

60. Murphy MB, Murray C, Shorten GD. Drug therapy: Fenoldopam – a selective peripheral dopamine – receptor agonist for the treatment of severe hypertension. *New Engl J Med* 2001;435(21):1548–57.
61. Velasco M, Luchsing A. Dopamine: pharmacologic and therapeutic aspects. *Am J Ther* 1998;5(1):37–43.
62. Weiss B, Zhang SP, Zhou LW. Antisense strategies in dopamine receptor pharmacology. *Life Sci* 1997;60(7):433–55.
63. Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Dopamine receptor-coupling defect in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002;4(3):237–44.
64. Umrani DN, Banday AA, Hussain T, Lokhandwala MF. Rosiglitazone treatment restores renal dopamine receptor function in obese Zucker rats. *Hypertension* 2002;40(6):880–5.
65. Shin Y, Kumar U, Patel Y, Patel SC, Sidhu A. Different expression of D-2-like dopamine receptors in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 2003;21(1):199–207.
66. Strange PE. Agonism and inverse agonism at dopamine D-2-like receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26(Suppl S): S3–S9.
67. Doggrell SA. The therapeutic potential of dopamine modulators on the cardiovascular and renal systems. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11(5): 631–44.
68. Bailey JM. Dopamine – one size does not fit all. *Anesthesiology* 1999;92(2):303–5.
69. Taylor TB, Cockrill BA. Renal-dose dopamine: a siren song? *Lancet* 1994; 344(8914):7–8.
70. MacGregor DA, Smith TE, Prelipp RC, Butterworth JF, James RL, Scuderi PE. Pharmacokinetics of dopamine in healthy male subjects. *Anesthesiology* 2000;92(2):338–46.
71. Power DA, Duggan J, Brady HR. Renal-dose (low-dose) dopamine for the treatment of sepsis-related and other forms of acute renal failure: ineffective and probably dangerous. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; Suppl 26:523–8.
72. Laville M. Review: low-dose dopamine does not prevent acute renal failure or reduce mortality or need for hemodialysis. *ACP J Club* 2002;136(1):p3.
73. Murphy MB. Dopamine: a role in the pathogenesis and treatment of hypertension. *J Hum Hypertens* 2000;14(Suppl 1):S47–50.
74. Yasunari K, Kohno M, Kano H, Hanehira T, Minami M, Yoshikawa J. Anti-atherosclerotic action of vascular D1 receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;(Suppl 26):S36–40.
75. Ganguly PK, Mukherjee K, Sahai A. Renal dopamine receptors are involved in the development of cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 1995;144(1):81–4.
76. Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci* 2000; 319(1):51–62.
77. Kaplan JH. Biochemistry of Na⁺K⁺ATPase. *Annu Rev Biochem* 2002;71: 511–35.
78. Aperia A. Regulation of sodium/potassium ATPase activity: impaired salt balance and vascular contractility. *Curr Hypertens Rep* 2001;3(2): 165–71.
79. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, ur. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science; 2002, str.615–57.
80. Barendrecht JNM, Muizert Y, Pannerden LLAMVT, Chang PC. Intrarenal production of dopamine and natriuresis following DOPA and saline infusions in healthy human volunteers. *J Hum Hypertens* 1995;9(3):187–94.
81. Zeng C, Peiying Y, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Jose PA. D3 dopamine receptor up regulates and directly interacts with the D1 dopamine receptor in renal proximal tubular cells. *Am J Hypertens* 2002;15(4)(Suppl 1):pAll.
82. Strazzullo P, Galetti F, Barba G. Altered renal handling of sodium in human hypertension. Short review of the evidence. *Hypertension* 2003; 41:1000.
83. Williams GH. Arterial hypertension (2009). U: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL eds. Harrison's Principles of internal medicine. New York McGraw Hill 1997, str. 973–85.
84. Ogawa Y, Itoh H, Nakao K Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide family. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:49–53.
85. Soares da Silva P, Vieira Coelho MA, Pinto do O PC, Pestana M, Bertorello AM. Studies on the nature of the antagonistic actions of dopamine and 5-hydroxytryptamine in renal tissues. *Hypertens Res* 1995;18(Suppl 1): S47–51.
86. Budu CE, Efendiev R, Cinelli AM, Bertorello AM, Pedemonte CH. Hormonal dependent recruitment of Na⁺K⁺ATPase to the plasmalemma is mediated by PKC beta and modulated by Na⁺. *Br J Pharmacol* 2002;137(8):1380–6.
87. Cheng HF, Becker BN, Harris RC. Dopamine decreases expression of type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *J Clin Invest* 1996;97(12):2745–52.
88. Zeng CY, Asico LD, Wang XL i sur. Angiotensin II regulation of AT(1) and D-3 dopamine receptors in renal proximal tubule cells of SHR. *Hypertension* 2003;41(3 Part 2):724–9.
89. Xu J, Li XX, Albrecht FE, Hopfer U, Carey RM, Jose PA. Dopamine receptor G (s alpha) and Na⁺H⁺ exchanger interactions in the kidney in hypertension. *Hypertension* 2000;36(3):395–9.
90. Hu CM, Fan L, Crowder LA, Karim-Jimenez Z, Murer H, Moe OW. Dopamine actually stimulates Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3) endocytosis via clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem* 2001;276(29):26906–15.
91. Burkhardt G, Di Sole F, Helmle-Kolb C. The Na⁺/H⁺ exchanger gene family. *J Nephrol* 2002;15(5):S3–21.
92. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Proximal tubular phosphate reabsorption. molecular mechanisms. *Physiol Rev* 2000;80(4):1373–409.
93. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999;79(3):763–854.

PARANEOPLASTIČKI SINDROM POVEZAN S ANTIFOSFOLIPIDNIM PROTUTIJELIMA

PARANEOPLASTIC SYNDROME ASSOCIATED WITH ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES

DIANA KRMPOTIĆ, NADA ČIKEŠ, PAVAO KRMPOTIĆ*

Deskriptori: Paraneoplastički sindromi – imunologija, dijagnostika; Antifosfolipidna protutijela – imunologija; Antifosfolipidni sindrom – imunologija, dijagnostika; Tromboza – imunologija, etiologija

Sažetak. U bolesnika sa zloćudnim tumorima pojavljuju se simptomi koji se ne mogu objasniti masom primarnog tumora niti metastazama, lučenjem hormona niti imunosnim stanjem bolesnika. Skupina takvih poremećaja naziva se paraneoplastički sindrom. Bolesnici sa zloćudnim tumorima skloni su nastanku tromboza u svakom stadiju bolesti. Pretpostavlja se da bi pojava tromboza u bolesnika sa zloćudnim tumorima u sklopu sekundarnog antifosfolipidnog sindroma (APS-a) mogla biti primjer paraneoplastičke autoimunosti, tj. paraneoplastičkog sindroma. Poznato je da antifosfolipidna protutijela (APA), tj. antikardiolipinska protutijela (ACA) i cirkulirajući lupusni antikoagulansi (LAC), mogu biti povezana s nastankom venskih i arterijskih

* Klinika za plućne bolesti »Jordanovac« (mr. sc. Diana Krmpotić, dr. med.), Zavod za kliničku imunologiju i reumatologiju Klinike za unutrašnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkoga bolničkog centra Zagreb (prof. dr. sc. Nada Čikeš, dr. med.), Klinički odjel psihofiziologije Psihijatrijske bolnice »Vrapče« (mr. sc. Pavao Krmpotić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. D. Krmpotić, Klinika za plućne bolesti »Jordanovac«, Jordanovac 104, 10000 Zagreb

Primljeno 27. prosinca 2001., prihvaćeno 12. veljače 2004.

tromboza. Više kliničkih opažanja o povezanosti APA i zloćudnih tumora upućuje na ulogu APA kao dodatnoga trombogenog mehanizma u nastanku paraneoplastičkog tromboembolizma.

Descriptors: Paraneoplastic syndromes – immunology, diagnosis; Antibodies, antiphospholipid – immunology; Antiphospholipid syndrome – immunology, diagnosis; Thrombosis – immunology, etiology

Summary. In patients with malignant tumour signs and symptoms develop that cannot be explained on the basis of the mass effect produced by either primary tumour or its metastases, production of a hormone associated with tissue type giving rise to the malignant tumour, or patients' immune status. These symptom complexes are known as paraneoplastic syndrome. It is known that the patients with malignant tumours are prone to develop venous thromboembolism in any stage of their disease. It is suggested that thromboembolic manifestations in cancer patients may be part of the secondary antiphospholipid syndrome (APS) and an example of the paraneoplastic autoimmunity, eg., paraneoplastic syndrome. Antiphospholipid antibodies (APA), e.g., anticardiolipin antibodies (ACA) and circulating lupus anticoagulant (LAC) are known to predispose to venous and arterial thromboses. The growing number of clinical reports on the association of APA and malignant tumours suggests that APA may be one of contributory factors in the paraneoplastic thromboembolism occurring in malignancy.

Liječ Vjesn 2004;126:155–160

U bolesnika sa zloćudnim tumorom opisuju se paraneoplastički sindrom, tj skupina poremećaja koji se ne mogu objasniti tumorskim metastazama, posljedicama kompresije tumorskih masa, imunostimulacijom, metaboličkim promjenama, infekcijom ili djelovanjem lijekova. Klinička očitovanja paraneoplastičkog sindroma mogu biti: sistemska (kaheksija, vrućica), endokrina (posljedica ektopičkog lučenja hormona kao što su kortikotropin, anti-diuretski hormon, parathormon), neurološka (Eaton-Lambertov miastenički sindrom, subakutna senzorna neuropatija, polimiozitis, poliradikulitis), hematološka (leukomeoidna reakcija, trombocitoza, hiperkoagulabilnost, diseminirana intravaskularna koagulacija), vaskularna (migrirajući tromboflebitis, tzv. Trousseauov sindrom, venske i/ili arterijske tromboze), te dermatološka (pruritus, urtikarija, hiperpigmentacija). Mogu se pojaviti u svakom stadiju zloćudne bolesti, češće u uznapredovalim stadijima. Pretpostavljaju se dva osnovna patogenetska mehanizma nastanka paraneoplastičkog sindroma. Po prvom se razviju kliničke slike sindroma koji nastaju uz tumore koji po prirodi nisu endokrini, ali luče faktore rasta, peptidne hormone ili faktore s endokrinim efektima. Drugi patogenetski mehanizam uključuje patološki imunostimulativni odgovor domaćina prema tumoru. Stvaraju se protutijela te stanični citotoksični odgovor usmjereni na tumorske antigene koji križno reagiraju s tkivom domaćina na sličan način kao u autoimunim bolestima nemalignog podrijetla (to je tzv. paraneoplastička autoimunost).¹ Poznati su paraneoplastički autoimuni neurološki sindromi za koje se na temelju dosadašnjih znanstvenih spoznaja pretpostavlja da nastaju kao posljedica autoimunog odgovora potaknutog tumorom.^{2–4} U bolesnika s karcinomom pluća malih stanica može se pojaviti Eaton-Lambertov miastenički sindrom za koji su specifična protutijela protiv voltažnih kalcijevih kanala te paraneoplastički encefalomijelitis i senzorička neuropatija koji su povezani s prisutnošću antineuronalnih nuklearnih protutijela tipa 1 (anti-Hu-protutijela).^{5–7} U bolesnika s Hodgkinovim limfomom opisana je paraneoplastička cerebelarna degeneracija i pojava protutijela protiv Purkinjevih stanica.⁸

Paraneoplastički tromboembolizam podrazumijeva klinička očitovanja poremećaja zgrušavanja krvi koji nastaju protrombotičkim djelovanjem tumora. Povećano stvaranje trombina uočeno je u početnoj, kao i u uznapredovaloj fazi maligne bolesti. Trombogeneza je u malignim bolestima multifaktorska.⁹ Pretpostavlja se da u nastanku tromboze u bolesnika sa zloćudnim tumorom uz mehanizme tumorskih stanica mogu sudjelovati antifosfolipidna protutijela (APA, od engl. antiphospholipid antibodies) trombogenim mehanizmima u sklopu paraneoplastičke autoimunosti.¹⁰ APA su klinički važna zbog povezanosti s pojavom venskih i/ili arterijskih tromboza, tj. antifosfolipidnim sindromom (APS-om).¹¹ Smatra se da je APS auto-

imuni poremećaj u kojem protutijela uzrokuju protrombotičko stanje. U patohistološkoj se slici nalazi tromboza koja može nastati u krvnim žilama svih veličina i u bilo kojem organu. Najčešća su klinička očitovanja APS-a venske i/ili arterijske tromboze, spontani pobačaji i trombocitopenija. Ostale kliničke manifestacije APS-a mogu biti plućne tromboembolije, plućna hipertenzija, tromboza renalnih krvnih žila, trombi srčanih šupljina i zalistaka, Budd-Chiarijev sindrom, gangrena zbog okluzije perifernih arterija, cerebrovaskularne bolesti, multiinfarkt-na demencija, migrena.¹² Međutim, klinička slika APS-a razvije se u tek oko 30% osoba s nalazom APA.¹³ Dakle, APS je skup kliničkih i patoloških nalaza povezanih s prisutnošću antifosfolipidnih protutijela. Razlikuju se primarni i sekundarni APS: Po definiciji, primarni APS isključuje postojanje druge osnovne bolesti, a sekundarni se APS nalazi u sklopu bolesti kao što su sistemni eritemski lupus (SLE) i druge autoimune bolesti, lupusni sindrom uzrokovan lijekovima, maligne bolesti te infekcije. Primarni APS uključuje tri skupine bolesnika: 1. bolesnici sa spontanim pobačajima, 2. bolesnici s recidivirajućim dubokim venskim trombozama i/ili tromboembolijama, 3. bolesnici s cerebrovaskularnim inzultom i tranzitornim ishemičkim atakama i/ili arterijskim trombozama (uključujući velike periferne krvne žile i srčani infarkt).^{14–16} Premda su postavljeni kriteriji po kojima se razlikuje primarni od sekundarnog APS-a, međunarodna je multicentrična studija pokazala da im je zajednička većina kliničkih i laboratorijskih značajki.^{17,18}

Je li pojava APA epifenomen osnovnog imunostimulativnog poremećaja ili APA imaju patogenetsku ulogu u nastanku paraneoplastičkog tromboembolizma? Pretpostavlja se da bi APA mogla imati ulogu u patogenezi imunostimulativno posredovane tromboze u paraneoplastičkom sindromu. Više kliničkih opažanja o povezanosti APA i zloćudnih tumora upućuje na ulogu APA kao dodatnoga trombogenog mehanizma u nastanku paraneoplastičkog tromboembolizma. Pretpostavlja se da bi pojava tromboza u bolesnika sa zloćudnim tumorom mogla biti primjer paraneoplastičke autoimunosti, tj. paraneoplastičkog sindroma u sklopu sekundarnog APS-a.

O povijesti antifosfolipidnih protutijela

Proučavanje APA počinje 1907. godine kada je Wassermann upotrijebivši solni ekstrakt jetre fetusa s kongenitalnim sifilisom kao antigen za otkrivanje reaginskih protutijela postavio temelj dijagnostičkog testa za sifilis. Godine 1938. u Sjedinjenim je Američkim Državama u skrining programu za otkrivanje bolesnika sa sifilisom nađen velik broj zdravih osoba s pozitivnim testom na sifilis. Taj je fenomen nazvan biološki lažno pozitivan serološki test na sifilis, a opažen je u dva slučaja. U prvom je slučaju lažno pozitivan test na sifilis otkriven za vrijeme ili nakon zaraznih bolesti, a spontano je nestao nakon

izliječenja infekcije. U drugom je slučaju lažno pozitivan eraginski odgovor bez poznatog razloga perzistirao mjesecima ili godinama. Pangborn je 1941. godine dokazao da je antigen za koji se veće reaginsko protutijelo kiseli fosfolipid nazvan kardioliipin jer je dobiven alkoholnom ekstrakcijom iz srčanog mišića goveda. 1950-ih godina je Moore sa suradnicima utvrdio češće pojavljivanje autoimunih bolesti u skupini bolesnika s lažno pozitivnim testom na sifilis. Godine 1952. su Conley i Hartmann opisali dva bolesnika sa SLE i lažno pozitivnim testom na sifilis u čijoj su plazmi našli cirkulirajući antikoagulansi koji *in vitro* inhibira koagulacijske reakcije ovisne o fosfolipidima na razini protrombinskog aktivatorskog kompleksa (koji čine faktor Xa, faktor Va, fosfolipidi i kalcijevi ioni). Feinstein i Rappaport su uveli naziv lupusni antikoagulans za ovaj stečeni koagulacijski inhibitor čija se antikoagulantna aktivnost mogla također naći u plazmi bolesnika s drugim bolestima osim SLE. Pri tome treba napomenuti da plazma bolesnika sa sifilisom ne pokazuje aktivnost lupusnog antikoagulansa. Lechner i Shapiro su frakcioniranjem plazme s lupusnom antikoagulantnom aktivnošću utvrdili frakcije IgG i/ili IgM izotipa protutijela. Lechner i Firkin sa suradnicima su pokazali da je moguće aktivnost lupusnog antikoagulansa plazmatskih frakcija IgG i IgM neutralizirati specifičnim anti-IgM i anti-IgG protutijelima. S vremenom se opazilo da se u bolesnika s laboratorijskim nalazom lupusnog antikoagulansa unatoč *in vitro* prisutnoj antikoagulantnoj aktivnosti plazme ne javljaju krvarenja, već da su skloni nastanku tromboze. Godine 1963. su Bowie i suradnici prvi opisali duboku vensku trombozu u bolesnika sa SLE i nalazom cirkulirajućega lupusnog antikoagulansa, 1965. godine Alarcon-Segovia i Osmudson periferne vaskularne incidente.¹⁹ Hughes je prvi opisao povezanost pojave tromboze, spontanijih pobačaja i cerebrovaskularne bolesti s nalazom lupusnog antikoagulansa kao antikardiolipinski sindrom (Hughesov sindrom).²⁰ Kasnija su istraživanja pokazala da se protutijela bolesnika s antikardiolipinskim sindromom mogu vezati i za druge fosfolipide osim kardioliipina pa se naziv antifosfolipidni sindrom smatra prikladnijim.

Antifosfolipidna protutijela

APA su heterogena skupina protutijela u koja se ubrajaju antikardiolipinska protutijela (ACA), cirkulirajući lupusni antikoagulansi (LAC), a mogu se dokazati i lažno pozitivnim testom na sifilis. APA se mogu naći u bolesnika s primarnim i sekundarnim APS-om te u zdravih osoba kao dio spektra »prirodnih« (»Naturalnih«) protutijela različitih antigenskih specifičnosti bez poznate patofiziološke uloge i kliničkog značenja. »Prirodna« su autoantitijela uglavnom izotipa IgM i pokazuju široku križnu reaktivnost, dok su patogena (autoimuna) autoantitijela izotipa IgG i tek se ponekad nalaze u serumu zdravih osoba. APA su imunoglobulini svih izotipova (IgG, IgM, IgA) i supklasa (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) te pokazuju različitu zavidnost vezanja na antigene. U serumu istog bolesnika može se naći više imunoglobulinskih izotipova, kao i razne mješavine imunoglobulina u serumima različitih bolesnika.²¹ U posljednje je vrijeme postignut značajan napredak u razumijevanju antigenske specifičnosti APA. APA se mogu vezati na anionske fosfolipide, komplekse anionskih fosfolipida s plazmatskim proteinima kao kofaktorima te na same plazmatske proteine. Plazmatski proteini koji mogu vezati anionske fosfolipide su beta2-glikoprotein (beta2-GPI), protrombin, protein C, protein S i faktor X (tablica 1). Međutim, nije poznato da li APA kao epitope prepoznaju proteinske kofaktore, kompleks proteinskog kofaktora i fosfolipida, neoantigene ili kriptogene antigene koji se otkrivaju u međusobnom djelovanju fosfolipida i proteinskih kofaktora. Većina se autora, ipak, slaže da se autoimuna APA ne vežu na anionske fosfolipide *per se*, nego

Tablica 1. Reaktivnost protutijela prema plazmatskim proteinima koji vežu fosfolipide u standardnim antifosfolipidnim testovima

Table 1. Reactivity of antibodies to phospholipid binding plasma proteins in standard antiphospholipid antibody assays

Protutijelo Antibody	Antikardiolipinski test Anticardiolipin antibody assay	Koagulacijski test Coagulation test
Anti-beta-2-glikoprotein I	Da	Da/Ne
Anti-beta-2-glycoprotein I	Yes	Yes/No
Antiprotrombinska	Ne	Da
Anti-prothrombin	No	Yes
Anti-protein C	Ne/No	Ne/No
Anti-protein S	Ne/No	Ne/No
Anti-faktor X	Ne	Da
Anti-factor X	No	Yes

Tablica 2. Metode otkrivanja antifosfolipidnih protutijela

Table 2. Methods of detection of antiphospholipid antibodies

Tip protutijela Antibody type	Laboratorijski test Laboratory assay
Reagini	Aglutinacijski testovi
Reagens	Agglutination tests
Antikardiolipinska protutijela	Radioimunotest/Radioimmunoassay
Anticardiolipin antibodies	Enzimski imunotest/Enzyme linked immunosorbent assay
Lupusni antikoagulansi	Koagulacijski test
Lupus anticoagulant	Coagulation test

na njihove komplekse s plazmatskim proteinom. Pretpostavlja se da plazmatski proteini mogu u kompleksu s fosfolipidima kao kofaktori pojačavati vezanje APA na fosfolipide.²²⁻²⁷

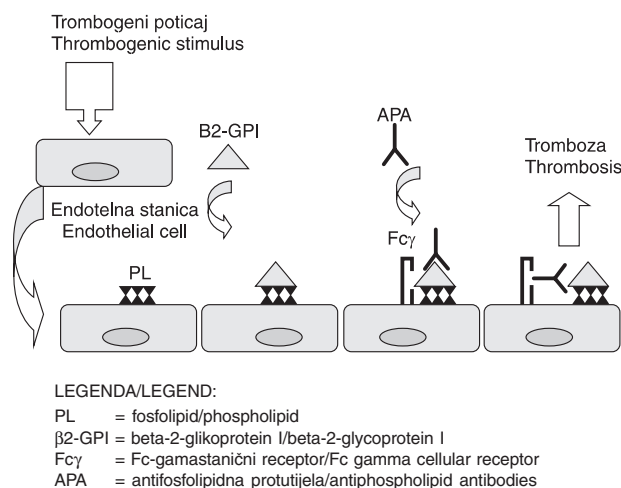
APA se mogu određivati antifosfolipidnim testovima (tablica 2). Lažno pozitivan test na sifilis, tj. reaginska protutijela otkrivaju se u netreponemskim aglutinacijskim testovima VDRL (prema engl. Venereal Disease Research Laboratory) i RPR (prema engl. Rapid Plasma Reagin Card). VDRL-antigen u aglutinacijskom testu na sifilis čini kolesterolska jezgra okružena kardioliipinom i fosfatidilkolinom u lamelarnom obliku. Protutijela prepoznaju epitop kardioliipina s fosfatidilkolinom koji važan za prostornu orijentaciju molekule kardioliipina. U testu RPR reagiska se protutijela vežu na modificirani VDRL-antigen koji se sastoji od koloidne suspenzije kardioliipina s lecitinom i kolesterolom te mikropartikulama ugljika. U prisutnosti reagina dolazi do aglutinacije. Test je kvalitativan i rezultati se očitavaju kao: reaktivna, slabo reaktivan i nereaktivan. Netreponemski testovi VDRL i RPR slabo su osjetljivi testovi za određivanje APA. Mogu pokazivati lažno pozitivne rezultate u autoimunim bolestima i nekim infekcijama.¹⁹⁻²⁸ ACA se mogu određivati u testovima RIA (prema engl. Radioimmunoassay) i ELISA (prema engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay).¹⁹⁻²⁹ Poznato je da ACA iz seruma bolesnika sa sifilisom bolje vežu mješavinu kardioliipina, fosfatidilkolina i kolesterola (tzv. VDRL-antigen) nego pročišćeni kardioliipin, dok ACA iz seruma bolesnika sa SLE bolje vežu kardioliipin u dvoslojnoj konfiguraciji.¹⁹ LAC se određuje u koagulacijskom testu koji inhibira koagulacijske reakcije na razini protrombinskog aktivatorskog kompleksa. Antikoagulantna aktivnost LAC-a je fenomen *in vitro* i paradoksalno je povezana s pojavom tromboze, a ne krvarenja.³⁰ Danas se u laboratorijskoj dijagnostici APA rabe antikardiolipinski test ELISA i koagulacijski LAC-test. U oko 60% slučajeva APA se otkrivaju u oba testa, tj. kao ACA i LAC.³¹ Ta nepotpuna podudarnost antifosfolipidnih testova ne javlja se zbog razlike u osjetljivosti testova, nego se smatra da su ACA i LAC različite populacije protutijela koje se djelomice preklapaju (engl. overlapping).

Opaženo je da se ACA vežu na komplekse fosfolipida s beta 2-GPI, a LAC na komplekse fosfolipida s protrombinom ili beta 2-GPI.^{22,23} Smatra se da dokaz protutijela izotipa IgG-ACA te rjeđe IgM-ACA i/ili LAC-a pridonosi dijagnozi APS-a.²¹⁻³²

Mehanizmi autoimune tromboze u antifosfolipidnom sindromu

APA su prikladan model za proučavanje imunološki posredovane tromboze. U animalnome modelu na miševima pasivnom i aktivnom imunizacijom APA-ima mogu se izazvati spontani pobačaji i trombotopenija, ali ne nastaje tromboza.³³ Animalni model venske staze oponaša stanje u kojem prisutnosti APA podupire u krvi prevagu protrombotičkih procesa. Međutim, za početak stvaranja krvnog ugrušaka nije dovoljna prisutnost APA, već je potreban dodatni trombogeni poticaj kao što je venska staza ili oštećenje stijenke krvne žile. Pretpostavlja se, dakle, da u APS-u postoji više patofizioloških mehanizama nastanka tromboze (»multiple hit« pathogenesis).³⁴

Hipoteza o nastanku tromboze u APS-u putem Fc γ -staničnih receptora pretpostavlja mehanizam »dvostrukog poticaja« (prema engl. »double hit« mechanism) (slika 1). Nakon oštećenja stanica endotela krvnih žila, trofoblasta ili trombocita izlažu se na površini stanica anionski fosfolipidi. Na tako izložene fosfolipide staničnih membrana mogu se vezati plazmatski proteini, kao na primjer beta-2-GPI ili protrombin. Na plazmatske proteine vežu se APA iz krvi, zbijaju na staničnoj površini te nakon vezanja za Fc γ -stanične receptore potiču protrombotička zbivanja. Tako su u trombocitima sintetizira prokoagulan trombosan A2, a na endotelu krvnih žila dolazi do ekspresije tkivnog faktora koji vezanjem na koagulacijski faktor VII potiče vanjski put zgrušavanja krvi.³⁵ Istraživanja Fc γ -staničnih receptora upućuju na gensku osnovu nastanka tromboze u APS-u. Salmon sa suradnicima postavio je hipotezu da se IgG2-APA u osoba s ekspresijom alela Fc γ RIIa-H131 mogu vezati za Fc γ -RIIa varijantu staničnog receptora te prepoznavati epitope na prethodno oštećenim trombocitima ili endotelnim stanicama putem protrombina, beta2-GPI, fosfolipida ili nekih drugih molekula. Prema tome, u osoba bez ekspresije Fc γ RIIa-H131 alela ne postoji odgovarajući Fc γ -stanični receptor pa se APA ne mogu tim putem vezati na trombocite ili endotelne stanice te ne uzrokuju nastanak tromboze.³⁶



Slika 1. Mogući mehanizam nastanka tromboze u antifosfolipidnom sindromu

Figure 1. Putative mechanism leading to thrombosis in the antiphospholipid syndrome

Regulacija fosfolipidne asimetrije dvosloja stanične membrane važna je u procesu zgrušavanja krvi. Procesi aktivacije faktora X, pretvorba protrombina u trombin te put aktivacije proteina C u razgradnji aktiviranih koagulacijskih faktora Va i VIIla zbivaju se na anionskim fosfolipidnim površinama. U fiziološkim se uvjetima anionski fosfolipidi nalaze na unutarnjem dijelu dvosloja stanične membrane. U patološkim uvjetima premještanjem negativno nabijenih fosfolipida iz unutarnjeg u vanjski sloj stanične membrane gubi se regulacija fosfolipidne asimetrije (tzv. remodeliranje). Fosfolipidi izloženi na vanjskoj strani membrane za vrijeme remodeliranja mogu po primiti ulogu autoantigena (engl. self-antigen) na koje se mogu stvarati patogene APA. Isto tako bi stalno prisutne male količine anionskih fosfolipida iz oštećenog endotela krvnih žila, aktiviranih trombocita, trombocitnih partikula ili apoptotskih stanica mogle potaknuti imunosti sustav na stvaranje APA.^{37,38}

Pretpostavlja se da APA mogu uzrokovati nastanak tromboze djelovanjem na endotelne stanice krvnih žila i trombocite te interakcijom s fosfolipidima i plazmatskim proteinima u procesu zgrušavanja krvi. APA mogu sprečavati sintezu prostaglandina u stanicama endotela inhibicijom fosfolipaze A2 pri čemu je nužna prisutnost kofaktora beta 2-Gpi atheriranog na membrani endotelne stanice.³⁹ Uočeno je da APA sinergistički s tumor-nekrotizirajućim faktorom mogu povećavati sintezu i ekspresiju tkivnog faktora na površini endotelne stanice koji nakon vezanja za koagulacijski faktor VII započinje vanjski put zgrušavanja krvi.⁴⁰ Nađeno je da APA mogu vezanjem na fosfolipide endotelne stanice inhibirati trombosan A2 i tako onemogućavati aktivaciju proteina C putem kompleksa trombosan A2-trombosan A2.⁴¹ Na endotelnim stanicama APA se mogu križno vezati za disaharidnu skupinu kompleksa heparin-heparan sulfata koju također prepoznaje antitrombin III, pa tako sprečavaju stvaranje kompleksa antitrombina III s trombinom na endotelnoj površini tj. djelovanje antitrombina III ovisno o heparinu.⁴²

Membrana aktiviranih trombocita važan je izvor anionskog fosfolipida fosfatidilserina koji je u inaktivnoj fazi trombocita smješten na unutarnjoj strani stanične membrane. Poremećaj regulacije fosfolipidne asimetrije stanične membrane javlja se prilikom aktivacije trombocita *in vitro* fiziološkim aktivatorima kao što je, na primjer trombin, nakon čega se na površini trombocita izlože fosfatidilserin i fosfatidiletanolamin. Fosfatidilserin izložen na vanjskoj strani membrane trombocita pruža katalitičku površinu za djelovanje koagulacijskih faktora iz krvi (aktivacija faktora X i protrombina). Osim toga, APA se mogu u prisutnosti plazmatskih proteina beta2-GPI ili protrombina vezati na anionske fosfolipide membrane trombocita te potaknuti oslobađanje trombosana A2 koji djeluje prokoagulantno.⁴³

Ulaženjem u interakciju s fosfolipidima i plazmatskim proteinima u procesu zgrušavanja krvi APA mogu inhibirati put aktiviranog proteina C i proteina S u razgradnji aktiviranih koagulacijskih faktora Va i VIIla. APA mogu prepoznavati fosfolipidnu komponentu u kompleksu aktiviranog proteina C na vanjskoj strani dvosloja stanične membrane i inhibirati djelovanje aktiviranog proteina C. Pri tome proces aktivacije proteina C nije zapriječen te razina proteina C ne mora biti snižena.⁴⁴ Osim toga, u prisutnosti APA protein koji veže C4b-komponentu komplementa s afinitetom vezanja za anionske fosfolipide pojačano se veže za slobodni protein S te smanjuje njegovu razinu u plazmi.⁴⁴

Kliničko značenje APA u tumorskoj bolesti

APA su klinički važna zbog povezanosti s APS-om tj. pojavom venskih i/ili arterijskih tromboza. Rijetko su prisutna u zdravih osoba, a u infekcijama se nalaze prolazno, najčešće su izotipa IgM te najvjerojatnije nastaju poliklonskom aktivacijom

protutijela, što govori u prilog da su APA epifenomen. Istraživanja o povezanosti APA s trombozom u SLE i primarnom APS-u upućuju, međutim, na njihovu patogenesku ulogu u nastanku tromboze u APS-u. Također je opaženo da bolesnici s malignom bolešću i APA-ima češće imaju tromboze. Pretpostavlja se da u nastanku tromboze u bolesnika sa zloćudnim tumorom uz mehanizme tumorskih stanica sudjeluju APA u sklopu paraneoplastičke autoimunosti.

U literaturi se nalazi veći broj retrospektivnih i manji broj prospektivnih studija o povezanosti APA i tromboze u bolesnika s primarnim APS-om i sekundarnim APS-om u SLE, dok se pojavi APS-a i kliničkom značenju APA u malignim bolestima većinom nalaze prikazi pojedinačnih slučajeva te istraživanja na skupinama bolesnika s različitim vrstama tumora. Prospektivna istraživanja APA u bolesnika s tumorom nisu brojna, skupine bolesnika obično nisu definirane prema tipu tumora, stadiju bolesti i terapijskom učinku, a broj ispitanika je malen te vrijeme praćenja kratko. Gotovo sve dosadašnje studije prikazuju rezultate određivanja APA nakon vremenski udaljenoga trombotičkog događaja. U tom slučaju ostaje nepoznato da li se APA u trenutku kliničke pojave tromboze mogu naći u serumu bolesnika te kolika je razina APA bila prije trombotičkog događaja.

Zuckerman i suradnici su prospektivnim istraživanjem u skupini od 216 bolesnika s dvadeset i devet različitih solidnih i hematoloških neoplazma ustanovili statistički značajnu prevalenciju ACA od 22% u usporedbi s kontrolnom skupinom zdravih osoba. Bolesnici s ACA-ima, imalo je venske tromboze i/ili plućne tromboembolije. Nije nađena statistička značajnost u pojavljivanju ACA i tromboze u odnosu na tip neoplazme, proširenost maligne bolesti i liječenje. U četiri bolesnika (dva s karcinomom debelog crijeva, jednog s karcinomom pluća i jednog s ne-Hodgkinovim limfonom) s povoljnim terapijskim učinkom nakon operacije u prva tri bolesnika te nakon citostatike polikemoterapije u četvrtog bolesnika, opažen je pad prije liječenja povišenih vrijednosti ACA. Do porasta razine ACA i pojave tromboze došlo je u relapsu maligne bolesti. Pad razine ACA u bolesnika s tumorom nakon uspješne resekcije tumora, odnosno citostatske polikemoterapije mogao bi se objasniti smanjenom antigenskom stimulacijom nakon smanjenja tumorske mase, odnosno imunosupresijom, tj. smanjenim stvaranjem ACA nakon citostatske polikemoterapije, što upućuje na autoimunu prirodu APA u sklopu paraneoplastičkog sindroma. Autori također smatraju da u prilog paraneoplastičke prirode ACA govori ponovna pojava ACA u pogoršanju maligne bolesti. Stoga pretpostavljaju da bi ACA uz druge trombotogene faktore u bolesnika s tumorom mogla pridonijeti nastanku paraneoplastičkog tromboembolizma.⁴⁶

U našem prospektivnom istraživanju skupine bolesnika s karcinomom pluća utvrđena je statistički značajna prevalencija IgG-ACA od 23% te pojava tromboze u 5,4% bolesnika. Pojavljivanje IgG-ACA nije se statistički značajno razlikovalo između bolesnika s trombozom i bolesnika bez nje, kao ni prema dobi, spolu i općem stanju bolesnika te tipu karcinoma pluća, stadiju bolesti, vrsti liječenja i ishodu bolesti. Međutim, u nekih je bolesnika nakon uspješnog liječenja došlo do pada povišene razine IgG-ACA izmjerene u trenutku postavljanja dijagnoze. U drugih smo bolesnika opazili da su nepovoljan terapijski odgovor i kliničko pogoršanje pratili porast razine IgG-ACA. Ni u nijednog bolesnika nije nađen pozitivan LAC u koagulacijskom testu. Stoga je moguće da se APA koja se u naših bolesnika stvaraju u sklopu tumorske bolesti, dakle, paraneoplastičkog antifosfolipidnog sindroma, a ne primarno autoimune bolesti, ne mogu dokazati kao oba protutijela: ACA i LAC. Moguće je da se ACA potaknuta tumorom razlikuju od ACA povezanih s primarnim APS-om i sekundarnim APS-om u SLE, pa nužno ne pokazuju aktivnost LAC-a.^{47,48}

Podaci iz literature o značajnoj prevalenciji APA u bolesnika s malignom bolešću te klinička opažanja dinamike razine APA s obzirom na antineoplastički terapijski učinak u pojedinačnim opisima bolesnika govore u prilog pretpostavci da APA mogu imati patogenetsku ulogu u nastanku sekundarnog APS-a u sklopu paraneoplastičke autoimunosti, tj. paraneoplastičkog sindroma. Prospektivna istraživanja APA na većem broju bolesnika sa zloćudnim tumorima pridonijela bi daljnjem razumijevanju paraneoplastičke autoimunosti te patofiziološke uloge i kliničkog značenja APA u tumorskoj bolesti.

LITERATURA

- Bunn PA, Ridgway EC. Paraneoplastic syndromes. U: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer. Principles and practice of oncology. 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott Comp. 1989;V2:1896-940.
- Mayer M, Čikeš N. Paraneoplastički autoimuni neurološki sindromi. Liječ Vjesn 1998;120:32-7.
- Posner JB, Dalmau JO. Paraneoplastic syndromes affecting the central nervous system. Annu Rev Med 1997;48:157-66.
- Lennon VA. Paraneoplastic autoantibodies: The case for descriptive generic nomenclature. Neurology 1994;44:2236-40.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, O'Suilleabhain PE, Windebank AJ, Wopmann A, Miljanich GP, Lambert EH. Calcium-channel antibodies in Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. N Engl J Med 1995;332:1467-74.
- Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy. Medicine 1992;71:59-72.
- Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology. 6th ed. New York: McGraw Hill; 1997, str. 1471-2.
- Hammack J, Kotanides H, Rosenblum MK, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration II Clinical and immunologic findings in 21 patients with Hodgkin's disease. Neurology 1992;41:1938-43.
- Naschitz JE, Yeshurun D, Lev LM. Thromboembolism in cancer. Cancer 1993;7:1384-90.
- Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, Stevens P, Hirsh J. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. Blood 1995;86:3685-91.
- McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. Adv Immunol 1991;193-280.
- Cervera R, Asherson RA, Lie JT. Clinicopathologic correlations of the antiphospholipid syndrome. Sem Arthritis Rheum 1995;4:262-72.
- Roubey RAS. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other »antiphospholipid« autoantibodies. Blood 1994;84:2854-67.
- Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. Lancet 1993;342:341-4.
- Khamashta MA, Asherson RA. Hughes syndrome: antiphospholipid antibodies move closer to thrombosis in 1994. Br J Rheumatol 1995;34:493-4.
- Ames PRJ, Khamashta MA, Hughes GRV. Clinical and therapeutic aspects of the antiphospholipid syndrome. Lupus 1995;4(suppl.1):S23-S25.
- Piette JC. Exclusion criteria for the primary antiphospholipid syndrome. J Rheumatol 1992;19:988-9.
- Vianna JL. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients. Am J Med 1994;96:4-9.
- McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. Adv Immunol 1991;193-280.
- Hughes GRV. The Anticardiolipin syndrome. Clin Exp Rheumatol 1985;4:285-6.
- Triplett DA. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. A consequence, coincidence or cause? Arch Pathol Lab Med 1993;117:78-88.
- Roubey RAS. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other »antiphospholipid« autoantibodies. Blood 1994;84:2854-67.
- Gharavi AE. Antiphospholipid cofactor. Stroke 1992;23(suppl.1):17-110.
- Galli M, Comfurius P, Maasen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vrijsman PJC, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet 1990;335:1544-7.
- Harper MF, Hayes PM, Lentz BR, Roubey AS. Characterization of β 2-glycoprotein I binding to phospholipid membranes. Thromb Haemost 1998;80:610-14.
- Matsura E, Igarashi M, Igarashi Y, Katahira T, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA, Koike T. Molecular studies on phospholipid-binding sites and cryptic epitopes appearing on β 2-glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. Lupus 1995;4(suppl.1):S13-S17.
- Kandiah DA, Hunt JE, Krilis SA. Epitope mapping studies of antiphospholipid antibodies and β -GPI using synthetic peptides. Lupus 1995;4(suppl.1):S7-S11.

28. McGrew Be, Ducros MJ, Stout GW, Falcone VH. Automation of flocculation test for syphilis. *Amer J Clin Pathol* 1968;50:52–9.
29. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46:1–6.
30. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: and update. *Thromb Haemost* 1995;74:1185–90.
31. Santoro SA. Antiphospholipid antibodies and thrombotic predisposition: underlying pathogenic mechanisms. *Blood* 1994;83:2389–91.
32. Lynch A, Marlar R, Murphy J, Davila G, Santos M, Rutledge J, Emlen W. Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome. *Ann Intern Med* 1994;120:470–5.
33. Bakimer Rguilburd B, Zurgil N, Shoengeld Y. The effect of intravenous gamma-globulin (IVG) on the induction of experimental antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;69:97–102.
34. Greaves M, Ford I, Phipps J. Thrombosis in the antiphospholipid syndromes: a »mutiple hit« pathogenesis involving antiendothelial cell antibodies. *Thromb Haemost* 1997;(suppl):359.
35. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996;75:536–41.
36. Esmon NL, Smirnov MD, Esmon CT. Thrombogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997;78:79–82.
37. Comfurius P, Bevers EM, Galli M, Zwaal ARFA. Regulation of phospholipid asymmetry and induction of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 1995;4(suppl.1):S19–S22.
38. Cheng HM. Apoptotic antigens, β 2-glycoprotein I, and antiphospholipid antibodies. *Blood* 1996;88:4396.
39. D'Cruz D, Hughes G. Antibodies, thrombosis and endothelium. *Br J Rheumatol* 1994;33:2–4.
40. Hasselaar P, Derksen RHW, Oosting J, Blokzijl L, de Groot PG. Synergistic effect of low doses of tumor necrosis factor and sera from patients with systemic lupus erythematosus on the expression of procoagulant activity by cultured endothelial cells. *Thromb Haemost* 1989;62:654–60.
41. Cariou R, Tobelem G, Bellucci S, Soria J, Soria C, Maclof J, Caen J. Effect of lupus anticoagulant on antithrombotic properties of endothelial cells – inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb Haemost* 1988;60:54–8.
42. Shibata S, Harpel PC, Gharavi A, Rand J, Fillit H. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III-thrombin complexes. *Blood* 1994;83:2532–40.
43. Martinuzzo ME, Maclof J, Carreras LO, Levy-Toledano S. Antiphospholipid antibodies enhance thrombin-induced platelet activation and thromboxane formation. *Thromb Haemost* 1993;70:667–71.
44. Smirnov MD, Triplett DT, Comp PC, Esmon NL, Esmon CT. On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. *J. Clin Invest* 1995;95:309–16.
45. Sorice M, Arcieri P, Griggi T, Circella A, Misasi R, Lenti L, Nucci D. Inhibition of protein S by autoantibodies in patients with acquired protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1996;75:555–9.
46. Zuckerman E, Toubi E, Golan TD, Rosenwald-Zuckerman T, Sabo E, Shmuel Z, Yeshurun D. Increased thromboembolic incidence in anticardiolipin-positive patients with malignancy. *Br J Cancer* 1995;72:447–51.
47. Krmpotić D. Prevalencija i kliničko značenje antifosfolipidnih protutijela u bolesnika s karcinomom pluća (magistarski rad). Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2000, str. 83–85.
48. Krmpotić D, Čikeš N, Pavelić Lj, Samaržija M. Effects of chemotherapy and irradiation therapy on antiphospholipid antibodies in patients with lung cancer. Abstracts. VII International Congress on Immunorehabilitation, New York, April 14–17, 2001, str. 78.