hraniční hodnoty pro aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM u 20 zdravých osob s použitím 95 % referenčních intervalů. Horní hraniční hodnoty jsou uvedeny v tabulce

9. Tyto hodnoty jsme použili při dalším hodnocení APA u našich pacientů. U ACLA (>10 GPL pro ACLA IgG, >7 MPL pro ACLA IgM) a anti-beta2GPI IgG (>8 U/ml) byly použity hodnoty doporučené výrobcem soupravy ELISA.

Tabulka 9. Horní hraniční hodnoty pro aPE IgG/IgM a aPS/PT u 20 zdravých osob.

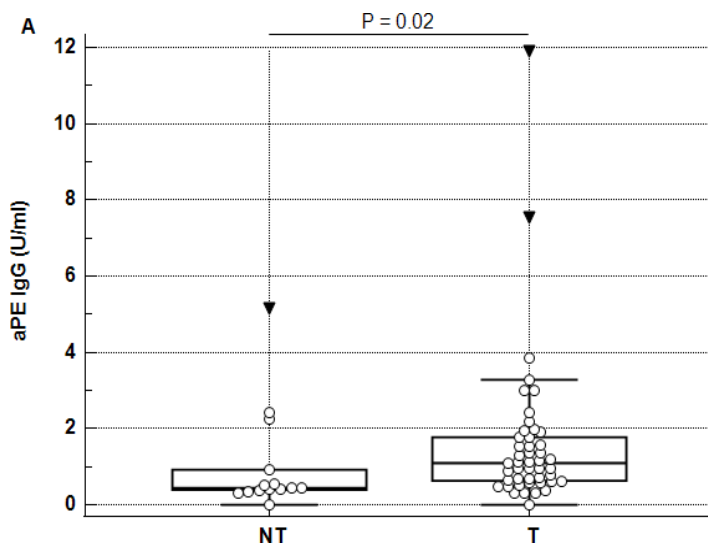
Type of APA	Upper limit (U/ml)
aPE IgG	6
aPE IgM	13.2
aPS/PT IgG	6.7
aPS/PT IgM	5.3

10.4.2. Hladiny testovaných APA u pacientů s TEN

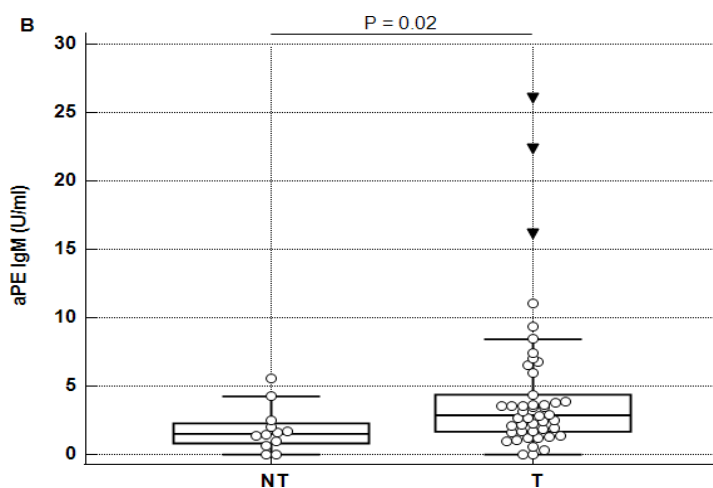
Srovnání nekriteriálních APA protilátek ukázalo významné rozdíly pro aPE IgG a IgM mezi skupinami pacientů s žilní TEN a pacienty s netrombotickými interními onemocněními (obrázek 10 A–F). Tyto protilátky byly významně vyšší ve skupině pacientů s žilní TEN (aPE IgG a IgM, $P=0,02$ pro obě třídy Ig). Nebyly však pozorovány žádné významné rozdíly mezi skupinami těchto pacientů a kontrolní skupinou s výjimkou signifikantně vyššího aPE IgM u kontrol než u netrombotických interních onemocnění ($P=0,04$). Hladiny aPS/PT IgG nebo IgM byly u obou skupin pacientů podobné. U hladin ACLA IgG nebo IgM a anti-beta2GPI IgG nebyly zjištěny žádné významné rozdíly.

Obrázek 10: Sérové hladiny ACLA a nekriteriálních APA ve skupinách pacientů s TEN (skupina T) a netrombotickými interními chorobami (skupina NT). Středový rámeček vymezuje hodnoty od 25. do 75. percentilu. Na mediánu je zakreslena vodorovná čára. Svislá čára znázorňuje minimální až maximální hodnotu s vyloučením vybočujících hodnot. Vzdálené hodnoty jsou označeny černým trojúhelníkem.

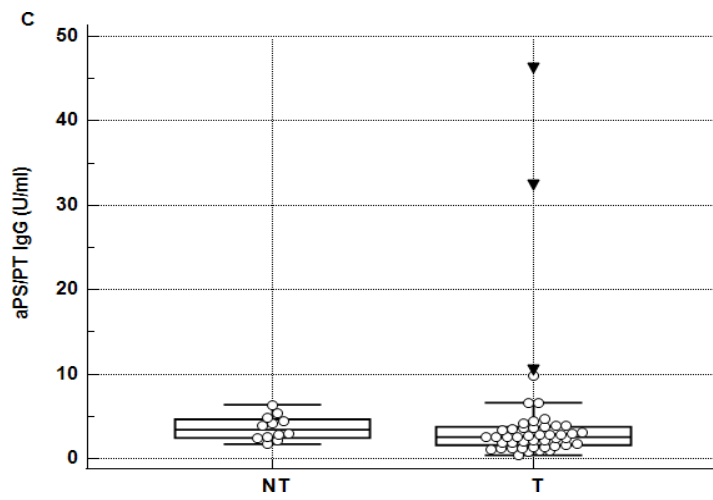
(A) aPE IgG hladiny



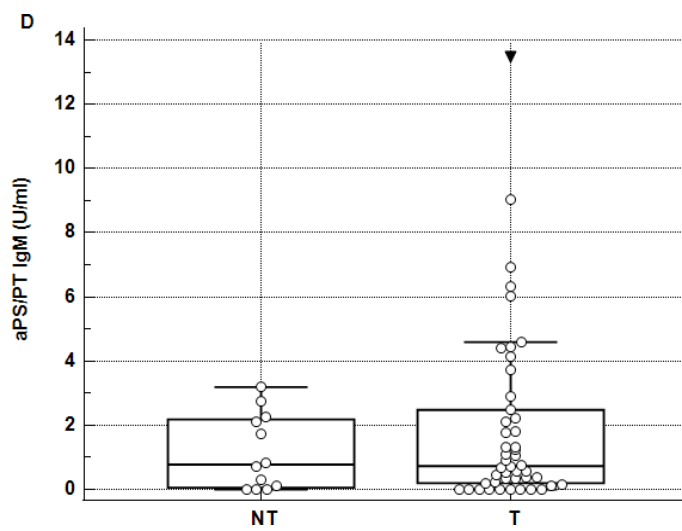
(B) aPE IgM hladiny



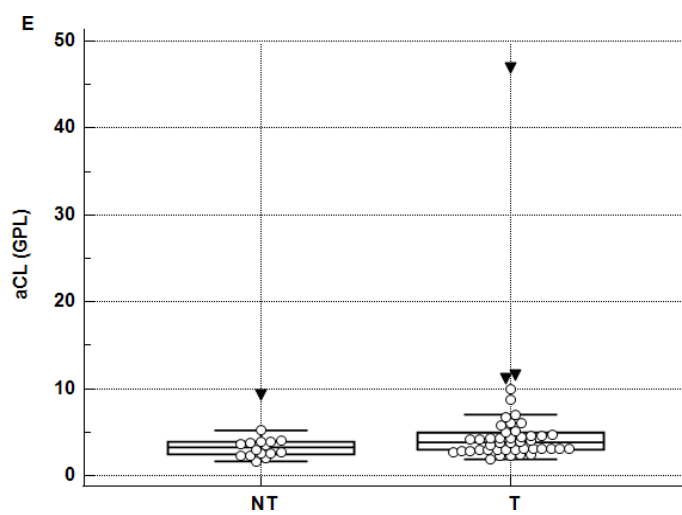
(C) aPS/PT IgG hladiny



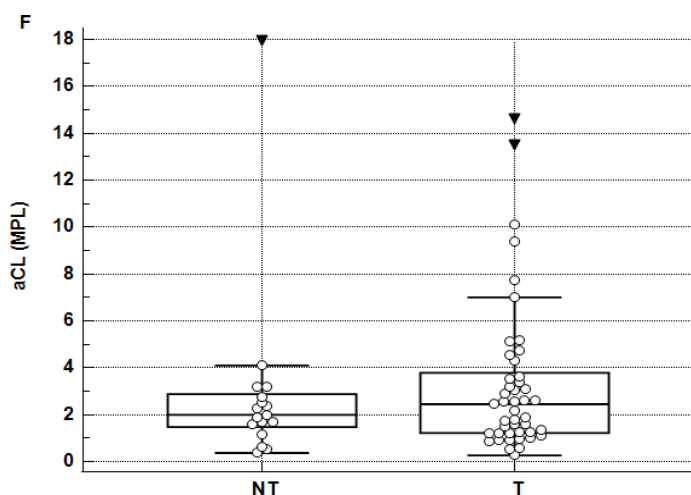
(D) aPS/PT IgM hladiny



(E) ACLA IgG hladiny

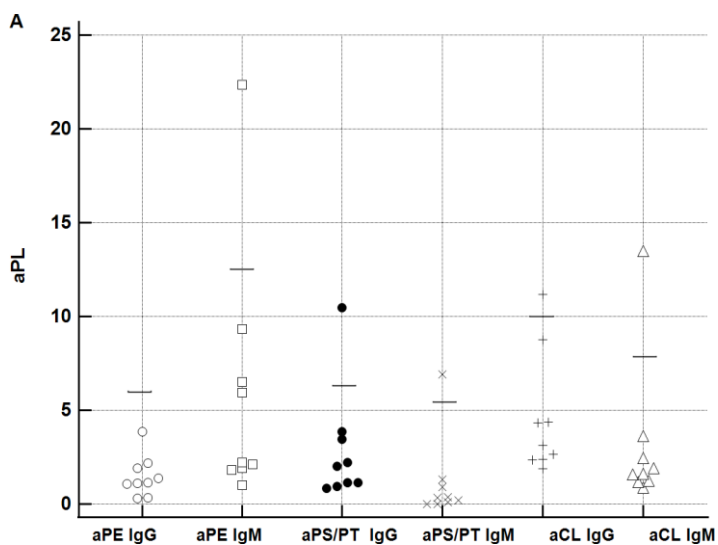


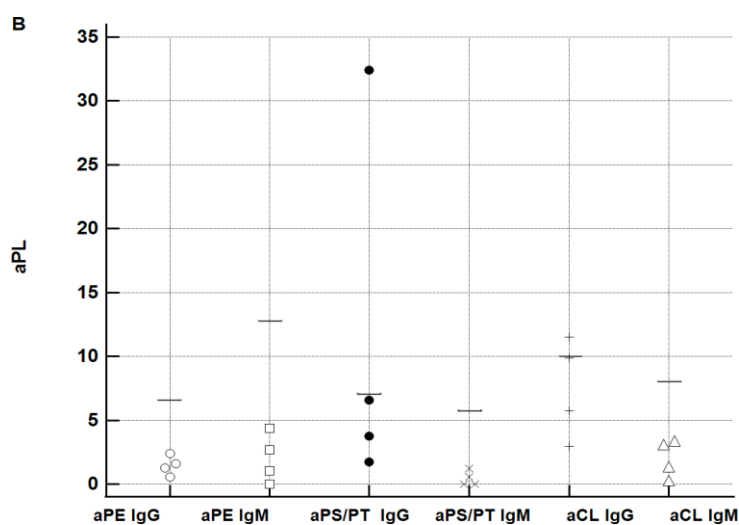
(F) ACLA IgM hladiny



Obrázek 11 A ukazuje hladiny APA zjištěné u pacientů s PE. Hladiny APA nad horní hranicí našich normativních hodnot byly zjištěny pouze u dvou pacientů s PE (jeden pacient měl zvýšený aPE IgM, druhý pacient měl zvýšené ostatní APA). Jednou byly hodnoty ACLA IgG a aPS/PT IgG vyšší než příslušné hraniční hodnoty u pacientů s ischemickou cévní mozkovou příhodou (obrázek 11 B).

Obrázek 11: Sérové hladiny ACLA a nekriteriálního APA u skupin pacientů s (A) PE a (B) ischemickou cévní mozkovou příhodou. Hraniční hodnoty jsou znázorněny vodorovnou čarou u každého z APA.





Pacienti s TEN a současně zvýšenými APA nad horní limity jsou uvedeni v tabulce 10. U 32,6 % pacientů s TEN byla zvýšena alespoň jedna z vyšetřovaných protilátek proti APA. ACLA IgG/IgM byly zvýšeny u 19,5 % a podobně i aPS/PT IgG/IgM, následovaly zvýšené aPE IgG/IgM u 10,8 % pacientů. Izolované zvýšení ACLA IgG/IgM i aPE IgG/IgM bylo pozorováno u 6,5 % pacientů pro každou z protilátek. aPS/PT IgG/IgM byly zvýšeny jako jediná APA u 8,6 % pacientů (tabulka 11). Anti-beta2GPI nebyly zvýšeny u žádného pacienta s TEN. Ve skupině pacientů s netrombotickými interními chorobami měl zvýšený APA pouze jeden pacient, a to ACLA IgM. Ve výskytu aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM u pozitivních pacientů s TEN a u kontrolní skupiny nebyly zjištěny žádné významné rozdíly.

Tabulka 10: Zvýšené hodnoty APA jsou vyznačeny tučně.

F – žena, m – muž.

Patient No.	AC LA IgG	AC LA IgM	Anti beta 2GPI IgG	aPE IgG (U/ml)	aPE IgM (U/ml)	aPS/PT IgG (U/ml)	aPS/PT IgM (U/ml)	Sex	Age (years)	Type of venous thromboembolism

)	PL)	(U/ ml)		ml)						
1	4.64	1.74	4.40	1.54	16.1 5	3.08	0.24	f	50	Ilio-femoro- popliteo-crural phlebothrombosis of left lowerlimb	
2	2.98	0.60	4.20	0.69	1.34	9.76	0	m	85	Femoro-popliteal phlebothrombosis of right lowerlimb	
3	4.31	7.00	2.80	2.99	26.0 1	2.41	4.41	m	69	Femoro-popliteo- crural phlebothrombosis of left lowerlimb	
4	5.08	9.41	3.00	0.96	3.14	4.38	9.02	m	47	Ilio-femoro- popliteo-crural phlebothrombosis of right lowerlimb	
5	4.38	3.54	3.40	1.76	7.45	3.00	6.31	m	57	Femoro-popliteal phlebothrombosis of left lowerlimb	
6	3.13	2.55	2.00	7.55	3.77	1.18	1.31	f	71	Femoro-popliteo- crural phlebothrombosis of left lowerlimb	
7	11.1 6	13.5 0	2.06	1.11	9.32	10.48	6.92	f	84	Femoro-popliteo- crural phlebothrombosis of left lowerlimb Pulmonary embolism	

8	2.38	1.60	1.30	3.85	22.3	0.85	1.30	f	42	Femoro-popliteo-crural phlebothrombosis of left lowerlimb Pulmonary embolism
					4					
9	4.92	14.5	1.90	1.18	2.85	3.58	13.4	m	73	Ilio-femoro-popliteal phlebothrombosis of right lowerlimb
		9					8			
10	3.07	7.73	3.10	1.77	3.91	3.30	4.59	f	75	Ilio-femoro-popliteal phlebothrombosis of right lowerlimb
11	11.5	3.37	2.10	1.29	2.67	3.77	1.24	m	67	Ischemic stroke
	0									
12	9.88	3.08	2.50	1.58	1.04	32.41	0.56	m	73	Ischemic stroke
13	46.8	1.77	3.70	11.8	0.36	46.28	0	f	64	Crural phlebothrombosis of right lowerlimb
	7			9						
14	6.71	10.1	2.50	3.01	11.0	6.61	2.11	f	62	Ilio-femoro-popliteo-crural phlebothrombosis of right lowerlimb
		0			5					
15	2.8	2.6	2.6	0.76	6.76	2.54	6.02	m	49	Popliteo-crural phlebothrombosis of left lowerlimb

Tabulka 11: Podíl zvýšených APA u pacientů s TEN (n = 46).

	ACLA IgG	ACLA IgM	aPE IgG	aPE IgM	aPS/PT IgG	aPS/PT IgM
IncreasedAPA	3 (6.5 %)	6 (13 %)	2 (4.3 %)	3 (6.5 %)	4 (8.7 %)	5 (10.8 %)
(number / %)						
Isolated increasedAPA	1 (2.2 %)	2 (4.3 %)	1 (2.2 %)	2 (4.3 %)	2 (4.3 %)	2 (4.3 %)
(number / %)						

10.4.3. Hladiny testovaných APA u pacientů s imunologicky zprostředkovanými poruchami

Pacienti vybraní do kohorty ID měli zvýšené hladiny APA IgG stanovené pomocí antifosfolipidového screeningu ELISA včetně ACLA, aPS, aPI, aPA, ale ne aPE.

Všichni pacienti ze souboru ID byli rovněž pozitivní na ACLA IgG (>10 GPL). IgG aPE byly vyšetřeny u 17 pacientů. Někteří pacienti byli vyšetřeni opakovaně, takže jsme aPE IgG vyšetřili celkem u 26 vzorků. Hladiny aPE IgG byly významně vyšší než u kontrol (P <0,001). Hladiny aPE IgG vyšší než naše mezní hodnota (>6 U/ml) byly zjištěny alespoň jednou u pěti pacientů (29 %). Tři z těchto pacientů byli sledováni pro SLE nebo pro systémové onemocnění pojivové tkáně, jeden pacient pro intersticiální nefritidu a jedna pacientka se léčila pro neplodnost. Tabulka 12 shrnuje výsledky testů APA IgG proti různým fosfolipidům/proteinům provedených v rámci imunologického vyšetření u pěti pacientů se zvýšeným aPE IgG. Všichni pacienti byli rovněž pozitivní na další APA IgG proti jiným fosfolipidům/proteinům. U opakovaně vyšetřovaných pacientů (n=8) nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi 1. a 2. měřením hladin aPE IgG. U dvou pacientů došlo ke změně s přesahem do nadlimitní hladiny.

Tabulka 12: Pacienti s imunologicky podmíněnými chorobami a zvýšeným aPE IgG. Hladiny ACLA IgG a ostatních APA jsou vyjádřeny v GPL, resp. v U/ml.

aPA – protilátky proti kyselině fosfatidové; aPI – protilátky proti fosfatidylinositolu; aPS – protilátky proti fosfatidylserinu.

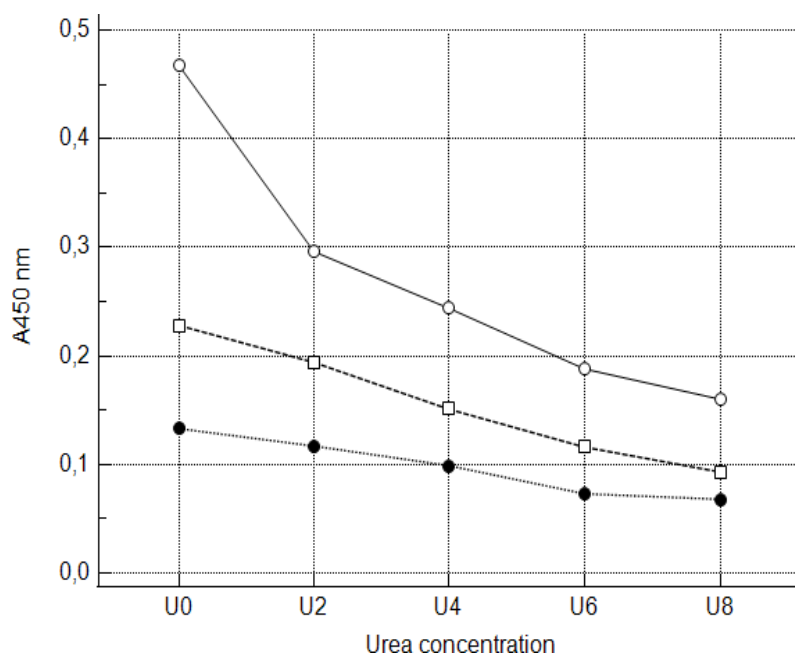
No of patients	aP E Ig G	A CL A Ig G	APA IgG screen	Anti-beta2 GPI IgG	aP S Ig G	aP I Ig G	aP A Ig G	Sex	Age (years)	Diagnosis
1	9.13	31.3	42.2	44.6	22.7	30.3	28.8	f	33	Infertility
2	25.27	80.9	>100	44.4	57.5	38.9	87.1	m	46	SLE
3	14.95	>100	98.5	71.8	90.9	78.9	99.6	f	32	Systemic connective tissue disease
4	7.31	49.0	34.2	33.8	39.4	33.3	43.7	f	12	Tubulo-interstitial nephritis
5	6.0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	f	31	SLE

10.4.4. Avidita aPE IgG

Počáteční experimenty pro stanovení optimálních podmínek pro stanovení avidity aPE IgG zahrnovaly analýzy různě zředěných sér při různých koncentracích močoviny (obrázek 12). Vyšší koncentrace močoviny disociovaly interakce v imunitních komplexech vytvořených mezi aPE IgG a PE vázaným na povrchu mikrotitrační jamky účinněji než koncentrace nižší. Vyšší ředění séra (1:100, 1:200) vedla u některých vzorků k příliš nízkým absorbcím, a tím k nižší přesnosti výsledků. Jako vhodná se ukázala močovina 6 mol/l nebo 8 mol/l při ředění sér 1:50, protože tyto podmínky umožnily dostatečně narušit imunitní komplexy (Dimitrov J.D. et al., 2011). Porovnání AI při použití močoviny 6 mol/l a 8 mol/l ukázalo významnou

korelaci ($n=48$, $r=0,71$, $P<0,0001$) stanovenou Passing-Bablokovou regresí.

Obrázek 12: Vazba aPE při různých koncentracích močoviny v séru zředěném 1:50, 1:100 a 1:200. Koncentrace močoviny – U 0 bez močoviny, U 2 – 2 mol/l, U 4 – 4 mol/l, U 6 – 6 mol/l, U 8 – 8 mol/l. Ředění séra: plná čára – 1:50, čárkovaná čára – 1:100, tečkovaná čára – 1:200.



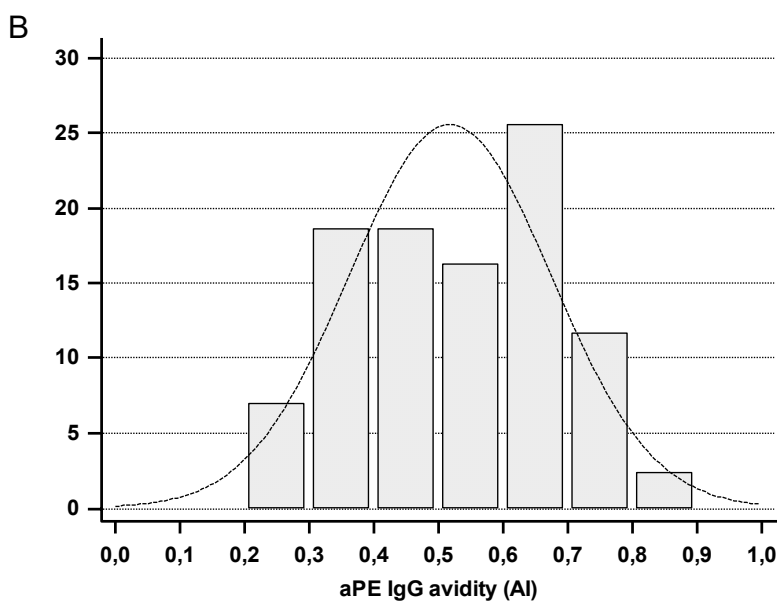
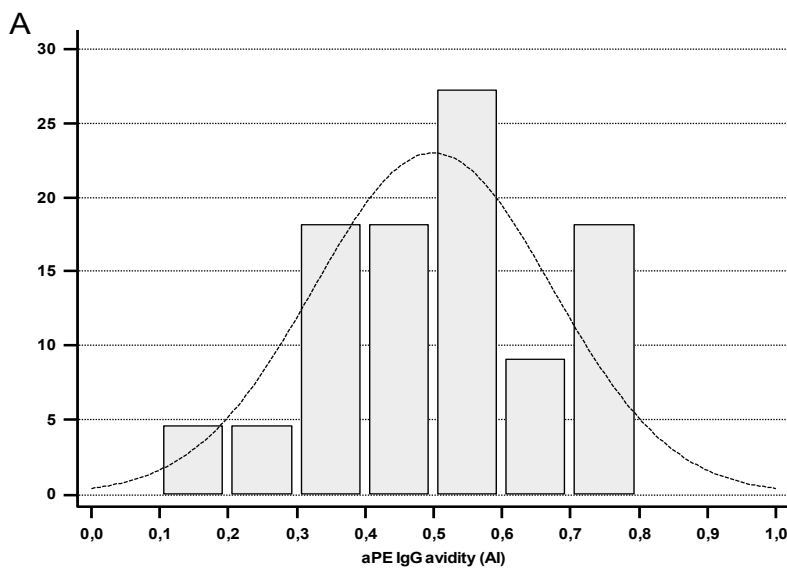
Vyšetřili jsme aviditu aPE IgG pomocí močoviny 6 mol/L v ředění 1:50 u 43 pacientů s TEN z TH kohorty a u 38 sér z ID kohorty (22 pacientů). Pacienti s žilní TEN syntetizovali aPE IgG s nízkou, střední a vysokou aviditou, hodnoty AI se pohybovaly v rozmezí 0,23-0,87. Nízkoavidní aPE IgG (AI méně než 0,4) byly pozorovány u 25 %, středněavidní aPE IgG (AI 0,4-0,6) u 35 % a ty s vysokou aviditou (AI více než 0,6) u 40 % pacientů (obrázek 13B). Hodnoty AI u imunologických pacientů se pohybovaly od 0,13 do 0,78. Nízká avidita aPE IgG byla podobná jako u pacientů s TEN (27 %), střední avidita u 46 % a vysoká avidita opět u 27 % pacientů (obrázek 13A). U opakovaně vyšetřovaných pacientů jsme hodnotili aviditu pouze v prvním vzorku.

aPE avidity IgG u pacientů vyšetřených podruhé se významně nelišily od předchozího vyšetření. Hodnoty AI pro aviditu ACLA IgG stanovené obdobným postupem v předchozí

studii (Fialová L. et al., 2020) byly významně vyšší ve srovnání s hodnotami pro aPE IgG ve skupině pacientů s TEN ($P < 0,0001$) i ve srovnání s imunologicky podmíněnými onemocněními ($P = 0,04$). Avidity aPE IgG u imunologických pacientů nekorelovaly s aviditami ACLA IgG, zatímco u pacientů s TEN avidity aPE a ACLA korelovaly, i když korelace byla slabá ($r = 0,36$, $P = 0,02$).

Obrázek 13: Distribuce avidity aPE IgG: (A) u pacientů s imunologicky zprostředkovanými onemocněními; (B) u pacientů s TEN.

AI – index avidity.



10.4.5. Vztah mezi aPE a dalšími APA

Hladiny aPE IgG v TH kohortě významně korelovaly s ACLA IgG pouze ve skupině pacientů s TEN. Další významná korelace byla prokázána mezi aPE IgM a ACLA IgM ($R = 0,54$, $P < 0,0001$) nebo aPS/PT IgM ($r = 0,58$, $P < 0,0001$) ve stejné skupině pacientů.

Kromě toho aPE IgM významně korelovaly s aPS/PT IgM ($r = 0,79$, $P = 0,002$) ve skupině pacientů s netrombotickými interními chorobami a v kontrolní skupině ($r = 0,51$, $P = 0,02$).

Ve skupině pacientů s imunologicky podmíněnými chorobami nebyla zjištěna žádná významná korelace mezi aPE IgG a ACLA IgG nebo jinými nekriteriálními APA (aPS, aPI a aPA) vyšetřeními během sledování.

10.5. Diskuze

Několik studií již popsalo vztah mezi hlavními klinickými projevy APS a přítomností protilátek proti neutrálnímu fosfolipidu – fosfatidyletanolaminu (Staub H.L. et al., 2012). Pozitivita aPE u našich pacientů s TEN byla podobná jako v multicentrické studii Sanmarca a kol. (2007). Podíl zvýšených hladin aPE IgG/IgM byl nejnižší ze všech vyšetřovaných APA, ale jako jediná byla pozitivní u 6,5 % pacientů. Podpořili jsme tedy názor, že aPE může být jediným typem APA u pacientů s trombózou (Sanmarco M. et al., 2001). Podle očekávání byl podíl pozitivních aPE IgG vyšší, více než dvojnásobný (29 %) u pacientů s imunologicky podmíněnými chorobami ve srovnání s pacienty s trombózou. Je však třeba vzít v úvahu, že do souboru pacientů s imunologicky zprostředkovanými chorobami byli zařazeni pacienti, kteří měli pozitivní ACLA IgG. Tento výsledek je blízký výsledku studie Bertolacciniho a kol. (2012), která prokázala aPE IgG u 46 % pacientů se SLE a zároveň APA pozitivních. Naproti tomu Zhang a kol. (2019) zaznamenali pozitivitu aPE pouze u 8,1 % čínských pacientů s APS. Ke stanovení aPE lze použít buď komerční soupravy, nebo vlastní metody ELISA. Bohužel pro aPE neexistují žádné mezinárodní standardy jako pro konvenční APA. Navíc byl prokázán vliv různě modifikovaných metod ELISA na výsledky (Sanmarco M., 2010; Ke K. et al., 2016). To ztěžuje porovnávání různých studií a může vést k nejednoznačným výsledkům.

Pozorování stabilních hladin aPE u pacientů sledovaných v průběhu času bylo v souladu s předchozími studiemi Sanmarca a kol. (2007). Tato studie však byla zaměřena na skupinu pacientů s trombózou. Souvislost mezi aPE a dalšími APA je nejasná. Shodně s Bertolaccinim a kol. (2012) jsme také nenašli vztah mezi aPE IgG a APA IgG proti negativně nabitým fosfolipidům ve skupině pacientů s imunologicky podmíněnými chorobami. Hladiny aPE IgG/IgM však korelovaly s ACLA IgG/IgM ve skupině pacientů s TEN, což může naznačovat společnou účast obou APA protilátek na tomto patologickém projevu.

Nejen hladiny protilátek, ale i jejich avidita mají vliv na závažnost autoimunitního onemocnění (Fialova L., 2014). Pokud je nám známo, žádná předchozí studie se tímto aspektem aPE nezabývala. Existují různé metodické přístupy ke stanovení avidity autoprottilátek. Běžně používanými testy jsou metody ELISA v přítomnosti různých chaotropních látek, které narušují vazby mezi antigenem naneseným na povrchu jamky a příslušnou protilátkou. Tyto metody ELISA již byly popsány pro testování avidity APA IgG, konkrétně ACLA nebo anti-beta2GPI (Vlachoyiannopoulos P.G. et al., 1998; Cucnik S. et al., 2012). Z tohoto důvodu jsme pro testování avidity aPE zvolili také modifikovanou metodu ELISA s použitím močoviny jako chaotropního činidla.

Pilotní studie stanovení avidity ukázala, že avidita aPE IgG se může pohybovat v širokém rozmezí. Je zajímavé, že jsme neprokázali vztah mezi aviditou aPE IgG a ACLA IgG u pacientů s imunologicky zprostředkovanými chorobami. Zatímco u aPE byly zastoupeny především protilátky s nízkou a střední aviditou, u ACLA převažovaly protilátky s vyšší aviditou. K podobnému zjištění dospěli Totland a kol. (2007), kteří zkoumali aviditu běžných onkoneurálních protilátek anti-Hu a anti-Yo a zjistili, že anti-Yo měly obecně vyšší aviditu než anti-Hu. Lze předpokládat, že různé APA se mohou podílet na patogenezi onemocnění různými způsoby, a to nejen s ohledem na různé vazebné cíle. To je známo ze studií avidity (afinity) jiných autoprottilátek (Fialova L., 2014). Například vysoce avidní antinukleární protilátky IgG by mohly být potenciálním biomarkerem pro hodnocení prognózy aktivity SLE (Zeng Y. et al., 2020). Naopak v jiné studii byly hladiny i avidita protilátek proti amyloidu nižší u pacientů s Alzheimerovou chorobou než u zdravých kontrol (Jianping L. et al., 2006).

Avidity aPE IgG vyjádřené jako AI se u většiny pacientů s imunologicky zprostředkovanými chorobami během jejich sledování významně nelišily. Lze předpokládat, že vyšetření avidity proběhlo v období, kdy již byla hodnota avidity diferencovaná.

Tato studie byla zpracována v práci Kuchar O., Petrackova M., Kalousova M., Noskova L., Zima T., Fialova L. Levels and avidities of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with thrombotic events and immunologically-mediated diseases. Biomed Papers, v tisku.

11. Závěr z provedených studií

11.1. Studie 1: Porovnání různých metod ELISA pro stanovení avidity APA

Prokázali jsme, že nejjednodušší metoda ELISA s jedním ředěním séra a fixní koncentrací chaotropu je vhodná pro stanovení avidity IgG ACLA protilátek. Tento způsob byl v dobré shodě s náročnějšími postupy.

Močovina i chlorid sodný mohou být užity jako chaotropní látky. Koncentrace močoviny 6 a 8 mol/l a NaCl 1 a 2 mol/l byly vhodné pro dostatečnou disociaci imunitních komplexů.

Vzhledem k tomu, že hodnoty AI se lišily v závislosti na ředění séra a koncentraci chaotropů, zejména močoviny, referenční hodnoty AI, které jsou nezbytné pro interpretaci výsledků pacientů musí být stanoveny individuálně pro různé podmínky testu.

11.2. Studie 2: Avidita APA ve vztahu k jejich hladinám

Souhrnně lze říci, že jsme jako první hodnotili aviditu ACLA IgG u pacientů nejen s vysokými hladinami ACLA IgG, ale i s hladinami velmi nízkými, které nejsou zahrnuty v laboratorních kritériích APS.

Naše výsledky naznačují, že avidita ACLA nezávisí na hladinách ACLA a že vysokoavidní ACLA s potenciálně škodlivými účinky mohou být také přítomny u pacientů s velmi nízkými hladinami ACLA.

Potvrdili jsme, že avidita ACLA patří mezi stabilní charakteristiky, a to ačkoli se v čase mění, ale bez statistické významnosti. U našich pacientů převažovaly protilátky s vyšší aviditou a kolísání hladin a avidit v longitudinálním sledování nevykazovalo významné rozdíly.

Dále jsme prokázali silnou pozitivní korelaci mezi hladinami ACLA a APA namířených proti anti-beta2GPI a dalším fosfolipidům, ale tyto hladiny nekorelovaly s aviditou ACLA.

11.3. Studie 3: Hladiny a avidita aPE u pacientů s trombotickými příhodami a imunologicky zprostředkovanými onemocněními

Naše studie prokázala signifikantně vyšší hladiny aPE IgG a IgM v kohortě pacientů s žilní TEN ve srovnání s pacienty s jinými interními onemocněními a v kohortě imunologicky zprostředkovaných onemocnění vyšší než u zdravých kontrol.

Zvýšení hladin aPE IgG a/nebo IgM nad námi stanovené hraniční hodnoty (95. percentil kontrolní skupiny) bylo pozorováno pouze u 10,8 % pacientů s trombózou, zatímco u pacientů s imunologicky zprostředkovanými chorobami u 29 %. Hladiny aPE IgG se zdají být stabilní.

Jeví se, že aPE IgG/IgM může souviset s ostatními APA, ale pouze u některých skupin pacientů.

Avidita aPE IgG může u různých onemocnění kolísat od nízkoavidních až po vysoce avidní protilátky (převaha nízké a střední avidity). Stejně jako v případě hladin aPE IgG nevykazovaly jejich avidity při opakovaném vyšetření významnou dynamiku.

Závěrem jsme potvrdili, že aPE mohou mít vztah k žilní TEN a mohou být součástí repertoáru APA u imunologicky zprostředkovaných onemocnění.

12. Seznam zkratek

aAnxA5	protilátky proti anexinu A5
ACLA	antikardiolipinové protilátky
AI	index avidity
Anti-beta2GPI	protilátky proti beta2-glykoproteinu I
Anti-beta2GPI-D1	protilátky proti doméně 1 beta2-glykoproteinu I
APA	antifosfolipidové protilátky
aPA	protilátky proti kyselině fosfatidové
aPE	protilátky proti fosfatidyletanolaminu
aPI	protilátky proti fosfatidylinositolu
ApoER2	receptor pro apolipoprotein E2
APS	antifosfolipidový syndrom
aPS	protilátky proti fosfatidylserinu
aPS/PT	protilátky proti komplexu fosfatidylserin/protrombin
aPT	protilátky proti protrombinu
ASA	kyselina acetylsalicylová
Beta2GPI	beta2-glykoprotein I
CAPS	katastrofický APS
Ckrea	clearance kreatininu dle Cockcroft-Gaulta
CLIA	chemiluminisceční imunoanalýza
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
C5aR	endoteliální receptor pro C5 složku komplementu
DOAC	přímá perorální antikoagulancia
EliA	fluorescenční enzymové imunoanalýzy

ELISA sorbent assay)	enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immuno
eNOS	endotelální NO syntetáza
GPL	jednotka antifosfolipidových protilátek třídy IgG
HŽT	hluboká žilní trombóza
Ig	imunoglobuliny
IgA	imunoglobuliny izotypu A
IgG	imunoglobuliny izotypu G
IgM	imunoglobuliny izotypu M
LA	lupus antikoagulans
LFA-1	antigen 1 asociovaný s funkcí lymfocytů
LK	levá komora
LMWH	nízkomolekulární hepariny
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza
MCP-1	monocytární chemoatraktivní protein 1
MPL	jednotka antifosfolipidových protilátek třídy IgM
n	počet vzorků
n.a.	nedostupné
NET	neutrofilní extracelulární past
NO	oxid dusnatý
NOAC	nová perorální antikoagulancia
n.s.	nevýznamné
OR	poměr šancí
p	míra významnosti
PE	plicní embolie

P-gp	glykoprotein P
PK	pravá komora
PP2A	proteinová fosfatáza 2 A
PTS	posttrombotický syndrom
PVDF	polyvinylidendifluorid (PVDF)
r	Pearsonův korelační koeficient
RNA	ribonukleová kyselina
SLE	systemový lupus erythematoses
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TLR	toll like receptor
UFH	nefrakcionovaný heparin
vs.	versus

13. Literatura

Agmon-Levin N, Blank M, Zandman-Goddard G, et al. Vitamin D: an instrumental factor in the anti-phospholipid syndrome by inhibition of tissue factor expression. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 145–50.

Alessandri C, Conti F, Pendolino M, et al. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2011; 10: 609–616.

Almanzar G, Ottensmeier B, Liese J, Prelog M. Assessment of IgG avidity against pertussis toxin and filamentous hemagglutinin via an adapted enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using ammonium thiocyanate. *J Immunol Methods.* 2013; 387: 36–42.

Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid syndrome, "the best prophet of the future". *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association.* 2018; 28: 409–16.

Ames PR, Batuca JR, Ciampa A, Iannaccone L and Delgado Alves J. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrative stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J. Rheumatol.* 2010; 37, 2523–2530.

Arnaud L, Mathian A, Devilliers H, et al. Patient-level analysis of five international cohorts further confirms the efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev.* 2015; 14: 192–200.

Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 2015; 72: 4–15.

Ayoglu B, Schwenk JM, Nilsson P. Antigen arrays for profiling autoantibody repertoires. *Bioanalysis.* 2016; 8: 1105–26.

Benagiano M, Gerosa M, Romagnoli J, Mahler M, Borghi MO, Grassi A, et al. Beta2 glycoprotein I recognition drives Th1 inflammation in atherosclerotic plaques of patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Immunol.* 2017; 198: 2640–8.

Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol.* 1998; 37: 1229–32.

Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus*. 2011; 20: 191–205.

Bertolaccini ML, Murru V, Sciascia S, Sanna G, Khamashta MA. The clinical value of testing for antibodies to phosphatidylethanolamine (aPE) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Thromb Res*. 2012; 130: 914–8.

Bertolaccini ML, Sciascia S, Murru V, Garcia-Fernandez C, Sanna G, Khamashta MA. Prevalence of antibodies to prothrombin in solid phase (aPT) and to phosphatidylserine-prothrombin complex (aPS/PT) in patients with and without lupus anticoagulant. *Thromb Haemost*. 2013; 109: 207–13.

Bevers EM, Zwaal RF, Willems G.M. The effect of phospholipids on the formation of immune complexes between autoantibodies and β 2-glycoprotein I or prothrombin. *Clin Immunol*. 2004; 112: 150–160.

Biggioggero M, Meroni PL. The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Rev*. 2010; 9: 299–304.

Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Autoimmune diagnostics: the technology, the strategy and the clinical governance. *Immunol Res*. 2015; 61: 126–34.

Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999; 8: 135–160.

Bowie EJW, Thompson JH Jr, Pascuzzi CA, Owen CA Jr. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med*. 1963; 62: 416–30.

Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B. Affinity and avidity of autoantibodies. In: Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni P, editors. *Autoantibodies*. 2nd ed., Elsevier, 2007: 21–28.

Bradacova P, Slavik L, Ulehlova J, Skoumalova A, Ullrychova J, Prochazkova J, Hlusi A, Manukyan G, Kriegova E. Current Promising Biomarkers and Methods in the Diagnostics of Antiphospholipid syndrome: A Review. *Biomedicines*. 2021; 9: 166.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303: 1532–5.

British Thoracic Society guidelines for the management of suspected acute pulmonary embolism. *Thorax*. 2003; 58: 470–483.

Bulíková A, Penka M. Antifosfolipidový syndrom. *Interní Med*. 2006; 5: 240–243.

Bulíková A. Antifosfolipidový syndrom - klinické projevy, diagnostika a možnosti léčby, komplikace. *Remedia*. Praha: Medical Tribune. 2016; 26(5): 444–450.

Burnett AE, Mahan CE, Vazquez SR, Oertel LB, Garcia DA, Ansell J. Guidance for the practical management of the direct oral anticoagulants (DOACs) in VTE treatment. *J Thromb Thrombolysis*. 2016; 41: 206–232.

Butkiewicz F, Kaszuba M, Brzezinski M, Izbicki J, Kubis M, Lopinski H, Borowiak M, Szelepajlo M, Fischer K, Flicinski J. Associations between the incidence of antiphosphatidylserine and antiphosphatidylethanolamine antibodies and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. *Pol Arch Med Wewn*. 2014; 124: 573–8.

Canaud G, Legendre C, Terzi F. AKT/mTORC pathway in antiphospholipid related vasculopathy: a new player in the game. *Lupus*. 2015; 24: 227–230.

Capozzi A, Lococo E, Grasso M, Longo A, Garofalo T, Misasi R, Sorice M. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay. *J Immunol Methods*. 2012; 379: 48–52.

Caraiola S, Jurcut C, Dima A, Baicus C, Baicus A. Antiphosphatidylethanolamine Antibodies and Deep Vein Thrombosis in Lupus Patients with Antiphospholipid Syndrome. *Revista Romana De Medicina De Laborator*. 2018; 26: 243–50.

Cavazzana I, Andreoli L, Limper M, Tincani A. Update on Antiphospholipid syndrome: ten topics in 2017. *Curr Rheumatol Rep*. 2018; 20(3):15.

Celli CM, Gharavi AE, Chaimovich H. Opposite beta2-glycoprotein I requirement for the binding of infectious and autoimmune antiphospholipid antibodies to cardiolipin liposomes is associated with antibody avidity. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1416: 225–238.

Cervera R, Boffa MC, Khamashta MA, Hughes GR. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus*. 2009; 18: 889–893.

Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity highlights*. 2017; 8: 9.

Clemens N, Frauenknecht K, Katzav A, Sommer C, and von Landenberg, P. In vitro effects of antiphospholipid syndrome-IgG fractions and human monoclonal antiphospholipid IgG antibody on human umbilical vein endothelial cells and monocytes. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2009; 1173: 805–813.

Conley MR, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Lab Clin Invest.* 1952; 31 :621–2.

Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1133–8.

Cucnik S, Kveder T, Krizaj I, Rozman B, et al. High avidity anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63: 1478–1482.

Cucnik S, Bozic B, Kveder T, Tomsic M, et al. Avidity of anti-beta2-glycoprotein I and thrombosis or pregnancy loss in patients with antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1051: 141–147.

Cucnik S, Kveder T, Ulcova-Gallova Z, Swadzba J, et al. The avidity of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with or without antiphospholipid syndrome: A collaborative study in the frame of the European forum on antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2011; 20: 1166–1171.

Cucnik S, Kveder T, Artenjak A, Ulcova Gallova Z, et al. Avidity of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2012; 21: 764–765.

Cui Z, Zhao MH. Avidity of anti-glomerular basement membrane autoantibodies was associated with disease severity. *Clin Immuno.* 2005; 116: 77–82.

Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, and Edelberg JM. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7: 701–709.

Richard Češka a kolektiv, Interna, TRITON, 2010

Dauner JG, Pan Y, Hildesheim A, Kemp TJ, Porras C, Pinto LA. Development and application of a GuHCl-modified ELISA to measure the avidity of anti-HPV L1 VLP antibodies in vaccinated individuals. *Mol Cell Probes*. 2012; 26: 73–80.

Decavele AS, Schouwers S, Devreese KM. Evaluation of three commercial ELISA kits for anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int. J. Lab. Hematol*. 2011; 33: 97–108.

de Groot PG, Lutters B, Derksen RHWM, Lisman T, Meijers JCM, Rosendaal FR. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1993–7.

de Groot PG, de Laat B. Mechanisms of thrombosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017; 31(3): 334–341.

de Laat B, Derksen RHWM, Mackie IJ, Roest M, Schoormans S, Woodhams BJ, et al. Annexin A5 polymorphism (-1C→T) and the presence of antiannexin A5 antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65: 1468–72.

Dellavance A, Coelho Andrade LE. Immunologic derangement preceding clinical autoimmunity. *Lupus*. 2014; 23: 1305–1308.

Devreese K, Hoylaerts MF. Challenges in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Clin Chem*. 2010; 56: 930–940.

Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid A. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2018; 16: 809–13.

Dima A, Caraiola S, Jurcut C, Balanescu E, Balanescu P, Ramba D, Badea C, Pompilian V, Ionescu R, Baicus A, Baicus C, Dan GA. Extended Antiphospholipid Antibodies Screening in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Rom J Intern Med*. 2015; 53: 321–8.

Dimitrov JD, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV. Important parameters for evaluation of antibody avidity by immunosorbent assay. *Anal Biochem*. 2011; 418: 149–151.

Doporučené postupy české angiologické společnosti ČLS JEP

Doporučené postupy Evropské kardiologické společnosti pro diagnostiku a léčbu akutní PE 2019

Doporučené postupy České kardiologické společnosti pro diagnostiku, léčbu a prevenci PE 2007

Dostál J., Lipidy [online]. Brno, 2013 [cit. 16.1.2022].

Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/med/podzim2013/BLLC0111p/um/lipidy.pdf>.

Dueymes M, Piette JC, Le Tonqueze M, Bendaoud B, et al. Role of beta 2-glycoprotein I in the anticardiolipin antibody affinity for phospholipid in autoimmune disease. *Lupus*. 1995; 4: 477–481.

Du VX, Kelchtermans H, de Groot PG, de Laat B. From antibody to clinical phenotype, the black box of the antiphospholipid syndrome: Pathogenic mechanisms of antiphospholipid syndrome. *Thromb Research*. 2013; 132: 319–326.

Eisen HN. Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2: 381–392.

Erkan D, Willis R, Murthy VL, et al. A prospective open-label pilot study of fluvastatin on proinflammatory and prothrombotic biomarkers in antiphospholipid antibody positive patients. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73: 1176–80.

Erkan D and Salmon JE. The role of complement inhibition in thrombotic angiopathies and antiphospholipid syndrome. *Turk. J. Haematol*. 2016; 33: 1–7.

Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Research & Therapy*. 2008; 10: 230–238.

Esther AA, Rani PS, Rajan A. Antiphospholipid Antibody Syndrome (Aplas) A Case Report. *International Journal of Nursing Education*. 2017; 9.4: 12–19.

Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb* 1972; 1: 75–95.

Fialova L, Bartos A, Svarcova J, Malbohan I. Increased intrathecal high-avidity anti-tau antibodies in patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2011; 6: e27476.

Fialova L. Avidity of antiphospholipid antibodies - our current knowledge. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2014; 63: 221–225.

- Fialova L, Malbohan I, Malickova K. Avidity of anticardiolipin antibodies-A factor that could be important for their detection by ELISA methods. *J Appl Biomed.* 2014; 12: 277–284.
- Fialová L. Avidity of autoantibodies against antigens in nervous tissue In: Costa A, Villalba E (eds.). *Horizons in Neuroscience Research.* Nova Science Publishers, New York. 2015: 159–169.
- Fialová L. Affinity and avidity of autoantibodies – their clinical significance. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2016; 65: 155–163.
- Fialová L, Petrackova M, Kuchar O. Comparison of different enzyme-linked immunosorbent assay methods for avidity determination of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Anal.* 2017; 31:e22121.
- Fialová L, Kuchař O, Petráčková M, Malbohan I, Zima T. Avidity of anti-phospholipid antibodies in relation to their levels. *Cent Eur J Immunol.* 2020; 45: 136–43.
- Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, et al. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med.* 1996; 100: 530–6.
- Forastiero R. Multiple antiphospholipid antibodies positivity and antiphospholipid syndrome criteria re-evaluation. *Lupus.* 2014; 23: 1252–1254.
- Fritzler MJ. Advances and applications of multiplexed diagnostic technologies in autoimmune diseases. *Lupus.* 2006; 15: 422–7.
- Fujieda Y, Atsumi T, Amengual O, Odani T, Otomo K, Kato M, et al. Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2012; 21: 1506–14.
- Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker MC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to serum protein cofactor. *Lancet.* 1990; 335: 1544–7.
- Gebhart J, Posch F, Koder S, Perkmann T, Quehenberger P, Zoghiani C, et al. Increased mortality in patients with the lupus anticoagulant: The Vienna Lupus Anticoagulant and Thrombosis Study (LATS). *Blood.* 2015; 125: 3477–83.

Gebhart J, Posch F, Koder S, Quehenberger P, Perkmann T, Kuessel L, Ay C, Pabinger I. High risk of adverse pregnancy outcomes in women with a persistent lupus anticoagulant. *Blood Adv.* 2019; 3: 769–776.

Gelderman KA, Drop AC, Trouw LA, et al. Serum autoantibodies directed against transglutaminase-2 have a low avidity compared with alloantibodies against gliadin in coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 2014; 177: 86–93.

Gharavi A, Reiber H. Affinity and avidity of autoantibodies. In: Peter J, Shoenfeld Y, editors. *Autoantibodies.* 1st ed., Elsevier, 1996:13–23.

Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis S. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2007; 109: 422–30.

Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *NEJM.* 2013; 368: 1033–1044.

Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem.* 1994; 269: 21191–7.

Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1983; 2: 1211–4.

Hedman K, Lappalainen M, Seppaia I, Makela O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis.* 1989; 159: 736–740.

Hluší A a Krčová V. Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína pro praxi [online].* 2003; 9: 434-436.

Hořejší V., *Základy imunologie*, Triton, 2013.

Houtkoper R H, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2008; 65.16: 2493–2506.

Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J.* 1983; 287: 1088–1089.

Hughes GR. Autoantibodies in lupus and its variants: experience in 1000 patients. *Br Med J.* 1984; 289: 339–42.

Hughes GR, Khamashta MA. Seronegativ antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 1127.

Hughes GRV. Hughes syndrome/APS. 30 years on, what have we learnt? Opening talk at the 14th International Congress on antiphospholipid antibodies Rio de Janiero, October 2013. *Lupus.* 2014; 23: 400–406.

Hunt JE and Krilis SA. The fifth domain of b2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anti-cardiolipin antibodies. *J. Immunol.* 1994; 152: 653–659.

Chaturvedi S, Brodsky RA, McCrae KR. Complement in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Front Immunol.* 2019; 10: 449.

Chayoua W, Kelchtermans H, Moore GW, Musiał J, Wahl D, De Laat B, Devreese KMJ. Identification of high thrombotic risk triple-positive antiphospholipid syndrome patients is dependent on anti-cardiolipin and anti-β2glycoprotein I antibody detection assays. *J. Thromb. Haemost.* 2018; 16: 2016–2023.

Cho CS, Cho ML, Chen PP, Min SY, Hwang SY, Park KS, et al. Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J. Immunol.* 2002; 168: 4209–4215.

Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: Detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J Clin Microbiol.* 1984; 20: 525–529.

Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermynen J, Hoylaerts MF, et al. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood.* 2003; 101(1): 157–62.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1972–1977.

Jianping L, Zhibing Y, Wei Q, et al. Low avidity and level of serum anti-Aβ antibodies in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006; 20: 127–132.

Kašparová V., Diagnostické metody u antifosfolipidového syndromu [online]. Pardubice, 2019 [cit. 27.01.2022].

Dostupné

z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/74121/KasparovaV_Diagnosticke_metody_MS_2019.pdf?isAllowed=y&sequence=1

Kato H and Enjyoji K. Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine b2-glycoprotein I: the presence of five Sushi domains. *Biochemistry*. 1991; 30: 11687–11694.

Ke K, Strango ZI, Harper PE, Zhao M. Influence of Phosphatidylethanolamine Concentration and Composition on the Detection of Antiphosphatidylethanolamine Antibodies by ELISA. *J Clin Lab Anal*. 2016; 30: 689–96.

Kinev AV and Roubey RA. Tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2008; 17: 952–958.

Pavel Klener et. al., VNITŘNÍ LÉKAŘSTVÍ, Galén, 2001

Kniffin WD, et al. The epidemiology of diagnosed pulmonary embolism and deep vein thrombosis in the elderly. *Arch Intern Med*. 1994; 154(8): 861–866.

Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2017; 6: 093724.

Koike T. Anticardiolipin antibodies and b2-glycoprotein I. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 1994; 72: 187–192.

Krause S, Landherr U, Agardh CD, et al. GAD autoantibody affinity in adult patients with latent autoimmune diabetes, the study participants of a GAD65 vaccination trial. *Diabetes Care*. 2014; 37: 1675–1680.

Krone KA, Allen KL, McCrae KR. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2010; 12: 53–7.

Lackner KJ, MullerCalleja N. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med*. 2018; 379: 1290.

Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum*. 2012; 64: 1–10.

- Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanita*. 2004; 40: 81–88.
- Lellouche F, Martinuzzo M, Said P, Maclouf J, and Carreras LO. Imbalance of thromboxane/prostacyclin biosynthesis in patients with lupus anticoagulant. *Blood*. 1991; 78: 2894–2899.
- Lindhoff E, Luxembourg B. Evidence-based indications for thrombophilia screening. *VASA*. 2008; 37: 19–30.
- Liu L, Sun D. Pregnancy outcomes in patients with primary antiphospholipid syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98: e15733.
- Liu X, Qiu Y, Yu ED, et al. Comparison of therapeutic interventions for recurrent pregnancy loss in association with antiphospholipid syndrome: a systematic review and network metaanalysis. *Am J Reprod Immunol*. 2020: e13219.
- Lynch HE, Stewart SM, Kepler TB, Sempowski GD, Alam SM. Surface plasmon resonance measurements of plasma antibody avidity during primary and secondary responses to anthrax protective antigen. *J Immunol Methods*. 2014; 404: 1–12.
- Macdonald RA, Hosking CS, Jones CL. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*. 1988; 106: 191–194.
- Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008; 451: 914–8.
- Mahler M, Bentow C, Serra J, Fritzler MJ. Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2016; 38: 14–20.
- Malickova K, Sandova P, Janatkova I. Několik poznámek k laboratornímu vyšetřování antifosfolipidových protilátek. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2006; 55: 158–163.
- Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*. 1990; 336: 177–8.
- Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Katahira T, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA and T. Koike. Molecular studies on phospholipid-binding sites and cryptic epitopes appearing on b2-glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus*. 1995; 4: 13–17.

Matsuura E, Kobayashi K, Hurley BL, Lopez LR. Atherogenic oxidized low-density lipoprotein/ beta2-glycoprotein I (oxLDL/beta2GPI) complexes in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2006; 15: 478–83.

Matsuura E, Lopez LR, Shoenfeld Y, Ames PR. beta2-glycoprotein I and oxidative inflammation in early atherogenesis: A progression from innate to adaptive immunity? *Autoimmun Rev*. 2012; 12: 241–9.

McCloskey N, Turner MW, Goldblatt TD. Correlation between the avidity of mouse-human chimeric IgG subclass monoclonal antibodies measured by solid-phase elution ELISA and biospecific interaction analysis (BIA). *J Immunol Methods*. 1997; 205: 67–72.

Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, et al. Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men. *Blood*. 2010; 116: 529–36.

Meroni PL, Del Papa N, Raschi E, Panzeri P, Borghi MO, Tincani A, et al. Beta2-glycoprotein I as a ‘cofactor’ for anti-phospholipid reactivity with endothelial cells. *Lupus*. 1998; 7 (Suppl. 2): 44–47.

Meroni PL, Chighizola CB, Rovelli F, Gerosa M. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16: 209.

Meroni PL, Macor P, Durigutto P, De Maso L, Gerosa M, Ferrareso M, et al. Complement activation in antiphospholipid syndrome and its inhibition to prevent rethrombosis after arterial surgery. *Blood*. 2016; 127: 365–7.

Mineo C. Inhibition of nitric oxide and antiphospholipid antibody-mediated thrombosis. *Curr Rheumatol*. 2013; 15: 324.

Misasi R, Capozzi A, Longo A, et al. “New” antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J Immunol Res*. 2015: 858542.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 295–306.

Moon JJ, Matsumoto M, Patel S, Lee L, Guan JL, and Li S. Role of cell surface heparan sulfate proteoglycans in endothelial cell migration and mechanotransduction. *J. Cell Physiol.* 2005; 203: 166–176

Moore JE, Mohr CF. Biologically false-positive tests for syphilis. *JAMA.* 1952; 150: 463–73.

Moore JE, Lutz WB. Natural history of systemic lupus erythematosus: approach to its study through chronic biologic false positive reactions. *J Chron Dis.* 1955; 1: 297–316.

Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 2594–2604.

Musil D. Rizika a prevence tromboembolické choroby. *Interní Med.* 2009; 11(12): 544–548.

Nayfe R, Uthman I, Aoun J, et al. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology.* 2013; 52: 1358–1367.

Nikolova-Vlahova MK, Nikolov KV, Baleva MP, et al. Antiphospholipid antibodies in patients with upper-extremity deep vein thrombosis. *Cent Eur J Immunol.* 2015; 40: 307–310.

Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 1030–5.

Ostrowski RA, Robinson JA. Antiphospholipid antibody syndrome and autoimmune diseases. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008; 22: 53–65.

Otomo K, Amengual O, Fujieda Y, Nakagawa H, Kato M, Oku K, et al. Role of apolipoprotein B100 and oxidized low-density lipoprotein in the monocyte tissue factor induction mediated by anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Lupus.* 2016; 25: 1288–98.

Out HJ, de Groot PG, Hasselaar P, dan Vliet M, Derksen RH. Fluctuations of anticardiolipin antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Ann RheumDis.* 1989; 48: 1023–8

Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart *Proc Soc Exp Biol Med.* 1941; 48: 484–6.

PENGO V, et al. Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2007; 5.5: 925–930.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 1737–40.

Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood.* 2011; 118: 4714–8.

Pengo V, Ruffatti A, Tonello M, Cuffaro S, Banzato A, Bison E, et al. Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of β 2-glycoprotein 1 correctly classify patients at risk. *J Thromb Haemost.* 2015; 13: 782–7.

Perciani CT, Peixoto PS, Dias WO, Kubrusly FS, Tanizaki MM. Improved method to calculate the antibody avidity index. *J Clin Lab Anal.* 2007; 21: 201–206.

Pericleous C, Clarke LA, Brogan PA, Latchman DS, Isenberg DA, Ioannou Y, et al. Endothelial microparticle release is stimulated in vitro by purified IgG from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.* 2013; 109: 72–78.

Petri M, Rheinschmidt M, Whiting-O’Keefe Q, Hellmann D, Corash L. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. A study of sixty consecutive patients by activated partial thromboplastin time, Russell viper venom time, and anti-cardiolipin antibody level. *Ann Intern Med.* 1987; 106: 524–31.

Petri M. Use of hydroxychloroquine to prevent thrombosis in systemic lupus erythematosus and in antiphospholipid antibody-positive patients. *Curr Rheumatol Rep.* 2011; 13: 77–80.

Petrovas C, Vlachoyiannopoulos PG, Kordossis T, et al. Anti-phospholipid antibodies in HIV infection and SLE with or without anti-phospholipid syndrome: comparisons of phospholipid specificity, avidity and reactivity with beta2-GPI. *J Autoimmun.* 1999; 13: 347–355.

Pierangeli SS, Liu SW, Anderson G, Barker JH, Harris EN. Thrombogenic properties of murine anti-cardiolipin antibodies induced by beta 2 glycoprotein 1 and human immunoglobulin G antiphospholipid antibodies. *Circulation.* 1996; 94(7):1746–51.

Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, and Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2120–2124.

Pierangeli SS, Harris EN. A protocol for determination of anticardiolipin antibodies by ELISA. *Nat Protoc.* 2008; 3: 840–848.

Pierangeli SS, Favaloro EJ, Lakos G, Meroni PL, Tincani A, Wong RC, Harris EN. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti- β 2glycoprotein I assays: A report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413: 358–360.

Pohanka M. Monoclonal and polyclonal antibodies production—preparation of potent biorecognition element. *J. Appl. Biomed.* 2009; 7: 115–121.

Polanec J, Seppälä I, Rousseau S, Hedman K. Evaluation of proteindenaturing immunoassays for avidity of immunoglobulin G to rubella virus. *J Clin Lab Anal.* 1994; 8: 16–21.

Prince HE, Wilson M. Simplified assay for measuring *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 904–908.

Prince HE, Lape-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol.* 2014; 21: 1377–84.

Pullen GR, Fitzgerald MG, Hosking CS. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods.* 1986; 86: 83–87.

Rahgozar S, Yang Q, Giannakopoulos B, et al. Beta2-glycoprotein I binds thrombin via exosite I and exosite II: anti-beta2- glycoprotein I antibodies potentiate the inhibitory effect of beta2-glycoprotein I on thrombin-mediated factor XIa generation. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 605–13.

Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 120–131.

Rauch J, Salem D, Subang R, Kuwana M, Levine JS. beta2-glycoprotein I-reactive T cells in autoimmune disease. *Front Immunol.* 2018; 9: 2836.

Reynaud Q, Lega JC, Mismetti P, Chapelle C, Wahl D, Cathebras P, et al. Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 2014; 13(6): 595–608.

- Rodriguez-Garcia V, Ioannou Y, Fernandez-Nebro A, et al. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: a systematic review. *Rheumatology*. 2015; 54: 2042–2050.
- Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2014; 383: 955–962.
- Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010; 376: 1498–509.
- Salma N, Julie L, Boutahar B, Sylvie LN, Eleonore B, Fabien LN, Elisabeth P, Sandrine JJ, Francis C, Sophie H, et al. Thrombotic risk assessment and analytical performance of the chemiluminescent analyzer IDS-iSYS for the detection of anticardiolipin and anti- β 2 glycoprotein I autoantibodies. *Clin. Immunol*. 2018; 194: 92–99.
- Sanmarco M, Alessi MC, Harle JR, Sapin C, Aillaud MF, Gentile S, Juhan-Vague I, Weiller PJ. Antibodies to phosphatidylethanolamine as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thromboses. *Thromb Haemost*. 2001; 85: 800–5.
- Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C, Audrain M, de Maistre E, Gris J-C, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. 2007; 97: 949–54.
- Sanmarco M, Boffa M-C. Antiphosphatidylethanolamine antibodies and the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2009; 18: 920–3.
- Sanmarco M. ELISA for antiphosphatidylethanolamine antibody detection: high impact of assay buffer on results. *J Immunol Methods*. 2010; 358: 9–16.
- Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, Salmon JE, Shen YM, Herz J, et al. Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood*. 2018a; 131: 2097–2110.
- Sacharidou A, Shaul PW, and Mineo C. New insights in the pathophysiology of antiphospholipid syndrome. *Semin. Thromb. Hemost*. 2018b; 44: 475–482.

Schousboe I. Beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*. 1985; 66: 1086–91.

Sciascia S, Khamashta MA, Bertolaccini ML. New tests to detect antiphospholipid antibodies: antiprothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/ prothrombin (aPS/PT) antibodies. *Curr Rheumatol Rep*. 2014; 16: 415.

Sciascia S, Radin M, Bazzan M, et al. Novel diagnostic and therapeutic frontiers in thrombotic anti-phospholipid syndrome. *Intern Emerg Med*. 2017; 12: 1–7.

Sene D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev*. 2008; 7: 272–277.

Shepherd SJ, Kean J, Hutchinson SJ, Cameron SO, et al. A hepatitis C avidity test for determining recent and past infections in both plasma and dried blood spots. *J Clin Virol*. 2013; 57: 29–35.

Shi T, Iverson GM, Qi JC, et al. Beta 2-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 3939–44.

Shoenfeld Y, Meroni PL, Toubi E. Antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: are they separate entities or just clinical presentations on the same scale? *Curr Opin Rheumatol*. 2009; 21(5): 495–500.

Sorkin A, von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 609–22.

Staub HL, Bertolaccini ML, Khamashta MA. Anti-phosphatidylethanolamine antibody, thromboembolic events and the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. 2012; 12: 230–4.

H-M. Steffen a kolektiv, *Diferenciální diagnostika ve vnitřním lékařství*, Grada, 2010

Steward MW. Antibody affinity: immunogenetic aspects and relationship to immune complex disease. *J Clin Pathol Suppl*. 1979; 13: 120–125.

Steward MW, Reinhardt MC, Staines NA. The genetic control of antibody affinity. Evidence from breeding studies with mice selectively bred for either high or low affinity antibody production. *Immunology*. 1979; 37: 697–703.

Sugi T, McIntyre JA. Certain autoantibodies to phosphatidylethanolamine (aPE) recognize factor XI and prekallikrein independently or in addition to the kininogens. *J Autoimmun.* 2001; 17: 207–14.

Suwannalai P, Scherer HU, van der Woude D, et al. Anti-citrullinated protein antibodies have a low avidity compared with antibodies against recall antigens. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 373–379.

Suwannalai P, van de Stadt LA, Radner H, et al. Avidity maturation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 1323–1328.

Pavel Ševčíka a pořadatelé, *Intenzivní medicína, Galén, 2014*

Tebo AE, Jaskowski TD, Phansalkar AR, Litwin CM, Branch DW, Hill HR. Diagnostic Performance of Phospholipid Specific Assays for the Evaluation of Antiphospholipid Syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 129: 870–875.

Tincani A, Taraborelli M, Cattaneo R. Antiphospholipid antibodies and malignancies. *Autoimmun Rev.* 2010; 9: 200–202.

Tonello M, Mattia E, Favaro M, Del Ross T, Calligaro A, Salvan E, Hoxha A, Fedrigo M, Ruffatti A. IgG phosphatidylserine/prothrombin antibodies as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid antibody carriers. *Thromb Res.* 2019; 177: 157–160.

Totland C, Aarseth J, Vedeler C. Hu and Yo antibodies have heterogeneous avidity. *J Neuroimmunol.* 2007; 185: 162–167.

Tozzoli R, Bonaguri C, Melegari A, Antico A, Bassetti D, Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin Chem Lab Med.* 2013; 51: 129–38.

Tozzoli R, Villalta D. Autoantibody profiling of patients with antiphospholipid syndrome using an automated multiplexed immunoassay system. *Autoimmun Rev.* 2014; 13: 59–63.

Vance JE. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J Lipid Res.* 2008; 49: 1377–87.

van Delft MAM, Verheul MK, Burgers LE, et al. The anti-carbamylated protein antibody response is of overall low avidity despite extensive isotype switching. *Rheumatology.* 2018; 57: 1583–1591.

Velásquez M, Álvarez ÁM and Cadavid ÁP. Cuantificación sistematizada de la remodelación vascular in vitro en la morbilidad gestacional asociada al síndrome antifosfolípido. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 2016; 81: 455–464.

Velásquez M, Rojas M, Abrahams VM, Escudero C and Cadavid AP. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association With Clinical Manifestations. *Front. Physiol.* 2018; 9: 1840.

Villalta D, Alessio MG, Tampoia M, Da Re A, Stella S, Da Re M, Tozzoli R, Bizzaro N. Accuracy of the first fully automated method for anti-cardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibody detection for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173: 21–7.

Vlachoyiannopoulos PG, Petrovas C, Tektonidou M, Krilis S, Moutsopoulos HM. Antibodies to beta 2-glycoprotein-I: urea resistance, binding specificity, and association with thrombosis. *J Clin Immunol.* 1998; 18: 380–391.

Vreede AP, Bockenstedt PL, Knight JS. Antiphospholipid syndrome: An update for clinicians and scientists. *Curr Opin Rheumatol.* 2017; 29: 458–66.

Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermynen J, Hoylaerts MF, et al. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood.* 2003; 101(1): 157–62.

Wahl D, Guillemin F, de Maistre E, Perret C, Lecompte T, Thibaut G. Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus meta-analysis. *Lupus.* 1997; 6: 467–73.

Wahl D, Membre A, Perret-Guillaume C, et al. Mechanisms of antiphospholipid-induced thrombosis: effects on the protein C system. *Curr Rheumatol Rep.* 2009; 11: 77–81.

Wasserman A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Deutsche Med Wochenschr.* 1906; 32: 745–6.

Weitz JI, Jaffer IH, Fredenburgh JC. Recent advances in the treatment of venous thromboembolism in the era of the direct oral anticoagulants. *F1000Res.* 2017; 6: 985.

- Wirestam L, Arve S, Linge P, Bengtsson AA. Neutrophils-important communicators in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Front Immunol* 2019; 10: 2734.
- Wojta J, Kaun C, Zorn G, Ghannadan M, Hauswirth AW, Sperr WR, et al. C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood*. 2002; 100: 517–523.
- Woznicová V. Avidita imunoglobulinů G u infekčních onemocnění. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2004; 53: 4–11.
- Wu M, Barnard J, Kundu S, McCrae KR. A novel pathway of cellular activation mediated by antiphospholipid antibody-induced extracellular vesicles. *J Thromb Haemost*. 2015; 13: 1928–40.
- Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Nunez-Alvarez C, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: A newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 2990–3003.
- Zachou K, Liaskos C, Rigopoulou E, Gabeta S, et al. Presence of high avidity anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune cholestatic liver diseases. *Clin Immunol*. 2006; 119: 203–212.
- Zeng Y, Lin Y, Wang X, Zhang Y, Peng F, Wang J, Jiang L, Liang S, Xiao Y. Assessment of a high-avidity IgG ANAs for the diagnosis and activity prediction of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2020; 39: 2619–29.
- Zhang J and McCrae KR. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood*. 2005; 105: 1964–1969.
- Zhang S, Wu Z, Zhang W, Zhang F, Li Y, Liu Y. Clinical performance of non-criteria antibodies to phospholipids in Chinese patients with antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta*. 2019; 495: 205–9.
- Zhixin L, Wells CW, North PE, Kumar S, Duris CB, McIntyre JA, Ming Z. Phosphatidylethanolamine at the luminal endothelial surface implications for hemostasis and thrombotic autoimmunity. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011; 17: 158–63.

Zhou J, Hou X, Zhang H, Wang T, Cui L. The Clinical Performance of a New Chemiluminescent Immunoassay in Measuring Anti- β 2 Glycoprotein 1 and Anti-Cardiolipin Antibodies. *Med. Sci. Monit.* 2018; 24: 6816–6822.

Zigon P, Podovsovník A, Ambrožić A, Tomsic M, Hocevar A, Gaspersic N, Rotar Z, Praprotnik S, Semrl SS, Cucnik S. Added value of non-criteria antiphospholipid antibodies for antiphospholipid syndrome: lessons learned from year-long routine measurements. *Clin Rheumatol.* 2019; 38: 371–8.

14. Seznam publikací autora

Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce (in extenso)

1.) Fialová L, Petráčková M, Kuchař O. Comparison of different enzyme-linked immunosorbent assay methods for avidity determination of antiphospholipid antibodies. J Clin Lab Anal. 2017 Nov;31(6):e22121. Příloha 1.

IF = 2,352

2.) Fialová L, Kuchař O, Petráčková M, Malbohan I, Zima T. Avidity of anti-phospholipid antibodies in relation to their levels. Cent Eur J Immunol. 2020;45(2):136-143. Příloha 2.

IF = 2,085

3.) Kuchar O., Petrackova M., Kalousova M., Noskova L., Zima T., Fialova L. Levels and avidities of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with thrombotic events and immunologically-mediated diseases. Biomed Papers, v tisku.

IF = 1,245

15. Přílohy

Příloha 1. Comparison of different enzyme-linked immunosorbent assay methods for avidity determination of antiphospholipid antibodies.

Příloha 2. Avidity of anti-phospholipid antibodies in relation to their levels.