

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologicko-biochemických věd

Diagnostické metody u antifosfolipidového syndromu

Veronika Kašparová

Bakalářská práce

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Kašparová**
Osobní číslo: **C14281**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Diagnostické metody u antifosfolipidového syndromu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

V dostupné literatuře se seznamte se systémovou autoimunitní chorobou. Vypracujte krátký přehled o historii, etiopatogenezi a epidemiologii onemocnění.
Zaměřte se na klinický obraz a jeho molekulární podstatu. A druhou důležitou částí práce budou aktuální diagnostické přístupy, zejména imunologická vyšetření.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**literatura mladší 10 let, doporučené databáze, např. <http://isiknowledge.com/>,
<http://www.pubmed.gov>; <http://www.sciencedirect.com/>;
<http://scholar.google.cz>**

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

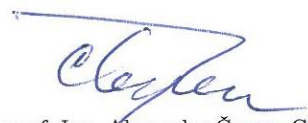
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3. 7. 2018

Kašparová Veronika

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za cenné rady a trpělivé vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá antifosfolipidovým syndromem, kde největší důraz je kladen na jeho diagnostiku a molekulární podstatu syndromu. Jedná se o autoimunitní onemocnění, které se projevuje opakující arteriální či žilní trombózou a ztrátou plodu. Složitá diagnostika syndromu je založena na laboratorních testech, ve kterých se prokážou tzv. antifosfolipidové protilátky. Práce dále shrnuje poznatky ohledně etiopatogeneze, epidemiologie a možné terapie syndromu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antifosfolipidový syndrom, antifosfolipidové protilátky, β_2 – glykoprotein I, trombóza, ztráta těhotenství

TITLE

Diagnostic methods for antiphospholipid syndrome

ANNOTATION

Bachelor thesis deals with antiphospholipid syndrome, with the greatest emphasis placed on its diagnostics and molecular basis of the syndrome. It is an autoimmune disease that is manifested by recurrent arterial or venous thrombosis and fetal loss. The complex diagnosis of the syndrome is based on laboratory tests in which so-called antiphospholipid antibodies are demonstrated. The work also summarizes the knowledge about etiopathogenesis, epidemiology and possible therapy of the syndrome.

KEYWORDS

Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, β_2 – glycoprotein I, thrombosis, loss of pregnancy

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	9
SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	10
ÚVOD	11
1 ETIOPATOGENEZE ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU	12
1.1 Trombóza	13
1.1.1 Rizikové faktory	14
1.1.2 Genetická predispozice	15
1.1.3 Selhání těhotenství	15
1.2 Molekulární základ antisfosfolipidového syndromu	18
1.2.1 Autoantigeny	18
1.2.2 Autoprotilátky	20
3 EPIDEMIOLOGIE VÝSKYTU ANTIFOSFOLIPIDOVÝCH PROTILÁTEK	23
4 DIAGNOSTIKA ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU	26
4.1 Klinická kritéria	27
4.2 Laboratorní kritéria	31
4.2.1 ELISA	31
4.2.2 Koagulační test	33
4.2.3 Jiné imunologické testy	35
5 MOŽNOSTI TERAPIE	36
5.1 Nová orální antikoagulancia	36
5.2 Primární prevence trombózy	36
5.3 Sekundární prevence trombózy (rekurentní)	37
5.4 Těhotenství a antifosfolipidový syndrom	37
5.5 Katastrofický antifosfolipidový syndrom	38
5.6 Pomocná terapie	38

5.6.1 Hydroxychlorochin.....	39
5.6.2 Vitamin D	39
5.6.3 Rituximab	39
5.6.4 Eculizumab	39
6 ZÁVĚR.....	40
SEZNAM ZDROJŮ.....	41

SEZNAM ZKRATEK

- APLA – antifosfolipidové protilátky (antiphospholipid antibodies)
- APS – antifosfolipidový syndrom (antiphospholipid syndrome)
- aPS/PT – fosfatidylserin/protrombin (phosphatidylserine/ prothrombin)
- CAPS – katastrofický antifosfolipidový syndrom (catastrophic antiphospholipid syndrome)
- CL – kardiolipin (cardiolipin)
- dRVVT – zředěný jed od Russelovy zmiže (Dilute Russell's viper venom time)
- ELISA – Enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- GPL – fosfolipidové jednotky ve třídě IgG
- HCQ – hydroxychlorochin (hydroxychloroquine)
- LA – lupus antikoagulans (lupus anticoagulant)
- LMWH – heparin s nízkou molekulární hmotností (low molecular weight heparin)
- MPL – fosfolipidové jednotky ve třídě IgM
- NOAC – nová perorální antikoagulancia (new oral anticoagulants)
- OAT – orální antikoagulancia (oral anticoagulation)
- PAPS – primární antifosfolipidový syndrom (primary antiphospholipid syndrome)
- PK – prekalikrein (prekalikrein)
- SLE – systémový lupus erythematosus (systemic lupus erythematosus)
- β_2 GPI – β_2 -glykoprotein I (β_2 -glycoprotein I)

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Patogeneze trombózy u APS	12
Obrázek 2: Patogenní mechanismy srážení zprostředkované APLA	17
Obrázek 3: Základní stavba imunoglobulinu.....	20
Obrázek 4: Aktualizovaná klasifikační kritéria pro antifosfolipidový syndrom	26
Obrázek 5: Klinické projevy antifosfolipidového syndromu	30
Tabulka 1: Možné patogenní mechanismy APLA.....	16
Tabulka 2: Onemocnění provázené výskytem antifosfolipidových protilátek	25
Tabulka 3: Nejčastější klinické manifestace APS	27

ÚVOD

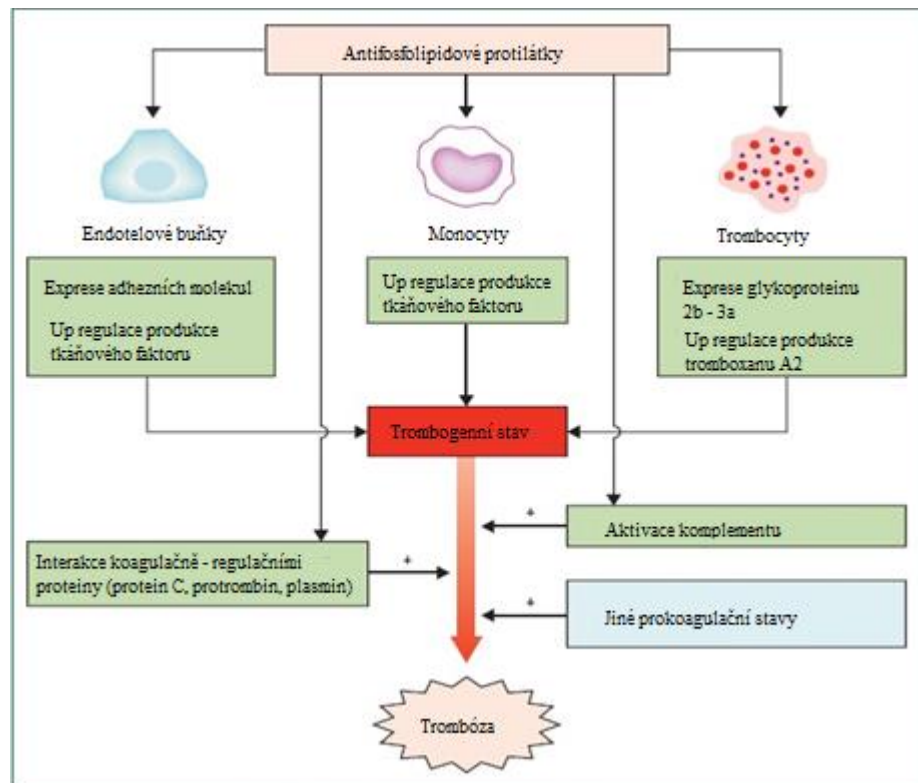
V současné laboratorní diagnostice antifosfolipidového syndromu (APS) se používá detekce antifosfolipidových protilátek (APLA). APLA byly dříve detekovány imunologickými testy při diagnostice syfilidy. V roce 1906 Wassermann vyvinul komplement fixační test pro diagnostiku syfilidy za použití antigenu, který byl izolován z jater u plodů s vrozenou syfilidou. Landsteiner předpokládal, že antigeny budou spíše lipidem než proteinem, a později se prokázalo, že antigenem v tomto testu byl fosfolipid. Tento lipid byl později přejmenován na kardiolipin (CL), protože byl izolován z myokardu. V roce 1952 Moore a Mohr identifikovali jedince, kteří měli pozitivní testy na syfilis, ale nevykazovali žádné příznaky onemocnění. Při pokračování sérologických testů založených na CL pro diagnózu syfilidy se ukázalo, že malá skupina pacientů s autoimunitní chorobou, většinou systémový lupus erythematoses (SLE), měla falešně pozitivní testy způsobené autoprotiilátkami proti CL. V roce 1983 Harris a spolupracovníci vyvinuli radioimunologický test pro detekci protilátek proti CL a o dva roky později vyvinuli první kvantitativní ELISA test. V 80. letech výzkumníci poznali, že přítomnost APLA u pacientů s SLE byla spojena s tromboembolickými příhodami a opakujícími se potraty a byl zaveden termín antikardiolipinový syndrom a pozdější APS. Jedním z nejzajímavějších zjištění na počátku 90. let 20. století bylo, že aktivita protilátky proti CL závisí na přítomnosti proteinového kofaktoru. Tři nezávislé skupiny ukázaly, že tzv. CL protilátky nebyly zaměřeny proti CL, ale proti β_2 – glykoproteinu I (β_2 GPI). [1, 2]

APS je jeden z nejčastějších získaných trombofilních stavů a je spojen s tvorbou APLA. Syndrom může nastat jako samostatná porucha (primární APS) nebo ve spojení s jinou nemocí nejčastěji se SLE nebo s revmatoidní artritidou, infekcí HIV, mononukleózou či syfilidou (sekundární APS). U malé části pacientů může nastat tzv. katastrofický APS (CAPS), kde příčinou je multiorgánová trombóza. Ke klinickým projevům APS patří trombocytopenie, žilní či arteriální trombózy a komplikace v těhotenství. Laboratorně musejí být APLA protilátky opakovaně prokázány. Jsou detekovány především 3 skupiny protilátek, a to lupus antikoagulans (LA) a protilátky proti CL a β_2 GPI. [3,4,5]

Cílem této bakalářské práce je poskytnout informace o diagnostických přístupech k APS s ohledem na klinický obraz. Budou zde shrnuty poznatky o výskytu APLA, projevech, příčinách vzniku APS a molekulární podstata syndromu. Také budou uvedeny aktuální možnosti léčby ve spojitosti s patogenezí onemocnění.

1 ETIOPATOGENEZE ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU

Kapitola o etiopatogenezi vysvětluje popis vzniku nemoci a možné příčiny trombózy u APS. Vznik APLA protilátek stále není zcela objasněn. Jsou zde představeny rizikové faktory z vnějšího okolí, ale i genetické predispozice k APS. Je nastíněn rozpor mezi vznikem trombózy v orgánech či tkáni a problémy, které mohou nastat v těhotenství. Dále je pozornost věnována β_2 GPI, jakožto nejdůležitějšímu autoantigenu u APS. V tabulce č. 1 jsou shrnuty nejčastější působení APLA protilátek v těle. Na obrázku č. 1 je znázornění možného vzniku trombózy u pacientů, u kterých došlo k výskytu APLA.



Obrázek 1: Patogeneze trombózy u APS, převzato a upraveno [2]

APS je forma získané trombofilie (protrombotická porucha), kde dochází ke vzniku trombózy a komplikací v těhotenství vlivem působení autoprotilátek. [6] Může být zasáhnuta jakákoliv tkáň, ale nejčastěji jsou zasáhnuty žíly dolních končetin a mozek. U CAPS pak dochází k multiorgánové poruše, kdy je zasaženo více malých cév. [7] Existují náznaky, že na molekulární úrovni jsou porodní a trombotické poruchy u APS odlišné. [5]

Klasifikační kritéria APLA jsou definována jako LA nebo titry IgG nebo IgM protilátek proti β_2 GPI a CL. Existují další APLA, které nejsou zahrnuty do klasifikačních kritérií, ale byly spojeny s klinickými projevy APS. Jsou to protilátky proti CL a β_2 GPI třídy IgA, stejně jako protilátky namířené proti fosfatidylserinu/protrombinu. [5]

Existují náznaky, že základem APS jsou genetické a environmentální faktory. [8]

1.1 Trombóza

U APS tělo patologicky identifikuje fosfolipidy nebo proteiny vázané na fosfolipidech jako cizí látky a tvoří proti nim protilátky, tzv. antifosfolipidové protilátky (APLA). Jejich přítomnost může vést ke vzniku krevních sraženin nebo ztrátě těhotenství, ale ne u všech pozitivních pacientů. [6,9] Souvislost APLA s trombózou je sporná, i když studie naznačují, že APLA jsou přímo protrombotické. [10] Bylo navrženo, že trombóza u APS má dva kroky. V prvním kroku dojde k poškození či narušení endotelu a v druhém kroku se posiluje tvorba trombu. Obrázek č. 2 ilustruje možné patogenní působení APLA protilátek v těle a jejich vliv na srážení krve. Autoprotilátky u APS nepodporují tvorbu trombu v nepřítomnosti poškození stěny cévy. [7] Zvířecí modely ukazují, že APLA jsou trombogenní, když jsou endotelové buňky ohroženy mechanickým nebo chemickým poškozením a mohou vyvolat resorpce plodu. [5] Bylo navrženo, že po aktivaci endoteliálních buněk, monocytů a krevních destiček pomocí APLA se indukuje prokoagulační stav, který je zprostředkován především zvýšenou syntézou tkáňového faktoru a tromboxanu A₂. Kromě toho může interakce APLA s proteiny, které se podílejí na regulaci srážení, jako je protrombin, faktor X, protein C a plazmin, bránit inaktivaci prokoagulačních faktorů a fibrinolýze. Navíc APLA mohou zabránit přirozené schopnosti těla zničit krevní sraženiny zasahováním do látek v krvi, které fyziologicky zabraňují nadměrnému srážení (protein C a S). [6,9]

Protein β_2 GPI je identifikován jako nejdůležitější autoantigen APS. [5] Aktivace endotelových buněk, trombocytu a placentární tkáně protilátkami proti β_2 GPI způsobuje zánětlivé reakce a klinické projevy APS. [10] Plazmový protein β_2 GPI cirkuluje v krvi v kruhové formě. Po vazbě na negativně nabitě povrchy se molekula β_2 GPI otevírá a získává charakteristický vzhled rybiho háčku, který vystavuje skrytý epitop. Protilátky proti β_2 GPI jsou většinou zaměřeny na tento skrytý epitop. [5]

Působení APLA je různorodé. Podle antigenu, na které APLA působí, vznikají v organismu pacienta rozdílné patogenní důsledky. Následkem těchto mechanismů se projeví zjevný klinický obraz ve formě trombózy či ztrátu těhotenství. V tabulce č. 1 jsou uvedeny možné patologické mechanismy působení APLA protilátek. [4]

1.1.1 Rizikové faktory

Mezi rizikové faktory pro vznik krevních sraženin řadíme: užívání perorální antikoncepce, těhotenství, pooperační stav, hormonální terapie, onemocnění ledvin či kouření. [7] Nedávná studie u pacientů s SLE zjistila, že kouření v anamnéze souvisí s přítomností APLA, a zvláště pak s trojitou pozitivitou. Překvapivě se APLA nacházely častěji u bývalých kuřáku než u současných. Několik důkazů naznačuje, že infekční agens slouží jako počáteční spouštěč produkce APLA. [5]

Pro vznik trombózy a těhotenských komplikací je silnějším rizikovým faktorem pozitivní test na LA nebo trojitě pozitivita než pouze jedné pozitivní protilátky proti β_2 GPI nebo CL. Riziko vzniku první trombózy je i u asymptomatických osob, které mají tzv. trojitou pozitivitu (tzn. Pozitivní test na LA a protilátky proti CL a β_2 GPI). Tito pacienti mají vysoké titry autoproti látek. [7]

Řada zjištění naznačuje, že APS je charakterizován zvýšeným oxidačním stresem. Oxidační stres hraje přímou roli ve struktuře a funkci β_2 GPI u pacientů s APS. Oxidační stres z vnějšího prostředí, jako je kouření, může vést k vaskulárnímu endoteliálnímu poškození a může dospět až k trombotickým příhodám. Např. oxidační stres může up-regulovat expresi annexinu A2, receptoru endoteliálního buněčného povrchu pro β_2 GPI. [7]

1.1.2 Genetická predispozice

Výzkumy rodin naznačují genetickou predispozici k APS. Etiologie není stále známa. Stejně jako u jiných autoimunitních onemocnění by měl syndrom vznikat u predisponovaného subjektu. [8] To je podpořeno studiemi, které identifikovaly geny, které jsou asociovány s pozitivitou APS nebo APLA. Nedávná metaanalýza dospěla k závěru, že Val247Leu jediný nukleotidový polymorfismus, který je spojena s APS, zejména pak s protilátkami proti β_2 GPI. Poloha tohoto polymorfismu je blízka místu na fosfolipidech vázající β_2 GPI. [5] Dále byly popsány další genetické rizikové faktory pro trombózu u pacientu s APS jako faktor V Leiden, nedostatek homocysteinu, protein C nebo protein S. Úloha těchto genetických faktorů v APS není objasněna, ale zdá se, že mohou působit jako dodatečné trombogenní rizikové faktory. Úloha epigenetických mechanismů v interakci s genetickými faktory a prostředím si žádá další studie. [8]

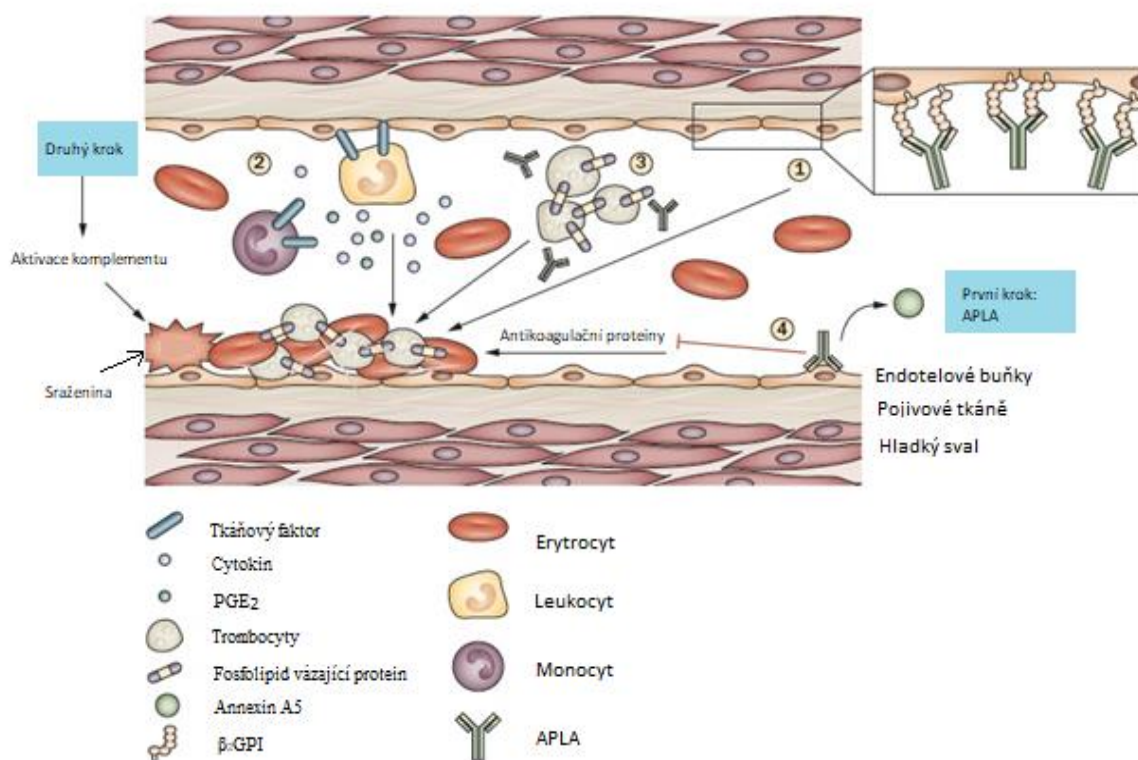
Mnoho údajů například naznačuje, že existuje velká shoda v genetických a buněčných abnormalitách mezi pacienty s APS a SLE. Takové studie by však měly být v budoucnu ověřeny, neboť se jedná o jediný způsob, jak dospět k pevným závěrům o úloze imunitního systému v APS. [5]

1.1.3 Selhání těhotenství

Opakované těhotenské komplikace spojené s APLA nelze vysvětlit pouze trombózou a byly hlášeny alternativní patogenní mechanismy. Akutní zánětlivé příhody jsou obecně shledávány odpovědnými za negativní výsledek těhotenství. Bylo předpokládáno, že APLA (zejména závislé na β_2 GPI) rozpoznávají svůj antigen na placentárních tkáních, inhibují růst a diferenciaci trofoblastů, a nakonec způsobí vadnou placentu. APLA může indukovat prokoagulační stav na placentární úrovni několika mechanismy, včetně schopnosti APLA protilátek narušit antikoagulační štít na annexinu A5 trofoblastu a endoteliálních buněčných monovrstev. Bylo zjištěno, že distribuce annexinu A5, pokrývajícího meziklčkové povrchy, je mnohem řidší v placentách žen s pozitivními APLA protilátkami, v porovnání s ženami, které postrádají APLA protilátky. Toto zjištění však nebylo potvrzeno jinou studií. [11]

Tabulka 1: Možné patogenní mechanismy APLA, převzato a upraveno [4]

Inhibice antikoagulačních reakcí		Buněčně zprostředkované události	
Inhibice antikoagulační aktivity β_2 – glykoprotein I		Na endotelových buňkách	Zvýšení prokoagulační aktivity endotelových buněk Zvýšení exprese a aktivace tkáňového faktoru Expres adhezních molekul Zhoršená fibrinolýza
Přemístění annexinu V			Dysregulace eikosanoidů Snížená produkce prostacyklinu z endoteliálních buněk Zvýšená produkce tromboxanu A2 trombocytů
Inhibice aktivity antitrombinu			
Inhibice dráhy proteinu C	Inhibice aktivity proteinu C nebo aktivovaného proteinu C		Narušená funkce endotelové syntézy oxidu dusnatého
		Na monocytech	Expres tkáňového faktoru Zvýšený oxidační stres
		Na krevních destičkách	Zvýšená aktivace/agregace krevních destiček
		Na plazmacytoidních dendritických buňkách	Zvýšená exprese receptoru podobného genu Toll 7 a 8



Obrázek 2: Patogenní mechanismy srážení zprostředkované APLA, převzato a upraveno [11]

Obrázek s číslem 2 popisuje, jak APLA podporují tvorbu sraženin prostřednictvím několika cest. APLA mohou reagovat s endotelovými buňkami prostřednictvím vazby GPI na buněčný povrch a indukují tak prokoagulační stavy. APLA také zvyšují expresi tkáňové faktoru na endotelových buňkách a monocytech, podporují adhezi endoteliálních leukocytů, sekreci cytokinů a syntézu PGE₂. APLA inhibují antikoagulační aktivity ovlivněním fibrinolýzy a přemístěním vazby přírodního antikoagulantu annexinu A5. [11]

1.2 Molekulární základ antisfosfolipidového syndromu

V této podkapitole jsou představeny molekuly, které se pravděpodobně podílejí na rozvoji APS. Hlavní roli, při vývoji trombofilního onemocnění, mají především autoantigeny a autoprotilátky. Autoantigenů a autoprotilátek, které souvisí s APS, je více, ale s ohledem na aktuální diagnostiku syndromu jsou zde zmíněny pouze následující činitelé. Mezi autoantigeny řadíme fosfolipidy, CL a nejdůležitějším zástupcem autoantigenů je β_2 GPI. Protilátky, které se vytvoří proti těmto autoantigenům se řadí mezi autoprotilátky. Z diagnostického hlediska je důležitým zástupcem lupus antikoagulans (LA). Dalšími možnými protilátkami, které by mohly být zahrnuty do diagnostiky APS jsou antitrombinové protilátky. [12, 13, 17,21]

1.2.1 Autoantigeny

Některé antigeny, které nejsou cizorodé a pocházejí z organismu, jsou nazývány autoantigeny. Autoantigeny se mohou stát imunogenními a vyvolat reakci proti vlastním strukturám organismu. Na autoantigeny jsou namířené autoprotilátky (imunoglobuliny). Potenciálními autoantigeny u APS mohou být glykoproteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy či glykofosfolipidy. V případě APS se jedná nejčastěji o β_2 GPI. Dalšími autoantigeny mohou být protrombin, protein C, protein S, annexin V, komplementový faktor H, vysokomolekulární kininogen, nízkomolekulární kininogen či tkáňový aktivátor plazminogenu. [12, 13]

Fosfolipidy

Fosfolipidy patří mezi lipidy, které jsou součástí membrán buněk. Vzhledem k amfifilním vlastnostem fosfolipidů mohou tvořit dvojvrstvy. Amfifilní vlastnost má molekula, která má hydrofilní a lipofilní vlastnosti. Struktura fosfolipidu se skládá ze dvou hydrofobních konců mastných kyselin a hydrofilní „hlavy“ sestávající z fosfátové skupiny. Hlavy mohou být nabitý kladně, negativně i neutrálně. [14] Fosfolipidy mají při neutrálním pH negativní náboj, jelikož mají fosfátovou skupinu. Společným znakem fosfolipidů je fosfátový zbytek, který tvoří ester s hydroxylovou skupinou na C-3 glycerolu nebo acylsfinгоzinu. [15]

Nejjednoduššími fosfolipidy jsou fosfatidáty. Jsou to anionty fosfátových kyselin, a zbytek z fosfatidátů fosfatidyl. Pokud se 2 fosfatidylové zbytky spojí s glycerolem, získáme kardiolipin. Tento fosfolipid se vyskytuje ve vnitřní membráně mitochondrií. Důležitým

příkladem je fosfatidylcholin, který je hlavním fosfolipidem membrán. [15] Má významný elektrický dipól, kterým řídí interakce. Hydrofobní interakce pomáhají sestavení lipidů ve vodném prostředí do lipidové dvojvrstvy. [14]

β_2 – glykoprotein I

β_2 – glykoprotein I (β_2 GPI) je nejdůležitějším antigenním cílem APLA. Mnoho infekcí může být doprovázeno zvýšeným výskytem APLA a v některých případech dochází ke klinickým projevům APS. β_2 GPI je plazmatický protein (dříve nazýván apolipoprotein H), který nemá jasnou fyziologickou funkci. Má výraznou afinitu k negativně nabitým fosfolipidům (kardiolipin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol). Je možné, že některé léky mohou vyvolat vznik APLA. Přítomnost APLA je spojena s genetickou predispozicí, která může být alespoň částečně spojena s geny hlavního histokompatibilního komplexu (HLA systém). Existují důkazy, že alela Val247 může být jedním z genetických rizikových faktorů pro vývoj APS. Jedním z původců APLA mohou být infekce. Další důvod vzniku APLA je, že se přirozené autoprotilátky vyvíjejí pro dobrý účel, ale stávají se patogenními za určitých nepříznivých podmínek, jako je stres s oxidačním účinkem. [16, 17]

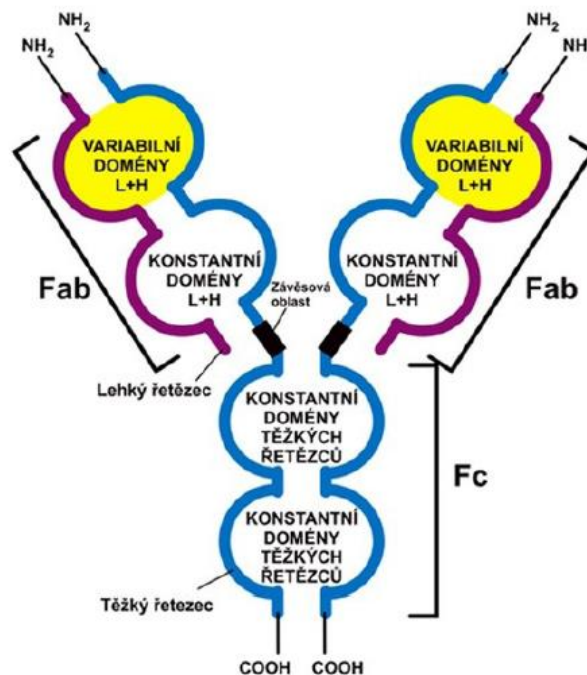
Kardiolipin

Kardiolipin (CL) je unikátní fosfolipid (tetra-acyl fosfolipid), který je výhradně lokalizován ve vnitřní mitochondriální membráně, kde je syntetizován z fosfatidylglycerolu a cytidindifosfát diacylglycerolu pomocí kardiolipinsyntázy. Mitochondriální fosfolipidový kardiolipin obsahuje 3 glycerolové kostry a 4 acylové řetězce, což vede k velmi specifické ultrastruktuře a role v mitochondriální funkci. CL byl v roce 1942 Mary Pangborn izolován z hovězího srdce, a to jako látka nezbytná pro reaktivitu antigenů hovězího srdce v sérologickém testu na syfilis. Je nezbytný pro optimální funkci enzymů. Změny v obsahu nebo složení CL byly hlášeny u nemocí, jako je diabetes nebo srdeční selhání. Od svého objevu byl CL zkoumán zpočátku pro jeho zapojení do sérologického testu na syfilis. Poznatky z posledních let prokázaly, že CL funguje jako klíčový mediátor mitochondriálního metabolismu. [18, 19]

1.2.2 Autoprotilátky

Protilátky jsou produkovány v plazmatických buňkách vznikající v B lymfocytech. Jsou to imunoglobuliny, které jsou nositeli humorální imunity. Protilátky se skládají z glykoproteinů tvořenými z polypeptidů a sacharidů. Vazba protilátek s antigenem patří mezi základní funkci v obraně člověka. Molekula imunoglobulinů má tvar písmene Y a skládá se ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců, které jsou spojeny disulfidovými můstky. Vazebné místo pro antigen je část imunoglobulinu označovaná jako variabilní a zbyváající část je konstantní. Nožička imunoglobulinu je tzv. Fc fragment, která se váže na Fc receptory na leukocytech. Raménka se nazývají Fab fragment a jsou tvořeny lehkými i těžkými řetězci. Na obrázku č. 3 je znázorněn detailní popis jednotlivých částí imunoglobulinu. [20]

Podle druhu těžkého řetězce se imunoglobuliny rozdělují do 5 různých tříd. Jsou to třídy IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. Lehké řetězce mají 2 strukturální varianty, které jsou značeny jako kappa a lambda. [20]



Obrázek 3: Základní stavba jednotky, převzato a upraveno [20]

Autoprotilátky u APS jsou heterogenní skupinou protilátek třídy IgM nebo IgG, které jsou namířeny proti antigenům vlastního těla, jako jsou proteiny, glykoproteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy či glykofosfolipidy. Tvorba může být indukovaná různými patogenetickými mechanismy (patologické autoprotilátky) nebo bez indukce jako součást přirozené obrany (přirozené autoprotilátky). [6] Přirozené autoprotilátky jsou převážně IgM a vykazují slabou afinitu k vlastním antigenům. Tvoří první linii obrany proti infekcím a přispívají k homeostáze imunitního systému. Naproti tomu IgG autoprotilátky s vysokou afinitou odrážejí patologický proces, při němž jsou narušeny homeostatické dráhy. V některých autoimunitních poruchách mohou být přítomny autoprotilátky před nástupem nemoci, avšak nejsou většinou příčinou onemocnění. Slouží jako biomarkery pro diagnostiku autoimunitního onemocnění. U orgánově specifických autoimunitních onemocnění, jako je myasthenia gravis, se autoprotilátky přímo vážou na cílové orgány a poškozují je. [21]

Při systémových autoimunitních onemocněních reagují autoprotilátky s volnými molekulami, jako jsou fosfolipidy, stejně jako s buněčnými povrchovými a nukleoproteinovými antigeny, které vytvářejí patogenní komplexy antigen-protilátka. Imunitní komplexy mohou aktivovat systém komplement a Fc γ R receptory, což vede ke vzniku zánětu a poškození tkání. Imunitní komplexy se mohou usazovat v cévách, ledvinách či v plicích. Příkladem poškození u APS je ztráta plodu. [9, 21, 22] Příkladem protilátek proti fosfolipidům jsou kardiolipinové protilátky, lupus antikoagulans (LA), fosfatidylcholinové protilátky, fosfatidyletanolaminové protilátky, fosfatidylinisitolové protilátky, fosfatidylserinové protilátky. [13]

APLA, vyskytující se u APS, nejsou zaměřeny přímo proti fosfolipidům, ale proti proteinům, které vážou fosfolipidy. Důležitou roli hraje tvorba komplexů APLA – β_2 GPI. Po navázání β_2 GPI na fosfolipidový povrch monocytů, trombocytů či endoteliálních buněk dochází k jeho přeuspořádání a odhalení skrytého antigenního neoepitopu. Následně dochází k vazbě autoprotilátky a dimerizaci molekuly β_2 GPI. Výsledný trimolekulární komplex (dimer β_2 GPI a autoprotilátka) vázaný na fosfolipidový povrch, pak může mít různé interakce s hemostatickými reakcemi a s buněčnými receptory. [17]

Lupus antikoagulans

Pacienti, s pozitivním testem na lupus antikoagulans (LA), mají autoprotilátky, které inhibují koagulaci krve. Jsou to autoprotilátky izotypu IgG nebo IgM a jsou zaměřeny především proti dvěma plazmatickým proteinům. Jedná se o proteiny β_2 GPI a protrombin, které jsou vázány na fosfolipidy. Přítomnost LA v krvi působí jako rizikový faktor pro žilní nebo arteriální trombózu či ztrátu těhotenství. LA byl pojmenován podle nalezení u pacientů s SLE. Je známý výskyt i u jiných autoimunitní onemocnění či infekčních chorob. Vyskytuje se u malého procenta lidí, u kterých však nebyla zjištěna příčina tvorby LA. [23]

Antitrombinové protilátky

Jedná se o skupinu heterogenních protilátek, ve které jsou zahrnuty protilátky proti protrombinu a proti komplexu fosfatidylserinu a protrombinu (aPS/PT). Protilátky, které jsou spjaty s APS, se vyskytují spíše proti komplexu aPS/PT než proti samotnému protrombinu. Některé studie stanovily, že tyto protilátky jsou rizikovým faktorem pro vznik trombózy. Neplatí to v každém případě. Stejně tak byly popsány ve spojení se ztrátou v těhotenství. Jiné studie nepotvrzují, že by antitrombinové protilátky u APS měly patogenní charakter. Antitrombinové protilátky budou v budoucnu zkoumané, aby mohly být zahrnuty do kritérií pro diagnostiku APS. [2]

Protilátky proti fosfatidylserinu/protrombinu jsou třídy IgG nebo IgM. U některých pacientů s APS byly hlášeny protilátky proti protrombinu, který je nezbytný v koagulační kaskádě. Fosfatidylserin je složka fosfolipidové membrány nacházející na její vnitřní straně. [24]

Některé anémie mohou být doprovázeny zvýšeným výskytem fosfatidylserinu. To vede k tomu, že erytrocyty aktivují trombocyty a dochází k zvýšené přeměně protrombinu na protrombin. Protrombin se váže na negativně nabitě fosfolipidy. Hraje důležitou roli v koagulaci. Může působit prokoagulačně i antikoagulačně. [25]

3 EPIDEMIOLOGIE VÝSKYTU ANTIFOSFOLIPIDOVÝCH PROTILÁTEK

V této podkapitole je zpracován přehled, u kterých pacientů se vyskytují antifosfolipidové protilátky a v jakém procentuálním zastoupení jsou pozorovány u různých klinických událostí. Pozornost je věnována ženám, které jsou ovlivněny APLA v těhotenství. V tabulce č. 2 jsou uvedeny příklady, u kterých případů se mohou vyskytovat antifosfolipidové protilátky. Mezi tyto události řadíme autoimunitní či maligní choroby. Přechodně se mohou vyskytovat u lidí s infekcí nebo u lidí, které jsou léčeny níže uvedenými preparáty.

APLA jsou nalézány v séru u zdravých jedinců v rozsahu 1-5 %, ale jen u některých dojde k rozvoji APS. Nedávná studie odhalila, že APLA jsou pozitivní u přibližně 13 % pacientů s mozkovou mrtvicí, 11 % s infarktem myokardu, 9,5 % s hlubokou žilní trombózou a u 6 % žen s úmrtím plodu. Převládání katastrofického APS je vzácné (méně než 1 % všech případů APS). [4]

Okolo 40 % pacientů s SLE má APLA, ale 17 a méně než 40 % z nich bude mít trombotický účinek. V populaci mohou být APLA detekovány přibližně u 1 z 5 pacientů (do 50 let), kteří měli cévní mozkovou příhodu. Pacienti starší 70 let s několika vaskulárními rizikovými faktory mají menší pravděpodobnost, že budou mít APLA v přítomnosti mozkové – vaskulární příhody než mladší lidé. APS způsobuje ischemické mozkové záchvaty především u lidí v mladší věku. U 24 % ze 4494 pacientů s žilním tromboembolismem, u kterých byl proveden trombofilní test, byly nalezeny APLA protilátky. Tato frekvence může záviset na typu provedení a definici pozitivního testu. Frekvence byla blízká frekvenci faktoru V Leiden a nebyla podstatně ovlivněna věkem pacientů nebo přítomností opakujících se příhod. Mutace faktoru V Leiden vede Leidenské mutaci, která se vyznačuje zvýšenou srážlivostí krve. [9]

Asi u 10-15 % žen s opakovaným potratem byl diagnostikován APS. Smrt plodu ve druhém nebo třetím trimestru těhotenství se vyskytuje až u 5 % těhotenství. Ačkoliv úmrtí plodu je spojeno s APS, celkový podíl na tomto syndromu je nejistý. Částečně kvůli účinku dalších možných faktorů, jako je hypertenze nebo již probíhající onemocnění, jako je SLE nebo renální onemocnění. Okolo 5 až 10 % všech těhotenství je komplikováno preeklampsií nebo nedostatečností placenty. Nedostatečnost placenty se projevuje především omezením růstu

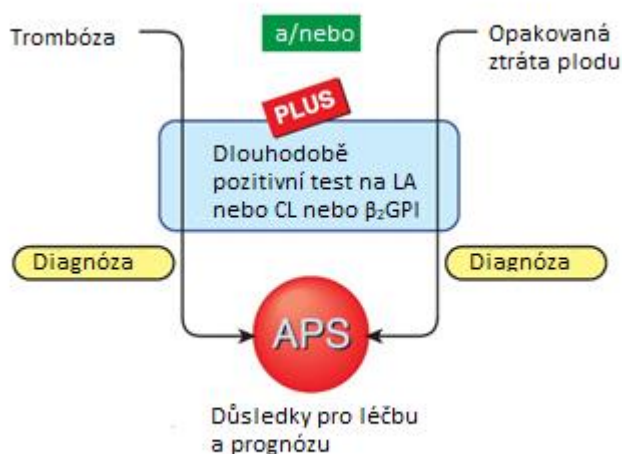
plodu. Mezi příčiny se řadí špatné prokrvení placenty jako důsledek narušení krevního oběhu těhotné ženy. Může nastat kombinace obou komplikací a projevy těchto poruch představují až 75 % předčasných porodů. Těhotné ženy s předchozí diagnózou APS jsou vystaveny zvýšenému riziku vzniku preeklampsie nebo nedostatečnosti placenty. Nicméně, souvislost mezi APLA a těmito poruchami v nepřítomnosti APS je nejistá. Výsledky kontrolních studií ukazují, že APLA jsou detekovány u 11-29 % žen s preeklampsií. [9]

Tabulka 2: Onemocnění provázené výskytem antifosfolipidových protilátek, převzato a upraveno [4]

Autoimunitní choroby	Malignity	Léky	Infekční choroby	Jiné onemocnění
<p><u>Systémová onemocnění pojiva:</u> SLE, revmatoidní artritida, primární Sjögrenův syndrom, systémová skleróza, dermato a polymyozitida, vaskulitidy (Bechtěrova nemoc, polyarteritis nodosa)</p>	<p><u>Pevné tumory:</u> plíce, ledviny, brzlík, vaječníku, prostata, jater, děložní čípek, tlusté střevo, jícen, prsu</p> <p><u>Hematologické:</u> myeloidní a lymfatická leukémie, primární polycytémie, myelofibróza</p> <p><u>Lymfoproliferativní onemocnění:</u> Hodgkinova choroba, Non-Hodgkinovy lymfom, lymfosarkom, kožní lymfom T-buněk, sezaryho syndrom</p> <p><u>Paraproteinémie:</u> monoklonální gamapatie, Waldenstromova makroglobulinémie, myelom</p> <p><u>Nemaligní hematologické stavy:</u> idiopatická trombocytopenická purpura, srdeční choroby, perniciózní anémie</p>	<p>fenotiazin, prokainamid, ethosuximid, chlorothiazid, perorální antikoncepce, chinin</p>	<p><u>Virové:</u> HIV, mononukleóza, hepatitida A, B, C, parvovirus, příušnice, zarděnky</p> <p><u>Bakteriální:</u> syfilis, lymská borelióza, tuberkulóza, lepra, infekční endokarditida, revmatická horečka, Klebsiella</p> <p><u>Protozoální:</u> malárie, toxoplazmoza</p>	<p>diabetes mellitus, autoimunní onemocnění štítné žlázy, zánětlivé onemocnění, dialýza, Klinefelterův syndrom, Ehlers-Danlosův syndrom</p>

4 DIAGNOSTIKA ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU

Komplexní diagnostika autoimunitního onemocnění APS zahrnuje klinická a laboratorní kritéria. Pro potvrzení diagnózy APS se vyžaduje přítomnost alespoň jednoho ze dvou hlavních klinických projevů, tj. trombózy nebo ztrátu těhotenství a potvrzení jedním ze tří laboratorních testů k detekci APLA [4,26]. Detekované protilátky jsou děleny do 3 skupin. Zahrnujeme sem lupus antikoagulans (LA) a protilátky proti CL, β_2 GPI. Tyto testy jsou prováděny povinně, zatímco jiné testy ještě nejsou validovány pro klinické použití. Mezi takové testy patří antitrombinové protilátky, které jsou možným budoucím kandidátem k zařazení do laboratorní části při diagnostice APS. [27] Na obrázku č. 2 je schematicky znázorněno postup při diagnostice APS.



Obrázek 4: Aktualizovaná klasifikační kritéria pro antifosfolipidový syndrom, převzato a upraveno [28]

4.1 Klinická kritéria

V tabulce č. 3 jsou uvedeny nejčastější hlavní klinické projevy APS s ohledem na jejich četnost výskytu u pacientů.

Tabulka 3: Nejčastější klinické manifestace APS, převzato a upraveno [9, 29]

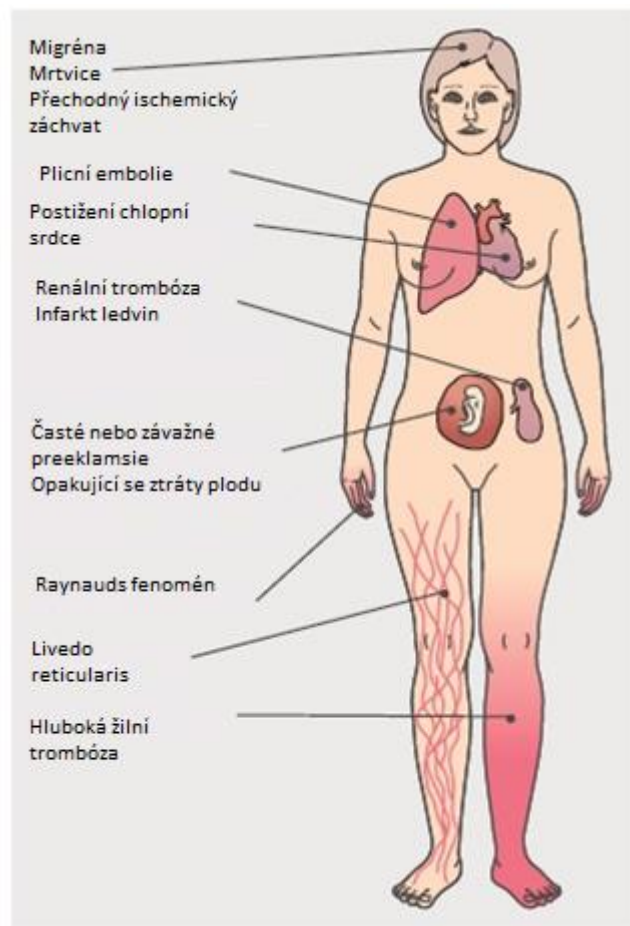
Časté (> 20 % případů)	<ul style="list-style-type: none">- Žilní tromboembolismus- Trombocytopenie (trombocytů méně než $100 \times 10^9/l$)- Opakované časně reprodukční ztráty- Mrtvice nebo přechodná ischemická cévní mozková příhoda- Migréna- Livedo reticularis, resp. Livedo racemosa
Méně časté (10-20 % případů)	<ul style="list-style-type: none">- Postižení chlopní- Preeklampsie/eklampsie- Předčasný porod- Autoimunitní hemolytické anémie- Ischemická choroba srdeční
Neobvyklé (<10 % případů)	<ul style="list-style-type: none">- Epilepsie, Chorea- Trombóza retinálních tepen nebo žil- Plicní hypertenze- Gangréna- Avaskulární kostní nekróza- Nefropatie APS- Mesenterická ischemie
Vzácné (<1 % případů)	<ul style="list-style-type: none">- Nadledvinová krvácení- Budd – Chiariho syndrom

Klinické projevy APS jsou různé a mohou ovlivnit všechny orgány. Nejčastějším projevem je trombóza. Venózní trombóza je častější než arteriální trombóza. Podle studie Euro-Phospholipid project, které se účastnilo 1000 pacientů s APS, představovala nejčastější klinickou manifestaci hluboká žilní trombóza. V tomto vzorku jí bylo postiženo bez mála 39 % nemocných. Plicní embolie byla diagnostikována u 14,1 %. Trombóza může u pacientů s APS vzniknout kdekoliv v cévním řečišti. Nejčastějším případem jsou cévní mozkové příhody (19,8 %) nebo ischemické ataky (11,1 %). Může nastat i mikrotrombotizace v tkáních či orgánech. U APS se můžeme setkat s klinickými projevy, které nelze vysvětlit trombózou ani mikrotrombózou. Do těchto projevů zahrnujeme migrénu, která je popisována u 19,8 % nemocných s APLA. Jedná o jednu z nejčastějších nekritických manifestací. Dále sem patří i epilepsie (7 %), chorea (1,3 %), postižení chlopní (11,6 %) či kardiomyopatii (2,9%). Hematologické projevy, jako trombocytopenie a hemolytická anémie, a kožní příznaky, jako livedo reticularis, se vyskytují u 10-30 % pacientů, i když tyto vlastnosti nejsou zahrnuty do klasifikačních kritérií. U pacientů bez SLE může dojít k poruše kognitivních funkcí a může tak nastat až u 38 % pacientů s APLA. Porucha reprodukce je další významný klinický projev pacientů s APS. U samovolných potratů se prevalence udává v rozmezí 5-50 %. U ztráty plodu po 20. týdnu těhotenství je prevalence až 30 %. Další komplikací těhotenství patří preeklampsie (9,5 %), eklampsie (4,4 %) a abrupce placenty (2,0 %) a předčasný porod (10,6 %). [29,30,31]

Onemocnění, které může výrazně zkomplikovat diagnostiku APS je roztroušená skleróza. Roztroušená skleróza je chronické autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému. Může mít různorodý klinický průběh. Pokud dojde k opakovaným uzávěrům tepen s atakujícím průběhem, může APS napodobit roztroušenou sklerózu. Neurologický projev APS může mít stejný klinický průběh těžko odlišitelný od ataku při roztroušené skleróze. Při vyšetření mozku pacienta s APS pomocí magnetické rezonance jsou nalézány postižené léze bílé hmoty, které jsou nalézány i u pacienta s roztroušenou sklerózou. Je důležité, aby při potvrzení diagnózy roztroušené sklerózy byli vyloučeny jiné choroby, které tuto chorobu můžou napodobit. Jedná se např. o APS, sarkoidóza, vaskulitida, systémový lupus erythematoses či Lymeskou boreliózu. [32]

Byl popsán případ pacientky, která byla několik let léčena pro roztroušenou sklerózu. Na mozku při vyšetření byly nalezeny ložiska v bílé hmotě, na které se zakládala diagnóza roztroušené sklerózy. Byla nasazena standardní léčba, ale u pacienty nedošlo ke zlepšení. Stav pacientky byl doprovázen těžkými atakami, zhoršením zraku, závratěmi a poruchou rovnováhy. Na základě zjištění, že jevíla známky multiorgánového postižení byla zvažována možnost, že by se mohlo jednat o systémové autoimunitní onemocnění. Při výrazném zhoršení pak byla vyšetřována magnetickou rezonancí, která neobjevila známky typické pro RS. Klinický průběh imitoval roztroušenou sklerózu. V průběhu onemocnění se vyskytlo postižení systémové, které vedlo ke správné diagnóze. Po nasazení antikoagulační léčby se pacientky stav stabilizoval. [32]

Obrázek č. 5 ukazuje klinické projevy APS na modelu člověka. Jak obrázek ilustruje, může se jednat prakticky o jakoukoliv část organismu. Jedná se např. o výskyt migrén, plicní embolii, mrtvici, přechodný ischemický záchvat, Raynaudova nemoc, hluboká žilní trombóza či v neposlední řadě ztráta plodu.



Obrázek 5: Klinické projevy antifosfolipidového syndromu, převzato a upraveno [31]

4.2 Laboratorní kritéria

Po zjištění zjevného klinického projevu je zapotřebí provést laboratorní část diagnostiky. Jedním způsobem diagnostiky je Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) metoda, která detekuje protilátky proti CL a β_2 GPI. Druhým způsobem je provedení detekce lupus antikoagulans (LA) prostřednictvím koagulačního testu.

Vyšetření APLA je součástí hodnocení APS. Při zjišťování příčin prodloužení PPT (parciální tromboplastinový čas), opakovaných potratů či nevysvětlitelné žilní a tepenní trombózy je vyšetřováno, zda u pacienta nedochází k nepřiměřenému srážení krve. Když je test u pacienta s autoimunitním onemocněním negativní, může být časem znovu test proveden, protože protilátky se mohou vytvořit později. [28]

4.2.1 ELISA

Stanovení protilátek proti CL a β_2 GPI je zdánlivě jednoduché vyšetření. Diagnostika je zatížena špatnou standardizací vyšetření a nízkou specifitou. Falešně pozitivní výsledky mohou mít dopad na špatné určení diagnózy a léčby. Efektivita a standardizace testů na protilátky proti CL a β_2 GPI vykazují jak analytické (tj. zdroj antigenu, mezní hodnoty) tak postanalytické (tj. špatná interpretace výsledků) nedostatky. Velký podíl na různorodosti výsledků mají komerčně dodávané laboratorní diagnostické sety. [25, 28, 33]

Mezi firmy, které dodávají komerční diagnostické sety, patří např.:

EUROIMMUN je firma, která vyrábí širokou škálu reagensů pro laboratorní diagnostiku. Hlavní důraz klade na testovací systémy pro protilátky v séru pacienta. Mezi jejich nabídku patří také ELISA metoda, která slouží pro detekci protilátek proti CL, β_2 GPI a fosfatidylserinu. Dodává mikrotitrační destičku, která zajišťuje vysokou citlivost a nevyžaduje čerstvou plazmu. [34]

Další firma, která dodává sety pro stanovení CL, β_2 GPI a fosfatidylserinu je BioVendor. Dodává enzymoimuno-analytickou soupravu, která obsahuje jamky, které jsou pokryty hověžím kardiolipinem, β_2 GPI, fosfatidylserinem. [35]

Diagnostické laboratorní sety pro detekci kardiolipinu a β_2 -glykoprotein I

Mezi komerčně dodávané diagnostické laboratorní sety můžeme zařadit tyto imunoanalýzy.

První je diagnostika pomocí Quanta lite ELISA, která je prováděna ručně a využívají se zde monoklonální protilátky. [33]

Další možností je využití CliA Bio-Flash. Tento test se skládá z paramagnetických částic potažených CL a lidským β_2 GPI nebo pouze β_2 GPI, na které se zachycují protilátky ve vzorku. Po inkubaci, magnetické separaci a promývacím kroku se přidá značka sestávající z protilátek IgG nebo IgM značeného isoluminolem. Po druhé inkubaci, magnetické separaci a promytí se přidají činidla, která vyvolají luminiscenční reakci a vyzařované světlo se měří optickým systéme. [33]

Další metodou je CliA Zenit-RA. Jedná se o plně automatizovaný imunoanalýzátor. CliA Zenit-RA je založen na magnetických mikročásticích a používá chemiluminiscenční detekci k zajištění vysoké přesnosti a rychlosti analýzy. Komplex CL/ β_2 GPI nebo β_2 GPI protilátky se používají k potahování magnetických částic a lidské protilátky proti IgG nebo IgM jsou označeny pomocí derivátem esteru akridinu (konjugátu). Během první inkubace se specifické protilátky přítomné ve vzorku, jak v kalibrátorech, tak v kontrolách, váží s pevnou fází. Během druhé inkubace konjugát reaguje s protilátkami zachycenými na pevné fázi. Po každé inkubaci se materiál, který není spojen s pevnou fází, odstraní promytím. Množství značeného konjugátu vázaného na pevnou fází se hodnotí chemiluminiscenční reakcí. [33]

Detekce kardiolipinu

Kardiolipin (CL) je detekován v séru či plazmě. Test zahrnuje vyhodnocení zředěného pacientova séra na vazbu CL potažených destiček v přítomnosti hovězího séra. Detekuje protilátky, které vážou pouze na samotný CL a ty které vážou CL navázaný na hovězí β_2 GPI. Slabinou testu je, že neodhalí přítomnost CL u pacientů s protilátkami, které vážou lidské, ale ne hovězí β_2 GPI. Proto nyní některé testy používají lidské β_2 GPI v CL-ELISA. Pozitivní výsledek je definován jako střední nebo vysoký titr např. > 99. percentil nebo > 40 GPL nebo MPL. Pacient musí být pozitivní po dobu nejméně 12 týdnů. [28]

Detekce β_2 – glykoproteinu I

Protilátky proti β_2 -glykoproteinu I (β_2 GPI) jsou detekovány v séru či plazmě. Test zahrnuje nanesení β_2 GPI přímo na ozařované destičky. [28] Jamky mikrotitračních destiček jsou potaženy β_2 GPI. Jedná se o 96 - jamkové mikrotitrační destičky z prostého polystyrenu. Destičky jsou ozářeny elektronovým paprskem nebo radiační kobaltem v atmosféře kyslíku. [36] Teoreticky by tento druh testu měl být schopen detekovat větší množství klinicky významných protilátek než kardiolipinový test. Pozorování, že existují nepatogenní protilátky, které v rámci tohoto testu váží β_2 GPI, značí, že lidské β_2 GPI vázající se s umělým plastovým povrchem může odhalovat další neoepitopy. To může částečně vysvětlovat, proč některé studie nenašly spojení mezi trombózou a pozitivním přímým β_2 GPI – ELISA. Obecně se zdá lepší mezilaboratorní shoda u ELISA v porovnání s CL. Kladný výsledek je definován jako titr >99 percentil a musí být prokázán nejméně dvakrát v časovém odstupu 12 a více týdnů standardizovaným typem ELISA. [28]

4.2.2 Koagulační test

Prostřednictvím tohoto testu se vyšetřuje lupus antikoagulans. Test vyžaduje urychlené zpracování plazmy na bezdestičkovou speciálními centrifugačními metodami, aby nedošlo ke zkreslení výsledků vyvázáním inhibitoru. Je to průkaz prodloužení testu závislého na fosfolipidech, kde se používají nejméně dva screeningové testy. Nepochází zde ke zkrácení po přidání normální plazmy. Test se zlepšuje po přidání fosfolipidů. Je také nutné odlišit jiné vlivy (specifický inhibitor, heparin). [25, 28]

Lupus antikoagulans (LA) je prokázán v plazmě dva a vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů. Jedná se o důležitý nástroj pro diagnostiku APS. Test detekuje protilátky, které přestože zabraňují koagulaci in vitro, jsou spojované s trombózou. Test LA musí být v souladu s 3 - krokovým postupem dle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu. Prvním krokem je screening test, který ukáže prodloužení srážecího času závislého na fosfolipidech nad horní limit referenčního intervalu. Následuje míchací test, který potvrdí přítomnost inhibitoru a vyloučí nedostatek koagulačního faktoru. Posledním krokem je potvrzení, že inhibitor je závislý na fosfolipidech a není zaměřen proti specifickému koagulačnímu faktoru. [28]

Důkaz přítomnosti LA je poskytnut provedením sekvenční řady vyšetření, které jsou vymezeny termínem screening testu a potvrzovacího testu. Později byl rozdělen na míchací test a na zkoušku posouzení závislosti na fosfolipidech. Existují různé testy, které lze použít ke screeningu LA. Vzhledem k tomu, že žádná samostatná screeningová zkouška není 100 % citlivá na detekci všech LA, doporučuje se alespoň jeden další screeningový test. Jeden z provedených screeningových testů by měl využívat aktivaci vnitřní cesty koagulace (např. APTT nebo dobu srážení kaolinu) a druhý přímou aktivaci faktoru X (např. dRVVT). Zkratka dRVVT je označení pro zředěný jed pocházející od zmije řetízkové. Pro každou použitou metodu LA a každý koagulometr by měly být stanoveny referenční rozsahy. [28]

Směšovací studie zahrnují kombinaci plazmy pacienta s normální plazmou v poměru 1:1 a posouzení vlivu tohoto postupu na dobu srážení. Pokud je prodloužení srážecího času důsledkem nedostatku koagulačního faktoru, pak by se srážecí čas měl vrátit do referenčních hodnot. V případě LA bude oprava vyžadovat větší poměr normálního plazmatu. K určení, zda je inhibitor závislý na fosfolipidech, se běžně používá postup neutralizace destiček, který využívá buď promyté destičky aktivované iontomerem vápníku nebo destičky lýzované opakovaným zmrazením a rozmrazením. Oprava doby srážení nastane v přítomnosti LA. Alternativní činidla pro posouzení této vlastnosti zahrnují modifikované aPTT činidlo, které obsahuje fosfolipidy hexagonální (II) fáze, které specificky váží LA. Pokud jde o potvrzující testy dRVVT, mohou alternativy k postupu neutralizace destiček zahrnovat činidla s vysokou koncentrací fosfolipidu nebo činidla s fosfolipidem citlivým na LA. [28]

Studie ukázaly 24 % falešně pozitivních příkladů detekce LA a 18,5 % falešně negativních. Jedna z příčin falešně pozitivních výsledků může být kontaminace heparinem. Tato možnost může být vyhodnocena změřením trombotického času, a pokud dojde k prodloužení, tak změřením anti-FXa aktivity. Dalším důvodem pro falešně pozitivní výsledky může být přítomnost specifických antikoagulačních faktorových protilátek. Nesprávná příprava plazmatu může vést k falešně negativním výsledkům kvůli kontaminaci destičkami. Zředující efekt směšovacích studií může také vést k falešně negativním výsledkům u vzorku, kde je nízké LA. Doporučuje se neprovádět měření LA, pokud je pacient antikoagulován. [28]

Nehledě na použitou metodu na testování LA je důležitá interní kontrola kvality v laboratoři. Zejména použití známých pozitivních a negativních LA kontrol u každé šarže testování. Pro lepší klinickou využitelnost testování LA bylo zkoumáno rozlišování LA

imunoglobulinů podle cílového antigenu na základě zjištění, že β_2 GPI-závislé LA by mohlo být silněji spojováno s trombózou než β_2 GPI-nezávislé LA. Tyto nové testy využívají odlišných vlastností β_2 GPI-závislého LA k vazbě na kardiolipin a vykazují zvýšenou vazbu na fosfolipidy v přítomnosti chloridu vápenatého ve srovnání s hodnotami β_2 GPI-nezávislého LA. [28]

4.2.3 Jiné imunologické testy

Pro diagnostiku APS byly v poslední době navrženy další testy. Mezi těmito testy je například stanovení podtřídy protilátek proti β_2 GPI, které jsou zaměřeny proti doméně 1 a 4/5 molekuly. Byla nalezena souvislost mezi pozitivním IgG β_2 GPI doménou 1 a trombotickými příhodami. Slibné, ale neurčité výsledky přicházejí z určování protilátek zaměřených na komplex fosfatidylserinu/protrombin. [27]

Detekce antitrombinových protilátek

Protilátky proti komplexu aPS/PT byly detekovány metodou ELISA. Pro detekci antitrombinových protilátek s použitím samotného protrombinu jako antigenu potaženého na ozařovaných plotnách byl popsán v roce 1995. Souvislost mezi samotnými antitrombinovými protilátkami a klinickými projevy APS zůstává kontroverzní. Studie stanovili metodu ELISA k detekci protilátek proti komplexu fosfatidylserinu a protrombinu a pozorovali, že IgG protilátky proti aPS/PT byl velmi rozšířený u pacientů s APS ve srovnání s pacienty s jinými nemocemi. Bylo také prokázáno, že detekce protilátek proti aPS/PT silně koreluje s klinickými projevy APS a s přítomností LA. [37]

5 MOŽNOSTI TERAPIE

Vysoký výskyt opakující se tromboembolie vedl k tomu, že antitrombotická léčba je základem léčby u pacientů s APS. [38] Doporučují se dlouhodobá perorální antikoagulancia, aby se zabránilo arteriální nebo žilní trombóze. K zabránění porodním komplikacím se používá heparin (s nízkou molekulovou hmotností) a aspirin. U katastrofického APS se používá heparin s vysokou dávkou kortikosteroidů a výměna plazmy. [39] Ačkoli warfarin zůstává hlavní léčebnou volbou v APS, stále existují obavy ohledně jeho účinnosti, bezpečnosti. [40]

Prevence trombózy je hlavní cílem léčby pacientů s APLA. Pacienti se rozlišují do dvou skupin. Pacienti s APS, kteří již trombotickou příhodu (sekundární tromboprolaxe) měli a pacienti, kteří trombotickou příhodu neměli, jako jsou pacienti s SLE nebo ženy s porodním APS (primární tromboprolaxe). [41]

5.1 Nová orální antikoagulancia

Bylo schváleno několik nových perorálních antikoagulancií (NOAC) zaměřených na trombin (dabigatran-etexilát) nebo faktor Xa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban). Randomizované studie prokázaly účinnost i bezpečnost ve srovnání s warfarinem a heparinem (s nízkou molekulovou hmotností) pro primární i sekundární prevenci. Tato slibná alternativa nebyla dosud přijata do klinické praxe, z důvodu omezených klinických výsledků. [40]

5.2 Primární prevence trombózy

O primární prevenci lze uvažovat v případě trojnásobného APLA pozitivního výsledku u asymptomatických jedinců, nebo u pacientů, kteří nesou základní autoimunitní onemocnění. U pacientů s nízkým titrem APLA není podávání aspirinu doporučeno. Je třeba prokázat, zda by tyto pacienti měli dostávat orální antikoagulancia (OAT). Mezi zástupce OAT patří antagonisté vitamínu K, perorálních antikoagulancie nebo léky, které se zaměřují na jeden nebo vícero možných patogenních mechanismů vzniku trombózy. Léčba žilních a arteriálních rizikových faktorů a adekvátní tromboprolaxe během vysoce rizikových situací jsou zásadní pro snížení rizika vzniku první trombotické příhody. [39] Studie ukázaly ochrannou úlohu vysokých dávek HCQ proti riziku pooperační žilní trombózy nebo plicní embolie po operaci náhrady kyčelního kloubu. U pacientů s SLE byl prokázán příznivý vliv HCQ na prevenci

primární trombózy. Předchozí výsledky ukazují, že užívání HCQ bylo spojeno se snížením titrů APLA. HCQ je spojeno i se sníženým rizikem trombózy u asymptomatických jedinců s pozitivními APLA protilátkami, s těhotenskou morbiditou a jedinců bez základního autoimunitního onemocnění. [40]

5.3 Sekundární prevence trombózy (rekurentní)

Dlouhodobý OAT s antagonisty vitamínu K jsou hlavním pilířem léčby pacientů s APS k prevenci recidivy trombózy. Obecně platí, že po první epizodě venózní trombózy se doporučuje OAT s nízkou intenzitou (zaměřené na PT INR 2-3). Po arteriální příhodě se doporučuje OAT s vyšší intenzitou (zaměřené na PT INR 3-4) nebo kombinovaná terapie. V případě druhé recidivy navzdory léčbě OAT (u PT INR 2-3) se doporučuje zvýšit intenzitu na PT INR 3-4. Celkový výskyt rekurentní trombózy u pacientů s APS je přibližně 4-6 % pacientů ročně. Pacienti bez OAT mají vyšší riziko rozvoje a opakování trombózy. V provedené studii u pacientů s trojnásobnou pozitivitou s APS se trombóza opakovala u 29 % pacientů léčených OAT a u 51 % pacientů neléčených OAT. Dále studie uvádí, že výskyt recidivy trombózy byl nejvyšší v prvním roce a poté klesal. Vysoce rizikovní pacienti, kteří mají trojitě APLA pozitivní, nemusejí být dostatečně chráněni OAT. [39] Studie uvádějí, že u žádných z pacientů léčených kombinovanou terapií, tzn. antikoagulační léčba a HCQ, se neobjevovaly nové trombózy ve srovnání s pacienty léčených samostatnou antikoagulační léčbou s INR v terapeutickém rozmezí. 14. Mezinárodní kongres ve zprávě o účincích léčby APS doporučil, aby HCQ byl považován za pomocnou léčbu v případech s refrakterními příznaky. Je třeba počkat na další randomizované klinické studie, která potvrdí účinnost a bezpečnost HCQ u pacientů s APS jak pro primární, tak sekundární prevenci trombózy. [40]

5.4 Těhotenství a antifosfolipidový syndrom

Před těhotenstvím by měl být proveden kompletní profil APLA protilátek. [42] Až 20 % žen s třemi a více těhotenskými ztrátami je APLA pozitivní. [39] Těhotenství by nemělo být doporučováno, pokud se u pacientů objevila trombotická příhoda v předchozích 6 měsících nebo u žen s neléčenou hypertenzí. Pro zvýšení úspěšnosti těhotenství se podávají nízké dávky aspirinu. Heparin, ať společně s nebo bez aspirinu, je doporučeným zásahem v těhotenství s APS. Heparin s nízkou molekulovou hmotností (LMWH) je široce používán, protože je stejně účinný jako nefrakcionovaný heparin a je spojen s méně vedlejšími účinky,

jako je trombocytopenie a osteoporóza. Ženy, které dostávají warfarin před těhotenstvím, by měly tuto léčbu přerušit kvůli teratogenním vlastnostem mezi 6. až 14. týdnem těhotenství a přejít na LMWH. [42] V případě, že pacient trpí trombotickým APS, musí v léčbě aspirinem pokračovat i při těhotenství a je vhodné zvažovat přidavek LMWH. Pokud nepodáváme žádné léky, mělo by být podávání LMWH zvaženo alespoň během těhotenství. U žen čistě s APS může být těhotenství úspěšně zvládnuto pomocí LMWH a aspirinu. Souběžná přítomnost SLE nebo jiných autoimunitních onemocnění je nezávislým rizikovým faktorem nežádoucích výsledků. Na základě tohoto zjištění se zvažuje podávání nízkých dávek aspirinu. [39] Existují omezené důkazy o klinických studiích účinnosti HCQ ke zlepšení výsledků při těhotenství u pacientů s APS. Ukázalo se, že ženy léčené HCQ s trvalým pozitivním APLA měly méně často plodové ztráty do 10. týdne těhotenství ve srovnání s těmi, které dostávaly pouze konvenční léčbu. Odborníci se shodují, že by se mohlo uvažovat o přidání HCQ k léčbě v případě selhání standardní postupů s aspirinem a heparinem. [40]

5.5 Katastrofický antifosfolipidový syndrom

Katastrofický APS (CAPS) je vzácná varianta APS, která se vyskytuje u 1 % pacientů s APS. CAPS je charakterizován trombózou ve více orgánech v krátkých časových úsecích. V první řadě léčba CAPS zahrnuje heparin, vysokou dávkou kortikosteroidů a výměnu plazmy, která je spojena s nejvyšší mírou návratnosti (78 %). [39]

5.6 Pomocná terapie

Vedle tradiční léčby se může podávat o pomocná terapie. Jejím úkolem je především zmírnit příznaky nemoci. Tato léčba se přidává k tzv. hlavní léčbě, která je účinnější. Mezi tuto formu terapie řadíme hydroxychlorochin, vitamín D či nová biologické přípravky jako je rituximab nebo eculizumab. Nové přípravky jsou používány jen u specifických případů a je zapotřebí dalších studií pro ověření jejich účinku. [43]

5.6.1 Hydroxychlorochin

Hydroxychlorochin (HCQ) je antimalarikum, které se běžně používá při revmatoidní artritidě a SLE, protože má široký rozsah protizánětlivých a antitrombotických účinků. HCQ chrání antikoagulační štít annexin A před narušením APLA. [40] Studie ukázala, že při léčbě s HCQ poklesly trombotické příhody. Jiné studie zaznamenaly, že HCQ přidané k perorální antikoagulaciím, chrání před rekurentní trombózou více než užívání jen samotné perorální antikoagulacia. [43] HCQ může být použita jako doplňková léčba v případě refrakterním APS. [40]

5.6.2 Vitamin D

U pacientů s APS se častěji vyskytuje nedostatek vitamínu D, což může vést k vyššímu riziku vzniku trombózy. Léčba pomocí vitamínem D není známa, a tak se používá jako vhodný a bezpečný doplněk léčby u pacientů s APS. [43]

5.6.3 Rituximab

Jde se o monoklonální protilátku proti CD20 pozitivním B lymfocytů. Předpokládá se, že B lymfocyty hrají u APS patologickou roli. Tento lék byl použit v řadě situací u pacientů s APS, ale důkazy o jeho účincích jsou nejasné. Rituximab se spíše používá společně s tradičními terapiemi. [43]

5.6.4 Eculizumab

Jedná se o monoklonální protilátku, která dokáže štěpit složku C5 komplementu. Dosud bylo popsáno jen několik případů použití eculizumabu. Jednalo se o pacienty, kteří měli v anamnéze CAPS či arteriální trombotickou formu APS a podstoupili transplantaci ledviny. Po operaci nezaznamenali návrat CAPS a zároveň byla zachována normální funkce nových ledvin. V současnosti probíhá studie na ověření účinku eculizumabu u pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledvin. [43]

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zmapovat diagnostické metody u antifosfolipidového syndromu. V úvodu práce byla krátce shrnuta historie výskytu antifosfolipidových protilátek a jejich využití v diagnostice antifosfolipidového syndromu. Nejprve byly v kapitole etiopatogeneze vysvětleny možné příčiny vzniku APS. Vznik APLA protilátek nebyl dosud objasněn. Tělo u APS patologicky identifikuje fosfolipidy nebo proteiny navázané na fosfolipidový povrch a tvoří proti nim APLA protilátky. Dále byla rozebrána molekulární podstata syndromu, tedy molekuly, které se nejpravděpodobněji podílejí na rozvoji APS. Následně byla popsána epidemiologie výskytu antifosfolipidových protilátek. Tento výskyt je velice různorodý a byla zde uvedena různá onemocnění, která jsou doprovázena výskytem APLA.

Hlavní část práce byla věnovaná diagnostice APS. Diagnostika se skládá ze dvou kritérií. V úvodní části diagnostiky je nastíněn klinický obraz APS. Projevy APS jsou různé a APLA mohou zasahovat prakticky jakoukoliv část těla. Nejčastěji se jedná o ztrátu plodu během těhotenství nebo postižení některé části těla trombózou. Při zjištění zjevného klinického kritéria se přechází na laboratorní část. V práci jsou shrnuty aktuální přístupy a možnosti v oblasti potvrzení diagnózy APS. Pozornost je upřena na ELISA metodu stanovující CL a β_2 GPI a na koagulační testy, které se používají ke stanovení LA.

Na závěr je předložena kapitola s možnou terapií APS. Popsána je standardní léčba zakládající se na perorální antikoagulanciích zahrnujících heparin či aspirin. Mimo jiné je postupně zaváděna i doplňková léčba, která má za úkol mírnit příčiny nemoci. Stále prochází klinickými studiemi a je předepisována k hlavní standardní léčbě.

SEZNAM ZDROJŮ

- [1] LACKNER, Karl J.; MÜLLER-CALLEJA, Nadine. Antiphospholipid Antibodies: Their Origin and Development. *Antibodies*, 2016, 5.2: 15.
- [2] DEVREESE, Katrien; HOYLAERTS, Marc F. Challenges in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Clinical chemistry*, 2010, 56.6: 930-940.
- [3] HLUŠÍ, Antonín, et al. Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína pro praxi*, 2005, 5.9: 434-436.
- [4] GÓMEZ-PUERTA, Jose A.; CERVERA, Ricard. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *Journal of autoimmunity*, 2014, 48: 20-25.
- [5] VAN DEN HOOGEN, Lucas L., et al. Delineating the deranged immune system in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity reviews*, 2016, 15.1: 50-60.
- [6] ESTHER, A. Angelin; RANI, P. Sheeba; RAJAN, Amala. Antiphospholipid Antibody Syndrome (Aplas)-A Case Report. *International Journal of Nursing Education*, 2017, 9.4: 12-19.
- [7] GIANNAKOPOULOS, Bill; KRILIS, Steven A. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2013, 368.11: 1033-1044.
- [8] SEBASTIANI, Gian Domenico, et al. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: an update. *Autoimmunity reviews*, 2016, 15.5: 433-439.
- [9] RUIZ-IRASTORZA, Guillermo, et al. Antiphospholipid syndrome. *The Lancet*, 2010, 376.9751: 1498-1509
- [10] KEELING, David, et al. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *British journal of haematology*, 2012, 157.1: 47-58.
- [11] MERONI, Pier Luigi, et al. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nature Reviews Rheumatology*, 2011, 7.6: 330
- [12] HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. s. 23. ISBN 978-80-7387-713-2.
- [13] HRDÁ, Pavlína a Ivan ŠTERZL. Vyšetření autoprotilátek – současné možnosti. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2003, roč. 5, no. 8, s. 410–413

- [14] MASHAGHI, Samaneh, et al. Lipid nanotechnology. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14.2: 4242-4282.
- [15] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [16] GALLI, Monica, et al. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood*, 2007, 110.4: 1178-1183.
- [17] ESPINOSA, G., CERVERA. R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 2008, 10, p. 230–238.
- [18] HOUTKOOPEER, R. H.; VAZ, F. M. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65.16: 2493-2506.
- [19] CHICCO, Adam J.; SPARAGNA, Genevieve C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, 292.1: C33-C44.
- [20] LOCHMANOVÁ, Alexandra. *Základy imunologie: skriptum*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2014. s. 38-40. ISBN 978-80-7464-570-9.
- [21] ELKON, Keith; CASALI, Paolo. Nature and functions of autoantibodies. *Nature Reviews Rheumatology*, 2008, 4.9: 491.
- [22] SUURMOND, Jolien; DIAMOND, Betty. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity. *The Journal of clinical investigation*, 2015, 125.6: 2194-2202.
- [23] 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.
- [24] HEIKAL, N. M., et al. Laboratory evaluation of anti-phospholipid syndrome: a preliminary prospective study of phosphatidylserine/prothrombin antibodies in an at-risk patient cohort. *Clinical & Experimental Immunology*, 2015, 180.2: 218-226.
- [25] PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

- [26] BERTOLACCINI, Maria Laura, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmunity reviews*, 2014, 13.9: 917-930.
- [27] PENGO, V., et al. Laboratory testing for antiphospholipid syndrome. *International journal of laboratory hematology*, 2016, 38.S1: 27-31.
- [28] GIANNAKOPOULOS, Bill, et al. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 2009, 113.5: 985-994.
- [29] BULIKOVÁ, Alena. Antifosfolipidový syndrom – klinické projevy, diagnostika a možnosti léčby, komplikace. Remedica, Praha: Medical Tribune, 2016, roč. 26, č. 5, s. 444-450. ISSN 0862-8947.
- [30] CERVERA, R., et al. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus*, 2009, 18.10: 889-893.
- [31] COHEN, Danielle, et al. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *Bmj*, 2010, 340.7756: 1125-1132.
- [32] NYTROVÁ, MUDr, et al. Antifosfolipidový syndrom aneb syndrom, jenž může napodobit roztroušenou sklerózu. *Neurologie pro praxi*, 2009, 10.1: 54-57.
- [33] MONTARULI, B., et al. Analytical and clinical comparison of different immunoassay systems for the detection of antiphospholipid antibodies. *International journal of laboratory hematology*, 2016, 38.2: 172-182.
- [34] EUROIMMUN ELISAs for the determination of autoantibodies against phospholipids [online]. [cit.26.6.2018] Dostupné z: https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Autoimmunity/Rheumatology/Cardiolipin/EA_1621_I_UK_B.pdf
- [35] BioVendro, Laboratorní medicína [online]. [cit. 26.6.2018] Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/serine-igg-igm-igg-nebo-igm-beta-2-glycoprotein-i-phosphatidylserine-/p91.AE-3207/>
- [36] MATSUURA, Eiji, et al. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *Journal of Experimental Medicine*, 1994, 179.2: 457-462.

- [37] OTOMO, Kotaro, et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis & Rheumatology*, 2012, 64.2: 504-512.
- [38] LIM, Wendy. Antiphospholipid syndrome. *ASH Education Program Book*, 2013, 2013.1: 675-680.
- [39] GALLI, Monica. Treatment of the antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Highlights*, 2014, 5.1: 1-7.
- [40] ANDRADE, Danieli; TEKTONIDOU, Maria. Emerging therapies in antiphospholipid syndrome. *Current rheumatology reports*, 2016, 18.4: 22.
- [41] GIANNAKOPOULOS, Bill; KRILIS, Steven A. How I treat the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 2009, 114.10: 2020-2030.
- [42] DEL PAPA, Nicoletta; VASO, Nikoleta. Management of antiphospholipid syndrome. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2010, 2.4: 221-227.
- [43] LEGAULT, Kimberly Janet, et al. Prevention of recurrent thrombosis in antiphospholipid syndrome: different from the general population?. *Current rheumatology reports*, 2016, 18.5: 26.