

	<p>group ($p < 0.05$). The mean levels of IgG and IgM AnV and PT were comparable in both SLE groups but were higher than the mean levels of these auto-antibodies in the control group. Overall 85% of the SLE/APS patients had positive IgG ACL, 62% had positive IgG Eth, 50% – positive IgM B2GPI, 46% – IgM ACL, and 35% – positive IgG B2GPI. In SLE patients without APS the most prevalent anti-phospholipid antibodies were IgG PS (29%) and IgG Eth (25%). The results of our study pose several questions: 1. Do we have to evaluate the levels of anti-phospholipid antibodies in all SLE patients? 2. If we have to, then which anti-phospholipid antibodies should we recommend? 3. What is the significance of the positive anti-phospholipid antibodies in the absence of past history and clinical data for thrombosis? 4. Could the positive results precede the development of thrombosis? Having in mind that APS is even more systemic disease than SLE and is probably one of the most prevalent conditions in humans, the investigation of different anti-phospholipid antibodies and the comparison of results with clinical symptoms is of great importance.</p>
Key words:	systemic lupus erythematosus, anti-phospholipid syndrome, anti-phospholipid antibodies
Address for correspondence:	<p>Prof. Marta Baleva, M. D., DMSc, Clinic of Clinical Immunology, University Hospital Aleksandrovska, 1, Sv. G. Sofiyski Str., POBox 45, Bg – 1431 Sofia, e-mail: marta_baleva@yahoo.com</p>

Антифосфолипидният синдром (АФС) като нозологична единица е описан преди повече от 30 г. Оттогава досега са установени множество антитела, свързани с него, като до този момент диагнозата на синдрома се основава на две от тях – антикардиолипинови антитела (ACL) и антитела срещу бета-2-гликопротеин I (B2GPI) [1, 2, 3]. Независимо от това в литературата се дискутира и участието на множество други антитела, чието значение остава неизяснено [4].

Цел на настоящата работа е сравнението на резултатите от изследването на няколко антифосфолипидни антитела при болни от системен лупус (СЛЕ) със и без данни за АФС и анализ на диагностичната стойност на тези антитела.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са 26 болни от СЛЕ с вторичен АФС – 24 жени и 2 мъже, на възраст от 8 до 56 г., средно $36,5 \pm 13,23$ г.; 24 болни от СЛЕ без АФС – 4 мъже и 20 жени, на възраст от 8 до 55 г., средно $40,87 \pm 12,68$ г.; и контролна група от 30 лица. Клиничните симптоми са показани на табл. 1.

Изследвани са IgG и IgM антикардиолипинови (ACL), анти-бета-2-гликопротеин I (B2GPI), антифосфатидилсеринови (PS), антипротромбинови (PT), антианексин V (AnV) и антиетаноламинови (Eth) антитела с ELISA (Orgentec – Германия). Резултатите са сравнени с тези на контролна група от 30 здрави лица.

Таблица 1. Клинични симптоми на изследваните пациенти със СЛЕ със и без АФС

АФС – симптоми	СЛЕ/АФС	СЛЕ
БТЕ	8	0
ДИК	4	0
ДВТ	1	1
Хабитуални аборти	7	0
Page-Schrotter syndrome	1	0
Миокарден инфаркт	2	0
БТЕ, ДИК, ДВТ, катастрофален АФС	1	0
Хабитуални аборти, бъбречен инфаркт, тромб в ляво предсърдие, инсулт, ливедо	1	0
Ливедо, хорея гравидарум	1	0
ОБЩО	26	1

*От болните със СЛЕ без данни за АФС само една жена имаше данни за венозна тромбоза на горен крайник. БТЕ = белодробен тромбоемболизъм, ДИК = дисеминирана интравазална коагулация, ДВТ = дълбока венозна тромбоза

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от изследването на отделните антитела срещу фосфолипиди от клас IgG и IgM са представени на табл. 2

Видно е, че антителата срещу ACL, B2GPI, PS и Eth и от клас IgG, и от клас IgM са значително по-високи при болните от СЛЕ + АФС в сравнение както с болните от СЛЕ без АФС, така и с контролите ($p < 0,05$). IgG и IgM антителата срещу AnV и Pt не показват значими разлики при двете групи лупусно болни, но са по-високи спрямо средните стойности при контролната група.

В табл. 3 са представени данните от процентното разпределение на положителните за различните антитела пациенти, както и минималните и максималните стойности на отделните антитела.

Прави впечатление фактът, че най-често (в 85% от случаите със СЛЕ/АФС) се доказват положителни IgG ACL, следвани от IgM B2GPI (50%), IgM ACL (46%) и IgG B2GPI (35%). Разликите между минималната и максималната стойност на всички тези антитела е много голяма, което обяснява и голямото стандартно отклонение в тази група. В същото време при болните със СЛЕ без АФС не се доказват положителни

антитела, а разликите между максималната и минималната стойност са значително по-малки, като само при 1 пациент без клинични данни за АФС IgM B2GPI са много високи – 26,5 U/ml.

По-нататъшният анализ на таблицата показва, че от останалите изследвани антитела най-често при болните със СЛЕ/АФС са положителни IgG Eth антителата – 62% от болните. При болните със СЛЕ без АФС е висок процентът на положителните антитела IgG PS (29%), както и IgG Eth (25%). При тях разликите между минималните и максималните стойности на антителата срещу PS, AnV, Pr и Eth са доста големи.

Таблица 2. Антифосфолипидни антитела при болни от системен лупус със и без данни за АФС

Антитяло	СЛЕ + АФС	СЛЕ	Контроли
IgG ACL	29,35 ± 18,55*	3,64 ± 3,52	4,02 ± 4,77
IgM ACL	22,78 ± 28,32*	3,88 ± 2,94	5,36 ± 5,81
IgG B2GPI	19,77 ± 32,66*	2,69 ± 1,8	3,01 ± 2,33
IgM B2GPI	15,65 ± 17,13*	3,87 ± 5,49	3,6 ± 2,94
IgG PS	13,41 ± 22,49*	4,14 ± 3,81	2,21 ± 1,94
IgM PS	13,26 ± 15,22*	6,6 ± 5,62	5,77 ± 6,79
IgG AnV	6,79 ± 7,25	7,25 ± 9,96	4,42 ± 4,24
IgM AnV	4,05 ± 5,66	4,55 ± 3,65	3,11 ± 3,77
IgG Pr	11,59 ± 7,47	10,63 ± 6,77	7,59 ± 7,98
IgM Pr	7,33 ± 8,5	5,9 ± 5,07	3,99 ± 3,36
IgG Eth	10,26 ± 10,87*	5,93 ± 4,5	4,02 ± 2,31
IgM Eth	10,31 ± 15,06*	7,91 ± 11,47	5,61 ± 5,99

*p < 0,05 в сравнение с болните от СЛЕ без АФС и контролите

Таблица 3. Процентно разпределение на положителните антитела при изследваните пациенти

Антитяло	СЛЕ + АФС	Минимална и максимална стойност (U/ml)	СЛЕ	Минимална и максимална стойност U/ml
IgG ACL	22/26 (85%)	0,1-92,5	0	0,1-11
IgM ACL	12/26 (46%)	1,2-118	0	0,1-9,6
IgG B2GPI	9/26 (35%)	0,2-135,4	0	0,1-6,3
IgM B2GPI	13/26 (50%)	0,1-57,4	1/24 (4%)	0,1-26,5
IgG PS	9/26 (35%)	0,8-107	7/24 (29%)	0,1-14
IgM PS	6/26 (23%)	0,1-54,8	1/24 (4%)	0,1-18,9
IgG AnV	6/26 (23%)	0,9-30,9	5/24 (21%)	0,1-47,7
IgM AnV	2/26 (7,6%)	0,2-26	3/24 (12,5%)	0,1-10,6
IgG Pr	2/26 (7,6%)	2,9-32,5	1/24 (4%)	2,7-27
IgM Pr	4/26 (15,3%)	0,2-45	4/24 (16,5%)	0,1-22,5
IgG Eth	16/26 (62%)	0,68-42,6	6/24 (25%)	1,1-15
IgM Eth	4/26 (15,3%)	2,13-75,1	1/24 (4%)	2,13-59

Отделно внимание заслужават пациентите с множество клинични симптоми за тромбоза. Тези данни са представени на табл. 4.

Таблица 4. Болни с няколко клинични симптома за тромбоза

Антитяло	Хабитуални абортти, бъбречен инфаркт, тромб в ляво предсърдие, инсулт, ливедо	БТЕ, ДИК, ДВТ, катастрофален АФС	Ливедо, хорейя гравидарум
IgG ACL	+	+	+
IgM ACL	+	+	+
IgG B2GPI	+	-	+
IgM B2GPI	+	-	+
IgG PS	-	-	+
IgM PS	-	+	+
IgG AnV	+	-	-
IgM AnV	+	-	-
IgG Pr	-	-	-
IgM Pr	+	-	-
IgG Eth	+	-	-
IgM Eth	-	-	-

ОБСЪЖДАНЕ

Проучванията върху антифосфолипидните антитела, и в частност антителата срещу кардиолипин, датират от началото на 80-те години на миналия век [5, 6]. През 90-те години групите на M. Galli и сътр. [9] и на H.P. Neil и сътр. [10] установяват, че някои ACL се нуждаят от наличието на определен плазмен белтък (β_2 -glycoprotein I), за да се свържат с кардиолипина. По-късно се установява, че освен тези антитела важни за диагнозата са и антителата, насочени срещу други фосфолипиди, както и към гликопротеини и протеини. Голямото разнообразие на антителата, описани при болни с АФС, както и фактът, че някои от тях са насочени към белтъци, а не към фосфолипиди, дават основание на автори като J. Vermuyen и J. Arnaut [11] през 1992 г. да предложат ново име на антифосфолипидните антитела – „антифосфолипид-протеин антитела”. Нашите първоначални проучвания [7, 8] показват значението на определянето на антителата както срещу ACL, така и срещу B2GPI, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, лизолецитин, сфингомиелин, PS и Eth за диагнозата на лупусната болест и тромботичните състояния.

Нашите данни потвърждават тезата на редица автори за връзката на ACL с тромбофилните състояния [12], но не и с хемолитичната

анемия и неутропенията при болни от СЛЕ/АФС. Данните на R. Servera и сътр. [13] показват, че при пациентите с високи титри на ACL по-често се наблюдават тромбози (в 30% от случаите срещу 9% от болните без антитела), а при жените с високи нива на ACL са по-чести спонтанните абортти. W. Egner подчертава че IgG ACL са рисков фактор за тромбоза при болните от лупус, но има и болни с това заболяване, при които въпреки липсата на антитела също може да се наблюдава тромбоза [14].

Висока е и честотата на антителата срещу B2GPI. Така например L. R. Lopez и сътр. [15] намират IgG B2GPI при 38% от лупусно болните с АФС, а IgM B2GPI – при 40% от тях; D. Fanoroulos и сътр. [16] – съответно IgG B2GPI при 25% от лупусно болните, а IgM B2GPI – при 27%.

Ние решихме да съпоставим данните от намирането на антителата срещу няколко антигена при лупусно болни с класически данни за АФС – положителни ACL и/или B2GPI и клинични симптоми за АФС, с резултатите при лупусно болни без клинични и лабораторни критерии за АФС.

Според нашите данни антителата срещу ACL, B2GPI, PS и Eth, както от клас IgG, така и от клас IgM, са значително по-високи при болните от СЛЕ + АФС в сравнение и с болните от СЛЕ без АФС, и с контролите ($p < 0,05$). IgG и IgM антителата срещу AnV и Pr не се различават статистически в двете групи лупусно болни, но са по-високи спрямо средните стойности при контролната група.

Интерес представляват трите пациентки с лупус, при които има няколко клинични симптома на АФС. При първата от тях са положителни всички антитела с изключение на тези срещу PS, при втората са положителни само антителата срещу ACL и IgG PS, а при третата – само антителата срещу ACL, B2GPI и PS и от двата класа. Участието на тези антитела в патогенезата на пъстрата клинична картина при тези 3 пациентки засега остава неясно.

Оценявайки значението на голям брой антитела – срещу бета-2-гликопротеин I, протромбин, протеин С, протеин S и AnV, J. Nojima и сътр. [17] подчертават, че концентрацията и честотата на AnV са най-високи при болните от лупус и данни за загуба на плода. Нещо повече, единственият значим рисков фактор за фетална загуба при тези болни според тях са AnV. Противоположно е мнението на B. de Laat и сътр. [18], които не считат, че AnV са рисков фактор за тромбоза или загуба на плода при болните с АФС и лупус, но мутациите в гена, контролиращ

производството на AnV могат да бъдат такъв независим от антителата фактор. Според нашите данни средната концентрация на AnV антителата не се различава в двете групи лупусно болни, но е по-висока в сравнение с тази при контролната група, т.е. тези антитела вероятно участват в сложната патогенеза на болестта, вкл. и тромбоембразуването. В подкрепа на това наше наблюдение са и данните на N. Bizzaro и сътр. [19], които доказват AnV антитела при 13% от лупусно болните, като ги намират и при 9% от пациентите с негативни антикардиолипидни антитела. В същото време те установяват, че рискът от тромбози при СЛЕ е най-нисък при наличие на AnV антитела.

Диагностичната стойност на определянето на антителата срещу анексин V е предмет на дискусия от много авторски колективи. Според част от тях той е допълнителен маркер при пациенти с различни тромботични състояния, репродуктивни нарушения, автоимунни болести [17, 20, 21], но други автори не намират достатъчни доказателства за това [18, 22, 23, 24]. Нашите данни показват, че концентрацията на тези антитела е сравнително ниска и макар че средните стойности се различават от тези при здравите лица, няма статистически значима разлика между групите болни от лупус с АФС и болните от лупус без данни за АФС. До голяма степен причина за различията в данните за тези антитела са може би различните критерии за поставяне на диагноза, фазата на болестта, при която са изследвани, и не на последно място – самият метод за определянето им [25].

През 1988 г. С. Е. Weidmann и сътр. [26] установяват, че с изключение на антителата срещу фосфатидил-етаноламин, всички останали антитела (срещу фосфатидилова киселина, фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидил-холин) се установяват при голям процент от болните с лупус и корелират с позитивния резултат за ACL. М. L. Bertolaccini и сътр. [27] изследват голям брой антифосфолипидни антитела – срещу фосфатидилова киселина, фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол, фосфатидил-етаноламин и фосфатидил-холин, и подчертават, че наличието им не подпомага диагнозата на АФС при лупус. През 2000 г. Е. L. Radway-Bright и сътр. [28] доказват, че антителата срещу фосфатидил-инозитол, фосфатидил-серин и фосфатидил-глицерол са почести при лупусно болни с АФС. Едно по-късно проучване от 2004 г. подчертава значението на определянето на антителата срещу фосфатидил-серин за установяването на АФС при системния лупус [29].

Всички пациенти от групата с АФС имаха характерните клинични симптоми за този синдром: 8 – БТЕ, 1 с ДВТ, 7 – хабитуални аборти, 1 – с Raget-Schrotter syndrome. При няколко пациенти клиниката бе особено тежка – 4 с ДИК, 2 с миокарден инфаркт, 1 – с БТЕ, ДВТ, ДИК, катастрофален АФС, 1 – с хабитуални аборти, бъбречен инфаркт, инсулт и ливедо, 1 – с ливедо и хорей гравидарум, В същото време само 1 от болните от лупус без антитела (СЛЕ без АФС) имаше ДВТ.

Средните стойности на антителата срещу отделните фосфолипиди при лупусно болни, намерени от нас, са съпоставими с данните на други автори [26]. В същото време тези антитела не са в много високи концентрации и не установихме връзка между наличието им и конкретна изява на болестта. Това съответства на мнението на други автори, изучавали този проблем [27], но е противно на изказаното в някои публикации мнение за значението им при системния лупус [15, 26, 28]. Ние се присъединяваме към мнението на М. L. Bertolaccini и сътр. [27], че намирането на други антитела освен тези срещу кардиолипиди и бета-2-гликопротеин I на този етап не подпомага значително диагнозата на АФС при лупуса. От друга страна, доказването им както в серума на болни с АФС, така и на тези без АФС, може би е от значение за изясняването на други патофизиологични механизми извън тромбофилията при системния лупус.

Нашите резултати поставят няколко въпроса:

1. Трябва ли да изследваме при всички лупусно болни антителата срещу фосфолипиди?
2. Ако ги изследваме – кои от антителата да препоръчаме?
3. Какво е значението на положителните антитела в случаите, когато няма анамнестични и клинични данни за тромбоза?
4. Може ли положителните антитела да предшестват тромбозата?

В свои публикации от 2007 и 2008 г. Y. Shoenfeld [30, 31] подчертава, че докато в началото на дефинирането на синдрома през 1983 г. са използвани 2 антитела – ACL и лупусен антикоагулант, в момента има “експлозия” на антифосфолипидни антитела, които също участват в патогенезата на синдрома. От друга страна, изглежда, че АФС е много по-системна болест от СЛЕ [30] и вероятно е една от най-честите болести в света. В този аспект изследването на антителата срещу различни фосфолипиди и съпоставянето на резултатите с клиничните симптоми е много важно.

Проучването е спонсорирано от грант ДОО2/125/2008 г. – Национален научен фонд

Библиография

1. Miyakis, S. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. – *J. Thrombosis Haemost.*, 4, 2006, 295-306.
2. Wilson, W. A. et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. – *Arthritis Rheum.*, 42, 1999, 1309-11.
3. Lockshin, M. P., L. R. Samantiano et S. Schwartzman. Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. – *Arthritis Rheum.*, 43, 2000, 440-443.
4. Alessandri, C. et al. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. – *Autoimmunity Reviews*, 10, 2011, 609-616.
5. Hughes, G. V. R., E. N. Harris et A. E. Ghavari. The anticardiolipin syndrome. – *J. Rheumatol.*, 13, 1986, 486.
6. Harris, E. N. et al. Anticardiolipin antibodies: detection by RIA and association with thrombosis in SLE. – *Lancet*, 2, 1983, 1211-1214.
7. Бояновски, Б., М. Русева, Г. Добрева, В. Ганев, А. Младенова, С. Моноу, К. Николов и М. Балева. Антифосфолипиден синдром, фактор V Leiden и активност на протеин Ц като причина за тромбози при пациенти със системен лупус еритематозус. – *Ревматология*, 8, 2000, № 4, 30-34.
8. Николов, К., Р. Рашков, Зл. Коларов, Зл. Янкова, Д. Петрова, М. Балева и сътр. Антифосфолипиден синдром – значение на определянето на антителата срещу фосфолипиди. – *Мед. преглед*, 39, 2003, № 1, 32-35.
9. Galli, M. et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. – *Lancet*, 335, 1990, 1544-1547.
10. McNeil, H. P. et al. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). – *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1990, 4120-4124.
11. Vermuyen, J. et J. Arnaut. Is the Antiphospholipid syndrome caused by antibodies directed against physiologically relevant phospholipids-protein complexes? – *J. Lab. Clin. Med.*, 120, 1992, 10-12.
12. Font, J. et al. Anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases: isotype distribution and clinical associations. – *Clin. Rheumatol.*, 8, 1989, № 4, 475-483.
13. Cervera, R. et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1 000 patients. – *Medicine (Baltimore)*, 72, 1999, № 2, 113-124.
14. Egnér, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. – *J. Clin. Pathol.*, 53, 2000, 424-432.
15. Lopez, L. R. et al. Anti- β 2-glycoprotein and antiphosphatidylserine antibodies are predictors of arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. – *Coagul. Transfus. Med.*, 121, 2004, 142-149.
16. Fanopoulos, D. et al. High frequency of abnormal levels of anti- β 2-glycoprotein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with antiphospholipid syndrome. – *J. Rheumatol.*, 25, 1998, 675-680.
17. Nojima, J. et al. Association between the prevalence of antibodies to β 2-glycoprotein I, prothrombin, protein C, protein S, and annexin V in patients with systemic lupus erythematosus and thrombotic and thrombocytopenic complications. – *Clin. Chem.*, 47, 2001, № 6, 1008-1015.
18. De Laat, B. et al. Annexin V polymorphism (-1C \rightarrow T) and the presence of anti-annexin V antibodies in the antiphospholipid syndrome. – *Ann. Rheum. Dis.*, 65, 2006, 1468-1472.
19. Bizzaro, N. et al. Prevalence and clinical correlation of anti-phospholipid-binding protein antibodies in anticardiolipin-negative patients with systemic lupus erythematosus and women with unexplained recurrent miscarriages. – *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 129, 2005, 61-68.
20. Lakos, G. et al. Antiprothrombin and antiannexin V antibodies imply risk of thrombosis in patients with systemic autoimmune diseases. – *J. Rheumatol.*, 27, 2000, 924-929.
21. Matsuda, J. et al. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. – *Am. J. Hematol.*, 47, 1994, 56-58.
22. Arai, T. et al. Anti-annexin V antibodies in reproductive failures in relation to antiphospholipid antibodies and phosphatidylserine. – *Am. J. Reprod. Immunol.*, 50, 2003, № 3, 2002-2008.
23. Ogawa, H. et al. Elevated anti-annexin V antibody levels in antiphospholipid syndrome and their involvement in antiphospholipid antibody specificity. – *Am. J. Clin. Pathol.*, 114, 2000, 619-628.
24. Siaka, C. et al. Low prevalence of anti-annexin V antibodies in antiphospholipid syndrome accompanied by spontaneous abortion. – *Rev. Med. Intern.*, 20, 1999, № 9, 762-765.
25. Galli, M. et T. Barbui. Prevalence of different antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and their relationship with antiphospholipid syndrome. – *Clin. Chem.*, 47, 2001, № 6, 985-987.
26. Weidmann, C. et al. Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody isotypes in systemic lupus erythematosus. – *J. Rheumatology*, 15, 1988, 74-79.
27. Bertolaccini, M. L. et al. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. – *Br. J. Rheumatol.*, 37, 1998, 1229-1232.
28. Radway-Bright, E. L., C. T. Ravizajan et D. A. Isenberg. The prevalence of antibodies to anionic phospholipids in patients with primary antiphospholipid syndrome, SLE and their spouses. – *Rheumatology*, 39, 2000, 427-431.
29. Lopez, L. R. et al. Anti- β 2-glycoprotein and antiphosphatidylserine antibodies are predictors of arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. – *Coagul. Transfus. Med.*, 121, 2004, 142-149.
30. Shoefeld, Y. APS – more systemic disease than SLE. – *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, 32, 2007, 129-130.
31. Shoefeld, Y. et al. Autoantibody explosion in antiphospholipid syndrome. – *J. Autoimmunity*, 30, 2008, 74-83.

Постъпила за печат на 30 август 2012 г.