



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Ústav pro péči o matku a dítě

Diplomová práce

**Placenta a antifosfolipidové protilátky
v etiologii těhotenských ztrát**
The Placenta and Antiphospholipid Antibodies in
Etiology of Recurrent Abortions

Vedoucí práce: MUDr. Kateřina Andělová
Vypracovala: Petra Martincová
Praha, prosinec 2009

Autor práce: **Petra Martincová**

Studijní program: **Všeobecné lékařství**

Vedoucí práce: **MUDr. Kateřina Andělová**

Pracoviště vedoucího práce: **Ústav pro péči o matku a dítě**

Datum a rok obhajoby: **10.12.2009**

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 2. prosince 2009

Petra Martincová

Obsah

ÚVOD	5
1. PATOGENEZE ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU	6
1.1. Původ antifosfolipidových protilátek.....	6
1.1.1. <i>Infekce</i>	6
1.1.2. <i>Genetická predispozice</i>	6
1.1.3. <i>Rakovinné bujení</i>	7
1.1.4. <i>Přeměna na škodlivé protilátky</i>	7
1.2. Působení antifosfolipidových protilátek.....	8
1.2.1. <i>Vliv na hemostázu</i>	9
1.2.2. <i>Aktivace buněk</i>	9
1.2.3. <i>Účinek komplexu β2GPI-protilátka na buňky trofoblastu</i>	11
1.2.4. <i>Vztah mezi aterosklerózou a antifosfolipidovým syndromem</i>	11
1.2.5. <i>Mikročástice původcem trombózy u antifosfolipidového syndromu</i>	11
2. MECHANISMUS VZNIKU TĚHOTENSKÝCH ZTRÁT U PACIENTŮ S ANTIFOSFOLIPIDOVÝM SYNDROMEM	12
2.1. Komplementová kaskáda	12
2.1.1. <i>Klasická cesta</i>	13
2.1.2. <i>Alternativní cesta</i>	13
2.1.3. <i>Lektinová cesta</i>	14
2.2. Působení komplementu u antifosfolipidového syndromu	14
2.2.1. <i>TNF-α</i>	16
2.2.2. <i>Tkáňový faktor</i>	17
2.2.3. <i>VEGF</i>	18
2.2.4. <i>Trombofilie zprostředkovaná komplementem</i>	18
3. HISTOPATOLOGICKÉ ZHODNOCENÍ PLACENTÁLNÍCH ZMĚN U PACIENTEK S ANTIFOSFOLIPIDOVÝMI PROTILÁTKAMI	19
3.1. Zhodnocení patologických lézí	20
3.2. Zhodnocení imunoreaktivity	20
3.3. Průkaz aktivace komplementu v placentách.....	20
3.4. Zhodnocení	21
4. ČÁSTEČNÉ ZVÝŠENÍ AKTIVACE KOMPLEMENTU JE BĚHEM TĚHOTENSTVÍ PŘIROZENÉ	22
5. KLINICKÁ KLASIFIKACE ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU	23
6. TERAPIE	23
ZÁVĚR	25
SOUHRN	26
SUMMARY	27
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	28
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	32
SEZNAM PŘÍLOH	32
PŘÍLOHY	33

Úvod

Tématem této diplomové práce je interakce placenty a antifosfolipidových protilátek při stejnojmenném syndromu. Jak bychom syndrom definovali? Antifosfolipidový syndrom je charakterizován tvorbou tepenných a žilních trombóz. Nejčastější je projev žilní - hluboká žilní trombóza. Arteriální trombóza se obvykle manifestuje jako cerebrovaskulární příhoda. Také je známou příčinou těhotenských komplikací, dochází k těhotenským ztrátám, preeklampsii, placentální insuficienci a zpomalení růstu plodu. Je dobré zmínit výskyt trombocytopenie, livedo reticularis a léze srdeční chlopně a jevy s nízkou prevalencí (pod 5 procent) jako velkou periferní arteriální okluzi, choreu, transverzní myelopatii, ARDS a avaskulární kostní nekrózu.

Při syndromu dochází k tvorbě antifosfolipidových protilátek, řazených do tří skupin: antikardiolipinové protilátky, protilátky při lupus antikoagulans a protilátky proti různým proteinům (hlavně proti beta 2-glykoproteinu). U pacienta se může vyskytovat jedna skupina samostatně nebo také všechny.

My se budeme zabývat patogenezí těhotenských komplikací. Rozebereme si různé mechanismy, jak protilátky působí na placentu, nastíníme roli komplementu, který je překvapivým ústředním článkem mechanismu poškození a částečně se dotkneme i terapie, když si ukážeme způsob účinku antikoagulantů, hlavně heparinu. Přesné pochopení do nedávné doby neznámé cesty poškození placenty u APS pomůže v budoucnu správnými preventivními postupy předcházet těhotenským ztrátám, díky léčbě, která bude více specifická a cílená než dosud.

1. Patogeneze antifosfolipidového syndromu

Antifosfolipidový syndrom je jednou ze známých příčin potratů, mateřské a fetální morbidity. Je charakterizován trombózami a těhotenskými ztrátami, ke kterým dochází v přítomnosti antifosfolipidových protilátek. Jaké faktory jsou zodpovědné za tvorbu antifosfolipidových protilátek? Překvapivě antifosfolipidové protilátky nejsou namířeny proti fosfolipidům, ale proti široké škále proteinů navázaných na fosfolipidy (také známých jako kofaktory). Beta 2-glykoprotein (β 2GPI) je nejdůležitějším cílem antifosfolipidových protilátek. Navíc se zdá, že jen protilátky s vysokou afinitou k β 2GPI mají význam v patogenezi onemocnění. V příloze č.1 nalezneme frekvenci výskytu antifosfolipidových protilátek v běžné populaci.

1.1. Původ antifosfolipidových protilátek

Hypotézy vysvětlující vznik antifosfolipidových protilátek můžeme rozdělit do čtyř skupin. V etiologii se může uplatnit infekce, genetická predispozice, rakovinné bujení a přeměna přirozených, neškodlivých protilátek na škodlivé.

1.1.1. Infekce

Množství infekcí je doprovázeno vzestupem antifosfolipidových protilátek a v některých případech dokonce klinickou manifestací antifosfolipidového syndromu. Někteří infekční činitelé mají na svém povrchu epitopy podobné β 2GPI, kterými se snaží zamaskovat exogenní podstatu činitele. B-Lymfocyty mohou zkříženě reagovat s těmito epitopy na běžných bakteriích a virech, následně syntetizovat antifosfolipidové protilátky. Anti- β 2GPI protilátky rozeznávají tyto maskovací peptidy na úrovni sekvence aminokyselin a konformační struktury.

1.1.2. Genetická predispozice

Ukazuje se genetická provázanost antifosfolipidových protilátek s MHC (major histocompatibility complex), tedy HLA systémem. Co se

týče genů pro β 2GPI, je prokázáno, že přítomnost alely Val247 může být jedním z genetických rizikových faktorů rozvoje APS – i když výsledky si protiřečí. *Yasuda et al. zjistili, že alela Val247 je spojena jak s vyšší frekvencí výskytu anti- β 2GPI protilátek, tak s jejich větší reaktivitou. Na druhou stranu, Camillieri et al. nenalezli žádné spojení mezi polymorfismem Val/Leu247 a přítomností anti- β 2GPI protilátek v bílé (kavkazské) populaci.(1)*

Vystavení geneticky predisponovaného jedince jednomu nebo více faktorům prostředí, například infekcím, může vést ke vzniku trombóz a těhotenských ztrát, a to díky již zmíněnému maskování mikrobiálních epitopů na β 2GPI.

1.1.3. Rakovinné bujení

Exscesivní proliferace, neúčinná apoptóza, případně obojí, stojí za hromaděním buněk u nádorového bujení. Apoptóza a autoimunita mají společné, že u nich dochází k tvorbě protilátek. Protilátky se vážou na apoptické buňky a rozeznávají povrchové epitopy, mezi tyto epitopy můžeme zahrnout také fosfolipidové komplexy a β 2GPI. Výskyt těchto protilátek se zvýší, když se změní antigenní struktura membrány maligní buňky procházející apoptózou a antigeny dosud ukryté intracelulárně se exponují na membráně. Tady je dobré poznamenat, že jednou z nejranějších změn u buněk procházejících apoptózou je externalizace fosfatidylserinu na povrch buňky. Navázání antifosfolipidových protilátek na fosfatidylserin bude zmiňováno později u buněk trofoblastu, bude to považováno za začátek aktivace klasické cesty komplementu.

1.1.4. Přeměna na škodlivé protilátky

Některé důkazy naznačují specifické regulační funkce přirozených protilátek v imunitním systému. Tyto přirozené protilátky proti infekčním činitelům mohou projít přeměnou kvůli vystavení oxidačnímu stresu a jiným nepříznivým podmínkám. To znamená, že původně nemusely být antifosfolipidové protilátky patologické formy imunity, ale mohly ztratit své původní funkce při změněných podmínkách v cévním systému a získat

svou autoimunitní podstatu. Pro tuto možnost hovoří následující zjištění: *Antifosfolipidové protilátky byly nalezeny přibližně ve 12% u starší populace a ve 2% u mladší populace. (2)*

1.2. Působení antifosfolipidových protilátek

Už jsme zmínili, že původcem poškození u antifosfolipidového syndromu jsou hlavně protilátky proti beta 2-glykoproteinu. U různých zvířecích modelů vyvolala imunizace kofaktorem β 2GPI klinické manifestace antifosfolipidového syndromu, zahrnující těhotenské ztráty, trombocytopenii, neurologické a behaviorální dysfunkce. β 2GPI je vysoce glykosylovaný jednořetězcový protein bez známé fyziologické funkce. Nachází se v plazmě, váže se k negativně nabitým fosfolipidům, jakými jsou kardiolipin, fosfatidylserin a fosfatidylinositol. Po navázání na fosfolipidy mění β 2GPI svou konformaci a exponuje skrytý epitop, na který se mohou vázat s vysokou afinitou protilátky. Autoprotilátky β 2GPI dimerizují a zafixují v aktivní konformaci, aby mohlo dojít k tvorbě komplexu s fosfolipidovým anionem. Tento komplex pak následně ovlivňuje hemostatické reakce, aktivuje rozličné buněčné elementy, komplement a má vliv také na aterosklerózu.

Tabulka 1

Vliv antifosfolipidových protilátek		
hemostatické reakce	koagulace	získaná rezistence na protein C inhibice kofaktorové aktivity proteinu S inhibice antitrombinu inhibice cesty inhibitoru tkáňového faktoru ukládání imunokomplexů indukce tvorby mikročástic
	fibrinolýza	inhibice aktivity tPA inhibice fibrinolýzy přes interakci s anti-plasminem aktivace faktoru XI
Aktivace buněčných elementů	endotel	prozánětlivý a protrombotický fenotyp TLR4 a annexin A2
	monocyty	indukce tkáňového faktoru TLR4
	destičky	aktivace a indukce agregace LRP-8, GPIIb
Aktivace komplementu		indukce trombózy aktivace buněk endotelu

Tabulka názorně popisuje vliv antifosfolipidových protilátek na různé oblasti, jež na tomto místě rozvineme. Tato práce je zaměřena na placentu, proto děje probíhající mimo tento rámec, které ač by si samy zasloužily podrobný popis, budou z kapacitních důvodů a pro lepší přehlednost vysvětleny jen stručně.

1.2.1. Vliv na hemostázu

Antifosfolipidové protilátky mají aktivitu prokoagulační i antikoagulační. Mění hemostatické reakce rozličnými způsoby - mohou se vázat na proteiny na membráně, blokovat interakci mezi proteiny, zabraňovat ostatním proteinům v přístupu k fosfolipidové membráně. Například bylo popsáno zabránění antikoagulace pomocí inhibice aktivity proteinu C, proteinu S a antitrombinu. Mohou se nacházet u pozměněné fibrinolýzy, jak naznačují zvýšené plazmatické hladiny antigenů PAI-1 a t-PA (plasminogen activator inhibitor 1 a tissue-type plasminogen activator). Na homologní katalytické domény serinových proteáz (mezi které patří trombin, t-PA a aktivovaný protein C) se vážou některé antikardiolipinové protilátky. To napovídá, že některé antikardiolipinové protilátky rozeznávají konformační epitop, který je sdílený s β 2GPI a homologní katalytickou doménu několika dalších serinových proteáz.

1.2.2. Aktivace buněk

Komplex β 2GPI-protilátka se váže na rozličné typy buněk, mezi které patří buňky endotelu, monocyty a destičky. Vysvětlením, proč je trombóza u antifosfolipidového syndromu tak hojně rozšířena, je značné množství membránových receptorů podílejících se na buněčné aktivaci a reagujících s protilátkami.

Přenos signálu přes Toll-like receptor (TLR) je zahrnut v aktivaci endotelu komplexem β 2GPI-protilátka. TLR je přirozený ligand pro mikrobiální struktury, což naznačuje, že β 2GPI s ním může interagovat.

Když komplex β 2GPI-protilátka rozezná tento receptor, kovalentně se na něj naváže. Endoteliální aktivace u antifosfolipidového syndromu je zprostředkována TLR4, výsledkem je up-regulace tkáňového faktoru, syntéza a sekrece adhezivních molekul a prozánětlivých cytokinů, jinak řečeno, protrombotický a prozánětlivý fenotyp.

Endoteliálním receptorem pro β 2GPI je annexin A2. Tento receptor se uplatňuje ve fibrinolýze a je schopen vázat monomer β 2GPI bez potřeby přítomnosti anti- β 2GPI protilátek. Dále váže plasminogen a tPA. Chybí mu transmembránová doména, a proto nemůže přenášet signály přes membránu do buňky, a tak musí být ještě jiné, zatím neznámé, receptory zahrnuté v aktivaci buněk endotelu. Dodejme, že u malého procenta pacientů s antifosfolipidovým syndromem nalézáme protilátky mířící přímo na annexin A2. Tyto anti-A2 protilátky jsou schopny vyvolat expresi tkáňového faktoru endotelem, podobně jako je to u anti- β 2GPI protilátek. Navíc anti-A2 protilátky znemožňují annexinu A2 zastávat svou funkci kofaktoru pro tvorbu plazminu, a tak částečně inhibují fibrinolýzu.

Dále může být antifosfolipidový syndrom zprostředkován skrz cesty zahrnujících aktivaci $\text{NF}\kappa\beta$ a fosforylaci p38 mitogen-activated protein kinase. Raschi et al. prokázali zahrnutí molekul myD88 a TRAF6, molekul závislých na TLR4, v této aktivaci endotelu.

Monocyty jsou také aktivovány komplexem β 2GPI-protilátka. Aktivace monocytů umožní up-regulaci tkáňového faktoru u antifosfolipidového syndromu. Lopez-Pedrerera et al. předpokládali že nitrobuněčný přenos signálu zahrnoval simultánní aktivaci $\text{NF}\kappa\beta$ /Rel proteinů přes p38 mitogen-activated protein kinase MEK-1/ERK. Nedávno Sorice et al. prokázali interakci mezi β 2GPI, annexinem A2 a TLR4 v lipidových čluncích plazmatické membrány lidských monocytů. Navíc ilustrovali způsob, jakým probíhá přenos signálu závislého na $\text{NF}\kappa\beta$, který zahrnuje TLR4 a kinázu spojenou s receptorem pro interleukin-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase), tento způsob je podobný tomu u buněk endotelu. (3)

Pro aktivaci destiček komplexem β 2GPI-protilátka jsou potřeba 2 receptory, low density lipoprotein receptor-related protein 8 (také znám jako apolipoprotein E receptor 2) a platelet adhesive receptor glycoprotein Iba. Ještě s pomocí trombinu indukuje tento komplex tvorbu tromboxanu B₂, *hlavně přes fosforylaci p38 mitogen-activated protein kinase a následnou fosforylaci cytosolové fosfolipázy A2. (4)*

1.2.3. Účinek komplexu β 2GPI-protilátka na buňky trofoblastu

Bylo prokázáno in vitro, že antifosfolipidové protilátky mají přímý účinek na placentální trofoblast. Tropismus protilátek k placentě má jednoduché vysvětlení, buňky trofoblastu externalizují fosfatidylserin a β 2GPI na vnější membránu. Antifosfolipidové protilátky mají rozličné účinky na placentu, mohou zasahovat do intermembránových vztahů buněk trofoblastu, jinak řečeno, zasahovat do tvorby vazeb těchto buněk, redukovat jejich proliferaci, invazivitu a uvolňování choriogonadotropinu, zvyšovat apoptózu. Vzniká prozánětlivé prostředí se sekrecí cytokinů a aktivací komplementu, kde mohou následně zánětlivé procesy zprostředkované antifosfolipidovými protilátkami indukovat defektní placentaci bez vzniku trombóz. Roli komplementu u těhotenských ztrát si důkladně popíšeme v dalších částech této práce.

1.2.4. Vztah mezi aterosklerózou a antifosfolipidovým syndromem

Vztah mezi komplexem β 2GPI-protilátka a aterosklerózou je nejasný. Zatímco in vitro studie prokázaly, že komplex β 2GPI-protilátka je spojen s odchylkou endoteliálních funkcí a zkříženou reakcí s oxidovanými low-density lipoproteiny, důkazů z klinických studií je pro toto spojení pomálu.

1.2.5. Mikročástice původcem trombóz u antifosfolipidového syndromu

Pokud začneme obecně, po buněčné aktivaci nebo indukci apoptózy u lidských buněk dochází k uvolnění mikročástic, v případě apoptózy se

nazývají apoptická tělíška. Tyto mikročástice vzniknou exocytózou, uvolňují se cytoplazmatické vesikly obalené membránou, na membráně vystavují negativně nabitě fosfolipidy a povrchové antigeny charakteristické pro původní buňky. Díky katalytickému povrchu, který vznikne vystavením fosfatidylserinu na povrchu nebo aktivitou tkáňového faktoru, dochází ke shromažďování koagulačních působků a tvorbě trombinu. Mnohé studie potvrdily souvislost mezi protrombotickými a prozánětlivými poruchami a zvýšenou hladinou mikročástic. Hladiny mikročástic endoteliálního původu byly zvýšeny u pacientů s lupus antikoagulans oproti skupině zdravých jedinců. Dále byl nalezen větší počet mikročástic u pacientů s trombotickými komplikacemi, než u těch bez komplikací.

Některá onemocnění provází výskyt antifosfolipidových protilátek. V příloze č. 2 se nachází jejich stručný výpis.

2. Mechanismus vzniku těhotenských ztrát u pacientů s antifosfolipidovým syndromem

Jak už jsme zmínili, při diferenciaci buněk trofoblastu dochází ke externalizaci fosfatidylserinu na vnější membránu. K této molekule mají antifosfolipidové protilátky vysokou afinitu, a proto se na ní začnou vázat. Při této reakci dochází k aktivaci klasické cesty komplementu, vzniku jeho štěpných produktů, které zprostředkují poškození placenty, těhotenské ztráty a omezení růstu plodu. Aby byl popis vzniku poškození přehledný, nejprve si je dobré vysvětlit, co to vlastně komplement je.

2.1. Komplementová kaskáda

Komplementový systém je složen z více než třiceti sérových a membránových proteinů. Ty v souhře pracují na ochraně organismu proti mikroorganismům, iniciují zánět a poškození tkáně. Aktivace komplementu vede k přivolání a aktivaci zánětlivých buněk.

Devět sérových proteinů , známých jako C1-C9, je hlavní složkou komplementu. Po různých podnětech se kaskádovitě aktivují. Ústředním článkem je C3, jehož fragment se váže na mikrobiální povrch. Meziprodukty komplementové kaskády se podílejí na opsonizaci a chemotaxi, terminální produkt komplementové kaskády Membrane Attack Complex (MAC) je schopen perforovat membrány mikroorganismů a tím je likvidovat. Tento komplex je složen z proteinů C5b, C6, C7, C8, C9. Komplement se aktivuje třemi cestami – klasickou, lektinovou a alternativní.

2.1.1. Klasická cesta

Protilátky se naváží na povrch mikroorganismu, tím se pozmění konformace protilátkové molekuly, a tak se odhalí vazebné místo pro protein C1. Protein C1 po vazbě na protilátku změni svůj tvar a začne proteolyticky štěpit C2 a C4. Štěpením vzniklé C4b a C2a se také naváží na povrch mikroorganismu a vytvoří klasickou C3-konvertázu, enzym štěpící C3 na C3a a C3b. Fragmenty C3a působí chemotakticky na fagocyty. Molekuly C3b slouží jako významné opsoniny, navíc z některých vznikají C3 konvertázy, zesilující odpověď na podnět. Z některých molekul C3-konvertázy vznikají složitější komplexy, C5-konvertázy, které mají za úkol štěpit protein C5 na C5b a chemotaktický C5a. Vznikem C5b vstupuje komplementová kaskáda do své závěrečné, lytické fáze.

Fragmenty C5b tvoří komplex s dalšími komplementovými proteiny, C6, C7 a C8. Komplex se zanoří do povrchové lipidové membrány cílové buňky a dojde k připojení 3-18 molekul C9, dostane tvar kruhu – póru. Póry unikají cytoplazmatické komponenty buňky, dojde k osmotické poruše vnitřního prostředí buňky, a tím začne lýza. Některé mikroorganismy jsou odolné vůči komplementovému lytickému poškození díky své buněčné stěně.

2.1.2. Alternativní cesta

Jedná se o nespecifickou imunitní reakci. Protein C3 se, zjednodušeně řečeno, s malou frekvencí štěpí na C3a a C3b samovolně.

Molekula C3b obsahuje velmi reaktivní thioesterovou skupinu, která se odhalila štěpením. Tato skupina většinou reaguje s vodou, a tak je deaktivována. Pokus se však naváže na hydroxy- a aminoskupinu na povrchu mikroorganismu nebo buňky vlastního organismu, následuje sled dalších reakcí. K molekule C3b se připojí faktor B, sérový protein. Ten je štěpen sérovou proteázou faktorem D na Ba a Bb. Properidin (faktor P) stabilizuje tvořící se komplex C3bBb, a tak vznikne alternativní C3-konvertáza. Kaskáda pak pokračuje způsobem totožným s klasickou cestou.

2.1.3. Lektinová cesta

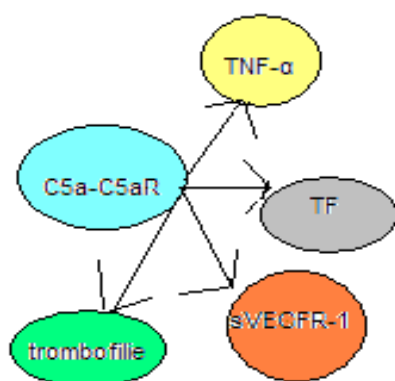
Podobná klasické cestě, ale iniciátorem je místo protilátky lektin vázící mannosu (MBL – mannose-binding lectin). Váže se přímo (tzn. bez protilátky) na sacharidové struktury povrchu mikrobů. Funkcí i strukturou je podobný C1, také proteolyticky štěpí C4 a C2.

2.2. Působení komplementu u antifosfolipidového syndromu

Salmon, Girardi et al. vytvořili myší model antifosfolipidového syndromu, tento model vznikl pasivním přenosem lidských antifosfolipidových protilátek. Prokázali, že aktivace komplementu tvoří základ a příčinu těhotenských ztrát, zpomalení růstu plodu u antifosfolipidového syndromu. *Pasivní přenos IgG od žen s opakovanými těhotenskými ztrátami a antifosfolipidovými protilátkami způsobil u 40 procent resorpci plodu, v porovnání s méně než 10 procenty u myší s IgG od zdravých jedinců a 35procentní snížení průměrné váhy přežívajících plodů. Pozorovali jsme podobný poměr selhání těhotenství při použití IgG od pěti rozdílných pacientů, stejně jako při užití monoklonálních lidských antifosfolipidových protilátek. Tyto in vivo pozorované patogenetické účinky potřebují jak rozpoznání relevantních cílových antigenů antifosfolipidovými protilátkami, tak přes Fc-doménu zprostředkovanou aktivaci komplementu, která indukuje následné vyvolavatele poškození.*
(5)

V jejich počátečních studiích se soustředili na pozorování, zda inhibice komplementové kaskády zabrání těhotenským ztrátám a zpomalení růstu plodu. Nejprve použili Crry-Ig, inhibitor C3-konvertázy. Prokázali, že myši deficientní v C3 komplementu byly rezistentní k poškození plodu antifosfolipidovými protilátkami. Tím ukázali, že inhibice společné cesty komplementové kaskády zabrání poškození, ale která z molekul je patogeneticky významná? Aby definovali počátky a kritické činitele antifosfolipidovými protilátkami zprostředkovaného poškození, použili myši s chybějícími elementy komplementové kaskády (C4, faktory B, C5 a C5a receptory) a také užívali inhibitory komplementové aktivace (anti-C5 mAb, anti-factor B mAb a antagonizující peptid C5a receptoru). Identifikovali komplementový protein C5 a zvláště jeho štěpný produkt C5a, jako klíčové mediátory fetálního poškození. Při použití protilátek nebo peptidů, které blokují interakce C5a-C5a receptoru, zabránili těhotenským komplikacím.

Navíc myši deficientní v alternativní a klasické cestě komplementu (faktor B, C4, C3 a C5) byli rezistentní k fetálnímu poškození způsobeném antifosfolipidovými protilátkami, a tak jejich výsledky naznačují, že obě, jak klasická, tak alternativní cesta aktivace komplementu přispívají k poškození. Vysvětlují to tak, že nejdříve dojde k aktivaci klasické cesty antifosfolipidovými protilátkami, na úrovni C3 potom dojde k aktivaci alternativní cesty komplementu, která vytvoří amplifikační smyčku, a tím zvětší rozsah poškození.



Obrázek 1. Interakce C5a-C5aR indukuje další děje

2.2.1. TNF- α

Další studie zkoumaly, jaké molekuly po aktivaci komplementu způsobí placentální poškození. Prokázaly, že transfer antifosfolipidových protilátek má za následek rychlý vzestup deciduálních a systémových hladin TNF- α . Ukázalo se, že TNF- α je důležitý mezičlánek procesu, spojnice aktivace komplementu s placentálním a fetálním poškozením. U myší deficientních v C5, kterým byly transferovány antifosfolipidové protilátky, nedošlo ke zvýšením hladin TNF- α a u těchto myší nebo myší léčených blokátorem TNF- α byla fetální resorpce méně častá. Účinek TNF- α na placentální tkáň je přímý a nepřímý.

Na buňkách trofoblastu nacházíme TNFR (receptor pro TNF- α), ten moduluje buněčnou proliferaci a diferenciaci při fyziologickém těhotenství. Jak ukázaly studie, TNF- α indukuje apoptózu buněk cytotrofoblastu, což napovídá, že chybná exprese TNF- α může mít škodlivé účinky na vývoj placenty a její funkci. Avšak regulovaná exprese TNF- α ve vyvíjející se placentě je v určitých stádiích esenciální. Dále má zvýšená hladina TNF- α vliv na corpus luteum, což se projevuje následnou nedostatečnou syntézou hormonů.

Dále může TNF- α působit nepřímo přes aktivaci leukocytů a buněk endotelu. Neutrofilů a monocytů stimulovaných TNF- α uvolňují zánětlivé mediátory. Patří mezi ně reaktivní oxidanty, proteolytické enzymy, komponenty komplementu. Tyto mediátory přímo poškozují deciduální

tkáň, akcelerují aktivaci alternativní cesty komplementu, zvyšují štěpení C5, a těmito mechanismy působí na další znásobující uvolňování TNF- α , vznikne zpětná smyčka, která způsobí další rozšíření zánětu.

Je možné, že buňky trofoblastu secernují TNF- α také, jako odpověď na štěpné produkty komplementu nebo MAC (membrane attack complex). Placentální tkáň vystavená nejdříve komplementem navozené hypoxii, pak následné reoxidaci, *in vitro* secernovala TNF- α , a tak podporovala zánět.

2.2.2. Tkáňový faktor

Jiný způsob, kterým komplement a hlavně C5a způsobuje poškození plodu a placenty, je indukci exprese tkáňového faktoru (TF). Transfer antifosfolipidových protilátek zvyšuje množství TF v deciduální tkáni bez vzniku fibrinových depozit nebo trombů. Podařilo se zabránit antifosfolipidovými protilátkami způsobenému zánětu a těhotenským ztrátám při blokádě TF monoklonální protilátkou a při snížení TF genetickými metodami. TF z myeloidních buněk, tzn. ne z trofoblastu fetálního původu, byl spojen s fetálním poškozením, což naznačuje, že neutrofilové jsou původci patologického TF. Přesný průběh můžeme popsat takto - spojení C5a s C5a receptory na neutrofilech indukuje expresi TF, to pak způsobí oxidativní vzplanutí, tím poškození trofoblastu a těhotenské ztráty.

Ale jak TF indukuje oxidativní vzplanutí? Na chvíli odbočíme k hemostáze - na TF se váže faktor VII z plazmy, je aktivován na FVIIa a vzniklý komplex TF/FVIIa aktivuje jak koagulační faktor X, tak faktor IX, a tak je aktivována koagulační kaskáda. V našem případě komplex TF/Faktor VIIa, TF/FVIIa/Faktor Xa, taktéž faktor Xa a trombin působí prozánětlivě navázáním se na receptor aktivovaný proteázou (PAR, protease activated receptor). Aktivováním tohoto receptoru spustí signalizační cestu vedoucí k expresi TNF- α , interleukinů a adhezivních molekul. Redecha et al. potvrdili, že pro aktivaci neutrofilů je důležitý PAR 2, PAR 1 nemá vliv. Taktéž ukázali, že pro oxidativní vzplanutí je ústředním článkem komplex TF/Faktor VIIa a není pro něj potřeba ani tvorba trombinu ani faktoru Xa.

2.2.3. VEGF

Za třetí, produkty aktivace komplementu mohou způsobit nerovnováhu angiogenních faktorů, která je potřeba pro fyziologický průběh těhotenství. Pro úspěšný embryonální růst je potřebný správný vývoj fetomaternálního vaskulárního rozhraní. Koordinace exprese VEGF a PlGF (vaskulárního endoteliálního a placentálního růstového faktoru) je potřebná pro správný vývoj placenty. Stejně tak je důležitá exprese jejich receptorů na buňkách invazivního trofoblastu, u VEGF to jsou VEGFR-1 a VEGFR-2. Ale při interakci C5a-C5a receptoru dojde v monocytech k pozměněnému štěpení VEGFR-1, vzniká solubilní VEGFR-1 (sVEGFR-1), který je následně secernován. Tento pozměněný solubilní receptor postrádá cytoplasmatickou a transmembránovou doménu, ale ponechal si doménu vázající proteiny. V podstatě vychytává VEGF, ale nemůže přenést signál, takže způsobuje depleci VEGF. A tak přebytek sVEGFR-1 inhibuje diferenciaci a invazivitu placentálního cytotrofoblastu, a tím má klíčovou roli v patogenezi abnormálního vývoje placenty spojeného s preeklampií a zpomalením růstu plodu.

2.2.4. Trombofilie zprostředkovaná komplementem

Komplement je schopen přispět ať už přímo, či nepřímo k trombofilním stavům. Proteiny komplementu C5b-9 (MAC) a interakce C5a-C5a receptoru mají schopnost indukovat tyto stavy. O hemostatickém působení antifosfolipidovými protilátkami aktivovaných monocytů, destiček a buněk endotelu jsme už psali, taktéž o reakcích mezi těmito aktivovanými elementy a komplementem. Ještě dodejme, že aktivace komplementu má důležitou úlohu v adhezi leukocytů k buňkám endotelu.

To bylo nastínění procesu, jakým antifosfolipidové protilátky působí na placentální tkáň, a teď se soustředíme na histopatologické nálezy.

3. Histopatologické zhodnocení placentálních změn u pacientek s antifosfolipidovými protilátkami

V minulé kapitole jsme vysvětlovali mechanismus antifosfolipidového syndromu na myším modelu. Aby tato práce byla kompletní, je potřeba si popsat změny, jež byly pozorovány na lidských placentách. O přesné popsání změn se pokoušeli Shamonki et al.. Jejich studie je pro naši práci klíčová, a proto si ji rozebereme podrobněji.

Pacientky byly vybrány retrospektivně, histopatologické diagnózy byly vyhodnoceny stejným patologem u všech placent, v době odeslání vzorku, nezávisle na této studii, klinické informace byly získány od gynekologa zodpovědného za porod. Kontrolní skupina byla vybrána mezi ženami s fyziologickým těhotenstvím a s placentami bez podstatných patologických nálezů. Studie zahrnovala 47 pacientek s klinicky potvrzenými antifosfolipidovými protilátkami. Pacientky s antifosfolipidovými protilátkami měly oproti kontrolní skupině výrazně více spontánních potratů v anamnéze a s větší závažností, nebyly zde žádné jiné klinické rozdíly. Obě skupiny byly podobného věku a parity. U obou skupin se v těhotenstvích tvořily placenty a plody měly podobnou velikost. Protože jen placenty donošených živých novorozenců byly zahrnuty ve studii, plody byly srovnatelného gestačního věku. Aby se zvýraznil efekt, který mají samotné antifosfolipidové protilátky na depozici komplementu, byly do studie vybrány jen pacientky s antifosfolipidovými protilátkami, ale bez antifosfolipidového syndromu. Byla vybrána část tkáně, která byla prostá patologických lézí, protože lépe ukazovala placentální funkčnost a reflektovala dynamické procesy. Předpokládali, že nedochází jen k aktivaci komplementu, ale také i k hlubším histopatologickým změnám placentální tkáně, imunohistochemickým barvením se barvícím nespecificky. Pomocí imunohistochemických metod se ve vilózním rozhraní zjišťovala depozice aktivovaných produktů

komplementové kaskády, a to klasické cesty (C4d), časné společné cesty (C3b) a konečné společné cesty (C5b-9).

3.1. Zhodnocení patologických lézí

Patologické léze byly pozorovány v 62 procentech případů pacientek s antifosfolipidovými protilátkami. Při hodnocení mikroskopem byly popsány následující změny v placentách těchto pacientek: deciduitis, deciduální nekróza, zvýšené množství syncytiálních uzlíků, „akcelerovaná“ zralost klků, avaskulární klky a vilózní infarkty, retroplacentální hematomy, intervilózní trombózy, atherosclerosis a přetrvávání vaskulárního hladkého svalu.

3.2. Zhodnocení imunoreaktivity

Abychom si ukázali, jak byli vzorky hodnoceny, ocitujeme zde část práce. *Intenzita imunoreaktivity a procento buněk, které se obarvily, byly u každého případu ohodnoceny pro každou protilátku, aby se mohlo vypočítat H-skóre. H-skóre je definováno jako $\Sigma pi(I)$, kde I je intenzita obarvení s hodnotami 0, 1 nebo 2 (žádné až minimální, střední a výrazné) a Pi je procento buněk, které byly obarveny pro každou intenzitu, v rozmezí 0-100% s maximálním skóre 200. Skóre byla počítána pro každý typ buňky (cytotrofoblast, syncytiotrofoblast, extravilózní trofoblast), polohu (cytoplazma, buněčná membrána, bazální membrána) a protilátku (C3b, C4d a C5b-9). Když byly řezy odečítány, patolog neměl údaje, zda se jedná o placenty pacientek nebo kontrolní skupiny. (6)* V příloze č. 3 se nachází ukázky intenzity imunoreaktivity v různých oblastech.

3.3. Průkaz aktivace komplementu v placentách

U placent pacientek s antifosfolipidovými protilátkami byla intenzita imunoreaktivity pro všechny měřené komponenty komplementu velmi

výrazná v extravilózním trofoblastu, ve vilózním trofoblastu byly zase větší rozdíly v barvení. Jednotlivé výsledky jsme umístili do přehledné tabulky.

	Imunoreaktivita	
	placenty pacientek	porovnání s kontrolní skupinou
C4d	cytoplazma vilózního trofoblastu (syncytiotrofoblast a cytotrofoblast)	zvýšená
	buněčná a bazální membrána buněk vilózního trofoblastu	zvýšená
	extravilózní trofoblast decidua basalis	zvýšená
C3b	cytoplazma vilózního trofoblastu (syncytiotrofoblast a cytotrofoblast)	zvýšená
	extravilózní trofoblast decidua basalis	neutrální (zvýšeno u obou skupin)
C5b-9	cytoplazma vilózního trofoblastu (syncytiotrofoblast a cytotrofoblast)	snížená
	extravilózní trofoblast decidua basalis	neutrální (zvýšeno u obou skupin)

Tabulka 2 Průkaz aktivace komplementu v různých oblastech placenty a porovnání s kontrolní skupinou

Navíc objevili významnou korelaci mezi přítomností patologických změn, které byly předtím popsány, a depozicí C4d v cytoplasmě trofoblastu, v buněčné a bazální membráně. Tento trend korelace mezi C4d depozicí a patologickými změnami byl pozorován také v deciduálním extravilózním trofoblastu, avšak tam nejsou výsledky statisticky významné.

3.4. Zhodnocení

Co z této studie vyplývá? I když byly vybrány pacientky bez klinických projevů v době těhotenství a nebyl rozdíl v porodní váze, bylo díky této studii prokázáno, že i u těchto klinicky němých případů způsobují antifosfolipidové protilátky histopatologické změny v placentě a jsou spojeny se zvýšenou depozicí C4d a C3b složek komplementu.

Relativně hypoxické prostředí, fyziologicky se nacházející v placentě, řídí diferenciaci trofoblastu a spouští aktivaci komplementu. V této studii byla také pozorována depozice produktů aktivace komplementu v klcích a deciduách u fyziologických těhotenství. Ale na buňkách cytotrofoblastu se nalézají proteiny regulujícími komplement - DAF, MCP a CD59, proto bývá

placenta chráněna proti spontánní aktivaci komplementu. A tak i když je zde potenciál pro spuštění komplementové kaskády, ke tkáňovému poškození nedochází. U pacientek s antifosfolipidovými protilátkami je však depozice produktů aktivace komplementu tak výrazná, že má, zjednodušeně řečeno, přesilu nad ochrannými proteiny. Takže se za příčinu poškození spíše předpokládá exscesivní aktivace komplementu než nedostatek ochranných faktorů. Pro hypotézu svědčí fakt, že klasická cesta je aktivována pomocí protilátek a u antifosfolipidového syndromu nalézáme vysokou hladinu antifosfolipidových protilátek.

Za nečekaný nálezn této studie se dá pokládat snížení depozice proteinů komplementového komplexu C5b-9 u placent pacientek s antifosfolipidovými protilátkami oproti kontrolní skupině. Je nejasné, co způsobuje rozdíl v depozici proteinů časně fáze (C4d a C3b) a terminální fáze (C5b-9) komplementové kaskády. Jak již bylo napsáno, aktivace komplementu vede k uvolnění anafylatoxinů C3a a C5a. Patologický nálezn pozorovaný u placent pacientek s aPL protilátkami koreluje významně s depozicí C4d a může mít možná spíše souvislost s uvolněním anafylatoxinů (C3a a C5a) než přímým lytickým efektem komplexu C5b-9.

4. Částečné zvýšení aktivace komplementu je během těhotenství přirozené

Popsali jsme si, jak se aktivuje komplement, úlohu antifosfolipidových protilátek v jeho aktivaci, jakým mechanismem působí poškození placentální tkáni a teď by bylo dobré zmínit práci Richani et al. porovnávající aktivitu komplementu v plazmě zdravých těhotných a netěhotných žen.

Ve studii bylo zahrnuto 174 žen, netěhotných 40 (ve věku od 18 do 40) a těhotných 134. V skupině těhotných byla zahrnuta těhotenství od 20. týdne až do konce třetího trimestru. Měřili hodnoty C3a, C4a a C5a v plazmě. Tyto anafylatoxiny byly vybrány, protože jsou spolehlivými markery aktivace komplementu. Těhotné ženy měly tyto hodnoty výrazně

vyšší a neměnily se s gestačním věkem. Jejich vysvětlení je, že aktivace komplementu, jakožto složky nespecifického imunitního systému, kompenzuje pokles složek specifického imunitního systému, který je pozorován během fyziologického těhotenství, a je ochranou matky a dítěte proti infekcím během těhotenství.

Ještě je dobré zmínit, že koncentrace inhibitoru C1 esterázy, který reguluje aktivaci klasické cesty, byla pozorována nižší nebo nezměněna během fyziologického těhotenství. *Její snížení může vést k aktivaci komplementové kaskády a následnému zvýšení C3a, C4a a C5a v plazmě matek. Navíc byl pozorován pokles exprese komplementového receptoru 1 (CR1) a DAF na červených krvinkách během fyziologického těhotenství. Tyto nálezy mohou také vysvětlit vysoké hladiny stěpných produktů komplementu v plazmě těhotných žen.*(7)

5. Klinická klasifikace antifosfolipidového syndromu

Práce není zaměřena klinicky, přesto byla pro úplnost zařazena do přílohy č. 4 klinická klasifikace antifosfolipidového syndromu podle International Consensus Statement.

6. Terapie

V dnešní době se v léčbě těhotných pacientek s antifosfolipidovým syndromem užívá kombinace aspirinu a heparinu. Používá se nefrakcionovaný nebo nízkomolekulární heparin (LMWH). Prekoncepční monoterapie aspirinem se stále ještě provádí u některých pacientek, které mají v anamnéze opakované těhotenské ztráty v časných stádiích těhotenství.

Při zavádění heparinu do léčebných postupů u antifosfolipidového syndromu se zdůrazňovalo jeho antikoagulační působení. Ale je předepsáno dávkování se sub-antikoagulačními dávkami, jak je tedy možné,

že je heparin přesto účinný? Vysvětlením je, že zabraňuje aktivaci komplementu na buňkách trofoblastu. Jako neúčinná se ukázala farmaka bez anti-komplementového efektu, jakými jsou hirudin a fondaparinux. Když se bavíme o komplementu, je dobré zmínit práci Redecha et al., kteří popsali cestu poškození placenty tkáňovým faktorem přes PAR2, protease activated receptor 2 (v předchozí části jsme si vysvětlili vztah mezi komplementem a TF) a hirudin inhibuje trombin, který užívá receptor PAR1.

Léčba heparinem má i své nežádoucí účinky, dlouhodobé užívání například zvyšuje riziko krvácení, osteoporózy a následných spontánních zlomenin. Je proto třeba hledat nové postupy, jak zabránit těhotenským ztrátám u tohoto syndromu. Nadějná se jeví léčba statiny, protože snižuje expresi zmiňovaných TF, PAR2 a zvyšuje expresi inhibitoru komplementu DAF. ACE inhibitory zase snižují expresi TF z monocytů. Taktéž se bude možné v budoucnu soustředit na potlačení TNF- α , jako i na zásahy z oblasti genového inženýrství.

Závěr

Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek na lidský organismus je komplexní. Podílí se na něm rozmanité působky, které jsou provázané a schopné se vzájemně potencovat. Mezi nejdůležitější oblasti ovlivněné antifosfolipidovými protilátkami patří hemostáza, aktivace buněk a komplementu. My jsme se soustředili na jevy související s aktivací komplementu, které probíhají během těhotenství na placentě, vedou k těhotenským ztrátám a zpomalení růstu plodu. I když je částečná aktivace komplementu během těhotenství běžná a má spojitost se změněnými imunitními požadavky, prokázali jsme, že u antifosfolipidového syndromu je nadměrná, vytváří zánětlivé prostředí v placentě a tak způsobuje její poškození. Taktéž se nám podařilo identifikovat složku komplementu, která má klíčový význam ve vytvoření prozánětlivého a následně protrombotického fenotypu v placentě. Poté jsme si popsali důležité molekuly, které jsou ovlivněny aktivací komplementu a mají svůj specifický podíl na těhotenských komplikacích u antifosfolipidového syndromu.

Díky přesné identifikaci činitelů zodpovědných za komplikace provázející tento syndrom bude prevence těhotenských ztrát více efektivní, lépe zaměřená. Už dnes se objevují nové možnosti, například v podobě statinů.

Souhrn

Antifosfolipidový syndrom je charakterizován tepennými a venózními trombózami, opakovanými těhotenskými ztrátami a zpomalením růstu plodu. Uplatňují se při něm antifosfolipidové protilátky, které se dělí na antikardiolipinové protilátky, protilátky při lupus antikoagulans a protilátky proti proteinům. Nejznámější protilátkou proti proteinům je anti- β 2GPI. β 2GPI se váže k negativně nabitým fosfolipidům, jakými jsou kardiolipin, fosfatidylserin a fosfatidylinositol. Dochází k ovlivnění rozličných dějů, například hemostázy, aktivaci buněk a komplementu. V placentě je hlavním původcem poškození komplement. Nejdříve je cestou C1 aktivována klasická cesta komplementové kaskády, následně na úrovni C3 se připojí i alternativní cesta, která poškození zesílí. Klíčovou se ukázala interakce komplementového anafylatoxinu C5a s jeho receptorem. Myší model ukázal, že inhibicí komplementové kaskády na této úrovni se dá zabránit těhotenským ztrátám. V etiologii poškození se následně uplatní tři důležité molekuly, které iniciují další zánětlivé reakce, a tak jsou schopny zprostředkovat i vznik trombóz, což je nejznámější projev antifosfolipidového syndromu. Těmito molekulami jsou TNF- α , tkáňový faktor a sVEGFR-1. A navíc komplement sám o sobě je schopen indukovat trombofilní stavy.

I když je zvýšená aktivace komplementu při fyziologickém těhotenství normální, v přítomnosti antifosfolipidových protilátek je zvýšena extrémně. I u těhotenství žen s antifosfolipidovými protilátkami, která nevykazují klinické známky poškození, dochází na úrovni placenty k indukci zánětu a nespecifickým zánětlivým změnám.

V dnešní době se prevence těhotenských ztrát provádí heparinem a aspirinem. Nové studie naznačují možnost použití statinů a ACE inhibitorů. V budoucnu bude terapie více cílena na zánětlivý proces, který je spuštěn aktivací komplementu v placentě.

Summary

Antiphospholipid syndrome is characterized by arterial and venous thrombosis, recurrent pregnancy loss, and intrauterine growth restriction (IUGR). It is associated with antiphospholipid antibodies, which are subdivided to anti-cardiolipin antibodies, lupus anticoagulant antibodies, and antibodies against proteins. Anti- β 2GPI is the best known antibody against proteins. β 2GPI binds to negatively charged phospholipids, like cardiolipin, phosphatidylserine, and phosphatidylinositol. Antiphospholipid antibodies influence several processes, such as hemostasis and cell and complement activation. Complement is the main mediator of tissue injury in the placenta. Initially, the classical pathway of complement activation is induced via C1, then, at the level of C3, the alternative pathway joins and amplifies the damage. It has been shown that interactions between complement anaphylatoxin C5a and its receptors play a key role in causing injury. The murine model has shown that by inhibition of the complement pathway at this level, pregnancies can be rescued. The etiology of placental injury involves three important molecules; these molecules first initiate a proinflammatory state which then allows subsequent induction of the prothrombotic state. The prothrombotic state is the best known complication of antiphospholipid syndrome. The molecules involved are TNF- α , tissue factor (TF), and sVEGFR-1. Additionally, complement itself is also capable of inducing thrombophilia. Although increased complement activation is not unusual during normal pregnancies, it is extremely elevated in the presence of antiphospholipid antibodies. Even in pregnancies with no clinical signs of injury, the presence of antiphospholipid antibodies still leads to inflammation and nonspecific inflammatory changes at the placental level.

Today pregnancies can be protected with heparin and aspirin. New studies indicate that treatment with statins and ACE inhibitors can also be effective. In the future, therapies targeted toward complement-induced processes in the placenta will play an increasingly significant role in the treatment of this syndrome.

Seznam použité literatury

Seznam citací

1,2,3,4 ESPINOSA, G. a CERVERA, R. Review Antiphospholipid syndrome, *Arthritis Research & Therapy* 2008, vol. 10, no. 6, **10:230**

5 SALMON, J. E. a GIRARDI, G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation, *J Reprod Immunol.* 2008, 77(1): 51-6, **53**

6 SHAMONKI, J.M. et al. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies, *Am J Obstet Gynecol.* 2007, 196(2): 167.e1-167.e5, **167.e3**

7 RICHANI, K. et al. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system, *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005, 17(4): 239-245, **242**

celá kniha

HOŘEJŠÍ, V. a BARTŮŇKOVÁ, J. Základy imunologie, Praha: Nakladatelství Triton, 2001. 260 s. ISBN 80-7254-215-X

VOJÁČEK, J. a MALÝ, M. a kol. Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi, Praha: GRADA Publishing, 2004. 276 s. ISBN 80-247-0501-X

kapitola – části knihy v češtině a angličtině

MOORE, K.L. a PERSAUD, T.V.N. Placenta a zárodečné blány. In MOORE, K.L. a PERSAUD, T.V.N. Zrození člověka, Praha: ISV nakladatelství, 2002, s. 129-166, ISBN 80-85866-94-3

ABBAS, A.K. Diseases of Immunity. In KUMAR, V., ABBAS, A.K. a FAUSTO, N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. – 7th ed., Philadelphia: Saunders, 2004, p. 193-268, ISBN-10: 0721601871, ISBN-13: 978-0721601878

článek v časopise

ESPINOSA, G. a CERVERA, R. Review Antiphospholipid syndrome, *Arthritis Research & Therapy* 2008, vol. 10, no. 6, **10**:230

SALMON, J. E. a GIRARDI, G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation, *J Reprod Immunol.* 2008, 77(1): 51-6

SALMON, J.E. a de GROOT, P. G. Pathogenic Role of Antiphospholipid Antibodies, *Lupus* 2008, 17(5): 405-411

SALMON, J. E. a GIRARDI, G. Theodore E. Woodward Award: Antiphospholipid Syndrome Revisited: A Disorder Initiated by Inflammation, *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007, 118: 99-114

DI SIMONE, N. et al. Pathogenic role of anti- β 2-glycoprotein I antibodies on human placenta: functional effects related to implantation and roles of heparin, *Human Reproduction Update* 2007, vol. 13, no. 2, pp. 189-196

CESARMAN-MAUS, G. et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome, *Blood* 2006, 107(11): 4375-4382

BERMAN, J., GIRARDI, G. a SALMON, J.E. TNF- α Is a Critical Effector and a Target for Therapy in Antiphospholipid Antibody-Induced Pregnancy Loss, *The Journal of Immunology* 2005, 174:485-490

REDECHA, P. et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody-induced fetal injury, *Blood* 2007, 110(7): 2423-2431

WEILER, H. Tracing the molecular pathogenesis of antiphospholipid syndrome, *The Journal of Clinical Investigation* 2008, vol. 118, no. 10, pp 3276-3278

REDECHA, P., GIRARDI, G. et al. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome, *J. Clin. Invest.* 2008, **118**: 3453-3461

SALMON, J.E. et al. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction, *JEM* 2006, vol. 203, no. 9, pp 2165-2175

SHAMONKI, J.M. et al. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies, *Am J Obstet Gynecol.* 2007, 196(2): 167.e1-167.e5

RICHANI, K. et al. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system, *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005, 17(4): 239-245

HORSTMAN, L.L. et al. Antiphospholipid antibodies: Paradigm in transition, *Journal of Neuroinflammation* 2009, **6**:3

internetové zdroje – tabulky a obrázky

http://www.vnitrnilekarstvi.cz/pdf/vl_05_08_07.pdf (28.11. 09)

http://www.thrombosis.cz/sources/guidelines_aps.pdf (28.11. 09)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC40059/figure/F1/>
(28.11. 09)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1540059/figure/F2/>
(28.11. 09)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1540059/figure/F3/>
(28.11. 09)

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek č. 1 Interakce C5a-C5aR indukuje další děje	16
Tab č. 1 Vliv antifosfolipidových protilátek	8
Tab č. 2 Průkaz aktivace komplementu v různých oblastech placenty a porovnání s kontrolní skupinou	21

Seznam příloh

Příloha č. 1: Frekvence výskytu antifosfolipidových protilátek v běžné populaci	33
Příloha č. 2: Onemocnění a léky provázené výskytem antifosfolipidových protilátek	33
Příloha č. 3: Průkaz aktivace komplementu v různých oblastech placenty	34
Příloha č. 4: Klinická klasifikace APS podle International Consensus Statement	37

Přílohy

Příloha č. 1

Frekvence výskytu antifosfolipidových protilátek v běžné populaci.			
studie, rok	počet, skupina	LA (%)	ACLA(%)
Lockwood, 1989	737 těhotných	2,7	2,2
Shi, 1990	499 dárců krve	3,6	5,6
Infante-Rivard, 1991	993 těhotných	3,8	1,5
Patkinson, 1993	933 těhotných	1,2	1
Buliková, 1997	335 dárců krve	0,6	1,19

ACLA – antikardiolipinové protilátky LA – lupus antikoagulans 3.

Zdroj: http://www.vnitrnilekarstvi.cz/pdf/vl_05_08_07.pdf (28.11. 09)

Příloha č. 2

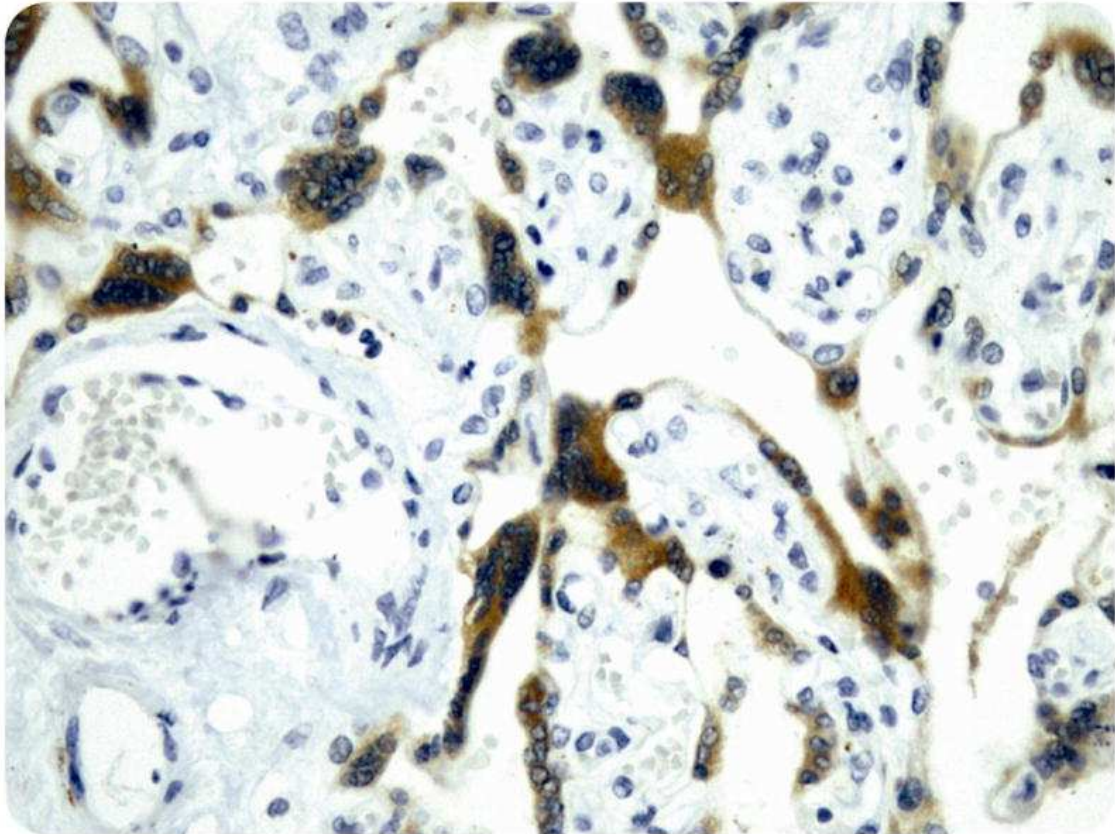
Onemocnění a léky provázené výskytem antifosfolipidových protilátek

Autoimunitní choroby	Malignity	Léky	Infekční choroby	Jiné stavy
<p><u>Systémová onemocnění</u> <u>pojiva</u>: SLE, lupus like disease, RA, MCTD, Sjögrenův sy, sklerodermie, ankylosující spondarthritis, difúzní fasciitida, dermatomyozitida-polymyozitida, vaskulitidy</p>	<p><u>Solidní tumory</u>: thymom, karcinomy (plíce, ledviny, ovarium, prostata, čípek děložní, kůže, trachea, močový měchýř, střevo, jícen, hepatocelulární karcinom)</p>	<p>fenothiaziny, prokainamid, estrogení kontraceptiva, a-inteferon, propranolol, interleukin 2, fenytoin, chinin/chinidin, hydralazin, acebutol, kys. valproová, streptomycin, penicilin a deriváty</p>	<p>malárie, lues, lepra tuberkulóza a jiné mykoplazmové, riketsiové infekce, borelióza, mykobakterium, slamonela, streptokoky, stafylokoky, E. coli, legionella, tyfus</p>	<p>renální selhání, GVHD</p>
<p><u>Jiné</u>: diabetes mellitus, Crohnova choroba, ITP, AIHA, autoimunitní thyreoiditis</p>	<p><u>Hematologické</u>: lymfomy, leukémie, Waldenstromova makroglobulinémie, myeloproliferativní choroby</p>		<p><u>virové</u>: HIV, hepatitidy, parvovirus B19, EBV, CMV, adenovirus, virus příušnic, zarděnky, spalničky, HLTV-1</p>	

Zdroj: http://www.thrombosis.cz/sources/guidelines_aps.pdf (28.11. 09)

Příloha č. 3

Průkaz aktivace komplementu v různých oblastech placenty



Obrázek 1

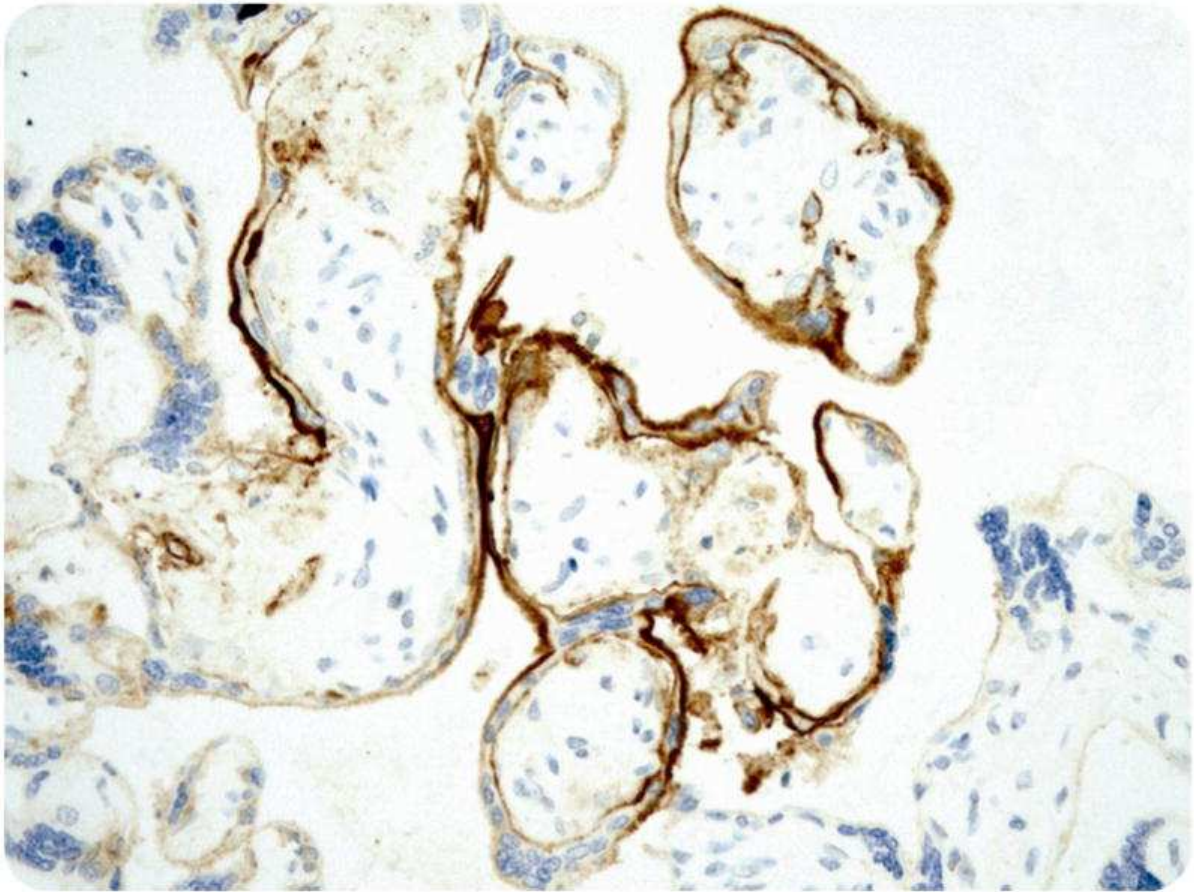
Cytoplazma vilózního trofoblastu

Výrazná imunohistochemická reaktivita k C4d ve vilózním trofoblastu (zvětšení ×40).

Zdroj:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/mid/NIHMS40059/figure/F1/>

(28.11. 09)



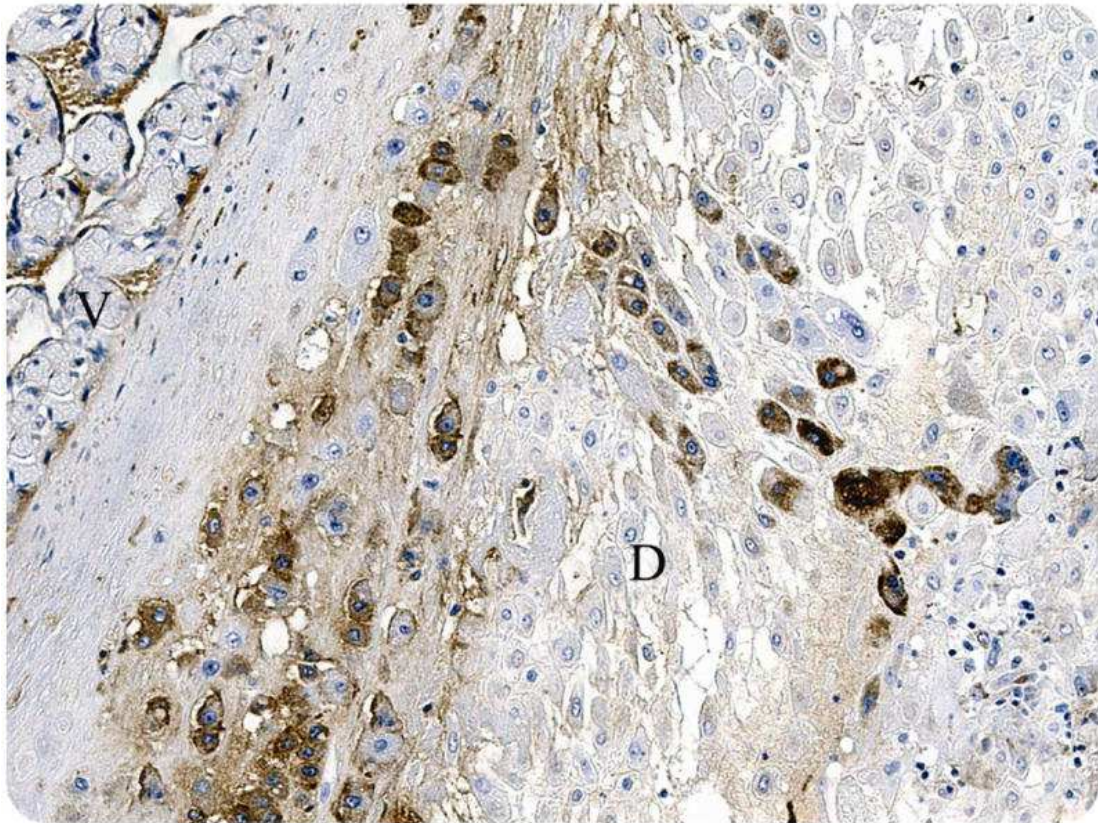
Obrázek 2

Buněčné a bazální membrány buněk vilózního trofoblastu
Výrazná imunohistochemická reaktivita k C4d v buněčných a bazálních
membránách buněk vilózního trofoblastu (zvětšení ×40).

Zdroj:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/NIHMS40059/figure/F2/>

(28.11. 09)



Obrázek 3

Extravilózní trofoblast decidua basalis

Jednotlivé extravilózní trofoblasty jsou přítomné napříč decidou a mají výraznou imunohistochemickou reaktivitu k C4d (zvětšení ×40). *V*, choriové klky decidua basalis; *D*, decidua.

Zdroj:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/mid/NIHMS40059/figure/F3/>
(28.11. 09)

Tab. 3. Klinická klasifikace APS podle International Consensus Statement.

klinická kritéria	příznaky
trombózy	<ul style="list-style-type: none"> - jedna a více arteriální a/nebo venózní trombóza - trombóza malých cév v jakékoli tkáni či orgánu prokázaná jasně klinicky, dopplerovským vyšetřením nebo histopatologicky (v tomto případě bez známek zánětu cévy)
poruchy těhotenství	<ul style="list-style-type: none"> - 3 a více nevysvětlitelných následných samovolných potratů před 10. týdnem gestace s vyloučením anatomických, genetických nebo hormonálních příčin - 1 nebo více nevysvětlitelných odúmrťí morfoloicky normálního plodu v 10. a vyšším týdnu gravidity s tím, že morfologie plodu byla dokumentována ultrasonografií nebo přímým vyšetřením plodu - 1 nebo více předčasných narození morfoloicky zdravého novorozence ve 3-4. týdnu či dříve spojeném s těžkou preeklampií nebo těžkou insuficiencí placenty
laboratorní kritéria	příznaky
ACLA	<ul style="list-style-type: none"> - IgG a/nebo IgM izotypu jsou přítomny ve středním nebo vysokém titru, prokázány 2 a vícekrát v odstupu 6 a více týdnů, jsou vyšetřeny standardizovaným typem ELISA pro průkaz na β_2-glykoproteinu 1 závislých ACLA protilátek
lupus antikoagulans	<ul style="list-style-type: none"> - prokázán 2- a vícekrát v odstupu 6 a více týdnů - detekce je provedena dle doporučení SSC Subcommittee pro lupus antikoagulans/fosfolipidově závislých protilátek v následujících krocích: <ul style="list-style-type: none"> - průkaz prodloužení fosfolipidově-závislého screeningového testu - nedochází ke korekci normální plazmou chudou na destičky - zkrácení nebo korekce testu po přidání nadbytku fosfolipidů - vyloučení jiných poruch krevního srážení (především inhibitor FVIII a heparin)

Jistá diagnóza APS je v případě naplnění 1 klinického a 1 laboratorního kritéria.

Kategorie „možného“ nebo „pravděpodobného“ APS nebyly na tomto sympoziu definitivně ustanoveny.