



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Stanovení avidity antifosfolipidových protilátek metodou ELISA

Determination of avidity of antiphospholipid antibodies by the ELISA method

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Eliška Bernardová

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Konzultant bakalářské práce: Milada Petráčková

Kladno 2023

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Bernardová** Jméno: **Eliška** Osobní číslo: **503401**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Stanovení avidity antifosfolipidových protilátek metodou ELISA

Název bakalářské práce anglicky:

Determination of avidity of antiphospholipid antibodies by the ELISA method

Pokyny pro vypracování:

Antifosfolipidové protilátky (APL) zahrnují heterogenní skupinu protilátek reagujících buď se samotnými fosfolipidy, nebo jejich komplexy s proteiny. Zvýšení antifosfolipidových protilátek je jedním z diagnostických kritérií antifosfolipidového syndromu (APS), jehož hlavními klinickými projevy jsou opakované trombózy a opakované potraty u žen. Patogenita protilátek je dána nejen výší koncentrací, ale i jejich kvalitativními vlastnostmi jako je jejich afinita a avidita. Některé studie naznačují, že hodnocení avidity by mohlo být využito jako doplňková charakteristika APL vedle stanovení jejich koncentrace. Cílem bakalářské práce v teoretické části bude podat stručnou informaci o APL zahrnující jejich rozdělení, možnosti stanovení a klinický význam. V praktické části bakalářské práce bude cílem porovnání metod ELISA pro stanovení avidity vybrané skupiny antifosfolipidových protilátek za využití různých chaotropních činidel.

Seznam doporučené literatury:

- [1] BRADACOVÁ, Pavla, Ludek SLAVIK, Jana ULEHLOVA, et al., Current Promising Biomarkers and Methods in the Diagnostics of Antiphospholipid Syndrome: A Review., online, Biomedicines, ed. 2021, ročník 9, číslo 2, Přístupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020166>, ISSN 2227-9059
- [2] BUSTAMANTE JG, GOYAL A, SINGHAL M. , BUSTAMANTE JG, GOYAL A, SINGHAL M. , online, StatPearls, StatPearls Publishing, [Treasure Island (FL)], 2021, [Revidováno 2022], Přístupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613698/>
- [3] CHAPEL, Helen, Mansel HAENEY, Siraj A, MISBAH a Neil SNOWDEN, Základy klinické imunologie: 6. vydání. , ed. 6, Stanislav Juhaňák - Triton, 2018, ISBN 978-80-7553-396-8

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Milada Petráčková

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2024**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
odkaz

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Stanovení avidity antifosfolipidových protilátek metodou ELISA vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2023

.....
Eliška Bernardová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, paní MUDr. Lence Fialové, CSc. za trpělivost, odborné vedení a cenné rady při řešení dané problematiky. Dále bych ráda poděkovala mé externí konzultantce této bakalářské práce, paní Miladě Petráčkové za odborné vedení v laboratoři a cenné rady z praxe.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou intenzivně zkoumaných antifosfolipidových protilátek a jejich aviditou. Přítomnost antifosfolipidových protilátek způsobuje antifosfolipidový syndrom charakterizovaný trombózami a komplikacemi v těhotenství.

Teoretická část obsahuje aktuální informace o typech antifosfolipidových protilátek, kritériích pro diagnostiku antifosfolipidového syndromu a je vysvětlen pojem avidita a afinita.

V praktické části bylo provedeno a popsáno stanovení avidity antifosfolipidových protilátek, konkrétně antifosfatidylethanolaminových protilátek (aPE). Ke stanovení byla použita imunologická metoda ELISA, za použití různých chaotropních činidel, konkrétně urey a NaCl. Byla testována různá kontrolní směsná séra, intravenózní imunoglobuliny a vzorky pacientů.

Porovnáním výsledků byla z použitých chaotropních činidel vyhodnocena urea jako vhodnější. Ve všech případech stanovení se nám podařilo zachytit klesající trend indexu avidity se stoupající koncentrací chaotropního činidla. Výsledky také naznačily, že u pacientů trpících trombózami by se mohly vyskytovat aPE s vyšší aviditou v porovnání se zdravými osobami.

Klíčová slova

Antifosfolipidové protilátky; avidita; antifosfolipidový syndrom; ELISA; chaotropní činidla; autoimunitní onemocnění

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the issue of intensively researched antiphospholipid antibodies and their avidity. The presence of antiphospholipid antibodies causes the antiphospholipid syndrome characterized by thromboses and complications in pregnancy.

The theoretical part contains current information about the types of antiphospholipid antibodies, criteria for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and the concept of avidity and affinity is explained.

In the practical part, the determination of the avidity of antiphospholipid antibodies, specifically antiphosphatidylethanolamine antibodies (aPE), was performed and described. The immunological ELISA method was used for the determination, using different chaotropic reagents, namely urea and NaCl. Various control mixed sera, intravenous immunoglobulins and patient samples were tested.

By comparing the results, we evaluated urea as the more appropriate of the chaotropic reagents used. In all cases of determination, we were able to detect a decreasing trend of avidity index with increasing concentration of chaotropic reagent. The results also indicated that aPE with higher avidity is found in patients suffering from thromboses.

Keywords

Antiphospholipid antibodies; avidity; antiphospholipid syndrome; ELISA; chaotropic reagents; autoimmune disease

Obsah

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	11
3	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU	12
3.1	Imunitní systém	12
3.1.1	Antigeny	14
3.1.2	Protilátky	15
3.2	Antifosfolipidové protilátky	16
3.2.1	Lupus antikoagulans	17
3.2.2	Antikardiolipinové protilátky	18
3.2.3	Anti- β 2-glykoprotein I.....	19
3.2.4	Antiprotrombinové protilátky	21
3.2.5	Antifosfatidylethanolaminové protilátky	21
3.3	Antifosfolipidový syndrom.....	23
3.3.1	Kritéria pro diagnózu a klasifikaci antifosfolipidového syndromu	24
3.3.2	Katastrofický antifosfolipidový syndrom.....	26
3.3.3	Léčba antifosfolipidového syndromu	28
3.4	Možnosti stanovení antifosfolipidových protilátek	29
3.5	Avidita	30
3.5.1	Avidita protilátek	31
3.5.2	Metody stanovení avidity	33
3.5.3	Avidita antifosfolipidových protilátek.....	35
4	METODIKA	37

4.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	37
4.1.1	ELISA metoda pro stanovení protilátek	38
4.2	ELISA metoda pro stanovení antifosfatidylethanolaminových protilátek.....	39
4.2.1	Použité pomůcky a přístroje:.....	40
4.2.2	Pracovní postup.....	42
5	VÝSLEDKY	45
5.1	Měření kontrolních sér.....	45
5.1.1	NaCl jako chaotropní činidlo.....	45
5.1.2	Urea jako chaotropní činidlo	48
5.2	Měření vzorků pacientů	51
6	DISKUZE	54
7	ZÁVĚR.....	58
8	Seznam použitých zkratk.....	59
9	Seznam použité literatury	61
10	Seznam použitých obrázků	69
11	Seznam použitých tabulek.....	70

1 ÚVOD

Imunitní systém chrání tělo proti infekčním onemocněním a patogenům (bakterie, viry, parazité nebo houby). Za účelem obrany proti etiologickým agens si imunitní systém vytvořil několik mechanismů. U některých dochází k abnormální reakci imunitního systému. Tato reakce je směřována proti vlastnímu tělu, tzn. vede tělo k útoku proti jeho vlastním tkáním nebo orgánům, což má za následek funkční poruchu, zánět, nebo někdy dokonce i trvalé poškození.

Takováto onemocnění způsobující reakci imunitního systému mířenou na vlastní tělo se nazývají autoimunitní onemocnění (AO). Mechanismem AO způsobeného protilátkovou imunitou je produkce protilátek, které jsou mířené proti vlastním buňkám, tzv. autoproti látek. Tyto autoproti látky jsou produkovány lymfocyty B. Příkladem tohoto typu AO je například idiopatická trombocytopenická purpura (ITP), antifosfolipidový syndrom (APS) nebo systémový lupus erythematoses (SLE).

Antifosfolipidový syndrom (APS) je získané autoimunitní onemocnění charakterizované přítomností antifosfolipidových protilátek (APLA), namířeným proti proteinům vázajícím fosfolipidy. Charakteristickým projevem APS je sklon ke zvýšené srážlivosti krve, který často vede k hlubokým žilním trombózám. Nejčastějšími místy žilní a arteriální trombózy jsou dolní končetiny, trombóza se však může vyskytnout v kterémkoli orgánu. Dalším klinickým projevem jsou předčasné spontánní těhotenské potraty.

Pojem avidita vyjadřuje sílu interakce mezi polyvalentním antigenem a polyvalentní protilátkou. Avidita také vypovídá o vyzrálosti protilátek, jelikož při sekundární imunitní odpovědi se tvoří protilátky s vyšší afinitou než při primární reakci. Tohoto faktu se dá využít při diagnostice a stanovení progresu u autoimunitních onemocnění. Některé studie naznačily, že hodnocení avidity by mohlo být bráno jako doplňková charakteristika antifosfolipidových

protilátek, a také možná jako jedno z kritérií pro diagnostiku antifosfolipidového syndromu. Práce tedy klade důraz na význam stanovení avidity protilátek, které by do budoucna mohlo přinést pokrok při diagnostice a léčbě autoimunitních chorob, v tomto konkrétním případě antifosfolipidového syndromu.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce bude podat ucelený obraz a informace o současném stavu vývoje výzkumu a znalostí o antifosfolipidových protilátkách, jejich významu v klinické diagnostice a možnosti jejich stanovení v laboratořích. V teoretické části bude na základě nejnovějších medicínských zdrojů podán přehled různých skupin antifosfolipidových protilátek. Dále bude v teoretické části probráno získané autoimunitní onemocnění – antifosfolipidový syndrom. Budou rozebrána kritéria pro jeho klinické stanovení a možnosti laboratorní analýzy. V poslední části teoretické části budou vysvětleny pojmy avidita a afinita, jejich role při vzniku protilátek a autoprotilátek a možnosti jejich stanovení.

Praktická část bude zaměřena na princip a postup stanovení avidity antifosfolipidových protilátek metodou ELISA. Stanovovány budou antifosfatidylethanolaminové protilátky. Bude objasněna samotná metoda a její princip. Dále budou porovnána různá chaotropní činidla na základě jejich schopnosti rozrušit interakce v imunokomplexu.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Imunitní systém

Imunitní systém je hlavním obráncem celého organismu proti patogenům a infekcím. Jeho základní a obecnou funkcí je udržování homeostázy organismu, a to tak, že rozeznává, co by mohlo tělu uškodit, a naopak, co je pro tělo neškodné. Patogeny poté likviduje za pomoci specifických a nespecifických mechanismů imunitního systému. Obecná funkce imunitního systému by se dala shrnout do tří bodů:

- Obranyschopnost – rozpoznání vnějších patogenů škodlivých pro tělo a jejich zneškodnění
- Autotolerance – rozeznání tkání těla vlastních a jejich tolerance
- Imunitní dohled – rozpoznávání vnitřních látek těla škodlivých, jako jsou např. staré, poškozené buňky a změněné mutované buňky, a jejich zneškodnění [1; 2]

Obecně můžeme imunitní systém a jeho složky rozdělit dle dvou kritérií (také viz tabulka 1). Prvním dělením je dělení dle specifity imunity a jejího vývoje na:

1. Imunitu vrozenou (také nazývaná přirozená nebo nespecifická) – ta vzniká již v prenatálním období a je tvořena humorální a buněčnou imunitou. Základem vrozené imunity je, že mnohé antigenní determinanty mají na svém povrchu rozličné typické molekuly (tzv. molekulární vzory asociované s patogeny, zkr. PAMP), jež mohou rozpoznat některé buňky přirozené imunity svými receptory.
2. Imunitu získanou (také nazývaná adaptivní nebo specifická) – svůj název nese proto, že se vyvíjí až v průběhu života. Uplatňuje se až později, po aktivaci nespecifické imunity. Aktivují se T a B lymfocyty přes specifické antigenní receptory (TCR, BCR) a dojde

ke specifické imunitní odpovědi. Pro tento typ imunity je velice důležitá tzv. imunologická paměť, kdy si imunita antigen a odpověď na něj zapamatuje, a když se s antigenem opět setká, imunitní odpověď je obvykle rychlejší a silnější.

Druhým kritériem dělení imunity je dělení dle povahy imunitní obrany a to na:

1. Buněčnou imunitu – jak již z názvu vyplývá, tento typ imunity zajišťují buňky imunitního systému, a to konkrétně bílé krvinky (leukocyty). Jako příklad si můžeme uvést třeba makrofágy, neutrofilní granulocyty či eosinofilní granulocyty. Buňky zneškodňují patogenní antigeny různými způsoby (nejčastěji fagocytóza, enkapsulace nebo použití cytotoxických látek).
2. Látková (humorální) – stejně jako buněčná imunita, tak i látková imunita může být součástí přirozené či adaptivní imunity. Klíčovou složkou humorální imunity jsou protilátky (imunoglobuliny) produkované lymfocyty B nacházející se v krvi. Protilátky se specificky navážou na antigen (povrch parazita, viru...), což má za následek jeho zneškodnění. Mezi další nezbytné složky látkové imunity patří například tzv. komplement nebo interferony. [3; 1]

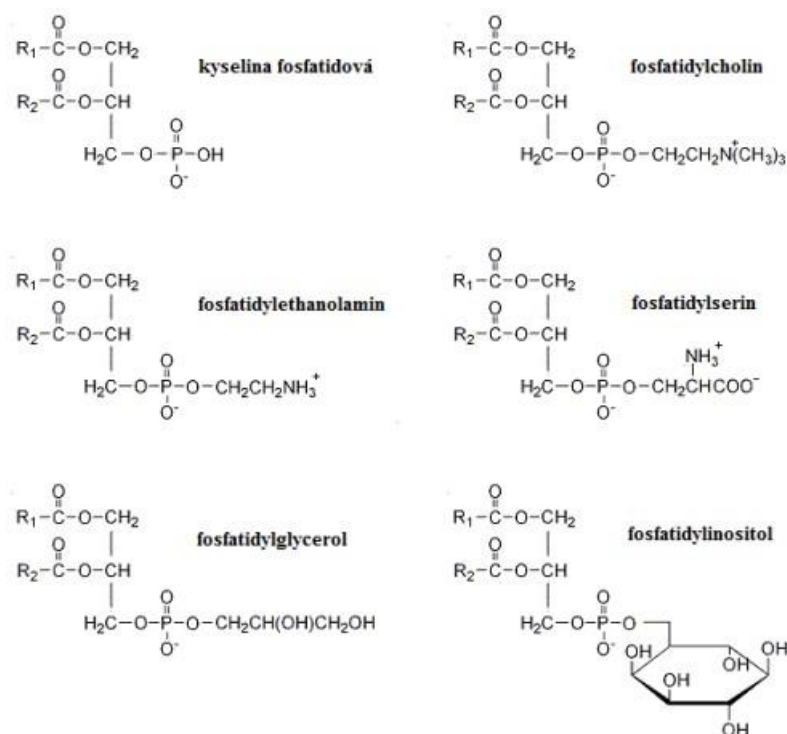
Tabulka 1: Rozdělení imunitního systému [1]

přirozená imunita	buněčná	fagocyty
		makrofágy
		NK-buňky
	humorální	komplement
		interferony
adaptivní imunita	buněčná	T-lymfocyty
	humorální	B-lymfocyty (protilátky)

3.1.1 Antigeny

Antigeny jsou látky, které vyvolají specifickou reakci imunitního systému. Antigeny mohou pocházet buď z vnějšího prostředí (exoantigeny), nebo pocházet přímo z organismu samotného (autoantigeny). Exoantigeny jsou nejčastěji infekční mikroorganismy a jejich produkty. Jako antigeny mohou působit skoro jakékoli chemické struktury, avšak aby na ně mohlo tělo a imunitní systém reagovat, musí být rozeznány ve formě makromolekul. Proto jsou nejobsáhlejší a nejvýznamnější skupinou antigenů proteiny, komplexní polysacharidy, ale také lipidy a lipoproteiny. Pro specifickou reakci imunitního systému je zapotřebí vazebné místo na antigenu zvané epitop, který rozeznávají imunitní receptory. Jedna molekula antigenu může nést variabilní množství epitopů. [1; 3]

Hlavním cílem antifosfolipidových protilátek jsou makromolekulární struktury navázané na polární lipidové složky, tj. fosfolipidy (PL), které jsou hlavním zdrojem antigenů buněčných membrán. Fosfolipidy se vyskytují s různými náboji, např. jako záporně nabitý fosfatidylserin, fosfatidylinositol, kyselina fosfatidová a kardiolipin, neutrální fosfatidylcholin a fosfatidyletanolamin (obrázek 1). Dalším významným antigenním cílem jsou komplexy fosfolipidů vázaných na plazmatické bílkoviny, jako je β 2 – glykoprotein I, protrombin, protein C, protein S, annexin V a kininogeny.



Obrázek 1: Vzorce glycerofosfolipidů [10]

Fosfolipidy mají důležité a různorodé biologické funkce. Jakožto součást buněčných membrán je zpevňují a řídí funkce buněk povrchových proteinů. Jsou také zodpovědné za iniciaci a průběh koagulačních kaskádových drah. Fosfolipidy aktivují koagulační faktory IX a X během vnější cesty, faktor X během vnitřní cesty a přeměňují protrombin na aktivní trombin během společné dráhy. Ačkoli experimenty *in vivo* prokázaly důležitou roli aniontových fosfolipidů vázajících protilátky, trombotické příhody u pacientů jsou způsobeny především fosfolipidy vázajícími plazmatické proteiny. [4]

3.1.2 Protilátky

Protilátka je látka bílkovinné povahy, vyskytující se u obratlovců v krevním séru a řadí se do skupiny imunoglobulinů. Specificky se váže na antigen vazbou nekovalentního charakteru. Při imunitní reakci se protilátky uplatňují jako složka humorální imunity a dochází k jejich tvorbě lymfocyty B (a potažmo plazmatickými buňkami) na základně imunologické paměti. [1; 5]

3.2 Antifosfolipidové protilátky

Antifosfolipidové protilátky (APLA) jsou heterogenní skupinou imunoglobulinů typu IgG a/nebo IgM, vzácně pak také IgA, namířených proti tkáním vlastního těla. Působení této skupiny protilátek je spojeno s klinickými projevy antifosfolipidového syndromu (APS), jako jsou například získané trombofilní stavy nebo předčasné potraty. APLA lze detekovat jako ukazatel autoimunitního onemocnění, ale vyskytuje se i u zdravých pacientů jako náhodný laboratorní nález po infekcích. Při infekcích se vyskytují obvykle protilátky třídy IgM, kdežto protilátky uplatňující se při antifosfolipidovém syndromu jsou většinou třídy IgG a jsou namířeny proti negativně nabitým fosfolipidům. Výskyt APLA v běžné populaci stoupá až na 5 %, ačkoli přítomnost APS se vyvíjí pouze u malé části pacientů, především u starších pacientů trpících chronickými chorobami. APLA může také ovlivnit hematologické testy tím, že prodlužuje protrombinový čas (PT) nebo aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT). Bylo široce zdokumentováno, že genetické faktory, které sdíleli vyšetřovaní pacienti, se mohou podílet na tvorbě antifosfolipidových protilátek a vzniku antifosfolipidového syndromu. Výzkumné údaje ukazují na vysoký výskyt APLA v rodinách pacientů s APS. Tento výzkum včetně genetických analýz a studií naznačuje autozomálně dominantní typ dědičnosti APS. [4; 6; 7; 8; 9]

Tyto protilátky lze rozdělit několika způsoby: na autoprottilátky a aloprottilátky. Dále pak na protilátky vyvolané léčivý, případně na primárně nebo sekundárně se vyskytující protilátky (tzn. nejčastěji u revmatických onemocnění, nádorových procesů, při bakteriálních nebo virových infekcích). Nejefektivnější rozdělení je však založeno na metodě detekce vazby protilátek na specifický antigen. Podle tohoto kritéria se tedy antifosfolipidové protilátky dělí do těchto skupin: lupus antikoagulants (LA), antikardiolipinové protilátky

(aCL), protilátky proti β 2-glykoproteinu I (anti β 2GPI) a další protilátky namířené proti aniontovým proteinům nebo proteinům koagulační kaskády, související s APS. [6; 8; 4]

3.2.1 Lupus antikoagulans

Již před více než 50 lety byl popsán unikátní inhibitor koagulace prodlužující dobu srážení plné krve u pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE). V této době byla prokázána imunoglobulinová povaha tohoto inhibitoru, jeho interakce s aniontovými fosfolipidy a jeho spojení s trombolytickými příhodami. Lupus antikoagulans je tedy heterogenní skupina protilátek, produkovaná imunitním systémem, vyskytující se v plazmě pacientů s autoimunitními chorobami (např. SLE), infekčními chorobami (např. HIV), záněty, ale i u zdravých jedinců. Kritériem pro jeho diagnózu je prodloužení alespoň jednoho z koagulačních testů závislých na fosfolipidech, jako jsou například aPTT nebo diluční test s jedem Russelovy zmiže (dRVVT). Pokud je ve vzorku přítomen lupus antikoagulans, způsobí vyvázání fosfolipidů, které se pak nemohou uplatnit v procesu srážení krve. [11; 12]

LA je jednou z autoprottilátek imunoglobulinového izotypu IgG nebo IgM namířených proti epitopu plazmatických proteinů (β 2 glykoprotein I a/nebo protrombin), fosfolipidům (kardiolipin a fosfatidylserin) a dalším proteinovým komplexům s aniontovým fosfolipidovým povrchem (annexin V, protein C a S). Tato vlastnost byla prokázána antikoagulačními vlastnostmi purifikovaných protilátek proti β 2GPI v normální plazmě. Výskyt LA u zdravých pacientů lze vysvětlit výraznou homologií mezi peptidy β 2GPI dependentními peptidy a různými patogeny (způsobujícími běžné infekce), které vyvolávají laboratorní nálezy LA v séru pacienta. Stále neexistují přesvědčivé důkazy o tom, jak přesně mechanismus tromboembolických nebo porodnických stavů funguje, žádná z vědeckých teorií není zcela průkazná. [11; 12; 7]

3.2.2 Antikardiolipinové protilátky

Další skupinou antifosfolipidových protilátek namířených proti tělním strukturám jsou antikardiolipinové protilátky (aCL) izotypů IgG, IgM a/nebo IgA. Tyto autoprottilátky nejsou primárně namířeny proti kardiolipinu, výskyt aCL spojen s autoimunitními chorobami zahrnuje přítomnost fosfolipidy vázajícího proteinu β 2-glykoproteinu I. Kardiolipin obvykle tvoří komplex s aniontovými fosfolipidy, mitochondriálními membránovými proteiny a plazmatickým proteinovým kofaktorem β 2-glykoproteinem I. Komplex kardiolipinu a β 2GPI je považován za hlavní cíl pro aCL protilátky. [13; 14]

Zájem o výzkum protilátek proti aCL vyvolala patofyziologie mechanismů proti fosfolipidům v buněčných membránách, které vedou k rozvoji antifosfolipidového syndromu, projevující se častými žilními trombózami a spontánními potraty. Později výzkumy z let 2006-2007 u dvou set pacientů s přetrvávajícím diabetem s vysokými rizikovými kritérii ukázaly, že imunologické mechanismy aCL mohou vést k patologickému vzniku diabetické mikroangiopatie a diabetické retinopatie prostřednictvím imunokomplexů. Při dalším stanovení byly objeveny protilátky aCL zaměřené proti endoteliálním antigenům, které mohou zřejmě způsobit iniciaci cévního poškození. Existuje také souvislost mezi přítomností protilátek aCL a výskytem cévního okluzivního onemocnění. [13]

V běžné klinické laboratorní praxi je nutné provádět testy izotypů IgG i IgM aCL a LA protilátek pro diagnostiku APS. Nejčastější je stanovení izotypu IgG aCL protilátek, které se objevují v progresivních stádiích autoimunitních onemocnění. Stanovení izotypu IgA aCL není vhodné pro účely screeningu, ale lze jej použít ve vybraných případech. Test na stanovení aCL je pozitivní až u 80% pacientů trpících APS. Tyto protilátky však mohou být pozitivní u poruch, jako jsou infekční onemocnění způsobující syfilis nebo Q horečku,

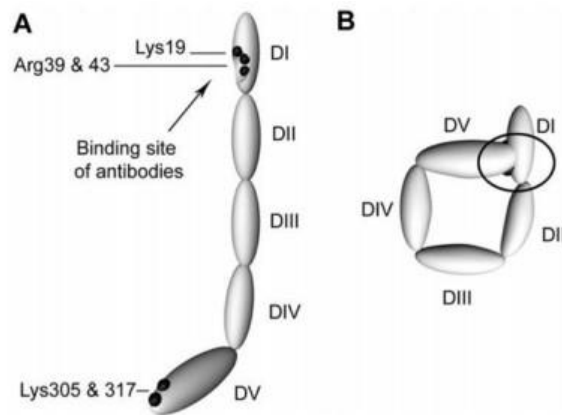
onemocnění pojivové tkáně a syndrom získaného selhání imunity (AIDS). Syntézu aCL může vyvolat také užívání léků, jako jsou beta-blokátory, hydralazin, interferon alfa, fenothiazin, fenytoin nebo omamné látky, jako třeba kokain. [4; 13]

3.2.3 Anti- β 2-glykoprotein I

Několik nezávislých výzkumů uvedlo, že hlavním antigenním cílem aCL protilátek je komplex β 2-glykoproteinu I vázaný na kardiolipin, a nikoliv samotný kardiolipin. V současné době jsou epitopy β 2GPI navázané na negativně nabitě fosfolipidy všeobecně uznávány jako klinicky významný antigenní cíl pro izotypy IgG, IgM, IgA anti- β 2GPI a jsou navrženy jako hlavní antigen v patogenezi autoimunitních onemocnění. [15]

β 2GPI, známý také jako apolipoprotein H, se skládá z pěti homologních domén, kdy doména I je primárním vazebným epitopem pro antifosfolipidové protilátky, ačkoli ostatní domény se mohou rovněž chovat jako epitopy (viz obrázek 2). β 2GPI má také přirozený antikoagulační charakter, který se aktivuje interakcí s fosfolipidovými buněčnými membránami krevních destiček nebo endoteliálních buněk. Toto spolupůsobení vytváří přitažlivý povrch pro autoprottilátky proti β 2GP, které způsobují trombotické stavy. V klinických a laboratorních praxích je běžné stanovovat izotyp IgG anti- β 2GPI individuálně, nebo spolu s protilátkami aCL a/nebo LA pro stanovení diagnózy APS. V poslední době bylo pozitivní testování izolovaných protilátek IgA anti- β 2GPI navrženo jako rizikové pro vytvoření trombózy u APS vedle běžných faktorů. Tento izotyp protilátek byl také zjištěn u žen trpících předčasnými spontánními potraty a úmrtím plodu, ale současně mající negativní výsledky testů na protilátky LA a protilátky izotypu IgG aCL. Další studie prokázaly vyšší asociaci IgA anti- β 2GPI protilátek s cévní mozkovou příhodou a tromboembolickými stavy, spíše než s izotypy IgG nebo IgM. Stále je však

vhodnější provádět jiné dostupné laboratorní testy (ELISA metodou) izotypů IgG a IgM anti- β 2GPI pro kompletní použitelnou a jistou diagnózu APS. [16; 17; 15]



Obrázek 2: Struktura β 2-glykoproteinů I, A-otevřená konformace, B – cirkulární konformace [18]

K prokázání klinického účinku protilátek proti doméně I byly realizovány dvě podobné studie. První studie podpořila roli těchto protilátek u žilní trombózy více než protilátek zaměřených na jiné domény. Tato skutečnost byla prokázána na laboratorních myších, kterým byly aplikovány purifikované IgG protilátky izolované od pacientů s APS. U myší došlo po aplikaci k vytvoření masivnějších trombů. Druhá studie dala do souvislosti protilátky proti doméně I s předčasnými těhotenskými potraty. Nicméně tyto studie musí být podpořeny dalšími experimenty před tím, než budou přiřazeny specifické protilátky proti doméně I β 2GPI do panelu pravidelného screeningu APS. [16]

Antifosfolipidové protilátky mohou také rozpoznávat oxidované povrchy v komplexech s epitopy β 2GPI, což je již komplex lipidů vázajících bílkoviny. Jedním z hlavních oxidovaných povrchů vytvářejících komplex s β 2GPI je oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě (LDL), patologicky se vyskytující při ateroskleróze. Kromě tromboembolických příhod způsobených autoprotiilátkami, mohou tyto komplexy vyvolat vznik předčasného

aterosklerotického kardiovaskulárního onemocnění u pacientů trpících APS nebo SLE. [15]

3.2.4 Antiprotrombinové protilátky

Antiprotrombinové protilátky namířené proti protrombinu jsou dalším typem antifosfolipidových protilátek. Vyskytují se v izotypech IgG a/nebo IgM. Výzkumy, které začínaly již v roce 1959, naznačily, že protrombin (PT, známý také jako faktor II) je kofaktorem LA, dle výsledků vyšetření pacientů se SLE, trpících poruchami srážlivosti krve. Výsledky několika testů in vivo s PT a anti-PT komplexy ve vzorcích s vyšší LA aktivitou vedly k popisu autoprotilátek proti fosfatidylserinprothrombinovému komplexu (anti-PS/PT) u pacientů s pozitivním testem na LA. Detekce těchto autoprotilátek je mnohem specifitější při použití komplexů PS a PT dohromady než použití samotného PT. Také byla zjištěna podobnost mezi PT a β 2GPI, což činí z PT jeden z hlavních antigenních cílů antifosfolipidových protilátek. Primární funkcí izotypu IgG anti-PT protilátek in vitro je vytváření imunokomplexů s PT nebo PL, což má za následek prodloužení času srážlivosti krve. [19; 20]

Několik studií se snažilo najít souvislost mezi anti-PT a klinickými příznaky APS, žádná z nich však nenalezla přesvědčivý důkaz pro potvrzení této souvislosti. Nicméně protilátky izotypu IgG pro PT/PS byly popsány jako specifitější pro diagnózu APS. Pravděpodobně způsobují především žilní trombózu. Ještě méně přesvědčivá je souvislost mezi morbiditou plodu a přítomností anti-PT protilátek zaměřených na protrombin. [19]

3.2.5 Antifosfatidylethanolaminové protilátky

Výše již bylo popsáno více typů antifosfolipidových protilátek jako příčina APS s různými klinickými projevy, relativně novější výzkumy zjistily souvislost mezi příznaky APS a protilátkami primárně zaměřenými proti

fosfatidylethanolaminu (PE). Fosfatidyletanolamin je fosfolipid, tvořící hlavní lipidovou složkou mikrobiálních membrán a ve velké míře se také nachází v mitochondriích. Molekula PE se skládá z kombinace glycerolu esterifikovaného dvěma mastnými kyselinami a kyseliny fosforečné. Fosfátová skupina (záporně nabitá) je vázána na ethanolamin, alkohol s kladným nábojem. Tyto kontrastní náboje charakterizují PE jako typický zwitteriontový PL. Nicméně antifosfatidyletanolaminové protilátky (aPE) tvoří primárně komplexy s PE a různými plazmatickými proteiny z koagulační kaskády. Mezi tyto proteiny patří například faktor XI, prekallikrein a další vysokomolekulární kininogeny. [21; 22]

Klinické studie navrhly testování aPE protilátek u pacientů s negativním laboratorním výsledkem pro kritéria APS, ale s příznaky a projevy silně připomínajícími klinické projevy APS (těhotenské spontánní potraty a/nebo trombózy). aPE byly častější u žen trpících nevysvětlitelnou opakovanou ztrátou těhotenství než u zdravých žen se známou příčinou potratu. Kromě toho nejčastějším typem protilátek APLA u neplodných žen byly právě aPE, které byly zvýšeny až u 67,5 % všech APLA pozitivních pacientek. Laboratorní testování protilátek IgG aCL s IgG aPE nebo IgG aPE s LA (s pozitivním nálezem) se používá také jako prognostický faktor závažné hypertenze vyvolané těhotenstvím. Nedávné studie využívající myši, které byly pasivně imunizované protilátkami proti aPE, vykazaly redukci vrhu, potraty plodu, placentární trombózy, trombocytopenie, obecně řečeno tedy charakteristiky blízké projevům lidského APS. Specificita moderního testování (testy EIA) stoupá na 99,2 % a pomáhá předcházet opakovaným potratům, za použití vhodných léků podaných předem. [21; 22]

Další studie se zaměřily na popis souvislosti mezi přítomností aPE a výskytu trombózy, jakožto další klinické charakteristiky APS. V roce 1992 vyšly pozitivní

nálezů na protilátky aPE u pacientů trpících těžkou trombózou a plicní embolií, s pozitivním LA nálezem. V roce 2001 vyšetření pacientů s u cévní mozkovou příhodou prokázalo aPE jako nejdéle přetrvávající sérologický nález protilátek (v porovnání s protilátkami proti fosfatidylserinu a aCL). U těchto pacientů bylo také podezření na vývoj APS. Laboratorní testy odhalily, že 63 % ze 40 pacientů s pozitivním aPE mělo negativní výsledek v běžných laboratorních kritériích pro APS. Vědci popsali tento typ APS jako séronegativní. Dle podobných klinických projevů séronegativního a séropozitivního APS by diagnóza neměla být výjimečně založena na klasických laboratorních kritériích pro APS. Na základě studií prokazujících přítomnost aPE u pacientů s příznaky APS se uvažuje o zařazení aPE jako dalšího laboratorního nálezu APS. [21; 22]

3.3 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom je získané autoimunitní onemocnění, které bylo popsáno před přibližně 30 lety. Charakteristickým znakem APS je přítomnost přetrvávajících antifosfolipidových protilátek při arteriální a žilní trombóze. Dalším z klinických projevů jsou spontánní potraty u žen nebo, v těžkých případech, i neplodnost. Nejčastějšími místy žilní a arteriální trombózy jsou dolní končetiny a mozková arteriální cirkulace. Trombóza se však může vyskytnout v kterémkoli orgánu. Antifosfolipidový syndrom se může projevit buď samostatně (primární APS), nebo s přidruženým onemocněním SLE (sekundární APS). Jako asi u všech onemocnění, také u APS hrají roli při prognóze vývoje a rozvinutí onemocnění rizikové faktory. Mezi rizikové faktory u APS se řadí:

- věk (muži nad 55 let, ženy nad 65 let),
- kardiovaskulární rizikové faktory (hypertenze, diabetes mellitus, zvýšený LDL nebo snížený HDL cholesterol, mikroalbuminurie),
- špatný životní styl (kouření cigaret, obezita),

- genetické predispozice (rodinná anamnéza předčasného výskytu kardiovaskulárních chorob),
- vrozené trombofilie (především Leidenská mutace faktoru V),
- získané rizikové faktory trombózy (hormonální antikoncepce, nefrotický syndrom, maligní onemocnění, imobilizace, operace). [23]

3.3.1 Kritéria pro diagnózu a klasifikaci antifosfolipidového syndromu

Toto autoimunitní onemocnění je definované jak klinicky, tak laboratorně. Mezinárodní lékařské konvence definují přesná kritéria pro diagnózu a klasifikaci APS. Pro diagnózu APS je nutné splnit minimálně jedno klinické a jedno laboratorní kritérium. [24; 25; 26; 2]

Klinická kritéria:

- Trombóza – alespoň jedna arteriální, žilní nebo malá cévní trombóza v jakémkoli orgánu nebo tkáni, potvrzená histopatologickým vyšetřením, nebo vyhovující zobrazovací metodou.
 - Jeden ze získaných těhotenských stavů:
 - 1) Jeden nebo více potratů morfologicky normálního plodu po 10. týdnu těhotenství; anatomické, genetické a hormonální důvody pro potrat jsou vyloučeny.
 - 2) Jeden nebo více předčasných porodů před 34. týdnem těhotenství, způsobený těžkou placentární insuficiencí nebo těžkou preeklampií.
 - 3) Tři nebo více spontánních potratů před 10. týdnem těhotenství; anatomické, genetické a hormonální příčiny potratu vyloučeny.
- [2; 25; 26]

Laboratorní kritéria (přítomnost ve dvou různých měřeních s odstupem 12 týdnů):

- Pozitivní detekce LA v plazmě.
- Pozitivní detekce aCL protilátek izotypu IgG a/nebo IgM ve středních až vysokých titrech v séru nebo plazmě.
- Pozitivní detekce anti- β 2GPI protilátek izotypu IgG a/nebo IgM v séru nebo plazmě. [2; 25; 26]

Přestože při stanovení APS jsou majoritní výše zmíněné autoprotilátky, mohou být v klinické diagnostice důležité i nekriteriální protilátky. Přítomnost APLA v celkové populaci stoupá až na 5 %, ačkoli k rozvoji APS dochází především u starších osob, u pacientů užívajících léky, při lymfoproliferativních onemocněních a po infekcích (AIDS, syfilis, hepatitida C, malárie atd.).

Organizace AntiPhospholipid Syndrome Alliance for Clinical Trials and International Networking (APS ACTION) systematicky analyzovala publikované studie a dospěla k těmto odhadům obecného rozšíření APLA: 6 % u těhotenské morbidity, 10 % u hluboké žilní trombózy (DVT), 11 % u infarktu myokardu, 14 % u cévní mozkové příhody a 17 % u cévní mozkové příhody u osob ve věku nad 50 let. Observační evropská studie (projekt Euro-Phospholipid) definovala charakteristiky 1000 pacientů s APS, z nichž 82 % tvořily ženy. Většina z pacientů (53,1 %) měla primární APS bez přítomnosti jiného onemocnění. Zbytek měl APS ve spojení s jiným onemocněním, nejčastěji SLE. Ačkoli se APLA vyskytují až u 40 % pacientů se SLE, pouze u 40 % z nich se vyvine APS. Závažnější varianta s rozsáhlou mikrovaskulární trombózou a vysokou morbiditou/mortalitou – katastrofický APS (CAPS) - se vyskytuje u 1 % pacientů s APS. [25]

Při diagnostice APS je třeba vyloučit dalším testováním jiná onemocnění s příznaky blízkými projevům APS. Standardní krevní testy (kompletní krevní obraz, krevní chemické testy, testy krevních enzymů) mohou odhalit alternativní příčinu positivity přítomnosti APLA. Tato nepatologická přítomnost může být způsobena virovými nebo bakteriálními infekcemi, malignitami, koagulopatiemi nebo léky užívanými pacientem. Rychlost sedimentace erytrocytů může poukázat na zánětlivé procesy. Dysfunkce ledvin může rovněž vyvolat produkci APLA, proto je třeba provést vyšetření funkce ledvin, které může vyloučit APS. Imunologické testy na protijaderné protilátky (ANA – z angl. Antinuclear antibody), extrahovatelný jaderný antigen a protilátky proti komplementu 3/4 mohou odhalit SLE jako příčinu produkce APLA. [25]

3.3.2 Katastrofický antifosfolipidový syndrom

Katastrofický antifosfolipidový syndrom (CAPS) je závažný stav, kterým trpí méně než 1 % pacientů s APS. CAPS může být smrtelný a často se vyskytuje během těhotenství. Klasifikační kritéria CAPS zahrnují:

- 1) Mnohočetnou cévní trombózu v nejméně 3 orgánech a/nebo tkáních
- 2) Rozvoj trombotického stavu během jednoho týdne
- 3) Histopatologický průkaz cévní trombózy v nejméně jednom orgánu a/nebo tkáni
- 4) Laboratorní nález antifosfolipidových protilátek typu LA a/nebo aCL v časovém období méně než 12 týdnů

Pro diagnostiku CAPS je nutná přítomnost alespoň tří z výše zmíněných kritérií. [27; 28]

Mezinárodní registr prezentoval statistiky a výskyt u 500 pacientů s CAPS. Více než 70 % pacientů tvořily ženy středního věku, více než 50 % pacientů trpělo

primárním APS a přibližně třetina pacientů trpěla SLE nebo podobným autoimunitním onemocněním. U 50 % pacientů se CAPS vyskytl jako první známka vývoje APS. U většiny pacientů byly přítomny i další faktory rozvoje CAPS, jako jsou infekce, malignity, nebo neplodnost. CAPS bez řádné léčby končí úmrtí ve 44 % případech. [25; 27]

Diagnostika CAPS může být mnohdy komplikovaná vzhledem k podobnosti s jinými trombotickými stavy. Laboratorní nálezy potvrzují pozitivitu APLA, především LA a aCL izotypu IgG. Pacienti mají často trojnásobnou pozitivitou na LA, aCL a anti- β 2GPI. Hematologické stanovení potvrzuje trombocytopenii a prodloužený aPTT u dvou třetin pacientů, při buněčné diferenciaci může dojít k nálezům schistocytů. [27]

Příznaky a symptomy jsou různé, ale u více než tří čtvrtin pacientů s CAPS se vyskytuje selhání ledvin, dalšími častými projevy jsou plicní embolie a akutní respirační tíseň, cévní mozková příhoda a infarkt myokardu. Dále se potom vyskytují obvyklé kožní projevy APS, ke kterým patří livedo reticularis, kožní vředy a nekrózy. CAPS se během těhotenství může vyvinout do mnoha forem, jako je preeklampsie, hemolyticko-uremický syndrom nebo trombotický syndrom, trombocytopenická purpura, které všechny souvisejí s hematologickými poruchami. [25; 27]

Včasná diagnostika a léčba CAPS by měla být nastavena u pacientů s předchozími trombotickými stavy, diagnostikovaným APS nebo jinými autoimunitními onemocněními, u pacientek s opakovanými potraty. Důležité je také identifikovat další faktory, jako jsou infekční agens, aby bylo možné předvídat rozvoj CAPS. Laboratorní stanovení by mělo zahrnovat kompletní krevní obraz s počtem krevních destiček, koagulační testy, imunologické stanovení APLA, popř. stanovení ledvinných nebo jaterních funkčních testů. [27]

Vzhledem k tomu, že CAPS se vyskytuje pouze u 1 % pacientů s APS, jsou doporučení založena na kazuistikách a názorech odborníků a neexistují žádné klinické studie, které by léčbu CAPS usměrňovaly. CAPS zůstává diagnostickou výzvou, protože jeho široká škála klinických příznaků, symptomů a laboratorních nálezů, se často překrývá s jinými porodnickými komplikacemi. [28]

3.3.3 Léčba antifosfolipidového syndromu

Terapie pacientů s APS se může lišit podle závažnosti stavu. Hlavní cíl terapie je odstranění, nebo alespoň redukce, APLA pomocí podávání vysokých dávek steroidů, imunosupresorů a výměny plazmy při závažných stavech. Nicméně 1-3 týdenní pauzy v medikaci způsobují rychlý nárůst titrů protilátek, a proto u běžného APS není imunoterapie indikována. Zvýšení titrů APLA během 6 měsíců po léčbě způsobuje vyšší riziko opakované trombózy, proto jsou pacienti s předchozími trombotickými příhodami odkázáni na celoživotní antikoagulační terapii. [29]

V případě příležitostného nálezu APLA, první trombotické příhody nebo nízkých titrů protilátek jsou podávány antiagregační léky během 3-6 měsíců. Je třeba věnovat pozornost prediktivním faktorům trombózy, jako jsou infekce, perorální kontraceptiva nebo užívání jiných léků. Pacienti s definitivní diagnózou APS dostávají perorální antikoagulancia, jako například heparin, později doplněné nebo nahrazené warfarinem. Warfarin lze užívat také společně s nízkými dávkami aspirinu, nízkomolekulárním heparinem, nebo hydroxychlorochinem, který zabraňuje trombotickým a zánětlivým příhodám u SLE, nebo také se statiny, které snižují riziko žilní tromboembolie. V poslední době klinické studie navrhují zařazení přímého perorálního antikoagulancia. [25; 29]

Pacientky s porodnickým APS a komplikacemi v těhotenství dostávají nízké dávky aspirinu a nízkomolekulární heparin během těhotenství. Pacientky se SLE a APS často dostávají více léků kompatibilních s těhotenstvím, jako jsou kortikosteroidy a hydroxychlorochin. Warfarin se v těhotenství jako lék nebere v úvahu, z důvodu jeho teratogenního účinku. [25]

3.4 Možnosti stanovení antifosfolipidových protilátek

Laboratorní stanovení antifosfolipidových protilátek hraje důležitou roli v diagnostice a včasné léčbě APS. Klasifikační kritéria APS zahrnují jednu nebo více nevysvětlitelných trombotických příhod, jeden nebo více spontánních potratů nebo úmrtí plodu, trombocytopenii nebo prodloužený test srážlivosti. Tyto klinická kritéria by měla být indikací k vyšetření antifosfolipidových protilátek. Proto se kombinace klinických projevů a středně vysokého až vysokého titru perzistentních protilátek používá jako rutinní znak pro diagnózu APS. Je důležité rozlišit podle okolností pacienty s podobnými klinickými kritérii a příležitostným výskytem nepatogenních APLA. [25]

Laboratorní kritéria obsahují dva nepřímé testy ELISA s detekcí protilátek proti kardiolipinu nebo β 2GPI a stanovení LA. Pozitivní laboratorní APS diagnóza se skládá ze dvou nezávislých ELISA testů IgG/M aCL a/nebo IgG/M anti β 2GPI a/nebo stanovení LA. Dvě stanovení se provádějí s odstupem 12 nebo více týdnů a vyžadují přetrvávající titr protilátek. Časový odstup pomáhá vyloučit příležitostný náleznepatogenních protilátek po infekcích, které nemusí nutně souviset s klinickými projevy APS. Stanovení LA se skládá ze dvou testů srážlivosti, diluční test jedu Russellovy zmije závislého na faktoru Xa (dRVVT) a běžněji aPTT, přičemž oba parametry jsou v případě pozitivního nálezu LA prodlouženy. [25; 30]

Jelikož ne všichni pacienti, kteří vykazují klinické příznaky APS, produkují antifosfolipidové protilátky, které jsou uvedeny v současných kritériích pro diagnostiku APS, byly intenzivně zkoumány nové přístupy a možnosti v testování APLA. Uvažuje se o zařazení dalších APLA do laboratorních kritérií pro diagnostiku APS. Některé laboratoře používají test ELISA k detekci nekriteriálních protilátek proti fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu, některým bílkovinám koagulační kaskády, jako je protrombin, nebo k detekci specifické domény (DI) β 2GPI. V poslední době výzkumy použily ELISA metodu pro stanovení IgA aCL spojeného s APS. Tyto specializované metody však vyžadují nákladné komerční soupravy a vysoce purifikovaná činidla, a přesto nejsou validovány v rutinních klinických laboratořích. [25]

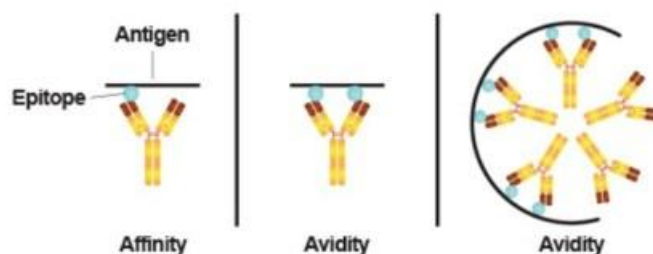
Kromě klasických laboratorních metod, jako je ELISA a aPTT, je na trhu také řada dalších metod vhodných pro stanovení APLA. V poslední době zavedené chemiluminiscenční a fluorescenční enzymové imunoanalýzy jsou automatizované metody, které mohou snížit variabilitu mezi laboratořemi. Nové technologie chemiluminiscence APLA poskytují vysokou citlivost a specifičnost, což napomáhá spolehlivé identifikaci pacientů s APS. Chemiluminiscenční metoda je dvoustupňová a využívá chemiluminiscenční reakci, měřenou jako světelný signál. Koncentrace specifických protilátek ve vzorku pacienta je úměrná generovanému světelnému signálu. [31; 32]

3.5 Avidita

Avidita vyjadřuje sílu vazby, tedy sílu, kterou polyvalentní protilátka interaguje s polyvalentním antigenem. Pojem avidita se často zaměňuje za pojem afinita. Tato záměna je chybná, avšak afinita je s aviditou úzce propojena. Afinita vyjadřuje sílu interakce jednoho vazebného místa s jedním antigenem. Avidita tedy vzrůstá s afinitou a také s počtem současně se uplatňujících vazebných míst. [1; 33; 34]

3.5.1 Avidita protilátek

V biochemii se avidita vztahuje ke kumulované síle více afinit jednotlivých nekovalentních vazebných interakcí, například mezi proteinovým receptorem a jeho ligandem. Běžné je taky označení funkční afinita. Ve vazbě mezi protilátkou (paratopem) a antigenem (epitopem) se uplatňuje několik mezimolekulových vazebných sil, např. relativně slabé nekovalentní interakce, jako jsou vodíkové vazby, elektrostatické síly, hydrofobní síly nebo Van der Waalovy síly. Jak již bylo zmíněno výše, avidita se liší od afinity, která popisuje sílu pouze jediné interakce (obrázek 3). Protože však jednotlivé vazebné události zvyšují pravděpodobnost výskytu dalších interakcí (tj. zvyšují lokální koncentraci každého vazebného partnera v blízkosti vazebného místa), neměla by být avidita chápána jako pouhý součet jejich složkových afinit, ale jako kombinovaný účinek všech afinit účastnících se biomolekulární interakce, jejich hustoty, rozestupu a polyreaktivitě protilátky. Avidita se běžně používá pro interakce protilátek, při nichž dochází k interakci více vazebných míst antigenu s cílovými antigenními epitopy současně. Jednotlivě může být každá vazebná interakce snadno přerušena. Pokud je však přítomno mnoho vazebných interakcí současně, přechodné rozvázání jednoho místa neumožňuje molekule difundovat a vazba této slabé interakce se pravděpodobně obnoví. [33; 35; 34]



Obrázek 3: Rozdíl mezi afinitou a aviditou [36]

Avidita také vypovídá o vyzrálosti protilátek. Při prvním setkání antigenu s organismem se tvoří protilátky s nízkou aviditou. Protilátky s vyšší aviditou se tvoří hojněji v důsledku somatické hypermutace a následné antigenem řízené proliferace vybraných klonů paměťových B buněk. Proto při sekundární odpovědi vznikají imunoglobuliny s průměrnou vyšší aviditou. Analýza avidity IgG je doplňkovým testem, který může rozlišit primární a sekundární expozici antigenu u různých infekčních onemocnění, jako jsou zarděnky, toxoplazmóza a další. [33; 34]

Avidita roste s počtem imunitních setkání také při AO, kdy dochází k produkci autoproti látek. Organismus vnímá tyto autoproti látky jako patogeny. Na rozdíl od infekčních onemocnění není možné v tomto případě přesně oddělit primární a sekundární odpověď a zrání avidity protilátek může být škodlivé. Stanovování avidity autoproti látek ukázalo, že jejich klinické projevy se mohou odvíjet od rozdílné avidity. Bylo naznačeno, že vysokoavidní autoproti látky hrají významnou roli u orgánově specifických autoimunitních onemocnění, zatímco nízkoavidní i vysokoavidní protilátky mohou přispívat k onemocněním zprostředkovaným imunitními komplexy, které nejsou orgánově specifické. Předpoklad je takový, že na počátku je avidita autoproti látek nízká, a s časem se v průběhu onemocnění zvyšuje. Samotné dokončení zrání protilátek se pak může projevit propuknutím autoimunitního onemocnění. Zrání protilátek z nízkých do vyšších hodnot v průběhu onemocnění není vždy shodné, a může být ovlivněno mnoha faktory, které se však u jednotlivců mohou lišit. Tento předpoklad byl demonstrován u protilátek proti citrulinovaným proteinům u pacientů s revmatoidní artritidou. Zatímco u většiny pacientů ve stadiu před onemocněním docházelo pouze k omezenému vyzrání avidity, u malé skupiny docházelo k podstatnému vyzrání avidity. [33]

Různorodost protilátek se může kromě rozličné antigenní specifity projevovat také různou aviditou. Ta je významnou charakteristickou vlastností protilátek, která popisuje celkovou sílu vazebných interakcí mezi protilátkou a antigenem. Avidita protilátek se dříve zkoumala u protilátek namířených proti infekčním agens s cílem zhodnotit vyzrávání jejich avidity spojené se zvyšováním specifické humorální imunity. Na rozdíl od antiinfekčních protilátek mohou avidity autoprotilátek dosahovat různých hodnot. U autoimunitních onemocnění se popisuje vysoká, nízká nebo střední avidita autoprotilátek. Nicméně se předpokládá, že bez ohledu na aviditu se autoprotilátky mohou podílet na patogenezi některých autoimunitních onemocnění. [37]

3.5.2 Metody stanovení avidity

Existuje několik laboratorních postupů stanovení avidity, respektive afinity. Obvyklé techniky v klinických laboratořích nejčastěji využívají imunitní testy na pevné fázi. Avidita se nejčastěji měří pomocí enzymatického imunisorbentního testu ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), při kterém chaotropní činidla rozrušují interakce, mezi antigenem a protilátkou. Toto uspořádání ELISA však neumožňuje měření skutečné rovnovážné disociační konstanty, jelikož antigeny a protilátky jsou v jednotlivých oddělených fázích. Z tohoto důvodu byl zaveden pojem tzv. relativní avidita. Ta se vypočte jako rozdíl mezi prvotní vazbou protilátek na daný antigen za fyziologické koncentrace soli s vazbou po vystavení imunokomplexu působení chaotropních látek a narušení vazby. Naměřené a vypočtené hodnoty testů avidity metodou ELISA se dobře shodují s výsledky exaktnějšího měření, získané analýzou biospecifických interakcí nebo rovnovážnou dialýzou. [33]

V literatuře jsou podrobně zdokumentovány dva postupy stanovení. První možností je tzv. preventivní princip, při kterém se do ředícího roztoku, kterým se ředí sérum, přidávají chaotropní činidla. Tento krok je zde, aby se předešlo

navázání nízkoavidních protilátek na antigeny přítomné na pevné fázi (ředící/diluční princip). Častěji se však používá spíše druhý postup stanovení. Tento postup zahrnuje další krok navíc, který následuje po vytvoření imunokomplexů specifických protilátek a antigenů potažených na dně mikrotitračních jamek. Během tohoto dodatečného kroku jsou k vzniklým imunokomplexům antigen-protilátka přidány chaotropní látky prostřednictvím promývacího pufru, v kterém jsou přítomné (vymývací/eluční princip). Při tomto kroku jsou vazby mezi protilátkami s nízkou aviditou s antigeny lehce narušeny chaotropními činidly, zatímco protilátky s vysokou aviditou zůstávají i po vystavení chaotropním činidlům navázané na antigeny. Nízkoavidní protilátky, které se odpoutaly z imunokomplexu s antigenem, se eluují z jamek před kvantifikací protilátek, které zůstaly navázané na antigeny. Tato metoda se někdy označuje jako "bind and break" ELISA. [23; 33]

Tento základní metodický přístup lze různě modifikovat. Rozdílné chaotropní látky mají různé vlastnosti, co se týče narušování imunokomplexů. Obecně lze říci, že chaotropní látky usnadňují disociaci imunitních komplexů při ELISA. Jako chaotropní činidla se používá například močovina, thiokyanatan amonný, chlorid sodný nebo guanidin-hydrochlorid. Zdá se, že síla potřebná k přerušení vazby, se odvíjí od zkoumaného antigenu a jeho specifických protilátek. Další modifikace testů avidity ELISA spočívají v jiném ředění analyzovaných protilátek nebo v jiné koncentraci přidávaných chaotropních látek. Jeden z postupů je založen na stanovení avidity při konstantní koncentraci chaotropního činidla za rozdílného ředění protilátek. Alternativou k tomuto postupu je použití séra s jednotnou koncentrací, ke kterému jsou přidávány chaotropní činidla o různé koncentraci. [33]

Také klinické studie, zaměřené na stanovení avidity APLA, zvolily testování metodou ELISA s použitím chaotropních látek k rozrušování interakcí

v imunitních komplexech. Jako chaotropní látky se používala močovina nebo NaCl. Co se použití močoviny týče, byla séra testována zároveň v sériových ředěních za využití chaotropního činidla, a naopak zcela bez přídavku močoviny. Při těchto studiích byl také zaveden termín tzv. reziduální (zbytková) aktivita. Přesná definice tohoto termínu je ředění séra po ošetření močovinou vyjádřené v procentech zředění séra bez přidání močoviny, odpovídající stejné absorbanci. Větší reziduální aktivita signalizuje vyšší aviditu aCL. Rozlišení vysoce a nízké avidních anti- β 2GPI protilátek bylo provedeno srovnáním hodnoty původní vazby protilátek za přítomnosti 0,15 mol/l NaCl s vazbou zjištěnou při koncentraci 0,5 mol/l NaCl. Pokud vazba protilátek v imunokomplexech za přítomnosti 0,5 mol/l NaCl byla vyšší než 65 % původní vazby, byly protilátky anti- β 2GPI prohlášeny za protilátky s vysokou aviditou. Jestliže se vazba za přítomnosti 0,5 mol/l NaCl snížila na nebo pod hodnotu 25 % počáteční vazby, byly protilátky klasifikovány jako nízkoavidní. Pokud protilátky ani jedno z těchto kritérií nesplnily, byly klasifikovány jako protilátky s tzv. heterogenní aviditou. [23; 33]

Nejpřesnější postupy analyzují biospecifické interakce mezi epitopy a paratopy pomocí rovnovážné dialýzy nebo velmi sofistikované fyzikální metody povrchové plazmonové rezonance (SPR). První metoda pro odhad afinity protilátek byla metoda rovnovážné dialýzy. Bohužel použití této metody se nyní omezilo pouze na difúzní malé antigeny nebo hapteny. SRP je vysoce citlivá technika, která umožňuje studovat jak asociační, tak disociační kinetiku interakcí antigen-protilátka. Tato technika je však nákladná a není běžně dostupná. [33]

3.5.3 Avidita antifosfolipidových protilátek

Doposud se v klinických studiích hodnotila z většiny avidita APLA izotypu IgG. Pro první klinické studie se k rozrušení interakcí mezi antigenem

a protilátkou používala jako chaotropní činidlo močovina. Tyto studie odhalily, že protilátky anti- β 2GPI a/nebo protilátky proti komplexu kardiolipinu a β 2GPI, získané od pacientů s diagnózou antifosfolipidového syndromu, mají vysokou odolnost vůči působení močoviny, v porovnání se séry pacientů s jiným AO. Vysokoavidní protilátky byly zjištěny u 30 % pacientů trpících APS nebo SLE. Na druhou stranu protilátky s nízkou aviditou byly detekovány u pacientů trpících malárií, syfilis či syndromem získané imunodeficiencie. [23]

Čučník a kol. provedli stanovení avidity séra po vystavení působení NaCl o postupně se zvyšující koncentraci (0,15, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 a 6 mol/l). Rozdělení anti- β 2GPI na protilátky s nízkou a s vysokou aviditou byl určen srovnáním původní avidity protilátek v přítomnosti 0,15 mol/l NaCl s aviditou naměřenou při koncentraci 0,5 mol/l NaCl. Jak již bylo zmíněno výše, protilátky anti- β 2GPI s aviditou vyšší než 65 % původní hodnoty byly označeny za vysokoavidní, a protilátky s aviditou nižší než 25 % počáteční hodnoty byly označeny za nízkoavidní. Tato studie naznačila, že ani vysoká hustota antigenu, ani vysoká avidita protilátek sama o sobě nestačí k vazbě anti- β 2-GPI protilátek na β 2-GPI. I přesto však výsledky studie označily vysokoavidní anti- β 2-GPI protilátky jako klinicky významnější než protilátky s nízkou aviditou. Hustota antigenu není tak důležitá pro vysokoavidní protilátky charakterizované převážně monovalentní vazbou. Předpoklad byl, že pro rozpoznání β 2GPI polyklonálními anti- β 2GPI protilátkami jsou nutné určité konformační modifikace a následně exponované neoepitopy. Multicentrické výzkumy také určily jasnou spojitost mezi přítomností vysokoavidních anti- β 2-GPI protilátek a porodnickými obtížemi. Ve skupině pacientek s porodnickými komplikacemi se stanovenou vysokou aviditou protilátek byl vyhodnocen statisticky významný rozdíl v závažnosti komplikací, oproti pacientkám s přítomností nízkoavidních protilátek. Díky těmto studiím by se v dohledné budoucnosti mohla avidita stát jedním z klasifikačních kritérií při diagnóze APS. [23; 33]

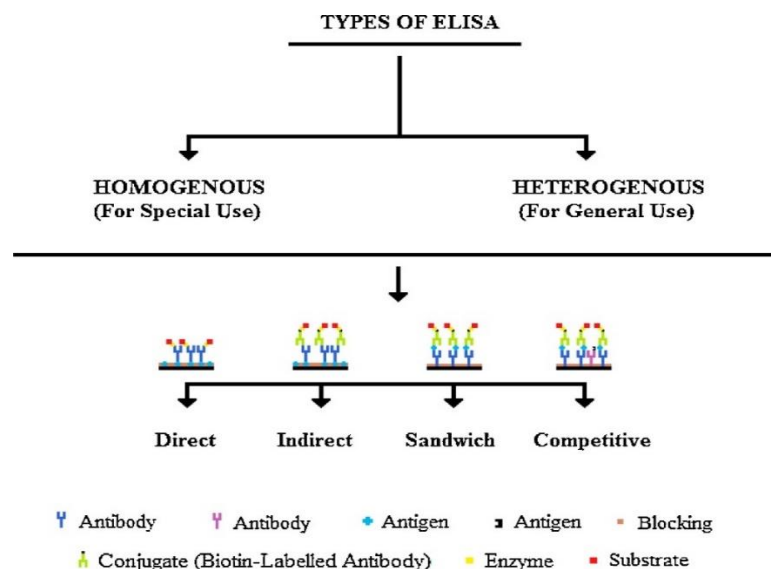
4 METODIKA

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, pro stanovení protilátek v patientském séru se nejčastěji využívají imunologické testy ELISA. Patogenitu protilátek definuje nejen jejich hladina, ale ovlivňují ji také kvalitativní vlastnosti, jako jsou afinita a avidita. Pro stanovení avidity, která popisuje vazebnou sílu v imunokomplexu, se používají nejčastěji imunoanalytické metody, jako je právě ELISA. [23]

4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Snad nejpoužívanějšími metodami v imunologické laboratoři jsou enzymové metody využívající imunotesty, jako jsou enzymatické imunoanalýzy (EIA), především enzymově vázané imunosorbentní testy (ELISA). Tyto kvantitativní analytické metody poskytují přesné měření molekul s velmi nízkou koncentrací, jako jsou peptidy, proteiny, hormony, vitaminy atd. v různých biologických tekutinách. Uvedené metody využívají specifickou reakci mezi antigenem a protilátkou v přítomnosti enzymu. Reakce antigenu a protilátky je vizualizována reakcí enzymového konjugátu a enzymového substrátu. [38]

Enzymatické imunoanalytické metody se dělí na dvě obecné skupiny: homogenní enzymatické imunoanalytické metody a heterogenní enzymatické imunoanalytické metody (obrázek 4). U homogenních enzymatických imunoanalytických metod se enzymy inaktivují, když se navážou na protilátku, a proto neexistuje fáze (promývací), kdy se antigen odděluje od média. Homogenní enzymatická imunoanalytická metoda se obvykle používá k měření látek v malých množstvích, jako jsou léky. Tato metoda je nákladná a má nízkou citlivost. [38]



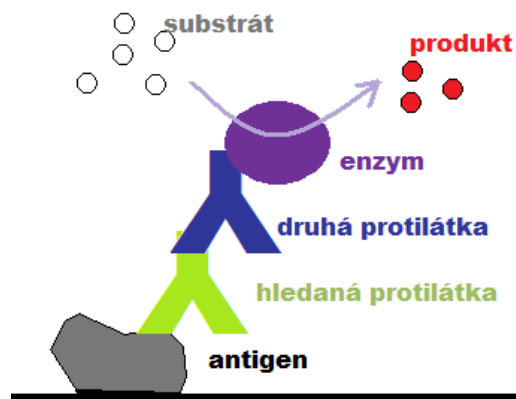
Obrázek 4: Typy ELISA [38]

U heterogenní enzymatické imunoanalytické metody je antigen nebo protilátka vázán na pevnou fázi. Jako pevná fáze se používají zkumavky a mikrotitrační destičky nebo proužky z polystyrenu, polyvinylu a polypropylenu. Při této metodě se imunokomplex antigen-protilátka váže na pevnou fázi, aby se zabránilo interferenci jakékoliv molekuly v médiu po navázání antigenu a protilátky. Vše ostatní kromě komplexu se z média odstraní promytím. Tedy obecně řečeno, v heterogenních metodách enzymatické imunoanalýzy je nezbytné mít promývací fázi. Protože heterogenní metoda je citlivější než homogenní, používá se častěji. Jelikož struktura a vlastnosti měřených látek nejsou vždy stejné, byla vyvinuta řada typů ELISA, aby se zvýšila specifičnost měření. Podrobněji bude popsána ELISA metoda pro stanovení protilátek. [38]

4.1.1 ELISA metoda pro stanovení protilátek

Tato imunologická metoda využívá tvorbu imunokomplexů jako východisko pro vysoce citlivou detekci protilátek (viz obrázek 5). Předem známý antigen je potažen na pevné fázi (např. dno mikrotitrační jamky). Do jamky mikrotitrační

destičky je aplikován zkoumaný vzorek (nejčastěji sérum) obsahující specifické protilátky. Následuje promytí, při kterém jsou z jamky vymyty nenavázané složky vzorku. Po promytí je do jamky aplikován enzymem značený antiglobulin, tzv. konjugát, což je známá zvířecí protilátka proti lidskému imunoglobulinu. Následuje další promytí, po kterém je do jamky přidán substrát. Jeho přeměnu katalyzuje enzym ze značeného konjugátu. Tato reakce zajišťuje barevnou změnu, jejíž výsledná intenzita je úměrná koncentraci hledané protilátky. Následuje stanovení výsledků ve spektrofotometru při vlnových délkách 400–600 nm v závislosti na vlastnostech použitého konjugátu. [39]



Obrázek 5: Schéma ELISA metody pro stanovení protilátky [40]

4.2 ELISA metoda pro stanovení antifosfatidylethanolaminových protilátek

Bylo provedeno stanovení avidity aPE IgG ve směsných kontrolních sérech a preparátu IVIG (intravenózní imunoglobuliny) o různých koncentracích (ředění 10×, 25×, 50×, 100×, 200× a 400×) za použití NaCl o různých koncentracích (0,5 mol/l, 1 mol/l, 2 mol/l, 3 mol/l a 4 mol/l) a urey o různých koncentracích (1 mol/l, 2 mol/l, 4 mol/l, 6 mol/l a 8 mol/l) jakožto chaotropních činidel. Dále byla stanovena avidita u osmi vzorků pacientů při dvou různých ředěních (25× a 50×).

Při tomto měření byla jako chaotropní činidla použita urea, v tomto případě však jen o dvou různých koncentracích (4 mol/l a 6 mol/l).

4.2.1 Použité pomůcky a přístroje:

- Kádinky skleněné;
- Zkumavky skleněné;
- PES (polyesterová vlákna) fólie;
- Mikrotitrační stripy zasazené do rámečku Polysorp (Nunc, Dánsko);
- Analytické váhy SI-234 (Denver Instruments, USA);
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo);
- Vortex V-1 plus (Biosan, Litva);
- Magnetická míchačka (Lavet, ČR);
- pH metr (Denver Instruments, USA);
- Termotřepačka na mikrodestičky (Biosan, Litva);
- Odsávačka/aspirátor (Biosan, Litva);
- ELISA-reader (Tecan, Švýcarsko);

Chemikálie:

- Antigen Phosphatidylethanolamin 10 mg/1 ml (Sigma-Aldrich, Merck, Německo);
- Hovězí sérum (Biosera, Francie);
- Kyselina sírová (2 mol/l) (Penta, ČR);
- NaH_2PO_4 , NaHPO_4 (Penta, ČR);
- NaHCO_3 (Penta, ČR);
- NaCl , KCl (Penta, ČR);
- Substrát TMB (TestLine, ČR);
- Sekundární protilátka proti lidskému Fc IgG konjugovaná s peroxidasou kozí (ředění 1:5000) (Southern Biotech, USA);

- Urea (Mr 60) (Lachner, ČR);

Roztoky:

- 10% hovězí sérum v PBS;
- Promývací roztok (PBS o pH 7,4);
- Roztoky PBS (pH 7,4) – různá koncentrace NaCl;

4.2.1.1 Použité komerční preparáty pro testování avidity

Kiovig (Baxter AG, Rakousko)

KIOVIG 100 mg/ml, infuzní roztok je vyroben z plazmy lidských zdravých dárců. Jeden ml obsahuje 100 mg normálního lidského imunoglobulinu o čistotě nejméně 98 % IgG.

Kontrolní sérum Lyonorm Human P (Erba Lachema, ČR)

Kontrolní sérum Lyonorm Hum P je lyofilizované kontrolní sérum založené na humánním séru s koncentracemi většiny analytů v patologickém rozsahu. Celkový obsah proteinu činí 77,1 - 104,1 g/l. Pro použití se musí lyofilizované sérum promíchat s destilovanou vodou. Toto kontrolní směsné sérum bylo vyrobeno ze séra lidských zdravých dárců.

Proteinového kontrolní sérum Biosystems (Španělsko)

Toto lyofilizované lidské sérum obsahuje plazmatické proteiny v koncentracích vhodných pro kontrolu kvality v klinické laboratoři. Sérum neobsahuje konzervační látky, které by mohly interferovat při testování. Pro použití se musí lyofilizované sérum promíchat s destilovanou vodou.

4.2.2 Pracovní postup

První den

První den stanovení je spíše přípravného charakteru. Provádí se navázání komerčně dodávaných známých antigenů na dna jamek mikrotitračních stripů zasazených do rámečku. Jedná se o antigen PE o koncentraci 50 µg/ml. Do každé z jamek se napipetuje 50 µl tohoto antigenu, všechny stripy se poté promíchají krouživým pohybem na stole. Odkryté stripy v rámečku se pak inkubují přes noc v lednici při 4 °C.

Druhý den

Před začátkem měření je nejprve potřeba nechat reagentie vytemperovat na pokojovou teplotu 20-25 °C, jelikož se uchovávají v lednici. Dále je třeba rozmrazit vzorky sér, které se do vyšetření skladují v mrazáku v polypropylenových mikrozkuvkách při teplotě -80 °C. Podle předem provedených výpočtů jsme naředili analyzované vzorky v poměru 1:25 a 1:50. V případě kontrolních sér jsme provedli ředění 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 a 1:400.

Enzymová imunoanalýza byla provedena na mikrotitračních stripech zasazených do rámečku o 96 jamkách. Vzorky pacientů byly napipetovány v tripletu, kontrolní séra a preparát IVIG se pipetovala v dubletu. Postup byl však pro patientská séra i kontrolní séra stejný:

- 1) Jamky potažené antigenem jsme 2× promyli 100 µl promývacího roztoku PBS.
- 2) Po promytí jsme do stripů aplikovali vždy 150 µl blokovacího roztoku (10% hovězí sérum), abychom dodatečně zablokovali zbylá místa na dně jamky, kam se nenavázal antigen.
- 3) Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 60 minut.

- 4) Po inkubaci jsme stripy opět promyli 280 μ l promývacího roztoku. Při tomto kroku se vymyl nenavázaný blokovací roztok.
- 5) Dále jsme provedli nanesení vzorků, naředěných 10% hovžím sérem. Do každé jamky jsme nanесли dle rozpisu 100 μ l různě naředěného vzorku, mikrotitrační stripy jsme promíchali krouživým pohybem, zakryli PES folií a sklíčkem a dali inkubovat na jednu hodnu do termotřepačky při 22°C.
- 6) Po vyjmutí z termotřepačky jsme 3× promyli všechny jamky mikrotitrační destičky 280 μ l promývacího roztoku. Následně jsme odsáli zbytky promývacího roztoku hřebínkem aspirátoru.
- 7) Po tomto kroku jsme přistoupili k aplikaci chaotropních činidel (NaCl nebo urey), potřebných k přerušení interakce mezi antigenem a protilátkou. Dle rozpisu jsme do každé jamky napipetovali 100 μ l denaturačního činidla o různé molární koncentraci.
- 8) Mikrotitrační stripy jsme poté inkubovali 10 minut při laboratorní teplotě.
- 9) Následovalo opět čtyřnásobné promytí 280 μ l PBS promývacím roztokem.
- 10) Po důkladném promytí jsme do jamek nanесли vždy 100 μ l roztoku konjugátu.
- 11) Mikrotitrační destičku jsme zakryli PES fólií a víčkem, vložili ji do termotřepačky a nechali jednu minutu promíchat při 300 rpm. Stripy jsme zde nechali ještě jednu hodinu inkubovat při 22 °C.
- 12) Po inkubaci následovalo 4× promytí jamek 280 μ l promývacího roztoku.
- 13) Dále jsme aplikovali vždy 100 μ l substrátu (TMB) na jamku, mikrotitrační stripy jsme lehce promíchali a zakryli víčkem a alobalem, abychom obsah chránili před světlem.
- 14) Takto chráněné stripy jsme nechali inkubovat 20 minut při laboratorní teplotě.

- 15) Po inkubaci jsme aplikovali zastavovací roztok, v našem případě H_2SO_4 o koncentraci 2 mol/l, vždy 100 μl /jamku.
- 16) Po tomto závěrečném kroku jsme destičku přesunuli do ELISA-readeru od firmy Tecan a změřili absorbanci při vlnové délce 450 nm. Výsledky jsme následně dále zpracovali a vyhodnocovali v programu u Microsoft Office Excel 365.

5 VÝSLEDKY

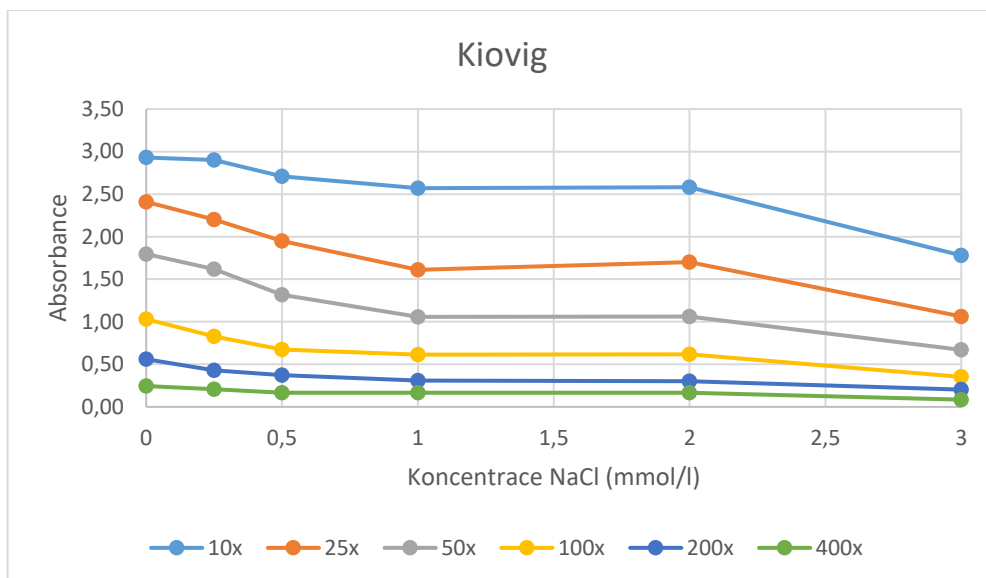
V rámci praktické části této bakalářské práce bylo provedeno stanovení avidity aPE IgG kontrolních směsných sér (Lyonorm Human P a Biosystems) a preparátu Kiovig. Dále byla stanovena avidita osmi sér pacientů léčených pro trombózy, kteří byli zařazeni do širší studie schválené etickou komisí a pacienti podepsali informovaný souhlas. Vazebné interakce mezi antigenem a protilátkou jsme při stanovování narušovali chaotropními činidly, vždy buď NaCl nebo ureou v různých koncentracích. Pro vzorky byl následně vypočítán index avidity (AI), a to jako procento protilátek, které zůstalo navázaných na antigeny po vystavení účinku chaotropního činidla. Hodnota absorbance v jamkách stripu bez chaotropního činidla byla brána jako 100 %.

Bylo provedeno také statistické zpracování výsledků měření patientských vzorků. Byl proveden Wilcoxonův párový dvouvýběrový test a Mann-Whitneyův test při hladině významnosti $\alpha=0,05$. Ke statistickému zpracování byl použit program Microsoft Office Excel 365 a MedCalc Software (Ostend, Belgie).

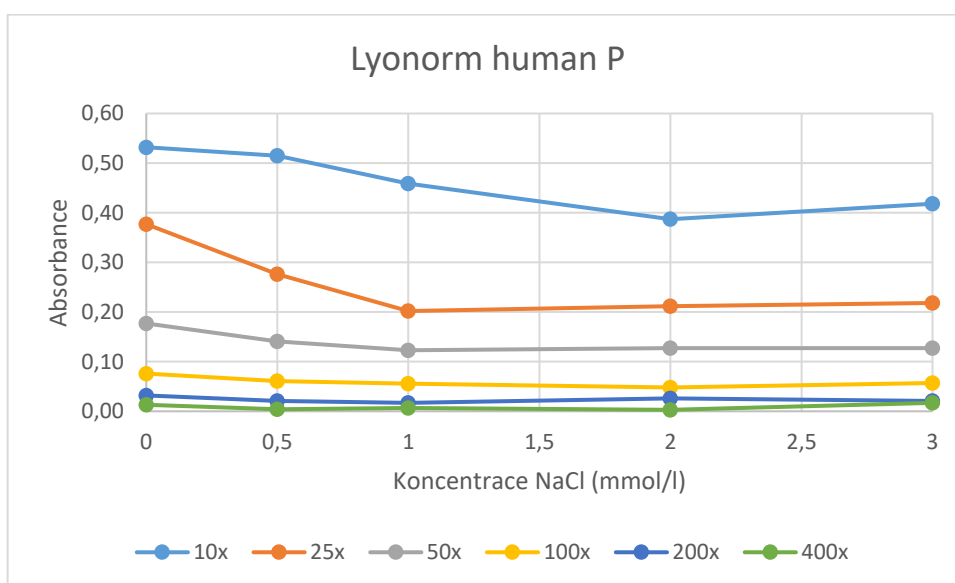
5.1 Měření kontrolních sér

5.1.1 NaCl jako chaotropní činidlo

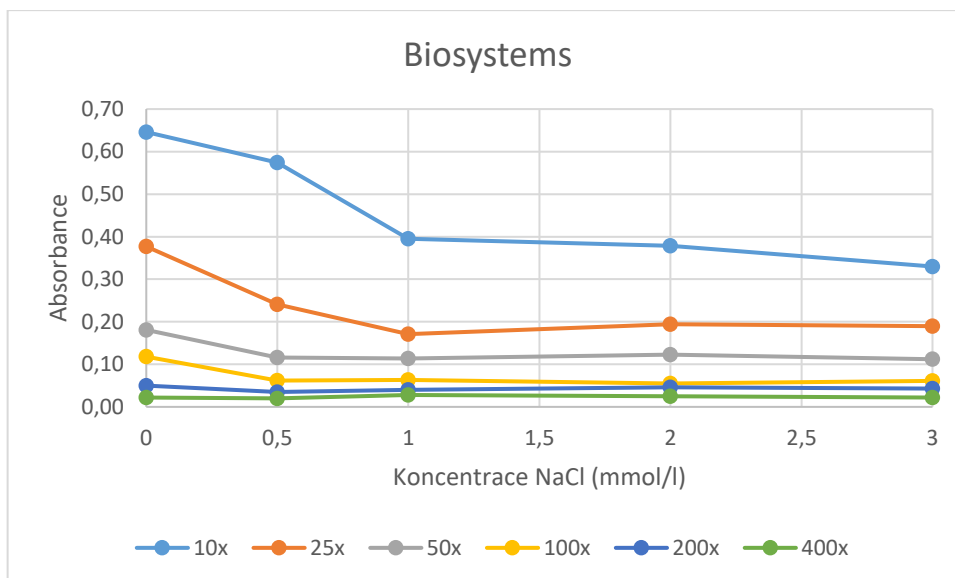
Obrázky 6-8 zachycují v grafu průběh absorbancí u různě ředěných směsných sér a Kiovigu v prostředí chaotropního činidla NaCl o stoupající koncentraci. U méně zředěných vzorků (ředění 10×, 25×, 50×, popř. 100×) je patrný převážně klesající trend absorbancí při stoupajících koncentracích NaCl.



Obrázek 6: Graf závislosti absorbance na koncentraci NaCl pro preparát Kiovig [vlastní zdroj]



Obrázek 7: Graf závislosti absorbance na koncentraci NaCl pro kontrolní sérum Lyonorm human P [vlastní zdroj]



Obrázek 8: Graf závislosti absorbance na koncentraci NaCl pro kontrolní sérum Biosystems [vlastní zdroj]

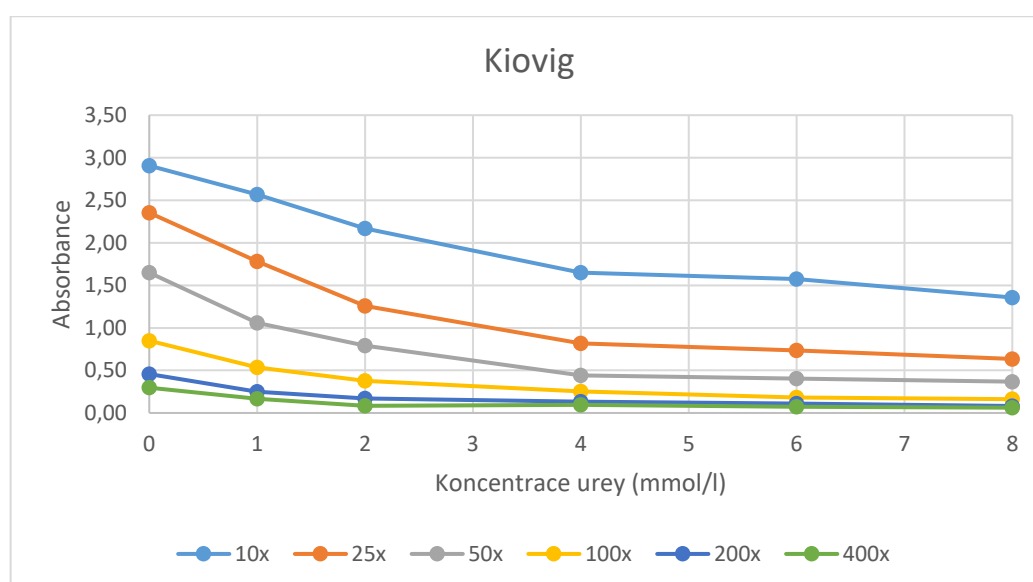
V tabulce 2 jsou uvedeny vypočtené hodnoty AI aPE pro kontrolní séra a Kiovig o rozdílných koncentracích v prostředí chaotropního činidla NaCl. Pro porovnání byla zvolena koncentrace chaotropního činidla 0,5 mol/l a 3 mol/l, tedy nejnižší a nejvyšší použitá koncentrace. U Kiovigu byl rozdíl AI signifikantní ($p=0,02$), zatímco u kontrolních sér byly rozdíly nižší, nesignifikantní. Při ředění sér 400× vycházely absorbance příliš nízké, a tedy mohly být naměřeny nepřesné hodnoty.

Tabulka 2: Porovnání indexů avidity různých kontrolních sér a Kiovigu za použití NaCl jako chaotropního činidla o různé koncentraci (0,5 mol/l a 3 mol/l) [vlastní zdroj]

Ředění vzorku	Indexy avidity kontrolních sér a Kiovigu s NaCl (%)					
	Kiovig		Lyonorm human P		Biosystems	
	0,5 mol/l NaCl	3 mol/l NaCl	0,5 mol/l NaCl	3 mol/l NaCl	0,5 mol/l NaCl	3 mol/l NaCl
10×	92,5	60,7	96,8	78,6	88,9	51,1
25×	81,0	44,1	73,2	57,8	63,9	50,4
50×	73,4	37,3	79,7	71,8	64,1	61,9
100×	65,4	34,2	80,3	75,0	52,5	51,7
200×	66,8	36,3	65,6	65,6	70,0	86,0

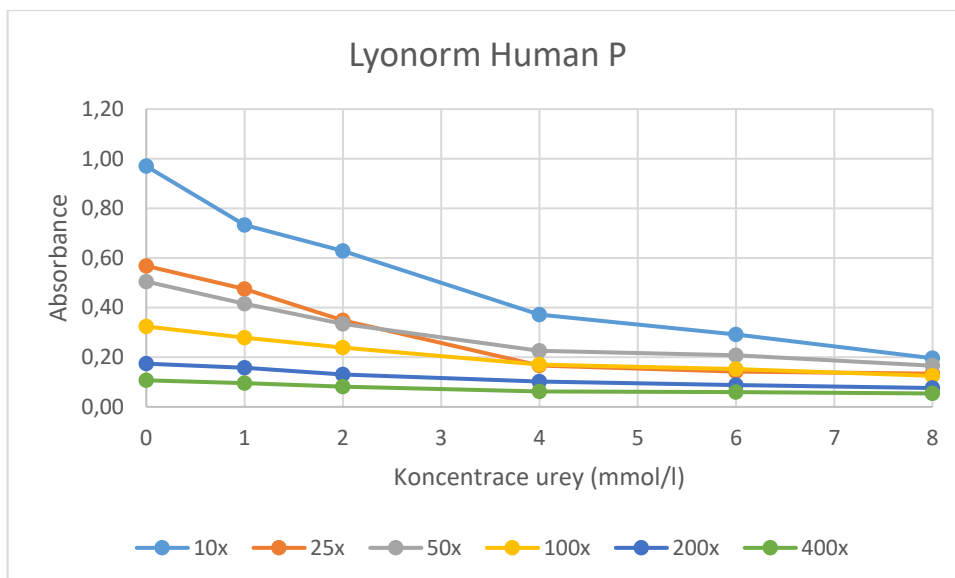
5.1.2 Urea jako chaotropní činidlo

Obrázky 9-11 zachycují v grafu průběh absorbancí u různě ředěných směsných sér a Kiovigu v prostředí chaotropního činidla urey o stoupající koncentraci. U vzorků s vyšší koncentrací je (ředění 10×, 25×, 50×, event. 100×) je rovněž patrný klesající trend absorbancí při stoupajících koncentracích chaotropního činidla.

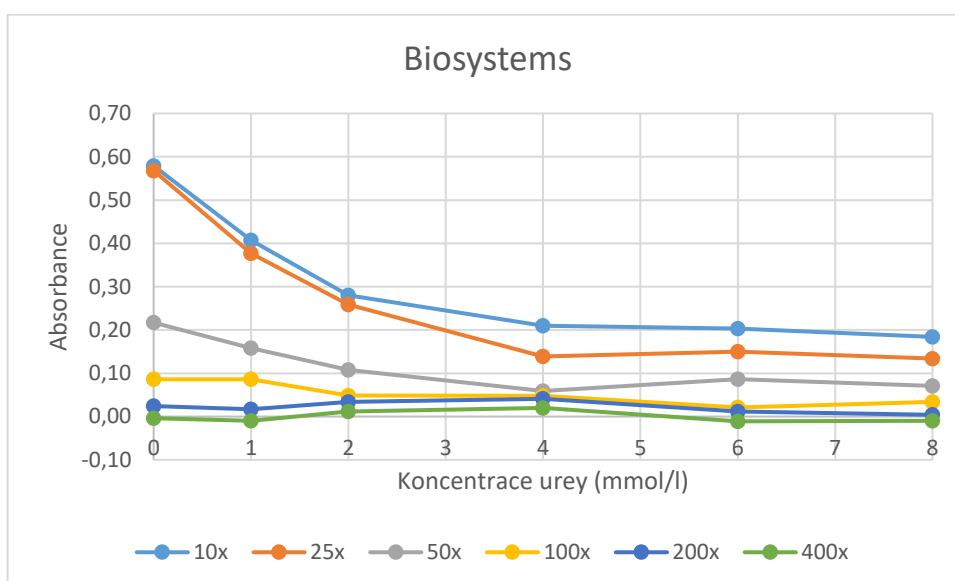


Obrázek 9: Graf závislosti absorbance na koncentraci urey pro preparát Kiovig

[vlastní zdroj]



Obrázek 10: Graf závislosti absorbance na koncentraci urey pro kontrolní sérum Lyonorm human P [vlastní zdroj]



Obrázek 11: Graf závislosti absorbance na koncentraci urey pro kontrolní sérum Biosystems [vlastní zdroj]

V tabulce 3 jsou uvedeny vypočtené hodnoty indexu avidity aPE pro kontrolní séra a Kiovig o rozdílných koncentracích v prostředí chaotropního činidla urey. Pro porovnání byly zvoleny nejnižší a nejvyšší použité koncentrace

chaotropního činidla 1 mol/l a 8 mol/l. V případě použití urey jako chaotropního činidla byl u obou testovaných směsných sér i Kioviu pozorován signifikantní pokles hodnoty indexu avidity při vyšší koncentraci chaotropního činidla (Kiovig: $p=0,038$; Lyonorm human P a Biosystems: $p=0,043$). Při ředění sér 400× vycházely rovněž velice nízké absorbance a AI v nich nebyl proto hodnocen.

Tabulka 3: Porovnání indexů avidity různých kontrolních sér a Kioviu za použití urey jako chaotropního činidla o různé koncentraci (1 mol/l a 8 mol/l)

[vlastní zdroj]

Ředění vzorku	Indexy avidity kontrolních sér a Kioviu s ureou (%)					
	Kiovig		Lyonorm human P		Biosystems	
	1 mol/l urea	8 mol/l urea	1 mol/l urea	8 mol/l urea	1 mol/l urea	8 mol/l urea
10×	88,4	46,7	75,6	20,2	70,3	31,8
25×	75,7	27,0	83,6	23,6	66,4	23,6
50×	64,3	22,3	82,2	32,9	72,8	32,7
100×	62,9	19,1	86,1	38,6	100,0	39,5
200×	54,9	17,9	90,8	43,7	70,8	16,7

V tabulce 4 jsou vypočteny hodnoty indexů avidity aPE pro různá použitá kontrolní séra a Kiovig v chaotropním prostředí urey o koncentraci 4 mol/l a 6 mol/l. Tyto koncentrace byly zvoleny pro výpočet kvůli porovnání výsledků s výsledky vzorků pacientů, jež byly vystaveny působení urey o stejné koncentraci. V tabulce jsou uvedeny hodnoty indexu avidity pouze pro vzorky ředěné 25× a 50×, ze stejného důvodu jako zvolení koncentrace chaotropního činidla.

Tabulka 4: Porovnání hodnot indexů avidity kontrolních sér a Kiovigu po přidání urey (4 mol/l a 6 mol/l) [vlastní zdroj]

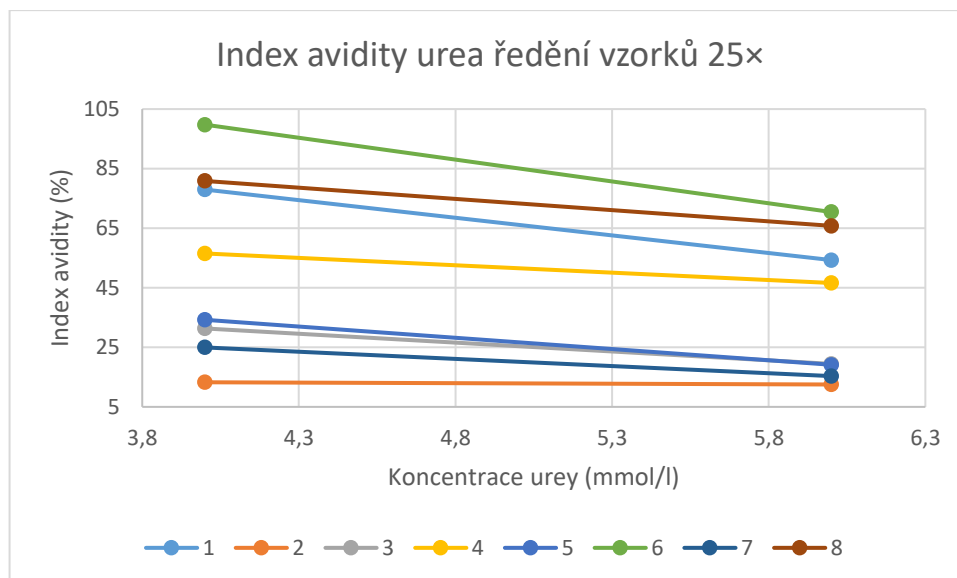
Ředění vzorku	Index avidity kontrolních sér a Kiovigu pro ureu 4 mol/l (%)			Index avidity kontrolních sér a Kiovigu pro ureu 6 mol/l (%)		
	Kiovig	Lyonorm hum P	Biosystems	Kiovig	Lyonorm hum P	Biosystems
25×	34,8	29,4	24,5	31,2	25,0	26,4
50×	26,7	44,8	27,2	24,5	41,2	39,6

5.2 Měření vzorků pacientů

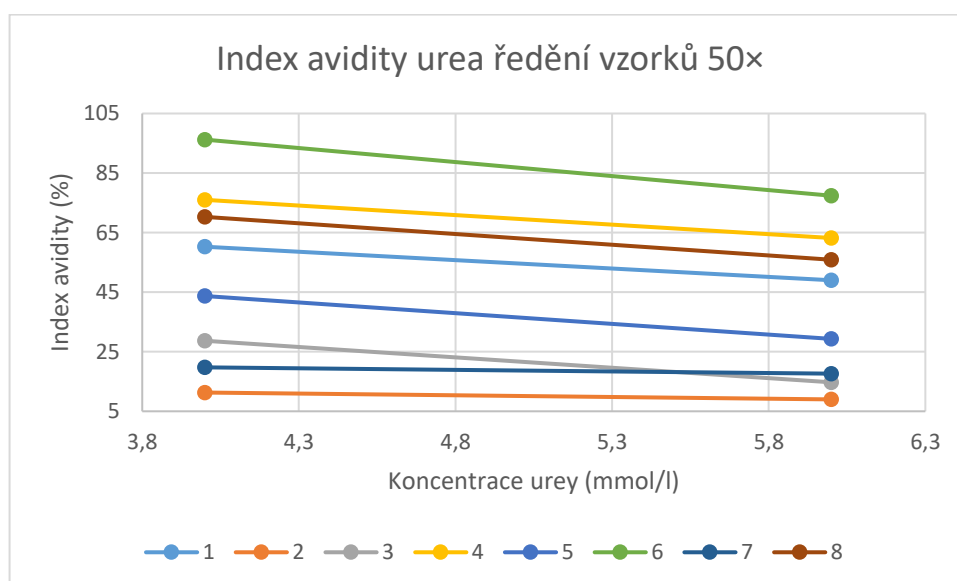
Na základě výsledků měření avidity při testování směsných sér a Kiovigu byly vzorky pacientů testovány za použití urey jako chaotropního činidla, jelikož séra v prostředí chaotropního NaCl nevykazovala signifikantní pokles avidity.

Tabulka 5: Srovnání indexů avidity (AI) patientských vzorků při různém ředění a různé koncentraci urey [vlastní zdroj]

Číslo vzorku	Index avidity urea ředění 25× (%)		Index avidity urea ředění 50× (%)	
	4 mol/l	6 mol/l	4 mol/l	6 mol/l
1	78,0	54,3	60,3	49,0
2	13,3	12,5	11,3	9,0
3	31,3	19,4	28,7	14,7
4	56,5	46,6	76,0	63,2
5	34,2	19,1	43,7	29,3
6	99,8	70,4	96,2	77,4
7	25,0	15,3	19,8	17,6
8	80,9	65,8	70,3	55,9



Obrázek 12: Graf závislosti indexu avidity na koncentraci urey při ředění vzorků pacientů 1:25 [vlastní zdroj]



Obrázek 13: Graf závislosti indexu avidity na koncentraci urey při ředění vzorků pacientů 1:50 [vlastní zdroj]

V tabulce 6 jsou uvedené výsledky statistického vyhodnocení měření indexu avidity vzorků pacientů. Pro porovnání jsme zvolili ureu jako chaotropní činidlo (o molární koncentraci 4 mol/l a 6 mol/l). Vyšší koncentrace urey (6 mol/l)

účinněji narušovala vazbu mezi aPE a antigenem v porovnání s ureou o koncentraci 4 mol/l jak při ředění sér 1:25, tak 1:50. Ředění vzorku při použití stejně koncentrované urey nemělo signifikantní vliv na hodnotu indexu avidity. Na obrázku 12 a 13 jsou zobrazeny indexy avidity aPE u jednotlivých pacientů.

Tabulka 6: Statistické vyhodnocení měření indexu avidity patientských vzorků pro ureu jako chaotropního činidla o koncentraci 4 mol/l a 6 mol/l.

[vlastní zdroj]

Ředění	Počet vzorků	Urea 4 mol/l				Urea 6 mol/l				p
		Průměr	Medián	SD	25-75 P	Průměr	Medián	SD	25-75 P	
25×	8	52,366	45,381	31,131	28,148-79-421	37,946	33,024	23,983	17,243-60,044	0,0117
50×	8	50,782	51,988	29,838	24,220-73,151	39,523	39,161	25,301	16,195-59,545	0,0117

SD: směrodatná odchylka; P: percentil; p: hladina významnosti

6 DISKUZE

Antifosfolipidové protilátky jsou stále předmětem intenzivního výzkumu. Nedávné studie uvedly, že nízký titr APLA lze stanovit u desetiny zdravých dospělých a až u 1 % populace je diagnostikován středně vysoký titr APLA. Antifosfolipidové protilátky byly zjištěny u desetiny pacientů s cévní mozkovou příhodou, přičemž téměř 30% výskyt je u mladých pacientů s cévní mozkovou příhodou. Tyto protilátky se vyskytují také až u pětiny pacientek, které prodělaly tři nebo více spontánních potratů, jelikož způsobují placentární trombózu a záněty. APLA byly rovněž nalezeny u jedné sedminy pacientů s opakovanými žilními trombózami. Popsaná epidemiologie je významným důvodem spolehlivé identifikace APS pacientů, přesného laboratorního stanovení a správné včasné léčby příznaků APS. [41]

Stanovení antifosfolipidových protilátek je nezbytnou součástí diagnostiky některých autoimunitních onemocnění. Klinické studie a výzkum pravidelně přinášejí poznatky o nových metodách a pokročilých technikách detekce APLA. Mezinárodní hematologické a APS konvence však stále doporučují validované a standardizované metody stanovení, jako je ELISA a aPTT. [25]

Důležitou vlastností protilátek je jejich avidita, která také vypovídá o vyzrálosti protilátek. V případě infekčních chorob vznikají při primárním setkání patogenu s organismem protilátky s nižší aviditou, při sekundárním následném setkání vznikají protilátky s aviditou vyšší. U autoimunitních onemocnění však není zrání protilátek zcela objasněno a je předmětem četných studií. Čučník a kol. provedli analýzu séra pozitivního na přítomnost anti- β 2GPI protilátek v přítomnosti močoviny jako chaotropního séra. Výsledky této studie naznačily, že vysokoavidní anti- β 2-GPI protilátky jsou klinicky významnější než ty samé protilátky s nízkou aviditou. Multicentrické studie také určily vztah mezi závažností porodnických obtíží a aviditou anti- β 2-GPI protilátek.

U pacientek s protilátkami s vyšší aviditou byl prokázán statisticky významnější výskyt komplikací než u pacientek s přítomností stejných nízkoavidních protilátek. [23; 33]

Stanovení avidity aPE IgG, jímž se zabývá tato bakalářská práce, zatím nebylo předmětem mnoha studií a výzkumů. Jedna ze studií v rámci disertační práce se však kromě vztahu hladin protilátek zabývala také právě aviditou aPE. Tato studie došla k závěru, že aPE by mohly mít blízký vztah s žilními trombózami a být součástí souboru APLA v případě imunologických onemocněních. Tento výsledek tedy naznačuje, že přítomnost aPE by se mohla zařadit mezi laboratorní kritéria diagnostiky APS. V případě této bakalářské práce bylo stanovení provedeno také pomocí imunologického testu ELISA v sendvičovém uspořádání s navázanými antigeny. Jako chaotropní činidla byla použita urea a NaCl o různých koncentracích. Srovnání použitých chaotropních činidel při testování směsných sér i preparátu IVIG ukázalo klesající trend absorbance při zvyšující se koncentraci chaotropního činidla. Tento trend vykazovala obě použitá chaotropní činidla. Validní výsledky poskytnuly vzorky ředěné 10×, 25×, 50×, eventuelně 100×. Při porovnání avidit pro různá chaotropní činidla se urea projevila jako účinnější, jelikož pro obě směsná séra i Kiovig vykazovala se zvyšující se koncentrací signifikantní pokles indexů avidity. Čím nižší je avidita, tím více imunitních komplexů bylo narušeno. [23]

Jelikož účinnější chaotropní vlastnosti v předchozích stanoveních vykazovala urea, byla také použita ke stanovení avidity jednotlivých vzorků pacientů. Byl patrný signifikantní pokles hodnoty indexu avidity při vyšší koncentraci urey, zatímco ředění vzorků hodnotu indexu avidity neovlivňovalo. Pro spolehlivé určení avidity by mělo být docíleno dostatečného poklesu vazby protilátek, kolem 50 %. Tohoto poklesu bylo dosaženo již při koncentraci urey 4 mol/l. V případě vysokých hodnot avidity může být optimální použít chaotropní

čínidlo i ve vyšší koncentraci. Vyšší směrodatná odchylka, a tedy míra variability souboru, nám vyšla při ředění vzorků 25×. Při porovnání hodnot AI vzorků pacientů s hodnotami AI kontrolních sér a preparátu IVIG v přítomnosti chaotropního činidla urey o koncentraci 4 mol/l a 6 mol/l si můžeme povšimnout, že Kiovig vykazoval při stejném ředění a stejné koncentraci chaotropního činidla nižší hodnoty. To by mohlo naznačovat, že u pacientů s trombózami jsou přítomny aPE IgG s vyšší aviditou, nicméně hodnoty indexu avidity u konkrétních pacientů vyšly velice různorodé a pohybovaly se v širokém rozmezí od 11,3 % do 96,2 % za podmínek použití urey 4 mol/l a ředění séra 50×. [42]

Jak již bylo zmíněno výše, o stanovení avidity izotypu IgG aPE zatím nemáme mnoho informací. Stanovení avidity prováděné doposud podobnou metodou se týkala spíše jiných antifosfolipidových protilátek než antifosfatidylethanolaminových, namířených proti neutrálním fosfolipidům – fosfatidylethanolaminům. Více prozkoumaným typem APLA jsou například antikardiolipinové protilátky. Aviditě aCL IgG protilátek se věnovala například studie, která rovněž použila jako chaotropní činidlo ureu o různých koncentracích, podobně jako tato bakalářská práce. Tato studie došla k závěru, že specifické aCL IgG protilátky (specificky vázané na kardiolipin) disponují vyšší aviditou než protilátky nespecifické. [43]

Další podobná studie se zaměřila na aviditu antineurocytoskletálních protilátek u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou. Studie testovala stejná chaotropní činidla, jako byla použita v této bakalářské práci – NaCl a ureu. Jakožto vhodnější chaotrop byla také vyhodnocena urea. Z této studie vyplynulo, že patogenní autoprottilátky mají vyšší aviditu. Všechny studie tedy naznačují, že stanovení avidity protilátek a autoprottilátek by mohlo pomoci při diagnostice a posouzení závažnosti daného onemocnění. [44]

Rozdělení protilátek na vysokoavidní a nízkoavidní se provádí na základě porovnání reziduální avidity po vystavení působení chaotropního činidla s původní aviditou. Pokud mají protilátky aviditu vyšší než 65 % původní hodnoty, jsou klasifikovány jako vysokoavidní. V případě, že protilátky vykazují aviditu nižší než 25 % počáteční hodnoty, jsou klasifikovány jako nízkoavidní. Jestliže zkoumané protilátky nesplňují ani jedno z těchto kritérií, jsou označeny jako protilátky s heterogenní aviditou. Čučník a kol. provedli tuto klasifikaci anti- β 2GPI protilátek za použití 0,5 mol/l NaCl jakožto chaotropního činidla. Vzhledem k nízkému počtu vyšetřených pacientů nebylo rozdělení na skupiny dle indexů avidity prováděno. [45]

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá tématem stanovení avidity antifosfolipidových protilátek. V teoretické části byl podán stručný pohled na fungování imunitního systému. Byly probrány skupiny heterogenních antifosfolipidových protilátek a jimi způsobené onemocnění antifosfolipidový syndrom. V závěru teoretické části se zmiňuji o možnosti stanovení APLA včetně stanovení avidity protilátek.

Praktická část popisuje princip metody ELISA v uspořádání pro detekci protilátek. Dále je zde popsán postup, podle něhož jsem prováděla stanovení avidity aPE v rámci této bakalářské práce.

Výsledky získané z měření indexů avidity aPE IgG kontrolních sér a IVIG preparátu ukázaly jasný vztah mezi hodnotou indexu avidity a koncentrací chaotropního činidla – urey nebo NaCl. Pro interpretaci výsledků avidity je tedy nezbytná znalost referenčních hodnot vytvořených pro konkrétní podmínky metody stanovení avidity.

Porovnání hodnot indexů avidity IVIG preparátu s průměrnými hodnotami vzorků pacientů naznačuje, že u pacientů s trombózami jsou přítomny aPE s vyšší aviditou, ale individuální hodnoty indexu avidity u pacientů se pohybovaly v širokém rozmezí. Pro spolehlivější a validnější výsledky by bylo nutné analyzovat větší množství vzorků.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aCL – antikardiolipinové protilátky

AI – index avidity

ANA – antinuclear antibody

AO – autoimunitní onemocnění

aPE – antifosfatidyletanolaminové protilátky

APLA – antifosfolipidové protilátky

APS – antifosfolipidový syndrom

aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas

CAPS – katastrofický antifosfolipidový syndrom

dRVVT – diluční test jedu Russelovy zmije

DVT – hluboká žilní trombóza

EIA – enzymatická imunosorbentní analýza

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Event. – eventuelně

HDL – high-density lipoprotein

ITP – idiopatická trombocytopenická purpura

IVIG – intravenózní imunoglobuliny

LA – lupus antikoagulans

LDL – low-density lipoprotein

NaCl – chlorid sodný

PE – fosfatidylethanolamin

PES – polyesterová vlákna

PS – fosfatidylserin

PT – protrombinový čas

SLE – systémový lupus erythematoses

SPR – povrchová plazmonová rezonance

TF – tkáňový faktor

Tzv. – Takzvaný

β 2GPI – beta-2 glykoprotein I

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 2. vyd. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4215-X.
- [2] SHOENFELD, Yehuda, Terezie FUČÍKOVÁ a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. 1. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-2044-9.
- [3] CHAPEL, Helen, Mansel HAENEY, Siraj MISBAH a Neil SNOWDEN. *Základy klinické imunologie: 6. vydání*. 6. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2018. ISBN 978-80-7553-396-8.
- [4] KHAMASHTA, Munther, Savino SCIASCIA a Maria BERTOLACCINI. Anticardiolipin Antibodies. *Autoantibodies* [online]. Elsevier, 2014, 2014(1), 735-739 [cit. 2023-03-11]. ISBN 9780444563781. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-56378-1.00087-3
- [5] ŠTERZL, Ivan. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. 4. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0972-X.
- [6] GÓMEZ-PUERTA, José, Gerard ESPINOSA a Ricard CERVERA. Antiphospholipid Antibodies: From General Concepts to Its Relation with Malignancies. *Antibodies* [online]. 2016, 5(3), 20 [cit. 2023-03-11]. ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib5030018
- [7] KHAMASHTA, M., M. TARABORELLI, S. SCIASCIA a A. TINCANI. Antiphospholipid syndrome. *Best Practice & Research Clinical*

- Rheumatology* [online]. 2016, **30**(1), 133-148 [cit. 2023-03-11]. ISSN 15216942.
Dostupné z: doi:10.1016/j.berh.2016.04.002
- [8] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. 1. [Hradec Králové]: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-862-2550-X.
- [9] BRADACOVA, Pavla, Ludek SLAVIK, Jana ULEHLOVA et al. Current Promising Biomarkers and Methods in the Diagnostics of Antiphospholipid Syndrome: A Review. *Biomedicines* [online]. 2021, **9**(2), - [cit. 2023-03-28]. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9020166
- [10] TOMKOVÁ, Mgr. Hana. *Analytické metody pro výzkum fosfolipidů*. Olomouc, 2017. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
- [11] PENGO, Vittorio a Amelia RUFFATTI. Lupus Anticoagulant Testing. *Autoantibodies* [online]. Elsevier, 2014, **2014**(1), 731-734 [cit. 2023-03-13]. ISBN 9780444563781. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-56378-1.00086-1
- [12] KHAN, Tara, Olivia LOPEZ a Robert BIRKHAHN. Lupus Anticoagulant Syndrome: A Case Report. *The Journal of Emergency Medicine* [online]. 2010, **39**(3), 121-124 [cit. 2023-03-13]. ISSN 07364679. Dostupné z: doi:10.1016/j.jemermed.2007.10.046
- [13] SHAHIN, Maha, Amany EL-DIASTY a Mohamed MABED. Anticardiolipin antibodies in proliferative diabetic retinopathy: An additional risk factor. *Saudi Journal of Ophthalmology* [online]. 2009, **23**(2),

165-169 [cit. 2023-03-13]. ISSN 13194534. Dostupné z:
doi:10.1016/j.sjopt.2009.06.001

- [14] SERRICCHIO, Mauro, Adriano VISSA, Peter KIM, Christopher YIP a G. MCQUIBBAN. Cardiolipin synthesizing enzymes form a complex that interacts with cardiolipin-dependent membrane organizing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2018, **1863**(4), 447-457 [cit. 2023-03-13]. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2018.01.007
- [15] MATSUURA, Eiji a Luis LOPEZ. β 2-Glycoprotein I Autoantibodies. *Autoantibodies* [online]. Elsevier, 2014, **2014**(-), 689-698 [cit. 2023-03-22]. ISBN 9780444563781. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-56378-1.00081-2
- [16] NAYFE, R., I. UTHMAN, J. AOUN, E. SAAD ALDIN, M. MERASHLI a M. KHAMASHTA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* [online]. 2013, **52**(8), 1358-1367 [cit. 2023-03-22]. ISSN 1462-0324. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/ket126
- [17] TEBO, Anne, Rohan WILLIS, Troy JASKOWSKI, Marta GUERRA, Silvia PIERANGELI, Jane SALMON, Michelle PETRI a D. BRANCH. Clinical significance and correlations between anti- β 2 glycoprotein I IgA assays in antiphospholipid syndrome and/or systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2016, **460**(-), 107-113 [cit. 2023-03-22]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2016.06.025
- [18] CHATURVEDI, Shruti a Keith MCCRAE. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *Blood Reviews* [online]. 2017, **31**(6),

406-417 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0268960X. Dostupné z:
doi:10.1016/j.blre.2017.07.006

- [19] PREGNOLATO, Francesca a Cecilia CHIGHIZOLA. Phospholipid Autoantibodies (Nonanticardiolipin)-Antiprothrombin Antibodies. *Autoantibodies* [online]. Elsevier, 2014, **2014**(3), 741-749 [cit. 2023-03-22]. ISBN 9780444563781. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-56378-1.00088-5
- [20] BODE, Wolfram. Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. 2006, **36**(2), 122-130 [cit. 2023-03-24]. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107997960600009X?via%3Dihub>
- [21] NAYFE, R., I. UTHMAN, J. AOUN, E. SAAD ALDIN, M. MERASHLI a M. KHAMASHTA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* [online]. 2013, **52**(8), 1358-1367 [cit. 2023-03-25]. ISSN 1462-0324. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/ket126
- [22] STAUB, Henrique, Maria BERTOLACCINI a Munther KHAMASHTA. Anti-phosphatidylethanolamine antibody, thromboembolic events and the antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2012, **12**(2), 230-234 [cit. 2023-03-25]. ISSN 15689972. Dostupné z:
doi:10.1016/j.autrev.2012.07.008
- [23] KUCHARŤ, MUDr. Oliver. *Antifosfolipidové protilátky a jejich avidita u vybraných skupin onemocnění*. Praha, 2022. Disertační práce. Univerzita Karlova 1. lékařská fakulta. Vedoucí práce MUDr. Lenka Fialová, CSc.

- [24] BUSTAMANTE, Jean, Amandeep GOYAL a Mayamp SINGHAL. Antiphospholipid Syndrome. *StatPearls: Treasure Island (FL)* [online]. 2022, **2022**(1), 1 [cit. 2022-12-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430980/>
- [25] CLARK, Kristina a Ian GILES. Antiphospholipid syndrome. *Medicine* [online]. 2018, **46**(2), 118-125 [cit. 2023-03-15]. ISSN 13573039. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpmed.2017.11.006
- [26] HLUŠÍ, MUDr. a CSc, KRČOVÁ. Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2003, -(9), 434-436 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2003/09/02.pdf>
- [27] SILVER, Robert M. Catastrophic antiphospholipid syndrome and pregnancy. *Seminars in Perinatology* [online]. 2018, **42**(1), 26-32 [cit. 2023-03-24]. ISSN 01460005. Dostupné z: doi:10.1053/j.semperi.2017.11.006
- [28] CARRASCO, Marta, Alejandra TRIANA, Ignacio GARCÍA, Noelia PÉREZ, Nuria MÉNDEZ, Patricia RUIZ a Virginia GONZÁLEZ. Catastrophic antiphospholipid syndrome during pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* [online]. 2021, -(264), 21-24 [cit. 2023-03-24]. ISSN 0301-2115. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301211521003377>
- [29] GÓMEZ-PUERTA, Jose a Ricard CERVERA. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *Journal of Autoimmunity* [online]. 2014, **48-49**(-), 20-25 [cit. 2023-03-24]. ISSN 08968411. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaut.2014.01.006

- [30] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. -. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [31] CAPOZZI, Antonella, Emanuela LOCOCO, Maria GRASSO, Agostina LONGO, Tina GAROFALO, Roberta MISASI a Maurizio SORICE. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2012, 379(1-2), 48-52 [cit. 2023-04-05]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2012.02.020
- [32] AN, Gyu-Dae, Hyeon-Ho LIM a Jin-Yeong HAN. Laboratory Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome. *Clinical & Experimental Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2017, 3(1), 2-7 [cit. 2023-04-05]. ISSN 2288-8209. Dostupné z: doi:10.14345/ceth.17002
- [33] FIALOVÁ, L. Avidity of antiphospholipid antibodies – our current knowledge. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* [online]. 2014, 63(3), 220-224 [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2014-3-5/avidita-antifosfolipidovych-protilatek-nase-soucasne-znalosti-50383?hl=en>
- [34] FIALOVÁ, L. Avidity of selected autoantibodies – usefulness of their determination for clinical purposes. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* [online]. 2016, 65(3), 155-163 [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2016-3-9/avidity-of-selected-autoantibodies-usefulness-of-their-determination-for-clinical-purposes-59118>

- [35] JANEWAY, CA, P. TRAVERS, M. WALPORT a MJ SHLOMCHIK. *Imunobiology*. 5th ed. New York: Garland Science. p., 2001. ISBN 0-8153-3642-X.
- [36] LECTURES, Biology. Affinity vs Avidity. In: *Youtube* [online]. -: -, 2021 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: https://www.youtube.com/watch?v=XQOf5_iysVo&ab_channel=BiologyLectures
- [37] FIALOVÁ, Lenka, Oliver KUCHAR, Milada PETRÁČKOVÁ, Ivan MALBOHAN a Tomáš ZIMA. Avidity of anti-phospholipid antibodies in relation to their levels. *Central European Journal of Immunology* [online]. 2020, **45**(2), 136-143 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1426-3912. Dostupné z: [doi:10.5114/ceji.2020.97901](https://doi.org/10.5114/ceji.2020.97901)
- [38] AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**(-), 4-15 [cit. 2023-04-07]. ISSN 01969781. Dostupné z: [doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012)
- [39] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii* [online]. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011 [cit. 2023-04-13]. ISBN 978-80-247-3533-7. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/vysetrovaci-metody-v-imunologii-1285008/>
- [40] Schéma capture ELISA metody. In: *Wikiskripta* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/ELISA>

- [41] PARIDA, Jyoti, Durga MISRA, Anupam WAKHLU a Vikas AGARWAL. Antiphospholipid antibody syndrome. *Clinical Queries: Nephrology* [online]. 2014, **3**(1), 9-14 [cit. 2023-04-27]. ISSN 22119477. Dostupné z: doi:10.1016/j.cqn.2014.03.007
- [42] PULLEN, G.R., Margaret FITZGERALD a C.S. HOSKING. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1986, **86**(1), 83-87 [cit. 2023-05-06]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(86)90268-1
- [43] FIALOVÁ, Lenka, Ivan MALBOHAN a Karin MALÍČKOVÁ. Avidity of anticardiolipin antibodies—A factor that could be important for their detection by ELISA methods. *ScienceDirect* [online]. 2014, **12**(-), 277-284 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://jab.zsf.jcu.cz/pdfs/jab/2014/04/12.pdf>
- [44] NOSKOVA, Libuse, Lenka FIALOVA, Ales BARTOS a Tomas ZIMA. Avidity of antineurocytoskeletal antibodies in Alzheimer's disease patients. *Biomedical Papers* [online]. 2017, **161**(2), 179-186 [cit. 2023-04-28]. ISSN 12138118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2017.017
- [45] BOŽIČ, Borut, Saša ČUČNIK, Tanja KVEDER a Blaž ROZMAN. Affinity and Avidity of Autoantibodies. *Autoantibodies* [online]. Elsevier, 2014, **2014**(), 43-49 [cit. 2023-05-06]. ISBN 9780444563781. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-56378-1.00005-8

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vzorce glycerofosfolipidů.....	15
Obrázek 2: Struktura β 2-glykoproteinu I	20
Obrázek 3: Rozdíl mezi afinitou a aviditou.....	31
Obrázek 4: Typy ELISA.....	38
Obrázek 5: Schéma ELISA metody pro stanovení protilátky.....	39
Obrázek 6: Graf závislosti absorbance na koncentraci NaCl pro kontrolní sérum Kiovig.....	46
Obrázek 7: Graf závislosti absorbance na koncentraci NaCl pro kontrolní sérum Lyonorm human P.....	46
Obrázek 8: Graf závislosti absorbance na koncentraci NaCl pro kontrolní sérum Biosystems.....	47
Obrázek 9: Graf závislosti absorbance na koncentraci urey pro preparát Kiovig.....	48
Obrázek 10: Graf závislosti absorbance na koncentraci urey pro kontrolní sérum Lyonorm human P.....	49
Obrázek 11: Graf závislosti absorbance na koncentraci urey pro kontrolní sérum Biosystems.....	49
Obrázek 12: Graf závislosti indexu avidity na koncentraci urey při ředění vzorků pacientů 1:25.....	52
Obrázek 13: Graf závislosti indexu avidity na koncentraci urey při ředění vzorků pacientů 1:50.....	52

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení imunitního systému.....	13
Tabulka 2: Porovnání indexů avidity různých kontrolních sér a Kiovigu zapoužití NaCl jako chaotropního činidla o různé koncentraci (0,5 mol/l a 3 mol/l).....	48
Tabulka 3: Porovnání indexů avidity různých kontrolních sér a Kiovigu za použití urey jako chaotropního činidla o různé koncentraci (1 mol/l a 8 mol/l).....	50
Tabulka 4: Porovnání hodnot indexů avidity kontrolních sér a Kiovigu po přidání urey (4 mol/l a 6 mol/l)	51
Tabulka 5: Srovnání indexů avidity (AI) patientských vzorků při různém ředění a různé koncentraci urey	51
Tabulka 6: Statistické vyhodnocení měření indexu avidity patientských vzorků pro ureu jako chaotropního činidla o koncentraci 4 mol/l a 6 mol/l.....	53