

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**  
Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Antifosfolipidové protilátky a jejich avidita u vybraných skupin onemocnění**

MUDr. Oliver Kuchař

2022

## **Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Biochemie a patobiochemie.

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK v Praze

Školitel: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

Abstrakt .....	1
Abstract .....	2
1. Úvod .....	3
2. Cíle a hypotézy dizertační práce .....	4
3. Materiál a metody.....	6
3.1. Soubory pacientů.....	6
3.2. Stanovení hladin APA .....	6
3.3. Stanovení avidity IgG ACLA.....	7
3.4. Stanovení avidit ACLA IgG a aPE IgG v klinických studiích.....	8
3.5. Statistické analýzy .....	9
4. Výsledky.....	10
4.1. Výsledky avidit z metody 1 a 2 .....	10
4.2. Vztah mezi AI ACLA IgG při použití močoviny nebo NaCl.....	13
4.3. Srovnání avidit ACLA IgG podle hladin ACLA IgG .....	13
4.4. Longitudinální hodnocení avidity ACLA IgG .....	14
4.5. Korelační analýzy avidity ACLA IgG.....	14
4.6. Stanovení mezních hodnot (horní hranice) pro aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM .....	14
4.7. Hladiny testovaných aPE a jiných APA u pacientů s TEN.....	15
4.8. Hladiny testovaných aPE a jiných APA u pacientů s imunologicky zprostředkovanými poruchami.....	17
4.9. Avidita aPE IgG .....	17
4.10. Vztah mezi aPE a dalšími APA.....	18
5. Diskuze.....	19
6. Závěr.....	21
7. Seznam zkratk.....	22
8. Literatura .....	23
9. Seznam publikací autora .....	26

## Abstrakt

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

Hlavní cíle dizertační práce byly:

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

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

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

Výsledky z klinické části práce ukázaly, že avidity ACLA se ve skupinách pacientů klasifikovaných podle hladin ACLA nelišily. aPE IgG/IgM byly signifikantně vyšší ve skupině pacientů s žilním tromboembolismem než u pacientů s netrombotickými interními poruchami. aPE IgG/IgM zvýšené nad námi stanovenými hraničními hodnotami byly zjištěny u 10,8 % pacientů s žilním tromboembolismem a jako jediná APA u 6,5 % těchto pacientů. Hladiny aPE IgG vyšší než naše mezní hodnoty byly zjištěny u 29 % pacientů s imunologicky zprostředkovanými onemocněními s dalšími pozitivními APA. U pacientů obou kohort byly nalezeny avidity aPE IgG v rozmezí od nízkých až po vysoké hodnoty. Avidity aPE IgG se lišily od avidit ACLA IgG. Hladiny a avidity ACLA a aPE IgG se během sledování významně neměnily.

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

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

## Abstract

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

The main objectives of this dissertation were:

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

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

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

The results of the clinical part of the study showed that the ACLA avidities did not differ between the groups of patients classified according to the ACLA levels. IgG/IgM aPEs were significantly higher in the group of patients with venous thromboembolism than in patients with nonthrombotic internal disorders. IgG/IgM aPEs elevated above our cutoff values were found in 10.8% of patients with venous thromboembolism and as the only APA in 6.5%. Levels of aPE IgG levels higher than our cutoff values were found in 29% of patients with immunologically mediated diseases with other positive APAs. Avidities of aPE IgG ranging from low to high levels were found in patients from both cohorts. The avidities of aPE IgG differed from those of ACLA IgG. ACLA and aPE IgG levels and avidities did not change significantly during follow-up.

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

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

# 1. Úvod

Antifosfolipidové protilátky (APA) jsou velice různorodou skupinou protilátek, které jsou namířeny zejména proti negativně nabitým fosfolipidům a/nebo jejich komplexům s různými plasmatickými bílkovinami (Ruiz-Irastorza G. et al., 2010). Trvale zvýšené APA představují důležitý laboratorní nález u pacientů s antifosfolipidovým syndromem (APS), autoimunitním onemocněním, klinicky se manifestujícím především cévní trombózou a/nebo těhotenskými komplikacemi (Hughes G.R.V., 1983; Hughes G.R.V., 2014; Nikolova-Vlahova M.K. et al., 2015). Nejčastější klinickou manifestací APS je hluboká žilní trombóza (Cervera R. et al., 2009).

Mezinárodní klasifikační kritéria pro APS zahrnují protilátky proti kardiolipinu (ACLA) IgG/IgM (imunoglobuliny izotypů G/M), proti beta2-glykoproteinu I (anti-beta2GPI) IgG/IgM a lupusové antikoagulanty (LA) (Miyakis S. et al., 2006). Protože ne všichni pacienti, kteří vykazují klinické známky APS, produkují kriteriální APA, jsou intenzivně studovány a vyšetřovány tzv. nekriteriální APA. Mezi nekriteriální APA řadíme např. protilátky proti protrombinu (aPT), protilátky proti komplexu fosfatidylserin/protrombin (aPS/PT) nebo anti-beta2GPI proti doméně 1 (Nayfe R. et al., 2013; Forastiero R., 2014; Sciascia S. et al., 2017; Bertolaccini M.L. et al., 2011).

Je známo, že hladina a avidita prezentují klíčové charakteristiky APA (Steward M.W., 1979). Avidita (funkční afinita) je důležitou vlastností protilátky související s její specifitou (Pohanka M., 2009). Je vyjádřena jako síla interakce mezi antigenem a odpovídající protilátkou, která je nezávislá na mechanismech řídicích hladiny protilátek (Steward M.W. et al., 1979). Avidita autoprottilátek může hrát rozhodující roli v určitých orgánově specifických onemocnění spojených s autoprottilátkami (Gharavi A. a Reiber H., 1996). Čučník a kol. potvrdili (2011,2012), že vysokoavidní anti-beta2GPI protilátky jsou klinicky významnější než protilátky s nízkou aviditou. Přítomnost anti-beta2GPI s vysokou aviditou nebyla vzácná u pacientů s APS. Hlavní klinickou manifestací anti-beta2GPI s vysokou aviditou byla žilní trombóza, která naopak byla vzácná ve skupině pacientů s vysokým titrem protilátek, ale s nízkoavidními anti-beta2GPI.

S ohledem na výše uvedené poznatky se budu v dizertační práci zabírat problematikou APA především u pacientů s tromboembolickou nemocí (TEN) a imunologicky podmíněnými nemocemi.

## 2. Cíle a hypotézy dizertační práce

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

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

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

### Cíle dizertační práce jsou:

1.) Srovnat dvě různé chaotropní látky (močovinu a chlorid sodný), které již byly dříve použity pro stanovení avidity APA (Cucnik S. et al., 2012; Vlachoyiannopoulos P.G. et al., 1998; Fialova L. et al., 2014).

2.) Porovnat několik modifikací ELISA s použitím různých koncentrací chaotropních látek a různého ředění vzorků séra pro stanovení avidity ACLA.

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

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

4.) Hodnotit změny hladin ACLA a avidit ve skupině pacientů během dlouhodobého sledování.

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

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

Hypotéza: Avidita ACLA souvisí s hladinami převážně nekriteriálních APA.

6.) Vyšetřit a porovnat hladiny aPE (protilátky proti fosfatidyletanolaminu) u vybraných skupin pacientů a v této souvislosti stanovit mezní hodnoty (horní hranice) pro aPE IgG a IgM vyšetřením zdravých osob.

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

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

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

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

8.) Určit vztah mezi aPE a kriteriálními APA.

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



### **3. Materiál a metody**

#### **3.1. Soubory pacientů**

Ad studie 1.) Analyzovali jsme 28 vzorků séra od pacientů sledovaných na Imunologickém oddělení Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze. Hladiny IgG ACLA byly u pacientů vyšší než 10 GPL (jednotka antifosfolipidových protilátek třídy IgG).

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

Ad studie 2.) Retrospektivně jsme analyzovali 78 vzorků séra od 60 pacientů. Sběr vzorků byl proveden na Imunologickém oddělení Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze (Česká republika) v období let 2011 až 2015 a v Thomayerově nemocnici v Praze v letech 2015 až 2016. Pacienti byli vyšetřeni nebo hospitalizováni převážně pro systémová imunologická onemocnění a hlubokou žilní trombózu.

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

Ad studie 3.) Analyzovali jsme vzorky ze dvou kohort pacientů. Jednu kohortu tvořilo 68 pacientů hospitalizovaných v Thomayerově nemocnici v Praze (TH kohorta) a druhou kohortu utvářelo 22 pacientů vyšetřených na imunologickém oddělení Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky v Praze (ID kohorta). Pacienty z kohorty TH jsme rozdělili do dvou skupin. První skupinu tvořili pacienti, kteří byli hospitalizováni pro žilní TEN (46 pacientů) a druhou skupinu pacienti s různými interními onemocněními. Kohortu ID pacientů s imunologicky zprostředkovanými onemocněními tvořili převážně pacienti s ACLA IgG pozitivními systémovými imunologickými onemocněními. Kromě těchto dvou kohort pacientů jsme vyšetřili kontrolní skupinu 20 zdravých osob s cílem stanovit mezní hodnoty (horní hranice) pro hladiny aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM.

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

#### **3.2. Stanovení hladin APA**

Hladiny ACLA IgG/IgM, anti-beta2GPI, anti-fosfatidylserin (aPS), anti-fosfatidylinositol (aPI), anti-fosfatidová kyselina (aPA) byly stanoveny v séru metodou ELISA (ELISA Anti-cardiolipin antibodies, Orgentec, Mainz, Německo).

Hladiny aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM byly stanoveny pomocí ELISA souprav (AESKULISA Ethanolamin-GM a AESKULISA Serine-Prothrombin-GM, AESKU.DIAGNOSTICS, Wendelsheim, Německo). Použité soupravy ELISA mají certifikaci CE IVD (In Vitro Diagnostic Medical Devices). Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách GPL (ACLA IgG) a MPL (jednotka antifosfolipidových protilátek třídy IgM) (ACLA IgG) nebo v libovolných jednotkách U/ml (anti-beta2GPI IgG, aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM).

### 3.3. Stanovení avidity IgG ACLA

#### **Chemikálie** (neuvedené v popisu metody):

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

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

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

Chlorid draselný, p.a. (Penta, ČR)

Chlorid sodný, p.a. (Penta, ČR)

Kyselina sírová 96%, p.a. (Penta, ČR)

Močovina, p.a., (Penta, ČR)

#### **Přístroje:**

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

Analytické váhy SI-234 (Denver Instrument, Německo)

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

Destičkový spektrofotometr Sunrise (TECAN, Švýcarsko) se softwarem Magellan

Pro vyšetření avidity IgG ACLA byl použit postup popsáný Vlachoyiannopoulosem a kol. (1998) v naší modifikaci. Podrobný popis postupu ELISA je uveden v publikaci Fialová L. a kol. (2014).

Testování různých možností pro stanovení avidity ACLA bylo předmětem metodické části práce.

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

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

Metoda 1: jediné ředění séra, jediná koncentrace chaotropu

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

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

$$AI = \frac{\text{absorbance v jamkách s chaotropem}}{\text{absorbance v jamkách bez chaotropu}}$$

Metoda 2: různá ředění séra, jediná koncentrace chaotropu

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

$$AI = \frac{\text{ředění séra po ošetření chaotropem k mezní absorbanci}}{\text{ředění séra bez ošetření chaotropem k mezní absorbanci}}$$

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

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

### 3.4. Stanovení avidit ACLA IgG a aPE IgG v klinických studiích

V klinických studiích byly avidity ACLA IgG a aPE IgG stanoveny modifikovanou metodou ELISA s použitím chaotropních látek, která byla podrobně popsána v předchozích studiích (Fialova L. et al., 2017; Fialova L. et al., 2014).

Pro stanovení avidity ACLA IgG jsme použili séra ředěná v poměru 1:50 a močovinu v koncentraci 6 mol/l a 8 mol/l jako chaotropní látku.

Pro stanovení avidity aPE IgG byly jamky mikrotitračních proužků potaženy 50  $\mu$ l fosfatidyletanolaminu v absolutním ethanolu (50  $\mu$ g/ml) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Jako chaotropní činidlo jsme použili močovinu, podobně jako v našem testu avidity pro ACLA IgG. Zpočátku jsme testovali různé koncentrace močoviny 2 mol/l, 4 mol/l, 6 mol/l a 8 mol/l v sérech ředěných v poměru 1:50, 1:100 a 1:200, abychom našli optimální podmínky pro stanovení avidity aPE IgG.

Výsledky avidity ACLA IgG a aPE IgG byly vyjádřeny jako AI metodou 1. Protilátky s AI > 0,6 jsme klasifikovali jako vysoceavidní, zatímco protilátky charakterizované AI < 0,4 byly nízkoavidní. Rozmezí AI od 0,4 do 0,6 označovalo středněavidní protilátky (Almanzar G. et al., 2013; Prince H.E. a Lape-Nixon M., 2014).

### 3.5. Statistické analýzy

Ad studie 1.) Statistické analýzy byly provedeny parametrickými testy po vyhodnocení normálního rozdělení pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. Vztah mezi AI vypočtenými různými způsoby byl vyhodnocen pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Byl použit párový t test pro statistickou analýzu rozdílů v párových měřeních avidity ACLA v séru nebo různých vyjádření AI. Hladina významnosti pro všechny testy byla  $P < 0,05$ . Porovnání dvou různých technik měření bylo provedeno pomocí Bland-Altmanových grafů (Bland J.M. a Altman D.G., 1999). Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistica 12 (StatSoft, ČR) a MedCalc (Ostende, Belgie).

Ad studie 2.) Vzhledem k tomu, že data nevykazovala normální rozdělení, byly použity neparametrické statistické testy. Srovnání skupin bylo provedeno pomocí Kruskal-Wallisova testu. Spearmanův korelační koeficient byl použit pro korelační analýzu. Párová měření byla vyhodnocena Wilcoxonovým párovým testem. Hladina statistické významnosti byla stanovena na  $p = 0,05$ . Statistické analýzy byly provedeny pomocí programů MedCalc (Ostende, Belgie) a Statistica (TIBCO Software Inc., ArcIT Consulting s.r.o., Czech Republic).

Ad studie 3.) Ke zkoumání normálního rozdělení proměnných byl použit Shapiro-Wilkův test. Protože většina sledovaných parametrů nevykazovala normální rozdělení, byly pro statistickou analýzu použity neparametrické testy. Porovnání skupin bylo provedeno pomocí Mannova-Whitneyho testu. K analýze vztahu proměnných byl použit Spearmanův korelační koeficient nebo Passing-Bablokova regrese. Párová měření byla vyhodnocena Wilcoxonovým párovým testem. Pro porovnání kvalitativních údajů byl použit Fischerův přesný test. Hladina statistické významnosti byla stanovena na  $0,05$ . Statistické analýzy byly provedeny v programu Medcalc (MedCalc, Ostende, Belgie). K vyjádření referenčních mezí pro aPE IgG/IgM a PS IgG/IgM jsme použili robustní metodu podle dokumentu Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A3 doporučeného pro hodnocení menšího počtu referenčních subjektů (Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. Biochem Med (Zagreb) 2016;26:5-16) s využitím softwaru MedCalc.

## 4. Výsledky

### 4.1. Výsledky avidit z metody 1 a 2

Metoda 1: jediné ředění séra, jediná koncentrace chaotropů

Koncentrace močoviny 2 a 4 mol/l nebo NaCl 0,25 a 0,5 mol/l nevedly k účinné disociaci imunitních komplexů.

Pro vyhodnocení výpočtu AI tímto přístupem jsme porovnali získané hodnoty:

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

1.) Byla zjištěna vysoká korelace mezi AI na základě různých koncentrací močoviny nebo NaCl nezávisle na ředění séra (sérum ředění 1:50: močovina 6 vs 8 mol/l,  $r=0,94$ ; NaCl 1 vs 2 mol/l  $r=0,89$ ; ředění séra 1:100: močovina 6 vs. 8 mol/l,  $r=0,88$ ; NaCl 1 vs. 2 mol/l,  $r=0,88$ ;  $P<0,0001$  pro každé srovnání). AI byl významně nižší u vyšší koncentrace močoviny (močovina 6 vs 8 mol/l -  $P<0,001$  pro ředění séra 1:50 a  $P=0,0008$  pro ředění séra 1:100), zatímco nedošlo k významnému poklesu hodnot AI stanovených v přítomnosti NaCl 2 mol/l ve srovnání s NaCl 1 mol/l.

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

Metody 2: různá ředění séra, jediná koncentrace chaotropů

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

Kromě toho jsme AI analyzovali také na základě poměru ploch pod vlivem chaotropu a ploch bez vlivu chaotropu vypočteného podle vzorce navrženého Percianim a kol. (2007) a v naší modifikaci. Korelace mezi AI vypočteným původním vzorcem a naší modifikací je vysoká, a

to zejména při použití močoviny. Na rozdíl od použití AI založeném na mezní absorbanci, umožnila tato změna stanovit AI nezávisle na hodnotě absorbance. Srovnání testovaných modifikací je uvedeno v tabulce 1. Korelační koeficienty a Blandovy-Altmanovy grafy (obrázek 1) také ukázaly dobrou shodu mezi stanovením AI pomocí různých ředění sér s jednou koncentrací chaotropu a s jedním ředěním séra.

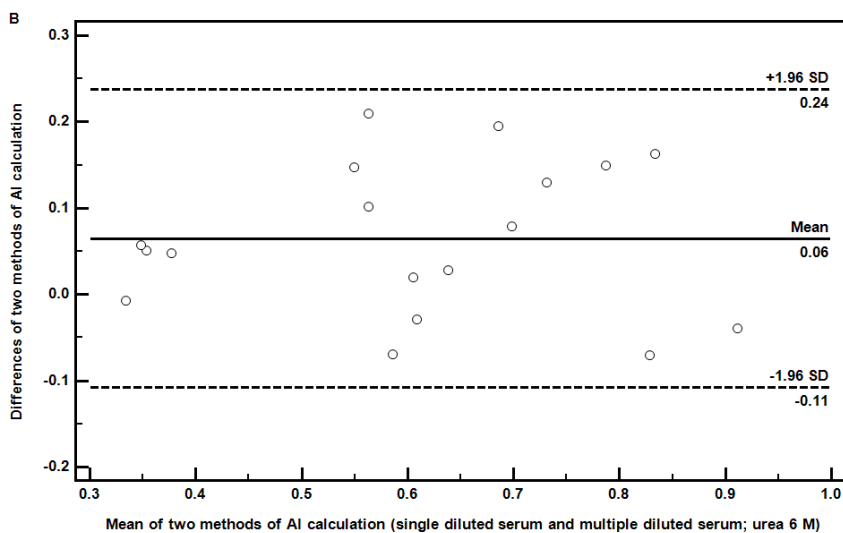
**Tabulka 1.** Srovnání AI stanovených metodou ELISA s použitím jednoho ředění séra (1:50 nebo 1:100) s fixní koncentrací chaotropu (močovina nebo NaCl) a AI stanovených metodou ELISA s použitím vícekrát naředěného séra.

Urea concentration	Comparisons	n	r	p	NaCl concentration	Comparisons	n	r	p
Urea 6 mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum	18	0,88	< 0.0001	NaCl 1 mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum	20	0,74	0.0002
	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	18	0,97	< 0.0001		single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	20	0,94	< 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	18	0,97	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	20	0,91	< 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum modified	24	0,94	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum modified	20	0,80	< 0.0001
Urea 8 mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple	18	0,91	< 0.0001	NaCl 2 mol/L	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum	20	0,81	< 0.0001

	diluted serum							
	single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	24	0,97	< 0.0001		single diluted serum 1:50 vs. multiple diluted serum modified	20	0,95 < 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	18	0,97	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum	20	0,87 < 0.0001
	single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum modified	24	0,95	< 0.0001		single diluted serum 1:100 vs. multiple diluted serum modified	20	0,84 < 0.0001

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

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



## 4.2. Vztah mezi AI ACLA IgG při použití močoviny nebo NaCl

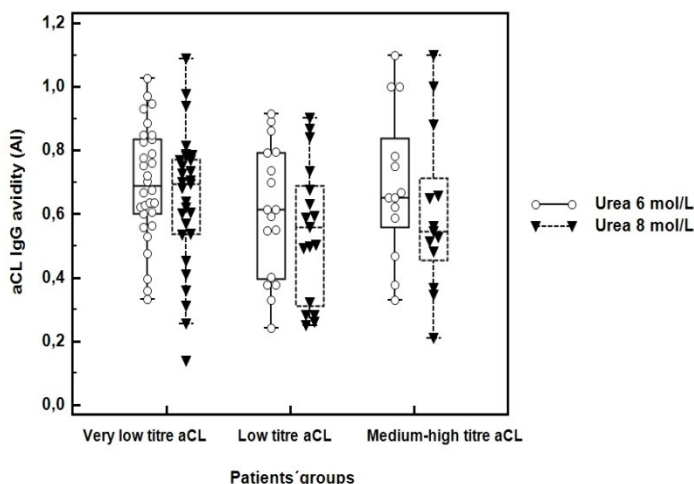
AI vypočtené z absorbancí získaných v přítomnosti NaCl nekorelovaly s hodnotami získanými v přítomnosti močoviny při použití sér zředěných v poměru 1:50. Při více naředěném séru (1:100) se korelace mezi provedenými testy ELISA s různými chaotropy zvýšila. Shoda však byla méně vyjádřena v porovnání s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

## 4.3. Srovnání avidit ACLA IgG podle hladin ACLA IgG

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

Pouze u jednoho pacienta s trombózou byla hladina ACLA > 10 GPL. Systémový lupus erythematodes nebo systémové onemocnění pojivové tkáně byly diagnostikovány u 11 pacientů s hladinou ACLA vyšší než 40 GPL. Na obrázku 2 jsou uvedeny hodnoty avidity testované v přítomnosti močoviny o koncentraci 6 mol/l a 8 mol/l. Avidita ACLA se mezi jednotlivými skupinami významně nelišila bez ohledu na koncentraci močoviny. Mediány AI byly u všech skupin vyšší než 0,6 při použití močoviny 6 mol/l. Zvýšení koncentrace močoviny pro stanovení avidity vedlo k mírnému poklesu mediánů AI, ale nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi skupinami pacientů.

**Obrázek 2.** Avidity ACLA IgG ve skupinách pacientů klasifikovaných podle titru ACLA (velmi nízký titr ACLA < 10 GPL, n = 30; nízký titr ACLA 10 - 40 GPL, n = 17; středně vysoký titr ACLA > 40 GPL, n = 13). Středový rámeček představuje hodnoty od dolního po horní kvartil (25 až 75 percentil). Medián je znázorněn jako střední čára. Svislá čára se táhne od minimální po maximální hodnotu s vyloučením vybočujících hodnot, které jsou zobrazeny jako samostatné body.





#### 4.4. Longitudinální hodnocení avidity ACLA IgG

Opakovaný odběr krve byl proveden u 14 pacientů v intervalu 315 dní (rozmezí 98-392 dní; medián 25.-75. percentil). V této skupině převažují pacienti s imunologickým onemocněním. Od většiny pacientů byl získán pouze párový vzorek séra. Podíl pacientů s nízkými nebo středně vysokými hladinami ACLA byl mezi pacienty podobný. Hodnota AI ACLA přesahovala 0,6 u většiny pacientů. Hladiny ACLA ani jejich avidita se během sledování významně neměnily.

#### 4.5. Korelační analýzy avidity ACLA IgG

Avidity ACLA stanovené pomocí močoviny 6 mol/l nebo 8 mol/l nekorelovaly s jejich hladinami v žádné skupině pacientů klasifikovaných podle hladin ACLA (velmi nízké, nízké a středně vysoké hladiny ACLA). Naopak hladiny ACLA významně korelovaly s hladinami APA naměřených proti beta2-glykoproteinu I a dalším fosfolipidům, ale tyto hladiny nekorelovaly s aviditou ACLA (tabulka 2).

**Tabulka 2.** Korelace mezi hladinami a aviditou ACLA IgG a především nekriteriálními APA. AI – index avidity; aPS – protilátky proti fosfatidylserinu; aPI – protilátky proti fosfatidylinositolu, n.s. – nevýznamné.

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

#### 4.6. Stanovení mezních hodnot (horní hranice) pro aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM

Stanovili jsme hraniční hodnoty pro aPE IgG/IgM a aPS/PT IgG/IgM u 20 zdravých osob s použitím 95 % referenčních intervalů. Horní hraniční hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3. Tyto hodnoty jsme použili při dalším hodnocení APA u našich pacientů. U ACLA (>10 GPL pro ACLA IgG, >7 MPL pro ACLA IgM) a anti-beta2GPI IgG (>8 U/ml) byly použity hodnoty doporučené výrobcem soupravy ELISA.

**Tabulka 3.** Horní hraniční hodnoty pro aPE IgG/IgM a aPS/PT u 20 zdravých osob.

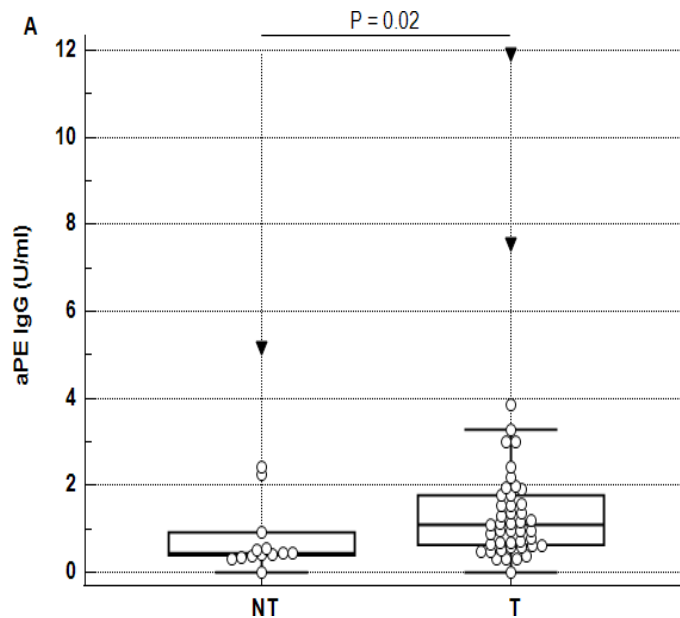
Type of APA	Upper limit (U/ml)
aPE IgG	6
aPE IgM	13.2
aPS/PT IgG	6.7
aPS/PT IgM	5.3

#### **4.7. Hladiny testovaných aPE a jiných APA u pacientů s TEN**

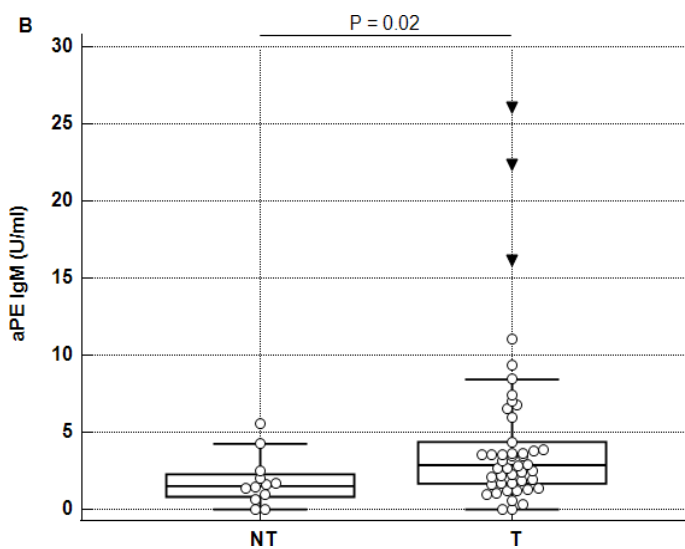
Srovnání nekriteriálních APA protilátek ukázalo významné rozdíly pro aPE IgG a IgM mezi skupinami pacientů s žilní TEN a pacienty s netrombotickými interními onemocněními (obrázek 3). Tyto protilátky byly významně vyšší ve skupině pacientů s žilní TEN (aPE IgG a IgM,  $P=0,02$  pro obě třídy Ig). Nebyly však pozorovány žádné významné rozdíly mezi skupinami těchto pacientů a kontrolní skupinou s výjimkou signifikantně vyššího aPE IgM u kontrol než u netrombotických interních onemocnění ( $P=0,04$ ). Hladiny aPS/PT IgG nebo IgM byly u obou skupin pacientů podobné. U hladin ACLA IgG nebo IgM a anti-beta2GPI IgG nebyly zjištěny žádné významné rozdíly.

**Obrázek 3.** Sérové hladiny aPE IgG a IgM ve skupinách pacientů s TEN (skupina T) a netrombotickými interními chorobami (skupina NT). Středový rámeček vymezuje hodnoty od 25. do 75. percentilu. Vodorovná čára je zakreslena u mediánu. Svislá čára znázorňuje minimální až maximální hodnotu, s vyloučením hodnot vybočujících hodnot. Vzdálené hodnoty jsou označeny černým trojúhelníkem.

**(A)** aPE IgG hladiny



**(B)** aPE IgM hladiny



#### 4.8. Hladiny testovaných aPE a jiných APA u pacientů s imunologicky zprostředkovanými poruchami

Pacienti vybraní do kohorty ID měli zvýšené hladiny APA IgG stanovené pomocí antifosfolipidového screeningu ELISA včetně ACLA, aPS, aPI, aPA, ale ne aPE. Všichni pacienti ze souboru ID byli rovněž pozitivní na ACLA IgG (>10 GPL). aPE IgG byly vyšetřeny u 17 pacientů. Někteří pacienti byli vyšetřeni opakovaně, takže jsme aPE IgG vyšetřili celkem u 26 vzorků. Hladiny aPE IgG byly významně vyšší než u kontrol ( $P < 0,001$ ). Hladiny aPE IgG vyšší než naše mezní hodnota (>6 U/ml) byly zjištěny alespoň jednou u pěti pacientů (29 %). Tři z těchto pacientů byli sledováni pro SLE nebo pro systémové onemocnění pojivové tkáně, jeden pacient pro intersticiální nefritidu a jedna žena se léčila pro neplodnost. Všichni tito pacienti byli rovněž pozitivní na další APA IgG proti jiným fosfolipidům/proteinům. U opakovaně vyšetřovaných pacientů ( $n=8$ ) nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi 1. a 2. měřením hladin aPE IgG. U dvou pacientů došlo ke změně s přesahem do nadlimitní hladiny.

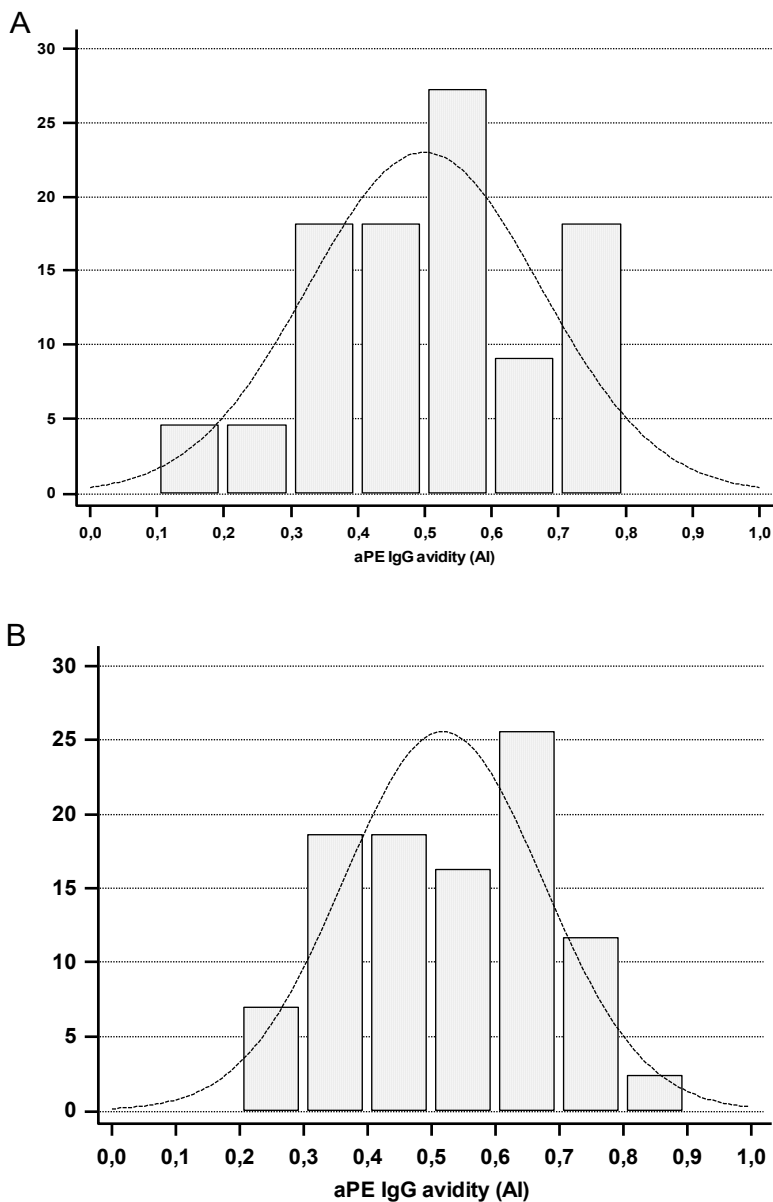
#### 4.9. Avidita aPE IgG

Počáteční experimenty pro stanovení optimálních podmínek pro stanovení avidity aPE IgG zahrnovaly analýzy různě zředěných sér při různých koncentracích močoviny. Vyšší koncentrace močoviny disociovaly interakce v imunitních komplexech vytvořených mezi aPE IgG a PE vázaným na povrchu mikrotitrační jamky účinněji než koncentrace nižší. Vyšší ředění séra (1:100, 1:200) vedla u některých vzorků k příliš nízkým absorbancím, a tím k nižší přesnosti výsledků. Jako vhodná se ukázala močovina 6 mol/l nebo 8 mol/l při ředění sér 1:50, protože tyto podmínky umožnily dostatečně narušit imunitní komplexy (Dimitrov J.D. et al., 2011). Porovnání AI při použití močoviny 6 mol/l a 8 mol/l ukázalo významnou korelaci ( $n=48$ ,  $r=0,71$ ,  $P<0,0001$ ) stanovenou Passing-Bablokovou regresí.

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

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

**Obrázek 4.** Distribuce avidity aPE IgG: (A) u pacientů s imunologicky zprostředkovanými onemocněními; (B) u pacientů s TEN.  
AI – index avidity



#### 4.10. Vztah mezi aPE a dalšími APA

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

Kromě toho aPE IgM významně korelovaly s aPS/PT IgM ( $r = 0,79$ ,  $P = 0,002$ ) ve skupině pacientů s netrombotickými interními chorobami a v kontrolní skupině ( $r=0,51$ ,  $P=0,02$ ). Ve skupině pacientů s imunologicky podmíněnými chorobami nebyla zjištěna žádná významná korelace mezi aPE IgG a ACLA IgG nebo jinými nekriteriálními APA (aPS, aPI a aPA) vyšetřeními během sledování.

## 5. Diskuze

Porovnali jsme dvě chaotropní látky močovinu a chlorid sodný popsané v literatuře pro stanovení avidity APA a testovali jsme několik možností výpočtu AI.

Jeví se, že oba testované chaotropy mohou být využity, a za situace kdy je vhodná koncentrace chaotropů a patřičné ředění séra, mohou být hodnoty avidity vzájemně srovnatelné.

Protože spolehlivý odhad avidity protilátek vyžaduje 50 % snížení vazby protilátek (Pullen G.R. et al., 1986), byly k dostatečné disociaci imunitních komplexů při ředění sér 1:50 a 1:100 použity koncentrace močoviny 6 a 8 mol/l a 1 a 2 mol/l NaCl. Vyšší koncentrace močoviny a více naředěná séra vedly k účinnější disrupci imunitních komplexů a k významnému snížení AI. Nejjednodušší způsob stanovení avidity je analýza jednoho ředění séra vystaveného pouze jedné koncentraci chaotropních látek.

Dimitrov a kol. (2011) zmiňují, že tento test pro stanovení avidity není dostatečně citlivý na mírné poklesy vazby při vysokých koncentracích IgG. Na základě našich výsledků se zdá, že stanovení avidity IgG ACLA není ovlivněno jejich hladinami podobně jako v případě IgG protilátek proti pertusovému toxinu a filamentóznímu hemaglutininu (Almanzar G. et al., 2013). Naše metoda stanovení avidity pro ACLA s jedním ředěním séra a ta, která používala sériově ředěné sérum, jež není ovlivněné hladinami protilátek, vykazovaly dobrou korelaci.

Stanovení AI pomocí sériově ředěného séra pacienta je považováno za zlatou standardní metodu pro stanovení avidity metodou ELISA (Hedman K. et al., 1989). Hlavní nevýhoda tohoto metodického přístupu spočívá v nutnosti čtyř nebo více ředění vzorku (Prince H.E a Wilson M., 2001). Pro tento nedostatek jsme tuto metodu modifikovali redukcí počtu ředění séra pouze na dvě, která se ukázala jako vhodná v rámci testování metody s jedním ředěním.

Ke stanovení avidity ACLA IgG, pro vyhodnocení vztahu mezi aviditou ACLA IgG a jejich hladinami v rozmezí od velmi nízkých až po vysoké, jsme aplikovali jednoduchou modifikaci ELISA metody - jednou ředěné sérum vystavené působení roztoku močoviny. Nezávisle na použité koncentraci močoviny (6 nebo 8 mol/l) nebyly zjištěny významné rozdíly v mediánech AI mezi testovanými skupinami pacientů (hladiny ACLA od velmi nízkých až po vysoké). U našich pacientů převažovaly ACLA s vyšší aviditou, protože mediány AI ve všech skupinách byly vyšší než hodnota 0,6 při použití močoviny 6 mol/l jako chaotropu.

Cucnik a kol. (2011) pozorovali, že ne všechny vzorky s vysokými hladinami anti-beta2GPI vykazovaly vysokou aviditu. Nedostatek vztahu mezi ACLA IgG hladinami a aviditou dokládá i naše studie.

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

Několik studií již popsalo vztah mezi hlavními klinickými projevy APS a přítomností protilátek proti neutrálnímu fosfolipidu – fosfatidyletanolaminu (Staub H.L. et al., 2012). Pozitivita aPE u našich pacientů s TEN byla podobná jako v multicentrické studii Sanmarca a kol. (2007). Podíl zvýšených hladin aPE IgG/IgM byl nejnižší ze všech vyšetřovaných APA, ale jako jediná byla pozitivní u 6,5 % pacientů. Podpořili jsme tedy názor, že aPE může být jediným typem APA u pacientů s trombózou (Sanmarco M. et al., 2001). Podle očekávání byl

podíl pozitivních aPE IgG vyšší, více než dvojnásobný (29 %) u pacientů s imunologicky podmíněnými chorobami ve srovnání s pacienty s trombózou. Je však třeba vzít v úvahu, že do souboru pacientů s imunologicky zprostředkovanými chorobami byli zařazeni pacienti, kteří měli pozitivní ACLA IgG. Tento výsledek je blízký výsledku studie Bertolacciniho a kol. (2012), která prokázala aPE IgG u 46 % pacientů se SLE a zároveň APA pozitivních. Naproti tomu Zhang a kol. (2019) zaznamenali pozitivitu aPE pouze u 8,1 % čínských pacientů s APS. Ke stanovení aPE neexistují žádné mezinárodní standardy. Tento fakt ztěžuje porovnávání různých studií a může vést k nejednoznačným výsledkům.

Nejen hladiny protilátek, ale i jejich avidita mají vliv na závažnost autoimunitního onemocnění (Fialova L., 2014). Pro testování avidity aPE IgG jsme zvolili modifikovanou metodu ELISA s použitím močoviny jako chaotropního činidla.

Pilotní studie stanovení avidity aPE IgG ukázala, že avidita aPE IgG se může pohybovat v širokém rozmezí. Je zajímavé, že jsme neprokázali vztah mezi aviditou aPE IgG a ACLA IgG u pacientů s imunologicky zprostředkovanými chorobami. Zatímco u aPE byly zastoupeny především protilátky s nízkou a střední aviditou, u ACLA převažovaly protilátky s vyšší aviditou. Lze předpokládat, že různé APA se mohou podílet na patogenezi onemocnění různými způsoby, a to nejen s ohledem na různé vazebné cíle. To je známo ze studií avidity (afinity) jiných autoprottilátek (Fialova L., 2014).

## 6. Závěr

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

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

Avidita ACLA nezávisí na hladinách ACLA; vysokoavidní ACLA mohou být přítomny u pacientů s velmi nízkými hladinami ACLA.

Potvrdili jsme, že avidita ACLA patří mezi stabilní charakteristiky, která se sice v čase mění, ale bez statistické významnosti. V naší skupině pacientů převažovaly protilátky s vyšší aviditou a kolísání hladin a avidit v longitudinálním sledování nevykazovalo významné rozdíly.

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

Prokázali jsme signifikantně vyšší hladiny aPE IgG a IgM ve skupině pacientů s žilní TEN ve srovnání s pacienty s jinými interními onemocněními a v kohortě imunologicky zprostředkovaných onemocnění vyšší než u kontrol.

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

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



## 7. Seznam zkratek

ACLA	antikardiolipinové protilátky
AI	index avidity
Anti-beta2GPI	protilátky proti beta2-glykoproteinu I
APA	antifosfolipidové protilátky
aPA	protilátky proti kyselině fosfatidové
aPE	protilátky proti fosfatidyletanolaminu
aPI	protilátky proti fosfatidylinositolu
APS	antifosfolipidový syndrom
aPS	protilátky proti fosfatidylserinu
aPS/PT	protilátky proti komplexu fosfatidylserin/protrombin
aPT	protilátky proti protrombinu
ELISA	enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immuno
sorbent assay)	
GPL	jednotka antifosfolipidových protilátek třídy IgG
IgG	imunoglobuliny izotypu G
IgM	imunoglobuliny izotypu M
LA	lupus antikoagulans
MPL	jednotka antifosfolipidových protilátek třídy IgM
n	počet vzorků
n.s.	nevýznamné
p	míra významnosti
r	Pearsonův korelační koeficient
TEN	tromboembolická nemoc
vs.	versus

## 8. Literatura

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

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

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

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

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

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

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

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

Fialova L, Malbohan I, Malickova K. Avidity of anticardiolipin antibodies. A factor that could be important for their detection by ELISA methods. *J Appl Biomed*. 2014; 12: 277–284.

Fialová L, Petrackova M, Kuchar O. Comparison of different enzyme-linked immunosorbent assay methods for avidity determination of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Anal*. 2017; 31: e22121.

Forastiero R. Multiple antiphospholipid antibodies positivity and antiphospholipid syndrome criteria re-evaluation. *Lupus*. 2014; 23: 1252–1254.

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

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

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

Hughes GRV. Hughes syndrome/APS. 30 years on, what have we learnt? Opening talk at the 14th International Congress on antiphospholipid antibodies Rio de Janeiro, October 2013. *Lupus*. 2014; 23: 400–40.

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

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

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2016; 4: 295–306.

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

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

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

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

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

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

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

Rodriguez-Garcia V, Ioannou Y, Fernandez-Nebro A, et al. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: a systematic review. *Rheumatology*. 2015; 54: 2042–2050.

Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010; 376: 1498–509.

Sanmarco M, Alessi MC, Harle JR, Sapin C, Aillaud MF, Gentile S, Juhan-Vague I, Weiller PJ. Antibodies to phosphatidylethanolamine as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thromboses. *Thromb Haemost*. 2001; 85: 800–5.

Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C, Audrain M, de Maistre E, Gris J-C, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 949–54.

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

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

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

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

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

Zachou K, Liaskos C, Rigopoulou E, Gabeta S, et al. Presence of high avidity anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune cholestatic liver diseases. *Clin Immunol.* 2006; 119: 203–212.

Zhang S, Wu Z, Zhang W, Zhang F, Li Y, Liu Y. Clinical performance of non-criteria antibodies to phospholipids in Chinese patients with antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta.* 2019; 495: 205–9.

## 9. Seznam publikací autora

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

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

*IF = 2,352*

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

*IF = 2,085*

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

*IF = 1,245*