

# Utjecaj estrogena na razinu antikardiolipinskih protutijela u bolesnica sa sistemskim eritemskim lupusom

---

**Martinović-Kaliterna, Dušanka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2007**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:638011>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Martinović Kaliterna, Dušanka (2007) *Utjecaj estrogena na razinu antikardiolipinskih protutijela u bolesnica sa sistemskim eritemskim lupusom [Influence of estrogens on the level of anticardiolipin antibodies in females with systemic lupus erythematosus].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/555>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Duška Martinović Kaliterna**

**Utjecaj estrogena na razinu  
antikardiolipinskih protutijela u  
bolesnica sa sistemskim eritemskim  
lupusom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2007.

Disertacija je izrađena u Internoj klinici KB Split u Splitu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragan Ljutić

Ovaj rad posvećujem našim bolesnicama sa sistemskim lupusom. Hvala dragoj prof.dr.sc. Nadi Čikeš na iskrenoj podršci, a posebno mentoru i prijatelju prof. dr.sc. Draganu Ljutiću na cjelokupnoj pomoći. Hvala suprugu Josipu Kaliterni na strpljenju i razumijevanju kao i mojim suradnicima na pomoći.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	4
1.1. SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS .....	4
1.1.1. Etiopatogeneza SLE-a .....	5
1.1.2. Spolni hormoni i SLE.....	8
1.1.3. Apoptoza i SLE .....	10
1.1.4. Genska ovisnost u SLE-u .....	11
1.1.5. Kliničke manifestacije SLE-a.....	11
1.1.6. Liječenje SLE-a.....	19
1.2. KOMPLEMENT .....	20
1.3. PROTUTIJELA .....	25
1.4. AUTOPROTUTIJELA.....	30
1.5. ANTIFOSFOLIPIDNA PROTUTIJELA.....	34
1.6. ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM .....	38
1.7 SPOLNI HORMONI I IMUNI SUSTAV .....	55
<b>2. CILJ RADA I POSTAVKE</b> .....	65
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	68
3.1 IZBOR ISPITANICA .....	68
3.2. ODREĐIVANJE ESTROGENA-ESTRADIOLA .....	69
3.3 ODREĐIVANJE ANTIKARDIOLIPINSKIH PROTUTIJELA .....	70
3.4 ODREĐIVANJE KOMPONENTI KOMPLEMENTA .....	71
3.5. STATISTIČKA OBRADA .....	71
<b>4. REZULTATI</b> .....	72
<b>5. RASPRAVA</b> .....	78
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	95
<b>7. SAŽETAK</b> .....	97
<b>8. SUMMARY</b> .....	99
<b>9. POPIS LITERATURE</b> .....	101
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	123

# 1. UVOD

## 1.1.SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS

Sistemski eritemski lupus (SLE) je složena autoimuna bolest koja može zahvatiti gotovo sve organske sustave. Oštećenje tkiva nastaje kao posljedica direktnog citotoksičnog učinka ili u sklopu upalne tkivne reakcije.

U osnovi proširene tkivne i stanične destrukcije je sklonost razvoju autoimune reaktivnosti usmjerene na različite sastojke stanične jezgre i membrane jednako kao i na cirkulirajuće proteine, što se klinički manifestira kroz pojavu autoprotutijela i posljedično stvaranje imunih kompleksa (1).

Čitava paleta autoimunih zbivanja obilježava SLE, što se u prvom redu odnosi na nastanak protutijela na staničnu jezgru i citoplazmu uz ostala brojna autoprotutijela na vlastita tkiva i stanice (2). Upravo su autoprotutijela uz novonastale imune komplekse osnovni patofiziološki supstrat odgovoran za aktivaciju komplementnog sustava i nastanak upale.

Komplement se aktivira vezivanjem za Fc-receptore autoprotutijela i posreduje u upali kroz oslobađanje brojnih proupalnih citokina (3).

Zanimljivo je da se autoprotutijela karakteristična za SLE mogu pojaviti u cirkulaciji više godina prije kliničkog ispoljavanja bolesti (4).

SLE je uglavnom bolest mladih žena i to najčešće u njihovom plodnom periodu između 15.-te i 40.-te godine života. U muškaraca se rijetko javlja, veća pojavnost SLE-a u muškom spolu zamijećena je jedino u Klinefelterovom sindromu (5).

Uloga genskih čimbenika bitna je za nastanak SLE-a kao i za tijek bolesti, a neosporan je i utjecaj virusnih infekcija (2).

Obiteljska sklonost je izražena u SLE-e stoga se nalazi značajno veća učestalost u prvom koljenu srodnštva. U pojedinim obiteljima bolest se javlja u sklopu drugih autoimunih zbivanja kao što je autoimuna hemolitička anemija, tiroiditis te idiopatska trombocitopenička purpura (4).

### **1.1.1. Etiopatogeneza SLE-a**

Etiopatogeneza SLE-a još nije dovoljno poznata. Kao mogući uzrok razmatraju se: virusi, bakterije, hormoni, ultraljubičasta zračenja uz različite kemijske čimbenike. Uz to nije zanemariv i utjecaj stresa, te okoliša (6).

SLE je posebice zanimljiv s patofiziološkog stajališta budući da su u zbivanja pored imunog uključeni i brojni drugi sustavi. Bolest se ispoljava upalom različitih organa, ranim infarktima, vaskulitisom te odlaganjem imunih kompleksa u brojna tkiva (7).

Najbolje proučena zbivanja u bolesnika s SLE-om su ona na bubrezima. Mikroskopskim pretragama nađene su različite promjene kao što je povećanje mezangijskih stanica i matriksa, nakupljanje upalnih stanica i različite promjene bazalne membrane uz odlaganje imunih kompleksa. U odloženim imunim kompleksima u bubregu pored imunoglobulina G, M i A nalaze se i komponente komplementa (8).

Zanimljivo je da se u kožnim lezijama nalaze slične promjene kao u bubrezima, naime na dermo-epidermalnom spoju nalaze se upalne stanice i depoziti imunoglobulina i komplementa (9).

Kako su i drugi brojni organi zahvaćeni u SLE-u, u njima je također potvrđena nespecifična upala u podlozi koje su depoziti imunih kompleksa. Povremeno može doći do stvaranja tromba koji zatvaraju krvne žile važne za opskrbu organa uslijed čega nastaju mikro ili makroinfarkti s posljedičnim propadanjem tkiva (10).

U podlozi trombotskih zbivanja su vjerojatno antifosfolipidna protutijela koja uzrokuju prokoagulantno stanje ali se ovdje ne smije zanemariti ni doprinos antiendotelnih protutijela u nastanku tromba (11).

Pojedina stanja su etiološki posebno zanimljiva, primjerice ubrzana ateroskleroza, povećan rizik kardiovaskularnih događanja te seriozna osteonekroza. Ovdje nije jasno što spada u samo patološko zbivanje a što je posljedica terapije, naročito glukokortikoidima (12).

SLE obilježava aberantna stanična populacija usmjerena na vlastite antigene; u naravi čitava paleta autoprotutijela usmjerena na vlastita tkiva odnosno molekule koje se nalaze u staničnoj jezgri, citoplazmi ili na staničnoj površini (2).

Serum lupusnih bolesnika sadrži i protutijela na markere tkivne histokompatibilnosti kao i na koagulacijske čimbenike. Analiza autoprotutijela upućuje da mnoga od njih nisu značajna u praćenju progresije i aktivnosti bolesti (13).

Pojedini autori smatraju da su samo anti-Smith protutijela i antinativna DNA protutijela specifična za SLE, iako se ona razlikuju u ekspresiji i kliničkoj povezanosti. Anti-Smith protutijela imaju trajnu razinu za vrijeme trajanja bolesti, dok vrijednosti anti-DNA variraju; povišene vrijednosti su većinom povezane s bubrežnim manifestacijama bolesti (14).

Jasno je da je glavna imunopatološka značajka SLE-a poliklonalna aktivacija B limfocita što vodi ka hiperglobulinemiji, povećanoj proizvodnji autoprotutijela i stvaranju imunih kompleksa. Pretpostavlja se da je u osnovi poremećaja



nemogućnost T limfocita da potisnu zabranjene klonove B limfocita, što ima za posljedicu bujanje ovih klonova (15).

U etiopatogenezi SLE-a sve se više razmatraju «superantigeni» koji predstavljaju proizvode bakterija i virusa, a naročito retrovirusa. Ovi antigeni mogu modulirati T stanični odgovor uz posljedičnu hiperaktivaciju B limfocita. Mehanizam djelovanja nije poznat, ali se zna da imaju sposobnost direktnog vezanja za klasu II gena glavne tkivne podudarnosti kao i za određene proteinske dijelove (16).

Zna se da je koštana srž primarni limfoidni organ odgovoran za razvoj B stanica dok su sekundarni limfoidni organi slezena i limfni čvorovi usavršeni u generiranju imunog odgovora B limfocita, te u prepoznavanju antigena.

Limfni čvorovi dreniraju veći dio međustaničnog prostora putem aferentnog limfatičnog toka, dok Peyer-ove ploče, apendiks i mezenterički čvorovi dreniraju crijeva. Strani antigeni koji ulaze u cirkulaciju odstranjuju se preko slezene (17).

Upravo povećani limfni čvorovi pojedinih SLE bolesnika uz histološku dijagnozu nekrotizirajućeg vaskulitisa sugeriraju moguću vezu genskih proizvoda retrovirusa i SLE-a (18).

Pored infekcija na aktivnost B limfocita mogu djelovati različiti čimbenici okoliša, jednako tako hormoni i geni. Pitanje je samo kolika je uloga pojedinih čimbenika u nastanku i ponavljanju bolesti (9).

SLE je skup različitih patofizioloških i kliničkih sindroma kojima je zajednički imuni odgovor na vlastito. Što je razlog ovom događanju još je dvojbeno. Svaki organizam nastoji zadržati ravnotežu između tolerancije na vlastito i imunog odgovora na strano. U organizmu postoje brojni mehanizmi koji kontroliraju toleranciju na vlastite stanice i DNK. Gubitak tolerancije na vlastiti DNK nastaje kada genski ili vanjski čimbenici dovedu do blokade ovih mehanizama. Smatra se da je

autoimuna ozljeda tkiva u lupusu posredovana imunim kompleksima koji sadrže nukleosom (nukleosom je osnovna jedinica kromatina: sastoji se od histonske srži omotane s DNK) ili druge kromatinske čestice. Ovi se imuni kompleksi prepoznaju preko Fc receptora i posljedične komplementne aktivacije (10).

### **1.1.2. Spolni hormoni i SLE**

Aktivnost SLE-a, koji je većinom bolest mladih žena, pokazuje povezanost s menstrualnim ciklusom, menopauzom, trudnoćom kao i s primjenom oralnih kontraceptiva. Odnos žena naspram muškarcima je 9:1 (19).

Studije pokazuju da spolni hormoni naročito estrogen i dihidroepiandrosteron sudjeluju u razvoju bolesti te da su sinteza i metabolizam ovih hormona poremećeni u SLE-u (20, 21).

Poznato je da zdrave žene mogu razviti SLE-u sličan sindrom pri primjeni lijekova koji podižu razinu estrogena. Štoviše postmenopauzne žene pokazuju povećanu sklonost SLE-u pri uzimanju produžene estrogene nadomjesne terapije (22, 23).

Nesrazmjer spolnih hormona u SLE-u očituje se povišenim razinama estrogena i 16 alfa hidroksiliranih metabolita uz smanjen testosteron i dihidroepiandrosteron što upućuje na poremećaj hormonalnog metabolizma u ovih bolesnika (24).

Hormoni svoje djelovanje ostvaruju preko receptora. Više godina se zna da su receptori za estrogen i dihidroepiandrosteron prisutni na timocitima, zrelih T stanicama i monocitima a prema novijim studijama i na B limfocitima (25).

Verthelyi i Petri su pokazali u skupini premenopauzних bolesnica s SLE-om značajno više razine estrogena u odnosu na kontrolnu skupinu (26).

Više razine estrogena potvrđene su u žena u menopauzi s SLE-om, kao i u muškaraca s SLE-om u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine, što potvrđuje stajalište da estrogeni doprinose nastanku i ponavljanju lupusne bolesti (27).

Studije na mišu i u humanoј populaciji pokazuju da estrogen potiče B staničnu hiperaktivnost s posljedičnom povećanom produkcijom autoprotutijela u zdravih individua kao i u onih s autoimunom bolešću. Većina ispitivača smatra da učinak na B limfocite nije direktan, već povišene razine estrogena uvjetuju povećanu produkciju interleukina 4, koji zatim potiče B limfocite na aktivnost (28).

U bolesnika s SLE-om u neaktivnoj fazi bolesti uočena je korelacija stanica koje luče interleukin 4 i estrogena, zanimljivo je da se ona progresivno smanjuje s stupnjem aktivnosti bolesti. Ovo upućuje na mogućnost fiziološkog ograničenja u sazrijevanju i aktivaciji B limfocita, ili moguće u izrazito aktivnoj bolesti dolazi do iscrpljenja limfocitnog odgovora na estrogeni utjecaj (29).

Značaj spolnih hormona u SLE-u je nedvojbен, pitanje je koliko se taj upliv može upotrijebiti u terapijske svrhe. Oskudni podaci u muškaraca s SLE-om upućuju na povoljan učinak supstitucijske terapije dihidroepiandrosteronom naročito u muškaraca s Klinefelter-ovim sindromom (5, 30).

### 1.1.3. Apoptoza i SLE

Brojnim mehanizmima imuni sustav nastoji učvrstiti svoju toleranciju. Primarna tolerancija T i B limfocita se u prvom redu odnosi na mehanizam uklanjanja stanica posredovan apoptozom.

Apoptoza ili programirana smrt stanice je glavni fiziološki mehanizam kojim višestanični organizmi mogu reorganizirati svoj stanični sastav bez da stanice umru nekrozom koja može prouzročiti upalu (31).

Nakon studija o ulozi apoptoze u etiologiji i patofiziologiji lupusa znatno je jednostavnije razumjeti brojna zbivanja u lupusu. Klirens apoptotičkih stanica ovisi o strukturnim promjenama same apoptotičke stanice; opsonizaciji različitim serumskim proteinima, vezivanju i posljedičnoj fagocitozi od susjednih fagocita (18). Apoptoza je najčešće potaknuta vanjskim stresom, na primjer ultraljubičastim zračenjem. Bitno se razlikuje od stanične nekroze; neophodna je ekspresija novih gena potaknuta pojavom ili gubitkom vanjskih signala, što vodi programu unutrašnje smrti stanice (31).

Stanična nekroza ne zahtijeva ekspresiju glasničke RNK ili proteina; drži se da je potaknuta staničnim oštećenjem ili narušavanjem osmotske ravnoteže. Kod apoptoze nema promjena u osmotskim gradijentima i ne postoji unutarstanični poticaj za upalu.

Apoptoza je normalan dio embrionalnog razvoja i u tom vremenu nastali fragmenti autoantigena mogu inducirati toleranciju. U konačnici abnormalni apoptotički događaji mogu generirati skrivene vlastite peptide (32).

U bolesnika s SLE-om oštećen je klirens apoptotičkih stanica. Za vrijeme apoptoze kromatin se degradira prije nego stanice izgube integritet membrane. Makrofazi fagocitozom uklanjaju apoptotične stanice sprječavajući na taj način

kontakt ostataka stanične jezgre s imunim sustavom. Kod oštećenog klirensa apoptotičkih stanica nastaje mogućnost kontakta dijelova stanične jezgre s imunim sustavom čime se može objasniti stvaranje antinuklearnih protutijela (33).

#### **1.1.4. Genska ovisnost u SLE-u**

Lupus je povezan s različitim genskim poremećajima. Egzogeni i endogeni čimbenici mogu potaknuti bolest ali je predispozicija za bolest očito nasljedna. Porijeklo bolesti je multigeno i uključuje različite genske kombinacije u pojedinih individua (6).

Na 6.-om kromosomu u humanoj populaciji nalaze se brojni genski markeri nazvani glavnim genima tkivne podudarnosti. Studije na većem broju bolesnika upućuju da je za sklonost lupusu odgovorna klasa II genskog polimorfizma (1).

Lupus je najčešće povezan s HLA -DR 2 i HLA –DR 3. Klasa II izgleda da ima važan utjecaj na produkciju antinuklearnih protutijela (24). Zanimljivo je da je na mišjem modelu pokazan bitno manji utjecaj gena na bolest naspram vanjskim utjecajima, ali se to ne može prenijeti na humanu populaciju budući da su u miša za razliku od ljudi genske varijacije znatno ograničenije (34).

#### **1.1.5. Kliničke manifestacije SLE-a**

##### **a) koža**

Prve kliničke manifestacije SLE-a uočavaju se na koži; karakterističan je «leptirast» osip koji je eritematozan, eleviran, popraćen često bolnim lezijama i ulceracijama. Mogu se javiti i bulozne lezije te fotosenzitivni osip. Alopecija je

također česta i može biti difuzna ili ograničena, važno je što je usko povezana s pogoršanjem bolesti (Slike 1.-3.). Lezije se javljaju i na mukoznim membranama; prisutne su ranice usne šupljine, vagine, pa čak i erozije nazalnog septuma. Na noktima se javljaju purpura uz ulceracije noktiju i vršaka prstiju, splinter hemoragije te Osler-ovi i Janeway-ovi čvorići (35).



**Slika 1.** Leptirasti osip lica



**Slika 2.** Ograničena alopecija vlasišta



**Slika 3.** Difuzna alopecija

### **b) zglobovi**

Artralgije i artritis javljaju se kao prve manifestacije bolesti u oko 90% bolesnika. Promjene se mogu javiti na bilo kojem zglobu, ali je za SLE karakterističan simetričan otok i bolnost malih zglobova ručja i koljena (36).

Artritis može biti migratoran, prolazan ili stalan, mikroskopski sinovijum pokazuje upalu, dok se iznimno rijetko javlja erozija kosti. Karakterističan neerozivni deformirajući artritis u lupusu naziva se Jaccoud-ova artropatija (37).

### **c) bubrezi**

U bubrežima gotovo svih bolesnika s SLE-om mogu se naći depoziti imunoglobulina. Bolest bubrega može biti i prva manifestacija SLE-a. Stupanj bubrežnih promjena ovisan je količini odloženih imunih kompleksa. Zahvaćenost bubrega procjenjuje se histološkom analizom tkiva bubrega na osnovu čega se donosi terapijska odluka. Najčešći oblici nefritisa u SLE-u su membranoproliferativni i membranozni glomerulonefritis. Prognoza lupusnog nefritisa ovisi o serioznosti

histopatoloških lezija, njihovom trajanju te arterijskoj hipertenziji (38). Distalna tubularna disfunkcija je rijetka u lupusu; praćena je distalnom tubularnom acidozom te oštećenjem lučenja kalija i hiporeninemičnim hipoaldosteronizmom (39).

#### **d) pluća**

Zbivanja na plućima u SLE-u imaju širok spektar manifestacija: čest je obostrani pleuritis, zatim akutni pneumonitis, nije rijetka ni intersticijska bolest pluća. Može se javiti plućna fibroza, mikroembolije uz posljedičnu plućnu hipertenziju, alveolarna hemoragija, te respiratorna i dijafragmalna miopatija (40). Najčešći simptomi su kašalj, povišena temperatura i gubitak daha, povremeno se mogu javiti hemoptize.

Pneumonitis se u lupusu valja razlikovati od klasične infekcije, što zahtijeva bronhoalveolarnu lavažu, mikrobiološku analizu sputuma te ponekad i biopsiju pluća. Pleuralne efuzije su česte, dok je plućna hemoragija prezentirana hemoptizom i infiltratima pluća izrazito rijetka.

Plućna hipertenzija u podlozi koje je vjerojatno antifosfolipidni sindrom teško se razlikuje od idiopatske plućne hipertenzije. Ovi bolesnici gotovo redovito imaju prisutan Raynaud-ov fenomen, izražena je dispneja, dok se na funkcionalnim testovima pluća bilježe restriktivne promjene (41).

#### **e) srce i krvne žile**

Kardiovaskularne bolesti se pored infekcije spominju kao najčešći uzrok smrti u SLE-u. U akutne srčane manifestacije SLE-a spadaju: miokarditis, perikardijalne efuzije, tamponada srca, te sterilne vegetacije valvula (Libman Sacks) (42).



U kroničnim srčanim manifestacijama ubrzana ateroskleroza je danas prepoznata kao važan čimbenik morbiditeta i mortaliteta u bolesnika s SLE-om.

U patogenezu lopusne ateroskleroze uključena je vaskularna ozljeda povezana s upalnim zbivanjem poput vaskulitisa ili oštećenja stjenke depositima imunih kompleksa i antifosfolipidnih protutijela. Ovdje se naravno ne smije zanemariti učinak terapije steroidima, kao i moguće prekomjerne tjelesne težine (43).

Očito da upala ima važnu ulogu u inicijaciji i progresiji ateroskleroze kako u reumatskih tako i u ostalih bolesnika. U općoj populaciji je dokazano da važnu ulogu u razvoju ateroskleroze imaju reaktanti akutne faze upale, te celularni medijatori (44). C-reaktivni protein (CRP) se pokazao kao značajan predskazatelj srčanog infarkta i cerebralnog inzulta neovisno o standardnim čimbenicima rizika kao što su dijabetes, hipertenzija, hiperlipidemija, te povišena razina homocisteina (45).

Histopatološke studije pokazuju da aktivacija endotelnih stanica potiče aterogenezu. Pojačana ekspresija adhezijskih molekula i produkcija kemoatraktanta, citokina i tkivnih faktora od strane endotelnih stanica u osnovi predstavlja upalu (46, 47).

Dosadašnja istraživanja su nedvojbeno pokazala da su protutijela kao što su anti oksidirajući lipoprotein niske gustoće, anti HSP 65 i anti beta 2 glikoprotein 1, te antifosfolipidna protutijela važan čimbenik nastanka rane ateroskleroze u bolesnika s SLE-om (44) .

Povišene razine antifosfolipidnih protutijela i anti beta GP1 značajniji su predskazatelji koronarne ateroskleroze u SLE-u od klasičnih čimbenika rizika kao što su hipertenzija i hiperlipidemija (48). Zanimljivo je da je već u djece s SLE-om, ultrazvučno potvrđeno značajnije zadebljanje intime-medije karotidnih arterija u odnosu na kontrolnu skupinu. Upravo je ultrazvuk karotida prikladan za otkrivanje

predkliničkih neopstruktivnih aterosklerotskih plakova, kao i za mjerenje zadebljanja intime medije krvnih žila. Prisustvo karotidne ateroskleroze snažno korelira s koronarnom aterosklerozom. Zadebljanje intime karotida u SLE-u u korelaciji je s proteinurijom, aktivnosti bolesti, uzimanjem većih doza glukokortikoida, te višim razinama kolesterola, lipoproteina niskog denziteta, apolipoproteina B i fibrinogena (49).

Poznato je da kortikosteroidi potiču aterosklozu kroz inicijaciju hipertenzije, hiperkolesterolemije i debljine (50). U SLE bolesnika u kojih su steroidi sniženi ili nadomješteni drugim citotoksičnim lijekovima nađena je značajno manja učestalost ateroskleroze i plakova. U mladih žena s SLE-om se gotovo redovita zaboravlja na prevenciju ateroskleroze, stoga je neophodno pored kontrole hipertenzije voditi računa i o razini LDL kolesterola kao i CRP-a (49).

#### **f) neuropsihijatrijski poremećaji**

Pored promjena ponašanja, glavobolja i neuropatija u SLE-u mogu nastati ozbiljni poremećaji CNS-a. Valja razlikovati vaskulitis (lupusni cerebritis) od vaskulopatija (ishemije, infarkti) u sklopu pridruženog antifosfolipidnog sindroma (51).

Prva manifestacija SLE-a može biti psihoza, korea, pseudotumor mozga ili encefalopatija. Najčešći simptomi su konvulzije a zatim glavobolje. Pojedine studije upućuju na učestalost poremećaja ponašanja koji u konačnici vode ka psihozi ili depresiji (52).

Novija istraživanja otkrivaju da su neuropsihijatrijski poremećaji češći kod vaskulitičnih kutanih lezija (35). Povišen titar antifosfolipidnih protutijela također je važan predskazatelj neuropsihijatrijskog poremećaja. Nije zamijećena povezanost diskoidnog osipa i zglobnih manifestacija s cerebralnim zbivanjima u SLE-u (37).

U patogenezi cerebralnog lupusa bitno je vaskularno oštećenje za vrijeme aktivne bolesti. Vaskularnoj ozljedi pogoduju prethodne neurološke bolesti, određeni lijekovi, uz posredan i neposredan učinak upalnih medijatora koji osim intratekalno mogu djelovati i sistemski (53).

Standardni laboratorijski parametri nisu dostatni za dijagnozu cerebralnih zbivanja u SLE-u. Novija istraživanja bave se analizom upalnih medijatora seruma i likvora radi procjene cerebralne zahvaćenosti. To se odnosi na: nitritne okside, interleukin 10 (IL 10), interferon gama, IL 6, IL 8, solubilni L selektin, TNF, glasničku RNK, ekspresijske stanice te antineuralna protutijela (54).

#### **g) gastrointestinalna događanja**

Gastrointestinalne manifestacije javljaju se kroz široku paletu trbušne boli, anoreksije, mučnine i nekontroliranog povraćanja. U podlozi ovih simptoma mogu biti: peritonitis, vaskulitis crijeva, pankreatitis ili upalna bolest crijeva.

U većine bolesnika akutna upala trbušne ovojnice izaziva jaku bol koja ne prolazi bez infuzije steroida, kada ova upala pređe u kronični oblik dolazi do pojave ascitesa. Vaskulitis crijeva manifestira se jakom boli u donjem dijelu trbuha koja traje više mjeseci, kliničku sumnju neophodno je potvrditi angiografijom crijeva (55).

Do porasta jetrenih enzima može doći u sklopu vaskulitisa ili pri uzimanju većih doza nesteroidnih antireumatika i salicilata. U lupusnoj bolesti jetre ili zbog troboembolijskih zbivanja u krvnim žilama jetre, također dolazi do porasta jetrenih enzima (56).

## **h) trudnoća**

Iako se po pitanju plodnosti SLE bolesnice ne razlikuju od ostale populacije prisutan je veći broj spontanih pobačaja, prijevremenih poroda te intrauterinih oštećenja (57). Trudnoća u periodu aktivne bolesti jedan je od razloga ovih događanja, kao i prokoagulantno stanje uslijed prisustva antifosfolipidnih protutijela. U trudnica s SLE-om u kojih nema naznaka aktivnosti bolesti valja ipak voditi računa o mogućim tromboembolijskim zbivanjima, hipertenziji te oštećenju bubrega (58).

## **i) laboratorijski pokazatelji**

U laboratorijskim nalazima u SLE-u često je prisutna citopenija: leukopenija, anemija, limfopenija i trombocitopenija (Tablica 1.). Leukopenija je najčešća, dok je trombocitopenija povezana s anemijom ili antifosfolipidnim sindromom. Anemiju valja razmatrati u sklopu kronične upalne bolesti ili uzrok anemije može biti hemoliza uslijed prisutnih protutijela na eritrocite (59).

Većina autora smatra da je u praćenju aktivnosti bolesti bitna hemolitička aktivnost komplementa, titar antitijela protiv DNK, te antifosfolipidna protutijela. Budući da se većinom autoprotutijela razmatraju kao organ specifična, pretrage ostalih autoprotutijela bile bi važne za potvrdu dijagnoze odnosno za procjenu zahvaćenosti pojedinih organa (60).

Poremećaje zgrušavanja često nalazimo u SLE-u. Smatra se da su im uzrok cirkulirajući prokoagulansi koji su povezani s antifosfolipidnim sindromom. Produženo parcijalno tromboplastinsko vrijeme kao i pozitivan test na sifilis su posredni pokazatelji prisustva lupus antikoagulansa i antikardiolipinskih protutijela (14).

**Tablica 1.** Laboratorijski pokazatelji SLE-a

<b>Hematološki</b>	<b>Imunološki</b>
Anemija Leukopenija Hipokomplementemija Trombocitopenija Hiperglobulinemija Pozitivan direktni Coombs-ov test	anti ds DNA anti Sm anti RNP a CL ANA Pozitivan RF LE stanice

#### **1.1.6. Liječenje SLE-a**

U terapijskom pristupu bolesniku s SLE-om neophodno je sagledati koji su sustavi zahvaćeni te da li se radi o akutnim ili kroničnim stanjima. Ako se ne radi o akutnim stanjima u izboru terapije valja procijeniti posljedice dugotrajne primjene određenih lijekova. Kod blagih oblika SLE-a, gdje su izražene uglavnom artralgiije izbor nesteroidnih antireumatika nije primjeren zbog mogućeg oštećenja bubrega, koji su zbog prirode bolesti već dovoljno izloženi. Antimalarici su učinkoviti kod zahvaćenosti zglobova, prikladni su u terapiji kožnih promjena, te se mogu primijeniti kao pridružena terapija u antifosfolipidnom sindromu (36).

Primjena glukokortikoida je neophodna u akutnim stanjima i pri zahvaćenosti pojedinih sustava, naročito kad su prisutni serološki pokazatelji aktivnosti bolesti kao što je snižena razina hemolitičke aktivnosti komplementa, snižena razina C3 i C4, te izrazito povišen titar ds DNK (12).

Ostali immunosupresivni lijekovi kao što su ciklofosamid, azatioprin i metotreksat daju se ovisno o zahvaćenosti CNS-a, bubrega i zglobova. Ako je neophodna duža primjena immunosupresivne terapije valja voditi računa o mogućoj supresiji gonada što može prouzročiti oštećenja plodnosti i razvoj osteoporoze (61).

U slučaju pridruženog antifosfolipidnog sindroma ne treba oklijevati s primjenom antikoagulantne terapije. Mikofenolat mofetil se u prvom redu primjenjuje kod značajnog oštećenja bubrega u kombinaciji s ostalom immunosupresivnom terapijom. U novije vrijeme razmatraju se biološki lijekovi kojima je zadatak inhibirati proupalne citokine. Također se sve više istražuju lijekovi koji moduliraju autoimunu bolest, selektivno blokirajući razne intracelularne receptore ili komponente komplementa (62, 63).

## **1.2. KOMPLEMENT**

Budući da je aktivacija komplementa sastavni dio immunosnog odgovora jasno je da poremećaj regulacije sustava komplementa može prouzročiti upalna oštećenja tkiva. Razgradni ulomci komplementa kao što su anafilatoksini: C3a i C5a te C5b, bitni su pokretači lokalne ozljede tkiva (3, 64).

### **a) Aktivnost komplementa**

Komplementni sustav sačinjava najmanje 30 proteina plazme koji sudjeluju u obrani organizma kao i u immunosnim reakcijama. Svaka komponenta komplementa se razgrađuje u okviru svojih ograničenih proteolitičkih reakcija, koje mogu biti potaknute klasičnim, alternativnim ili u novije vrijeme opisanim lektinskim putem.

Alternativni put je primitivniji i može biti potaknut različitim supstancama poput polisaharida (npr. endotoksin) koji su smješteni u staničnoj stjenici ili pak mikroorganizmima (65).

Aktivacija komplementnog sustava klasičnim putem posredovana je imunim kompleksima i zahtijeva vezanje prve komponente komplementa C1 na Fc dio imunoglobulina za što su naročito prikladni IgG1, IgG3 i IgM izotipovi (66).

Lektinski put potaknut je manozna vezujućim proteinom-lektinom, koji se veže za bakterijsku površinu koja sadrži manozne polisaharide. U bolesnika s SLE-om opisano je oštećenje ovog puta, koje se povezuje s pojačanim stvaranjem protutijela na kardiolipin i C1q (67).

Aktivacija treće komponente komplementa je zajednička ovim putovima s tim što se lektinski put završava generiranjem C5 konvertaze. U daljnjem tijeku C3 se razlaže konverzijom u aktivne čimbenike C3a i C3b (64,67).

C3a se javlja u tekućem obliku i potiče otpuštanje histamina iz mastocita i bazofila što izaziva kontrakciju glatkih mišića i indukciju agregacije trombocita.

Zadatak je C3b da zajedno s C5 konvertazom nastavi komplementnu kaskadu, te ujedno vrši zadaću glavnog opsonina komplementnog sustava. U svojstvu opsonina vezuje imune komplekse te različite aktivatore poput mikrobnih organizama. Vezanje C3b za ove čestice kao i pričvršćivanje za C3b stanični receptor omogućava komplementni receptor 1 (CR1) koji je prisutan na eritrocitima, neutrofilima, monocitima, B limfocitima i glomerularnim podocitima (68).

Pored toga što CR1 na fagocitima potiče fagocitozu, prisutnost na eritrocitima (predstavlja oko 90% ukupnog CR1) pomaže klirensu imunih kompleksa. Zadatak mu je da iz cirkulacije pomoću eritrocita prenosi imune komplekse u jetru i slezenu radi njihovog uklanjanja (69, 70).

Nova biološka uloga C3 opisuje se u regulaciji TNF alfa i IL-1 beta sinteze u neadherentnim mononuklearnim stanicama periferne krvi. Zadaća je supresija endotoksinom inducirane sinteze TNF alfa i IL -1 beta, te poticanje sinteze citokina od strane adherentnih monocita u lokalnim upalnim tkivima (71).

U svojoj ulozi opsonina C3b je sastavni dio C5 konvertaze, koja vodi stvaranju C5a i C5b. Poput C3a i C5a predstavlja anafilatoksin, koji može aktivirati bazofile i mastocite. Valja napomenuti da je C5a najjači biološki kemoatraktant neutrofila (72).

## **b) Komplement i SLE**

Upalna vaskulopatija u SLE-u je najčešće posljedica lokalnog depozita imunih kompleksa u stjenci krvne žile, što predstavlja poticaj za aktivaciju komplementa i generiranje anafilatoksina (C4a, C3a, C5a ) te kemotaksina (C5a).

Infiltracija stjenke krvne žile polimorfonuklearnim leukocitima koja histološki odgovara leukocitoklastičnom vaskulitisu, odražava se u otpuštanju lizosomnih enzima i oksidnih radikala što za posljedicu ima ozljedu tkiva (73).

Perez i Jacobs navode da vaskularna ozljeda ne mora biti posredovana isključivo imunim kompleksima. Imuni reaktanti poput komplementa i citokina mogu uvjetovati poremećaj regulacije endotelne stanične površine te tako potaknuti vaskularnu ozljedu (10).

Endotelna stanična aktivacija upravo je najizraženija u SLE bolesnika za vrijeme egzacerbacije bolesti a obilježava je značajan porast C3. Ovaj porast C3 obrnuto je proporcionalan oporavku bolesnika. Prenaglašena aktivacija komplementa u suradnji sa zrelim endotelnim stanicama može pogodovati neutrofilno-endotelnoj staničnoj adheziji. Na ovaj način za vrijeme aktivacije SLE-a može se stvoriti leukocitima inducirana upalna vaskulopatija (74).



Naslijeđeni manjak komplementa također pridonosi sklonosti SLE-u iako se ne zna dovoljno na koji način. *In vitro* serum s manjkom C1q ili C2 ima smanjen klirens apoptotičnih stanica. Klirens se normalizira nakon dodavanja komponenti komplementa što sugerira mogući mehanizam koji doprinosi gubitku tolerancije za vlastite antigene (75).

Poput molekula klase I i II gena tkivne kompatibilnosti, komponente komplementa naročito one unutar 6.-og kromosoma (C4a, C4b) pokazuju genski polimorfizam. Manjak komponente C4a, koji je relativno čest u zdravoj populaciji predstavlja rizik za razvoj SLE-a, jednako kao i manjak ranih komponenti komplementa kao što su C1q, C1 r/s i C2 (76, 77).

Doprinos manjka komplementa u razvoju bolesti može se objasniti slabošću komplementnog sustava u klirensu veće količine antigena. Iako je manjak komplementa prepoznata genska sklonost za autoimunu bolest poput SLE-a, veza između manjka komplementa i infekcije još je izravnija (78). Pitanje je da li sklonost infekciji ovih bolesnika povezana s razvojem SLE-a.

Iako postoje brojne nepoznanice o ulozi komplementa u etiopatogenezi SLE-a, neosporno je da je komplement bitan sudionik složene ozljede tkiva kroz otpuštanje anafilatoksina, vezanje za membrane, te oslobađanje imunih medijatora (10).

### **c) Komplement i APS**

Područje patologije nastale uslijed aktivacije komplementa neophodno je proširiti inicijacijom tromboze u APS-u. Brojne studije su pokazale da se antifosfolipidna protutijela (aPL) vežu za endotelne stanice, monocite, neutrofile i trombocite uzrokujući otpuštanje medijatora upale jednako kao i prokoagulantnih čimbenika (79).

Zadnjih godina pokazana je zanimljiva uloga komplementa u mišjem modelu lupusa. Skotnim mišicama aplicirana su poliklonalna ili monoklonalna aPL protutijela koja su prouzročila smrt više od polovine embrija. U mišica koje su imale manjak C3 ili su tretirane inhibitorima komplementne aktivacije nije došlo do smrti embrija (80).

#### **d) Komplement i estrogeni**

Sundstrom i suradnici su na mišjem modelu pokazali da estrogeni stimuliraju sintezu C3. Oni su estrogenima stimulirali epitelne stanice maternice štakora nakon čega je došlo do intraluminalnog lučenja proteina koji je potvrđen kao C3 komponenta komplementa. Iako je neosporno da je ovaj C3 nastao pod utjecajem estrogena, njegova biološka uloga u maternici je nejasna. Moguće je da ima zadatak vezanja i razlaganja stranih stanica i bakterija. Upravo C3 nastao lučenjem epitelnih stanica maternice pod uplivom estrogena mogao bi poslužiti u objašnjenju brojnih imunih poremećaja u bolesnica s endometriozom (81).

Yilmazer i suradnici su pratili serumske koncentracije C3, C4 i imunoglobulina u žena s hormonalnom nadomjesnom terapijom. Poznato je da je C3 citokin i reaktant akutne upale, te se kao takav može stvarati u aktiviranim makrofazima, jetri i masnom tkivu. Pored toga što regulira humoralni imuni odgovor, C3 je uključen u metabolizam glukoze i lipida. Budući da je poznata korelacija estrogena s C reaktivnim proteinom koji se također stvara u jetri, očekivao se porast C3 i C4 kod primjene hormonalne terapije. Razine C3 i C4 bile su značajno više u bolesnica na peroralnoj hormonalnoj terapiji. Isti rezultati nisu potvrđeni kod transdermalne primjene hormona što je moguće objasniti dolaskom estrogena u cirkulaciju bez prolaza kroz jetru (82).

### 1.3. PROTUTIJELA

Protutijela su složeni glukoproteini koji pripadaju velikoj obitelji imunoglobulina. Ta obitelj uključuje i druge imunološki značajne bjelančevine kao što su stanični receptori T i B limfocita, signalni proteini, glavni geni tkivne podudarnosti, različiti receptori citokina, Fc receptori, te razni inhibicijski receptori (83).

#### a) Struktura i osobine

Protutijela strukturom i osobinama nalikuju glukoproteinima, a posebnost je što su dijelovi peptida međusobno vezani disulfidnim vezama. Ponavljajuće jedinice peptida zovu se Ig domene.

U protutijelima Ig domene se ponavljaju nakon otprilike 110 aminokiselina tvoreći dva različita polipeptidna lanca koji se razlikuju u dužini i masi. Zbog toga se ovi lanci zovu teški i laki lanci. Kao i u Ig domenama ti su lanci međusobno vezani disulfidnim vezama (84).

Različitosti u stupnju sličnosti slijeda aminokiselina između IgG domena aminoterminalnog dijela teških i lakih lanaca u usporedbi s onima koje se nalaze u distalnom karboksiterminalnom dijelu ovih lanaca čini njihovu strukturu složenom.

Kada je proučavana struktura različitih protutijela postalo je jasno da je aminoterminalni dio svakog lanca značajno promjenjivi u slijedu aminokiselina od ostalog dijela. Upravo aminoterminalne domene lakih i teških lanaca predstavljaju varijabilni dio protutijela. Slijed aminokiselina u ostalom dijelu molekule koji je sličan u različitim vrstama protutijela naziva se konstantnim dijelom. Unutar varijabilne regije

postoje tri hipervarijabilne regije koje se značajno razlikuju u slijedu aminokiselina. Te regije oblikuju antigen vezujući džep-paratop u koji se smješta antigen (85, 86).

### **b) Vezanje antigena**

Hipervarijabilni dio varijabilne domene koji se veže s antigenom zove se komplementarno determinirajuća regija (CDR). Antigen vezujući džep ne može obuhvatiti cijeli antigen. U većini slučaja jedinice od samo 6-8 aminokiselina mogu pristati uz antigen vezno mjesto. Ove jedinice zovu se epitopi (87).

Veliki proteini stranih organizma ili autoantigeni redovito su sastavljeni od mnogo epitopa, koji mogu biti vezani određenim protutijelima kombinirajući vezna mjesta s više različitih protutijela. Veze između varijabilne domene teških i lakih lanaca i antigena su nekovalentne, bazirane na relativno slaboj vezi proteina s proteinom, koja je uz to izložena utjecaju različitih fizioloških i kemijskih čimbenika (88).

Budući da se antigen i antitijelo nekovalentno vežu, veza između dva proteina se stalno stvara i razdvaja u smislu dinamičke ravnoteže. Stupanj snažnosti ove veze izražava se kao afinitet određenog protutijela za antigen (15).

Zbog nekovalentnog vezanja antigena i protutijela moguće je da nekoliko različitih prikladnih antigena zaokupe paratop, premda ne istovremeno. Specifičnost određenog protutijela za antigen je relativna i ovisna je o stupnju afinitetu protutijela za dotični antigen (13, 15).

### **c) Funkcije protutijela**

Kao što je vidljivo iz njihovih karakterističnih strukturnih značajki zadatak protutijela je da prepozna i veže antigen te da pokrene efektorne funkcije u eliminaciji stranih molekula. Pripadajući CDR teških i lakih lanaca koji se nalazi u varijabilnoj domeni molekule protutijela dozvoljava prepoznavanje protutijelima posredovanog imunog odgovora. Glavne karakteristike molekule protutijela koje dopuštaju reakciju unutar varijabilne domene nalaze u konstantnoj domeni teških lanaca (13).

Protutijela su sastavni dio površine membrane B limfocita. Protutijela uložena u površinsku membranu B limfocita svojim jedinstvenim antigenom specifičnosti predstavljaju B staničnu jedinicu za prepoznavanje vanjskog svijeta. Zauzimanje vezne površine receptora protutijela antigenima je ključni trenutak koji potiče fazu prepoznavanja B staničnog odgovora, te se nastavlja fazom reakcije.

Budući da specifični receptori za antigen nisu striktno specifični za određeni antigen, afinitet interakcije antigena i protutijela je iznimno važan. U načelu antigeni koji imaju veći afinitet za receptore prije će potaknuti imuni odgovor od onih koji imaju slabiji afinitet. Samo one reakcije koje rezultiraju pozitivnim B signalom vode u staničnu ekspanziju ili sazrijevanje prema plazma stanicama koje proizvode protutijela (84).

#### **d) Vrste protutijela**

Svaki B limfocit koji je *de novo* kreiran u koštanoj srži sintetizira IgM protutijela čija je sposobnost vezanja drugih protutijela jedinstvena. Zrele B stanice prezentiraju na površini IgM i IgD protutijela koje imaju identične paratope.

Premda IgM i IgD protutijela predstavljaju glavne vezne stanice zrelih B limfocita njihova serumska komponenta je minorna u odnosu na ostala protutijela (86, 89).

IgM protutijelo se secernira u primarnim imunim reakcijama i u pravilu ima niži afinitet za antigene od IgG i IgA protutijela. U serumu se IgM protutijela javljaju kao pentameri i heksameri. Glavna protektivna uloga IgM protutijela je vezanje komplementa. Nakon interakcije s antigenima, vezujući se za C1q komponentu ta pentamerska protutijela se ponašaju kao snažan aktivator komplementnog sustava (90, 91).

Na mukoznim membranama i u majčinom mlijeku, IgM ima, kao i IgA, a moguće i IgD, zaštitnu ulogu, prenoseći se kroz epitelne stanice kao cirkulirajući receptor (86).

IgD koji je uveliko prisutan u majčinom mlijeku, nema sposobnost aktivacije komplementa ali moguće ima određenu efektornu funkciju, koja još uvijek nije dovoljno proučena (88).

IgG predstavlja oko 75% protutijela u cirkulaciji odraslih, prisutan je u limfnoj i cerebrospinalnoj tekućini. Javlja se u četiri podklase koje se razlikuju u svojim konstantnim domenama. IgG, kao i IgM može potaknuti kaskadu komplementa vezujući C1q za konstantnu domenu. Tipovi se razlikuju u sposobnosti aktivacije kaskade komplementa, što se zbiva tek nakon što IgG veže topivi antigen ili onaj na površini stranice.

IgG protutijela pospješuju opsonizaciju, staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima, te prelaze placentu, vezujući se za Fc receptore na različitim staničnim površinama (89).

IgA protutijelo manjim dijelom je prisutno u cirkulaciji, većim dijelom se nalazi u sekretima: suzama, pljuvački i majčinom mlijeku. Podijeljeno je u različite podklase i javlja se u obliku monomera, dimera i trimera. Serumski IgA je zastupljen klasom A1, sekretorni se sastoji od dimera IgA2 koji je uklopljen u sekretorne čestice te se na taj način prenosi kroz mukozu. Te sekretorne čestice pored olakšanog mukoznog prijenosa, štite IgA od razgradnje enzimima sadržanim u mlijeku i ostalim izlučevinama (84, 86).

IgE protutijela nalaze se u serumu u minimalnim količinama. Imaju snažan afinitet za bazofile i eozinofile. Ta protutijela koriste vazodilatatorne i upalne mogućnosti mastocita, bazofila i eozinofila. Ovaj učinak može biti povoljan u parazitarnim infekcijama ali isto tako životno ugrožavajući u sklopu alergijskih reakcija (92).

## 1.4. AUTOPROTUTIJELA

### a) Postavke o stvaranju

Postoje brojne teorije o stvaranju autoprotutijela, jedna od njih je **poliklonska aktivacija limfocita B**.

Postavka je bazirana na spoznaji da mikrobiološke supstance poput lipopolisaharida ili glukopeptida mogu stimulirati odmarajuće B limfocite na sekreciju poliklonskih imunoglobulina koji prepoznaju vlastiti antigen (13).

Smatra se da na taj način nastaju autoprotutijela protiv reumatoidnog faktora i DNA posebice u sklopu SLE-a. Štoviše lipopolisaharidi mogu prouzročiti egzacerbaciju bolesti (nefritis) u mišjem modelu lupusa. Iako poliklonska aktivacija limfocita B često prethodi pogoršanju lususne bolesti, ipak se čini da većina autoprotutijela nije nastala na ovaj način (2).

**Molekularna mimikrija** je drugi pretpostavljeni način stvaranja autoprotutijela uslijed križne reakcije protutijela protiv dva strukturno podjednaka antigena. Molekularna mimikrija može doprinijeti autoimunosti na dva načina: imuni odgovor potaknut stranim antigenima može križno reagirati s vlastitim tkivima što neposredno vodi ka autoimunosti; alternativno isti epitop može biti podijeljen s više vlastitih antigena te imuni odgovor na jednog od njih može biti usmjeren protiv ostalih (93).

**Virusne infekcije** često prethode stvaranju autoprotutijela ili pojavi autoimune bolesti. Imunosna križna reaktivnost virusnih antigena s vlastitima tkivima može voditi u produkciju autoprotutijela. Većina istraživača u ovom slučaju najčešće spominje retroviruse (94).



Primjeri molekularne mimikrije među vlastitim antigenima također su opisani, primjerice monoklonska protutijela na fosfoamino kiseline kao što je fosfotirozin koja nastaju imunizacijom i prepoznaju čitavu paletu fosfoproteina (87).

## **b) Autoprotutijela u SLE-u**

SLE je prototip sustavne autoimune bolesti. Karakterizira ga generalizirana aktivacija imunog sustava, a između ostalog i hipergamaglobulinemija. Autoprotutijela koja nastaju u bolesnika s SLE-om prvenstveno prepoznaju nukleinske kiseline i proteine koji su uz njih vezani. Ta autoprotutijela vežu različite makromolekule uključujući DNK, RNK, te razne proteine jednako kao i komplekse sastavljene od proteina i nukleinskih kiselina (2).

Smatra se da su antinuklearna protutijela (ANA) značajan dijagnostički i prognostički parametar SLE-a. Radi povezanosti s kliničkim manifestacijama; ANA su najviše proučena autoprotutijela. Studije na bolesnicima kao i na miševima koji razvijaju lupusu sličnu bolest pomogle su objasniti događanja koja su bitna za stvaranje ANA protutijela (17).

Ona se stvaraju u genski podložnih osoba u kojih imuni poremećaji promoviraju B i T staničnu autoreaktivnost. Tijekom bolesti ANA se javljaju kao odgovor na vlastite antigene, koji dolaze u kontakt s imunim sustavom otpuštanjem iz umiruće ili apoptotičke stanice (95).

ANA su klase IgG, njihovo pojavljivanje kontrolirano je T i B limfocitima jednako kao u odgovoru na strane antigene. Pojedina od tih protutijela, ali ne i sva mogu posredovati u upali i oštećenju tkiva. Postavljaju se tri pitanja: kako genski čimbenici utječu na stvaranje autoprotutijela u SLE-u, što čini vlastite antigene imunogenim i što čini autoprotutijela patogenim (85).

Usprkos izrazitoj povezanosti ANA s SLE-om njihova patogena uloga još je uvijek nejasna. Poteškoće se javljaju radi izrazite heterogenosti ANA uz kliničku različitost SLE-a, te zbog nedostatka mišjeg modela za pojedine oblike SLE-a što je CNS lupus (53).

Osim primjera mišjeg modela bubrežne bolesti posredovane imunim kompleksima, teško je naći teoretski okvir, koji bi poslužio za objašnjenje kako protutijela na različite antigene u stanici mogu posredovati u organ specifičnim manifestacijama bolesti (96).

Neusklađenost između serologije i kliničkih događanja sugerira da ciljani antigeni imaju organ specifičnu ekspresiju (još uvijek nije u cijelosti prihvaćeno) ili serum sadrži organ specifična patogena protutijela koja mogu biti povezana ali ne i identična s izmjerenim ANA (2).

U lupus nefritisu dokazana je povezanost anti-DNA s aktivnosti nefritisa; izolacijom anti DNA iz glomerula zahvaćenog bubrega te aplikacijom monoklalnog DNA, inducira se nefritis normalnom mišu (97).

Bubrežne lezije vjerojatno nemaju jednostavnu etiologiju budući da anti DNA potiče oštećenje glomerula na razne načine. Dolazi do odlaganja depozita imunih kompleksa ili neposrednog vezanja anti-DNA za dijelove glomerula putem križne reakcije (98).

U mehanizmu imunih kompleksa vezni antigeni se otpuštaju iz stanica nukleosoma i sadrže histone jednako kao i DNA. Budući da histoni imaju afinitet za glomerularnu bazalnu membranu, patogenost imunih kompleksa može se odražavati jednako kroz svojstva antigena i antitijela (99).

Nalaz ANA važan je kliničaru u postavljanju dijagnoze, te u manjoj mjeri za procjenu prognoze i aktivnosti bolesti. Sve je više podataka da nalaz autoprotutijela

može prethoditi pojavi kliničkih simptoma bolesti. Pored izrazite povezanosti sa sustavnim autoimunim bolestima ANA se mogu javiti i u zdravih jedinki (95).

Nasuprot kvalitativnim testovima za ANA, kvantitativni su u biti ograničeni za anti-DNA. Ostala ANA, kao što su anti RO, pokazuju vremenske fluktuacije u razini, koje se ne moraju podudarati s kliničkim zbivanjima. Razumijevanje povezanosti titra autoprotutijela s kliničkim zbivanjima ovisno je o spoznajama patogenosti ovih protutijela (100) .

Autoprotutijela se mogu javiti u prisutnosti autoimune bolesti ili bez nje, važan su klinički pokazatelj određene bolesti a ponekad i čimbenik patogeneze. Mogu potaknuti bolest direktnim vezanjem za ciljne antigene te tako započeti imunu ozljedu ili djeluju posredno stvaranjem imunih kompleksa (2).

Brojna specifična autoprotutijela povezana s autoimunim bolestima su ovisna o T pomoćničkim limfocitima u poticanju klasičnog B staničnog odgovora. Budući da autoprotutijela mogu nastati uslijed molekularne mimikrije, poremećaja naspram vlastitog, ili drugim putovima postavlja se pitanje što dominira u autoimunim bolestima (101)

### **c) Autoprotutijela-metode detekcije**

Prva antinuklearna protutijela su definirana 1940.-te primjenom staničnog testa (LE stanice) za SLE. Ovaj test se više ne rabi radi brojnih manjkavosti: oskudna specifičnost, slaba senzitivnost, otežana mjerljivost uz problematično izvođenje. Zamijenjen je imunofluorescentnom metodom za određivanje ANA, što u naravi predstavlja testove poput enzim-vezujućeg imunosorbentnog testa (ELISA). Koristi se još imunodifuzija i radioimunotest, dok se najčešće primjenjuje imunofluorescentni ANA test (2).

Pozitivna ANA javljaju se u sustavnim autoimunim bolestima (SLE), organ-specifičnim autoimunim zbivanjima (jetra, štitnjača, pluća), te u brojnim infekcijama. Povišen titar ANA ne znači i postojanje bolesti jer se pozitivna ANA mogu naći i u zdravoj populaciji; češće u žena i u osoba starije životne dobi, ali redovito u nižem titru naspram SLE bolesnika (95).

## **1.5. ANTIFOSFOLIPIDNA PROTUTIJELA**

Više od pola stoljeća određeni koagulacijski poremećaji se povezuju sa SLE-om da bi otkriće antifosfolipidnih protutijela (aPL) dalo drugačiji prikaz koagulopatija u ovoj bolesti.

U lupusu se aPL pojavljuje u 30 % do 40% bolesnika, od kojih jedna trećina do jedne polovine razvija antifosfolipidni odnosno Hughes-ov sindrom. Različitost postotka u pojedinim studijama ovisi o osjetljivosti eseja, izboru bolesnika te postavkama studije. Pojavljivanje aPL-a može biti posljedica privremenog nastanka pod utjecajem samog trombotičnog zbivanja ili antikoagulantne terapije (102).

### **a) Učestalost javljanja aPL-a**

Osim u SLE-u povišen titar aPL-a može se javiti i u drugim autoimunim bolestima kao što su reumatoidni artritis, sistemska skleroza, primarni Sjogren-ov sindrom, dermatomiozitis, psorijatična artropatija i sistemski vaskulitisi. Povezanost s tromboembolijama je u ovim bolestima iznimno rijetka te se smatra da su ovdje aPL samo dio prirodnog repertoara proizvedenih protutijela, koja ne moraju nužno biti patogena (44).

U različitim infekcijskim bolestima također se nalazi povišen titar aPL-a. To se najčešće odnosi na virusne infekcije poput virusa humane imunodeficijencije, Epstein-Barr-ovog virusa, parvovirusa, virusa hepatitisa A, B i C, te rubele i zauška. U spirohetalnim infekcijama kao što je sifilis, Lyme-ova bolest, kroničnim bolestima poput tuberkuloze i lepre može se javiti povišen titar aPL-a. Prisutan je i u bolestima s jakim imunim odgovorom kao što je infekcijski endokarditis, reumatska vrućica te u protozoalnim infekcijama kao što je malarija i toksoplazmoza (103).

Različita maligna zbivanja također mogu biti povezana s povišenim titrom aPL-a. Uočeno je zanimljivo nestajanje aPL-a u cirkulaciji nakon operacije tumorskog tkiva. Povezanost ANA i malignih zbivanja je već dugo poznata stoga je moguće pretpostaviti ostale imune aberacije u malignim bolestima poput stvaranja aPL-a (104).

U različitim nemaligim, hematološkim bolestima kao što je idiopatska trombocitopenična purpura, anemija srpastih stanica i perniciozna anemija također se javlja povišen titar aPL-a. Premda je njihov postotak u idiopatskoj trombocitopeničnoj purpuri visok, nije povezan s trombotskim komplikacijama.

Ostaje klinički upit da li bolesnici s idiopatskom trombocitopeničnom purpurom i povišenim titrom aPL-a naknadno mogu razviti lupus ili lupusu sličnu bolest (105). Lijekovi koji mogu potaknuti prisustvo aPL-a su isti oni koji mogu inducirati sindrom sličan SLE-u, a to su: prokainamid, fenotiazid, kinin te oralni kontraceptivi (103).

Prisutnost aPL-a opisana je i u drugim bolestima autoimune prirode kao što su: dijabetes, autoimuni tiroiditis, upalna bolest crijeva, kao i u bolesnika na dijalizi (106).

## **b) Testovi za aPL**

Antifosfolipidna protutijela su skupina autoprotutijela koja reagiraju s različitim fosfolipidima ili proteinskim kompleksima, koji vežu fosfolipide uključujući beta 2 glikoprotein 1 i protrombin. Testovi koji se rabe u njihovoj detekciji uključuju lupus antikoagulans testove. Koristi se protrombinsko vrijeme, parcijalno tromboplastinsko vrijeme (PTT), Russell - viperino vensko vrijeme (RVTT) i kaolinski test zgrušavanja. Može se koristiti i probirni test za sifilis i naravno imunosorbentni enzimski testovi za mnoge fosfolipide, uključujući kardiolipin i proteine koji vežu fosfolipid kao što je beta 2 glikoprotein 1 (103).

Osnovne laboratorijske pretrage su: 1. test za sifilis, 2. lupus antikoagulans (LAC), 3. antikardiolipinska protutijela (aCL), 4. protutijela na beta 2 glikoprotein 1.

Test za sifilis se može jedino upotrijebiti kao orijentacijski zbog niske senzitivnosti i specifičnosti. Ako u serumu bolesnika postoje aCL protutijela javlja se lažno pozitivan test na sifilis, budući da antigen treponeme koji se rabi u testu imitira kardiolipin (102).

Lupus antikoagulans odgovara protutijelima usmjerenim na proteine plazme koji vežu anionske fosfolipide. *In vitro* dokazuje blokadu kompleksa protrombinaze što ima za posljedicu produženje eseja zgrušavanja poput PTT-a i razrijeđenog RVTT-a, kaolinskog vremena zgrušavanja te rjeđe protrombinskog vremena. Iako pretrage sugeriraju oslabljenju koagulaciju ovi bolesnici pokazuju paradoksalnu učestalost tromboembolijskih zbivanja (107).

## **c) Antikardiolipinska protutijela**

Antikardiolipinska protutijela (aCL) koja su klinički sinonim antifosfolipidnih protutijela reagiraju s fosfolipidima kao što je kardiolipin i fosfatidil serin. Različiti

imunoglobulinski izotipovi i podklase su povezani s aCL-om uključujući IgG, IgA, IgM i četiri podklase IgG. Povišena razina IgG aCL-a , naročito IgG 2 znači veći rizik tromboembolijskih zbivanja (108).

Zanimljivo je da je povišen titar aCL-a nađen u bolesnika koji su liječeni zbog trombotskih zbivanja ili u onih koji su na antikoagulantnoj terapiji nakon zamjene srčanog zaliska. Najviši titar aCL-a nađen je u mladih bolesnika koji su bili kratkotrajno izloženi antikoagulantnoj terapiji (109).

#### **d) Aktivnosti aPL-a**

Protutijela na beta 2 glikoprotein 1 su fosfolipid vezujući inhibitori koagulacije. Potpuno je nejasno na koji način su aPL usmjerena na antigene. Izgleda da ona nisu direktno usmjerena na anionske fosfolipide, već na epitope plazminih proteina koji su nepokriveni ili se stvaraju vezanjem za fosfolipide. Antifosfolipidna protutijela su većinom usmjerena na neoepitope koji nastaju oksidacijom fosfolipida ili su privučena raspadnim produktima oksidiranih fosfolipida i različitih proteina (110).

U jednoj studiji bolesnika s APS-om potvrđeno je da protutijela pojačano vezuju kardiolipin ukoliko je fosfolipid progresivno oksidiran nakon izlaganja atmosferi. Različiti koagulacijski proteini mogu biti uključeni u vezanje fosfolipida čime se može objasniti predispozicija za trombozu. To se odnosi na beta 2 glikoprotein 1, protrombin, protein C i S. Beta 2 glikoprotein (apolipoprotein H) se prirodno javlja kao fosfolipid vezujući inhibitor koagulacije i trombocitne agregacije. Ovaj protein također vezuje fosfolipide negativnog naboja i inhibira kontaktnu aktivaciju kaskade zgrušavanja i protrombin - trombin konverziju. Beta 2 glikoprotein je mogući prirodni serumski antikoagulans, čime se može objasniti zašto neutralizirajuća protutijela usmjerena na ovaj protein mogu potaknuti trombozu (111).

## 1.6. ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM

Antifosfolipidni sindrom (APS) ili po autoru koji ga je opisao Hughes-ov sindrom podrazumijeva: serološku prisutnost aPI protutijela, produženo parcijalno tromboplastinsko vrijeme, pozitivan lupus antikoagulans test, lažno pozitivan test na sifilis te trombocitopeniju. Klinički se manifestira tromboembolijskim zbivanjima uključujući česte spontane abortuse (uslijed tromboza krvnih žila posteljice), infarkte te različite neurološke poremećaje (101).

U kliničkoj slici koja je obilježena venskim i arterijskim trombozama, gubitkom čeda i trombocitopenijom postoji čitava paleta kliničkih manifestacija ovisno o krvnim žilama koje su zahvaćene. Različite kombinacije vaskularne okluzivne bolesti mogu se javiti u pojedinog bolesnika a razmak događanja može biti od jednog dana do nekoliko tjedana, mjeseci ili čak godina. Kronološki brza okluzivna zbivanja nazivaju se «katastrofični APS» (112) (Slika 4.).



**Slika 4.** Brzoprogridirajuće promjene na krvnim žilama u bolesnika s „katastrofičnim APS-om“



### a) Zbivanja na krvnim žilama

Duboka venska tromboza je najčešće multipla i bilateralna. Česta je na donjim udovima premda se može javiti i na velikim krvnim žilama kao što su ileofemorlne, subklavije, jugularne i aksilarne krvne žile (Slika 5. i 6.). Površni tromboflebitis javlja se samostalno ili je pridružen dubokoj venskoj trombozi. Duboka venska tromboza može biti komplicirana venskom stazom i ranicama u području gležnja. Ove ranice treba razlikovati od onih nastalih uslijed multiplih okluzija malih krvnih žila. Imaju karakterističan zvjezdolik izgled i smještene su na vanjskoj strani donjih udova (113).

U trećini slučajeva duboke venske tromboze donjih udova kompliciraju se plućnim embolijama i infarktima. Ponavljane tromboembolije pluća vode prema plućnoj hipertenziji. Venske tromboze mogu zahvatiti i ostale krvne žile kao što je vena kava, bubrežne, mezenteričke, retinalne, adrenalne i hepatične vene. Klinički se ove tromboze manifestiraju kao sindrom vene kave, renalna venska tromboza, hipoadrenalizam ili Addison-ova bolest, Budd-Chiari sindrom ili okluzija centralne retinalne vene (114) (Slika 7. i 8.).



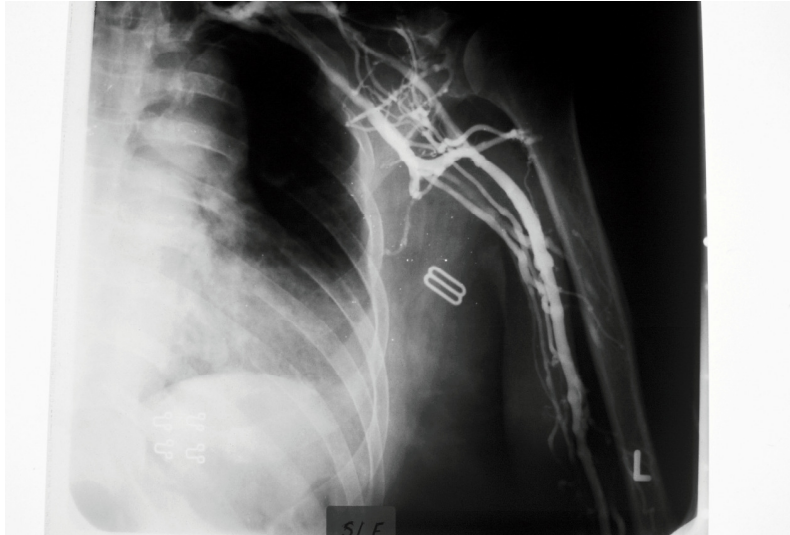
**Slika 5.** Okluzija perifernih arterija stopala



**Slika 6.** Mikrogangrene prstiju stopala



**Slika 7.** Izraženi kolateralni venski crtež u bolesnice s okluzijom *v. subclaviae*



**Slika 8.** Flebografija u bolesnice sa SLE-om i okluzijom *v. subclaviae*

### **b) Moždana zbivanja**

Cerebralne manifestacije javljaju se često kao multiple i rekurentne tromboze najčešće u području srednje cerebralne arterije i lezije koje zahvaćaju frontalne i parijetalne lobuse (Slika 9.).

Vertebrobazilarni sustav je rijetko zahvaćen. Prisustvo aCL-a nakon prvog ishemičnog infarkta upućuje na povećani rizik ponavljanja infarkta. Bolesnici s izrazito visokim titrom IgG aCL-a pokazuju sklonost kraćim intervalima tromboembolijskih zbivanja u mozgu (115).

Ishemijski inzulti u sklopu APS-a češći su u mladih muškaraca i žena; opisani su primjeri multiinfarktne demencije te akutne ishemične encefalopatije uz visok titar aCL-a u izrazito mladih osoba (116).

Tromboza cerebralnog venskog sinusa ili tromboza duralnog sinusa mogu imati čitav spektar kliničkih manifestacija kao što su glavobolja, edem papile, mučnina i povraćanje uz gubitak vida (113).



**Slika 9.** Bolesnica s SLE-om i APS-om: moždani infarkt.

### **c) Psihički poremećaji**

U pojedinih bolesnika psihoze se javljaju znatno prije serološke prisutnosti aCL -a. Poznato je da su promjene ponašanja česte u SLE bolesnika. Kod bolesnika s APS-om javljaju se brzo progresivne promjene mentalnog statusa, konfuzije, smetnje memorije i emocionalna nestabilnost. Opisana je i tranzitorna globalna amnezija kao i oblik pseudomultiple skleroze (117).

#### **d) Neurološki poremećaji**

Glavobolje redovito prethode ishemičnim moždanim inzultima. Migrene su česte u SLE-u, s tim što su one povezane s aCL-om učestalije, dugotrajnije i imaju slab odgovor na specifičnu terapiju (115).

Epileptički napadi mogu godinama prethoditi kliničkim i serološkim manifestacijama bolesti. Mogu biti posljedica ishemične vaskularne bolesti u sklopu APS-a ili prate aktivnost lopusne bolesti, te su povezani sa hipertenzijom, uremijom i elektrolitskim poremećajima (118).

Koreja je rijetka manifestacija SLE-a ali je usko povezana s nazočnošću aCL – a; klinički je teško razlikovati od koreje u reumatskoj vrućici (Sydenham) ili prirođenog oblika (Huntington). Često je precipitirana uzimanjem kontraceptiva (52). Hemibalizmus (rijedak poremećaj kretanja) kao i cerebralna ataksija također su opisani u sklopu APS-a lopusnih bolesnika. Spinalni sindromi poput transverzne mijelopatije rijetki su u lupusu i prognostički su loši. Najčešće se javlja akutna parestezija donjih udova koja se širi na prsište unutar 24 – 48 sati. Javlja se bol u leđima, paraplegija i gubitak kontrole sfinktera (119).

Može javiti i optički neuritis praćen boli u oku i brzim gubitkom vida. Opisan je i Guillain–Barree-ov sindrom kod kojeg je aktivnost bolesti povezana s IgA aCL -om. Lupoidna skleroza je se rjeđe javlja a klinički se manifestira spastičnom paraplegijom (114).

#### **e) Očne komplikacije**

Očne komplikacije se javljaju radi okluzija malih krvnih žila retine, optičkog nerva, horioida; posljedica kojih su ishemije i infarkti. Uslijed neovaskularizacije dolazi do sekundarnih vitrealnih hemoragija, povlačenja retine i glaukoma (120).

## **f) Kardijalna događanja**

Infarkt miokarda je česta komplikacija u SLE-u. Može biti potaknut ubrzanom aterosklerozom ili vaskulitisom odnosno vaskulopatijom uslijed sekundarnog APS-a.

Nazočnost aCL-a u mlađih osoba s infarktom može se razmatrati kao marker rekurentnih kardiovaskularnih zbivanja. Pojedini autori usko povezuju titar aCL-a s kardiovaskularnim zbivanjima, dok finski autori Vaarala i sur. izvještavaju o aCL-u kao neovisnom čimbeniku u riziku infarkta, odnosno kardiovaskularne smrti te objašnjavaju prisutnost aCL-a kao imuni odgovor na akutno oštećenje miokarda (49).

Ostali ponovno naglašavaju važnost aCL-a u povećanom riziku ponavljanih infarkta i drugih tromboembolijskih zbivanja. Također se prisutnošću aCL-a objašnjavaju infarkti za vrijeme trudnoće odnosno u postpartalnom periodu. U katastrofičnom antifosfolipidnom sindromu uslijed srčane mikrovaskulopatije može doći do infarkta miokarda (112).

Povišen titar aCL-a nalazi se i u bolesnika u kojih je nađena okluzija venskog grafta. Titar IgA aCL-a povišen je u bolesnika s koronarnom bolešću koji su tretirani perkutanom transluminalnom angioplastikom i u kojih je bila neophodna restenoza (121).

Multiple male vaskularne okluzije (trombotična mikrovaskulopatija) temelj su akutnih i kroničnih kardiomiopatija u APS-u. Klinička slika ovisi o brzini događanja okluzija. Akutni srčani kolaps je čest u bolesnika s katastrofičnim APS-om, te je ujedno i najčešći uzrok smrti ovih bolesnika (112).

Kronična kardiomiopatija može biti globalna ili lokalizirana. Javlja se segmentalna ventrikularna disfunkcija, oštećena dijastolička funkcija te miokardijalna fibroza (122).

Zadebljanje valvula kao i njihova disfunkcija česti su u APS-u; najčešće je zahvaćena mitralna valvula. Jednak broj promjena na valvulama nađen je u bolesnika s SLE-om i primarnim APS-om. Zanimljiva je povezanost titra aCL-a s pojavom tromba na valvulama. Prokoagulantni učinak aCL-a očituje se u nastajanju valvularnog tromba, koji biva organiziran što vodi prema fibrozi i kalcifikaciji (123).

Nebakterijske vegetacije u kombinaciji s zadebljanim valvulama u SLE-u (Libman-Sacks-ov endokarditis) često završavaju fibroznim plakovima, fokalnim kalcifikacijama te deformacijama ishod čega je disfunkcija valvule. Česte su regurgitacije dok su stenoze rijetke, najčešće je zahvaćena mitralna valvula, zatim aortna, dok su trikuspidalna i pulmonalna rjeđe zahvaćene. Obično valvularne lezije nisu klinički signifikantne ali u slučaju progresije deformateta neophodna je kirurška zamjena. Tromboembolički incidenti predstavljaju glavnu opasnost Libman-Sachs-ovog endokarditisa, oni mogu oštetiti mozak, bubrege, te brojne ostale organe (42).

U bolesnika s SLE-om može se javiti i pseudoinfekcijski endokarditis. Kod velikih vegetacija koje su češće u bolesnika koji nisu liječeni kortikosteroidima može doći do kolonizacije mikrobima. Ova infekcija valvula je učestalija u bolesnika s pridruženim APS-om: klinički se manifestira temperaturom, splinter hemoragijama, srčanim šumovima uz više puta ponavljane negativne hemokulture (123).

Intrakardijalni trombi također nisu rijetki, kliničke se manifestiraju kao embolija pluća ili imaju sistemske manifestacije, ovisno da li se tromb nalazi u lijevoj ili desnoj klijetki. Atrijalni trombi mogu imitirati miksom atrija (124).

#### **g) Zbivanja na plućima**

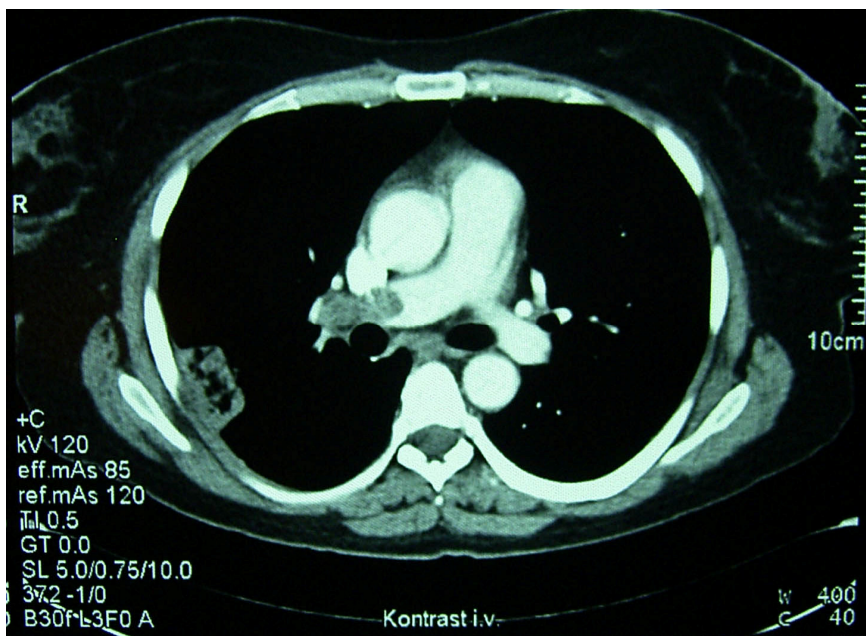
Plućna hipertenzija u osnovi koje su tromboembolična zbivanja rjeđa je komplikacija APS-a (Slika 10.). U primarnoj plućnoj hipertenziji također se razmišlja o

autoimunoj dijatezi budući da se često nalaze pozitivna ANA i ostali autoimuni markeri. Pretpostavlja se da postoji povezanost primarne plućne hipertenzije i aCL-a ali bez tromboembolijskih zbivanja vjerojatno u svezi endotelnog staničnog oštećenja odnosno smanjene produkcije prostaciklina ili endotelina (125).

Učestalost akutnog respiratornog «distres» sindroma opisana je u bolesnika s katastrofičnim APS-om. Zanimljivo je da se redovito se javlja povezan s adrenalnom hipofunkcijom što nameće uzročno posljedično pitanje (112).

Intraalveolarna plućna hemoragija također je opisana u APS-u, u podlozi koje su plućni kapilaritis, mikrovaskularni trombi i obliterirajući bronhiolitis. Opisani su i primjeri APS-u pridruženog fibroznog alveolitisa (126).

Postpartalni sindrom kojeg obilježavaju šubovi temperatura, pleuralna bol povezana s efuzijama i mjestimičnim infiltracijama pluća također se povezuje s APS-om (125).



**Slika 10.** CT pluća u bolesnice s SLE -om i APS-om: plućni infarkt.



### **i) Promjene na bubrežima**

Pri biopsiji bolesnika s SLE nefritisom često se nalaze glomerularni trombi koji se povezuju s povišenim razinama aCL-a. Pored toga se smatra da je prisutnost glomerularnih tromba važan predskazatelj progresije glomerularne skleroze. Glomerularna kapilarna tromboza u bolesnika s povišenim titrom aCL-a javlja se bez naznaka nekroze i subendotelnih depozita, što bi se moglo uklopiti u opis upale (127).

U sklopu APS-a može se javiti i bubrežna mikroangiopatija bez naznaka upale kakvu također nalazimo u malignoj hipertenziji, eklampsiji, trombotičnoj trombocitopeničnoj purpuri, hemolitičko - uremijskom sindromu, sistemskoj sklerozi, te u klasičnom odbacivanju presatka. Klinički su obično pridruženi znaci hemolitičke anemije i trombocitopenije, te ozbiljni oblici hipertenzije i bubrežnog zastoja koji može zahtijevati dijalizu. Slične promjene nalaze se u bolesnika koji se prezentiraju kliničkom slikom «katastrofičnog» APS-a (102).

Oštećenja ogranaka bubrežnih arterija opisana su u bolesnika s primarnim i sekundarnim APS-om. Posljedica je ozbiljna hipertenzija uz moguću akutni bubrežni zastoj. Ako nastanu jednostrane ili obostrane okluzije ovih arterija može doći do razvoja bubrežnog infarkta (128).

### **j) Poremećaji nadbubrežnih žlijezda**

Brojni primjeri insuficijencije nadbubrežnih žlijezda, naročito u mladih osoba usko se povezuju s APS-om. U podlozi ovih zbivanja su preklapanja tromboza nadbubrežnih vena s hemoragičnim infarktima. Ova događanja redovito zahvaćaju obje nadbubrežne žlijezde. Naime uslijed tromboza dolazi do porasta venskog tlaka u nadbubrežnim žlijezdama što se smatra glavnim uzrokom krvarenja unutar žlijezda.

Diferencijalno dijagnostički ovdje valja opservirati ozbiljnu sustavnu bolest kao što je srčana bolest ili infekcija, prethodna tromboembolijska zbivanja te postoperativna stanja (103).

### **k) Poremećaji jetre**

Budd–Chiari-ev sindrom kojeg obilježava opstrukcija velikih vena jetre s posljedičnom kongestijom jetre i staničnom nekrozom opisan je u sklopu APS-a. Također je opisana i portalna hipertenzija koja u pojedinih bolesnika može biti povezana s plućnom hipertenzijom (113).

Venookluzivna bolest jetre koja je često povezana s nodularnom hiperplazijom opisana je u sklopu APS-a. Obilježena je netrombotičnim, koncentričnim suženjem lumena malih centrolobularnih vena s posljedičnim gubitkom vezivnog tkiva i nekrozom stanica centrolobularne regije. Ovo stanje opisano je i u bolesnika kojima je presađena koštana srž (129).

Kronični aktivni hepatitis u sklopu APS-a opisan je u nekoliko bolesnika. Također je u studijama bolesnika s hepatitisom C uočena povezanost trombotskih zbivanjima s povišenim titrom aCL-a, što pretpostavlja opserviranje okultne infekcije hepatitis C virusom (HCV) u bolesnika s pozitivnim aCL-om i trombotskim zbivanjima (130).

Zanimljivo je da je i u bolesnika s alkoholnom bolešću jetre nađen porast titra aCL-a. Pojedini autori navode prisutnost aCL-a čak u 81 % bolesnika s alkoholnom cirozom jetre. Uočeno je da porast titra protutijela, naročito izotipova IgA aCL-a i IgM aCL-a u korelira s aktivnosti bolesti (56).

Smanjeno stvaranje čimbenika koagulacije u cirozi jetre drži se da poništava prokoagulantna svojstva aCL-a. Zanimljivo je da je u bolesnika s cirozom jetre predviđenog za presađivanje jetre, nađen povišen titar IgG aCl-a i IgM aCL-a nakon doživljenog moždanog infarkta u tijeku priprema za operaciju. Nakon izvršenog postupka presađivanja uslijedilo je sniženje razine ovih autoprotutijela (131).

Antikardiolipinska protutijela izotipa IgM nađena su 43 % bolesnika s primarnom bilijarnom cirozom. Ovdje valja razmotriti mogućnost križne reakcije IgM aCL-a s antimitohondrijalnim protutijelima, vjerojatno uslijed prisustva protutijela nižeg afiniteta koja mogu imati široku epitopnu specifičnost (103).

Opisna je i povezanost tromboza slezene s prisustvom LAC-a ili aCL-a cirozi jetre. Zanimljivo je da je 75 % bolesnika s pozitivnim LAC-om bilo HCV pozitivno, što ponovno povezuje APS i HCV infekciju (130).

## **I) Poremećaji probavnog trakta**

U bolesnika s primarnim APS-om opisana je tromboza krvnih žila donjeg dijela jednjaka koja je završila nekrozom, septičkim medijastinitisom i smrti bolesnika. Prikazana su i krvarenja iz varikoziteta jednjaka u sklopu tromboze portalnih vena (132).

Opisan je i progresivni vried želuca praćen jakom trbušnom boli u podlozi kojeg je bila proširena, okluzivna, vaskularna bolest koja je zahvatila vene, male arterije i arteriole (112).

Različiti slučajevi crijevnih infarkcija prikazani su u bolesnika s APS-om, nakon kojih su gotovo redovito uslijedile upale trbušne ovojnice. Opisana su i ozbiljna gastrointestinalna krvarenja uslijed ishemije crijeva ili atipičnog duodenalnog vrieda.

U upalnim bolestima crijeva također se može javiti povišen titar aCL-a koji se drži odgovornim za pridružena trombotska zbivanja (120).

Akutna upala gušterače u podlozi koje su tromboze malih krvnih žila gušterače, najčešće se javlja u sklopu «katastrofičnog» APS-a. Akutna akalkulozna upala žučnjaka, zatim okluzija krvnih žila slezene s posljedičnom atrofijom slezene također mogu nastati u sklopu «katastrofičnog» APS-a (112).

### **m) Zglobovi**

U SLE-u je česta avaskularna nekroza kosti u sklopu Raynaud-ovog fenomena, pridruženog vaskulitisa ili uslijed terapije glukokortikoidima ( Slika 11. i 12.). U bolesnika s primarnim APS-om koji nisu bili liječeni kortikosteroidima također je opisana aseptička nekroza kosti (103). Artritis se javlja isključivo u sekundarnom APS-u, njegovo postojanje isključuje sumnju na primarni APS (109).



**Slika 11.** Raynaudov fenomen



**Slika 12.** Avaskularna nekroza kosti u sklopu Raynaudovog fenomena

#### **n) Koža**

U primarnom i sekundarnom APS-u javlja se «livedo reticularis» koji u osnovi predstavlja zastoj krvi u dilatiranim površnim kapilarama i venulama. Već 1965. Alarcon-Segovia opisuje povezanost «*liveda reticularisa*», kroničnih ulcera donjih udova i ponavljajućih tromboflebitisa u SLE bolesnika s koagulacijskim poremećajima kao što je pozitivan LAC (102).

Ranice na koži naročito donjih udova česte su manifestacije APS-a. Radi se o neupalnim okluzijama arteriola kože koje za posljedicu imaju nekrozu i atrofiju kože. Kasnije se mogu razviti promjene koje sličje Kaposi sarkomu ili gangrenoznoj piodermi (35). Uočena je povezanost APS-a i DEGO-ove bolesti (maligna atrofična papuloza), vaskulopatije koja zahvaća kožu i probavni trakt. Kožne promjene se javljaju u vidu bolnih zvjezdolikih ranica u području gležnjeva koje zacjeljuju nakon primjene antikoagulantne terapije (103).

Ishemičke promjene kože u SLE-u koje nastaju u sklopu APS-a često završavaju gangrenom, koja je važan predskazatelj katastrofičnog APS-a. Ovu

gangrenu treba razlikovati onih nastalih u vaskulitisu, kriglobulinemiji ili diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji (112) (Slika 13.-15.).



**Slika 13.** Kronične promjene kože lica u SLE-u s APS-om



**Slika 14.** *Livedo reticularis*



**Slika 15.** Atrofične promjene kože kod bolesnice sa sekundarnim APS-om u sklopu SLE-a

#### **o) Hematološki poremećaji**

Različiti stupanj trombocitopenije javlja se u APS-u, ovisno o čimbenicima koji su uključeni u imunoposredovano oštećenje retikuloendotelnog sustava ili onih koji potiču stvaranje antitrombocitnih protutijela (121). Trombocitopenija u APS-u je većinom umjerena i nije povezana s krvarenjima, premda može biti ozbiljna i tada je teško razlikovati od idiopatske trombocitopeničke purpore (105). Hemolitička anemija i neutropenija se rijetko javljaju u APS-u i većinom su povezane s prisustvom IgM aCL-a (106).

#### **p) Trudnoća**

Razni poremećaji tijekom trudnoće kao što je spontani pobačaj, smrt fetusa te intrauterino zaostajanje u rastu povezuju se s APS-om. Povećana je učestalost preeklampsija odnosno HELLP sindroma (hemoliza, povišeni jetreni enzimi i sniženi

trombociti), zatim postpartalnog kardiopulmonalnog sindroma, koreje te postpartalnog moždanog infarkta (133). Uslijed odcjepljenja placente može doći do preuranjenog porođaja. Postoji mogućnost prolaza IgG aCL-a kroz posteljicu što uzrokuje neonatalne inzulte i diseminiranu trombozu fetusa, kao i multiple tromboze posteljice (134).

Većina studija povezuje neplodnost s povišenim titrom aPL-a. Stanja poput endometrioze, bolesti zdjeličnih organa te neuspjeh umjetne oplodnje također se dovode u vezu s titrom aPL-a (135).

Delgado i sur. pratili su titar aPL-a i aCL-a u žena kod kojih je primijenjena umjetna oplodnja. Pokazali su značajan porast aCL-a u žena koje su primale dodatnu hormonalnu terapiju u odnosu na kontrolnu skupinu i žene koje nisu primale hormone (58).

Zanimljiva su zapažanja na modelu skotne mišice s induciranim APS-om putem aplikacije monoklonalnih aCL-a. Primjenom C3 konvertaze došlo je do blokade komplementne aktivacije što je zaštitilo mišicu od komplikacija trudnoće u sklopu APS-a (80).

Verthelyi i sur. su također u mišjem modelu pokazali povezanost vanjskog estrogena i stvaranja aCL-a. Dokazali su da gonadektomirani mušjaci ili ženke autoimunog miša C57/BL6 nakon tretmana estrogenima stvaraju protutijela na kardiolipin. Ova protutijela koja opstaju i više mjeseci nakon prekida primjene vanjskih estrogena uglavnom su klase IgG ili IgM. Nije nađena klasa IgA aCL-a, a u klasi IgG prevladavala je podklasa IgG2 aCL.

Estrogenom potaknuta mišja aCL protutijela imala su minimalnu križnu reakciju s DNK, aktinom i ovalbuminom, vezala su se za kardiolipin iz seruma bolesnika tek u nazočnosti beta 2 glikoproteina 1 (136).



## 1.7 SPOLNI HORMONI I IMUNI SUSTAV

Spolni dimorfizam imunog odgovora u ljudi već je dugo poznat. Žene imaju snažnije humoralne i celularne imune reakcije, znatno su otpornije na pojedine infekcije, naročito bakterijske (137). U žena u odnosu na muškarce znatno je veća učestalost autoimunih bolesti. Spolni hormoni povezani su sa javljanjem pojedinih autoimunih bolesti kao što su lupus ili multipla skleroza. Tijek ovih bolesti usko je povezan s menstrualnim ciklusom ili trudnoćom. Pogoršanje za vrijeme trudnoće može biti posljedica poremećenih odnosa citokina. Očito je da nisu samo spolne različitosti bitne za imuni odgovor već i varijacije razina hormona tijekom plodnog ciklusa žene (138).

U prošlosti se više pažnje posvećivalo učinku spolnih hormona na nespecifični imuni odgovor naspram specifičnog imunog odgovora. Jasno je da jajnici reguliraju nespecifičnu imunost djelujući na monocite, granulocite i NK stanice još nedovoljno poznatim putovima (139). Dokazano je da na neutrofile i NK stanice estrogen ima protuupalni učinak, dok progesteron na neutrofile ima proupalno djelovanje. Utjecaj spolnih hormona na nespecifičnu imunost s današnjeg stajališta nije dovoljno jasan. I obrnuto, sporan je utjecaj nespecifične imunosti na određene reproduktivne procese kao što su menstruacija i ovulacija (140).

U pogledu specifične imunosti naročito humoralne danas je jasno da estrogen povećava produkciju protutijela dok je testosteron suprimira (141). Pokazan je učinak spolnih hormona na stvaranje limfocitnih citokina, premda valja napomenuti da se izvješća brojnih studija često ne podudaraju (142). Pri ovim istraživanjima je posebno važno voditi računa u kojem se periodu uzimaju uzorci krvi, budući da se limfociti ne

ponašaju uvijek jednako, (primjerice u različitim intervalima folikularne faze) što se odražava na raznolikost izvješća (140, 143).

Pored djelovanja na limfocite spolni hormoni vjerojatno imaju utjecaj na trombocite i endotelne stanice, premda su podaci iz te domene iznimno oskudni. Zna se da su receptori estrogena prisutni na endotelnim stanicama, te da estrogen i progesteron mogu potaknuti o endotelu ovisnu vazodilataciju (25, 27).

SLE je bolest u kojoj su spolni hormoni posebno važni i gdje se najbolje može objasniti njihov utjecaj na imuni sustav. Pored toga što su uključeni u patogenezu SLE-a, spolni hormoni su moćni regulatori razina citokina i posljedične aktivnosti bolesti (26, 28).

#### **a) Hormoni**

U jajnicima se ovisno o njihovoj aktivnosti stvaraju tri vrste spolnih hormona: estrogeni, progesteron i androgeni. Hormonalne fluktuacije u menstrualnom ciklusu podrazumijevaju porast estrogena (E2) u plazmi, uz niske razine progesterona u folikularnoj fazi. U luteinskoj fazi nalaze se visoke razine E2 i progesterona. U slučaju trudnoće luteoliza je zaštićena te razine E2 i progesterona ostaju visoke. Kasnije u menopauzi uslijed nestajanja folikula, koncentracije spolnih hormona se spuštaju vrlo nisko (137, 144).

U osoba koje rabe oralne kontraceptive progesteronska komponenta suprimira lučenje luteinizirajućeg hormona, dok estrogena komponenta suprimira lučenje folikulostimulirajućeg hormona (FSH), te tako onemogućava ovulaciju. Plazmine koncentracije prirodnog E2 i progesterona su stoga niske za vrijeme uporabe kontraceptivnih tableta (145).

## **b) Imuni sustav**

U imunom sustavu valja u prvom redu razlikovati nespecifičnu od specifične imunosti. Nespecifična imunost predstavlja prvu liniju obrane organizma od infekcije budući da prepoznaje strukture specifične za mikrobe. Efektorne stanice nespecifične imunosti su monociti, makrofagi, granulociti (neutrofili, eozinofili i bazofili), dentritičke stanice te urođeno ubilačke stanice (NK) (146).

Stanice nespecifične imunosti napadaju mikrobe pri njihovom ulasku u cirkulaciju. Neutrofili, monociti i makrofagi fagocitiraju mikrobe, dok NK stanice liziraju zaražene stanice. Sve stanice nespecifične obrane luče citokine, koji pojačavaju i specifični i nespecifični imuni odgovor (18, 47).

Stanice specifičnog imunog odgovora su T limfociti, te B limfociti koji stvaraju imunoglobuline. T limfociti imaju dvije vrste receptora od kojih su jedni povezani s genima tkivne podudarnosti a drugi su neovisni o njima (148). T-pomoćnički limfociti pružaju pomoć ostalim stanicama imunog sustava u lučenju citokina, dok T-supresorski limfociti pored toga što proizvode citokine mogu neposredno uništiti stranu ili zaraženu stanicu (32).

## **c) Plodnost**

Brojna reproduktivna zbivanja u koja ubrajamo: menstruaciju, ovulaciju i posebice trudnoću, predstavljaju stanja na koja imuni sustav ima neosporan upliv. Smatra se da je učinak citokina iznimno važan za stvaranje pogodnih okolnosti za uspješnu implantaciju zametka (139,140).

#### **d) T limfociti**

U perifernoj krvi ljudi 30% leukocita su limfociti od kojih 85-90% predstavlja T limfocite. Iako je cjelokupan broj limfocita u žena i muškaraca sličan, postotak T limfocita u odnosu na cjelokupnu populaciju limfocita niži je u muškaraca u odnosu na žene. Moguće je da je testosteron odgovoran za niži broj T limfocita u muškaraca budući da može stimulirati apoptozu T limfocita (149).

Brojni istraživači nisu našli promjena u cjelokupnom broju T limfocita, kao ni u njihovim podvrstama za vrijeme menstrualnog ciklusa. Pretpostavlja se da estrogen i progesteron nemaju učinak na limfocite pri izloženosti u kratkim intervalima (150).

Zanimljiva su istraživanja kojima je potvrđeno da žene u menopauzi imaju znatno niže razine cjelokupnog broja T limfocita u odnosu na trudne žene. Ovo može biti posljedica dugotrajnog nedostatka progesterona i E2 premda valja opservirati i ostale čimbenike kao što je starenje (151).

Nije potvrđeno da sintetički hormoni sadržani u kontraceptivnim tabletama remete odnose limfocita ili ukupan broj T limfocita. Naprotiv hormonalna nadomjesna terapija u menopauznih žena ima utjecaj na cjelokupan broj, podklase i postotak T limfocita, što je naročito izraženo kroz sniženje Th (152).

U razumijevanju regulacije imunog odgovora važna je podjela Th u dva podsoja: Th1 i Th2. Citokini Th1 (interferon gama, interleukin-2) uglavnom potiču celularni imuni odgovor dok citokini Th 2 pomažu u humoralnom imunom odgovoru a to su interleukin (IL)- 4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13. Razlike u produkciji Th1 u odnosu na menstrualni ciklus nisu nađene dok je uočena povećana produkcija IL-2 u žena u menopauzi. Među Th 2 citokinima nisu uočene promjene u odnosu na razine hormona (153).

### **e) B limfociti**

B limfociti koji su glavni izvor protutijela sačinjavaju 5-15 % cirkulirajućih limfocita. U odnosu na ovisnost o T limfocitima dijelimo ih u dvije podgrupe. Uobičajeni B limfociti (B2) imaju zadatak da predstave T limfocitima unutrašnje antigene, pomoću T limfocita se aktiviraju i razvijaju u plazma stanice koje stvaraju imunoglobuline. U drugoj podgrupi B limfocita (B1) protutijela nastaju neovisno o T limfocitima, drži se da je upravo ta podgrupa odgovorna za nastajanje autoprotutijela (141).

Razlike u broju B limfocita između muškog i ženskog spola, kao ni unutar menstrualnog ciklusa žene za sada nisu nađene. U menopauzi ukupan broj B limfocita je sličan ili snižen u odnosu na žene generativne dobi (23).

Kod primjene hormonalne nadomjesne terapije unutar prvih 6. mjeseci ne dolazi do bitnih promjena u broju B limfocita ali se nakon šest mjeseci njihov broj značajno povećava što upućuje da dugotrajan upliv hormona ima učinka na porast broja B limfocita (32).

Pokazano je da estrogene mogu imati različit učinak na podgrupe B limfocita. Izgleda da je podgrupa B1 stabilna nakon menopauze i ne pokazuje promjene u odnosu na hormonalnu nadomjesnu terapiju, dok je podgrupa B2 snižena u menopauzi i značajno se povećava pod utjecajem hormonalne terapije (154).

U studijama na životinjama pokazan je sličan utjecaj estrogena na populaciju B limfocita: estrogene u miša pozitivno djeluju na povećanje broja mladih B stanice koštane srži, na način da ih štite od apoptoze, također imaju pozitivan učinak na preživljenje B limfocita u slezeni (155).

Tijekom razvoja B stanica estrogeni mogu u naivnom nezrelom mišu smanjiti negativnu selekciju te tako pojačati preživljenje autoreaktivnih B stanica, što može poslužiti kao model za razumijevanje veće učestalosti autoimunih bolesti u žena (147).

Budući da je glavni zadatak B limfocita stvaranje protutijela, razlike među spolovima trebale bi se odraziti na razine protutijela u plazmi. Kako su u žena humoralne imune reakcije izrazito snažnije nego u muškaraca proizlazi da je aktivnost B limfocita različita u žena i muškaraca (149). U žena se zaista nalaze više serumske razine imunoglobulina IgM i IgG. Također se zabilježene promjena razina imunoglobulina u odnosu na menstrualni ciklus. Ova saznanja upućuju na zaključak da ženski spolni hormoni imaju pozitivan učinak na stvaranje protutijela, dok bi testosteron trebao imati potiskujući učinak (141).

U ljudi je *in vitro* dokazano da estrogeni potiču poliklonalnu aktivaciju B limfocita povećavajući stvaranje IgG i IgM imunoglobulina u žena i muškaraca. I u bolesnika s SLE-om je pokazano da estrogen ima pozitivan učinak na stvaranje autoprotutijela dok je učinak testosterona suprotan (156).

Iz studija na životinjama može se zaključiti da estrogen pored toga što potiče cjelokupno stvaranje autoprotutijela ima utjecaj i na uključivanje pojedinih izotipova. U miša tretiranog estrogenima stvaranje autoprotutijela je povećano i to uglavnom klase IgG, unutar koje su većinom zastupljeni IgG 2 i IgG 1 podtipovi (155).

#### **f) Monociti**

Monociti predstavljaju 5-10% cirkulirajućih leukocita, imaju kratak poluživot te u cirkulaciji opstaju najduže 24 sata. Učinak spolnih hormona na cjelokupni broj monocita je poznat.

U žena u menopauzi i u muškaraca nalazi se veći broj monocita nego u žena u folikularnoj fazi. Pri primjeni estrogena u žena u menopauzi broj monocita se spušta, iz čega se zaključuje da estrogen, moguće i progesteron smanjuje broj monocita. U osnovi ovog zbivanja je zastoj mitoze monocita pod uplivom spolnih hormona s posljedičnom apoptozom monocita (26).

Pojedini autori su pokazali veći broj monocita za vrijeme luteinske faze i trudnoće u odnosu na folikularnu fazu. Dokazano je da spolni hormoni imaju utjecaj i na otpuštanje monocita iz koštane srži (152).

Monociti imaju važnu ulogu u imunom sustavu: kontroliraju proizvodnju citokina i odnose patogene čestice iz cirkulacije. Stoga je jasno da se utjecaj spolnih hormona na poremećaj broja monocita bezuvjetno odražava na cjelokupnu imunu reaktivnost (157).

Imuni odgovor na spolne hormone se neposredno odražava kroz oslobađanje citokina. Važan posrednik upale i aktivator T limfocita je TNF-alfa, polipeptid kojeg luče aktivirani makrofazi i monociti. Stimulirani TNF viši je u muškaraca nego u žena u plodnom periodu, izgleda da su i plazmine razine IL-6 snižene pod utjecajem estrogena (158).

#### **f) Granulociti**

Granulociti obuhvaćaju oko 65% ukupnog broja leukocita od čega se 0,5 -1 % odnosi na bazofile, 3-5% na eozinofile i 90-95% na neutrofile. Neutrofili su važan čimbenik upale u mikrobnim infekcijama. Zadatak im je odgovoriti na kemotaktični stimulans stvaranjem slobodnih radikala čiji je cilj uništenje fagocitirane stanice (143).

Praćenjem utjecaja spolnih hormona na aktivnosti neutrofila pokazano je da progesteron pojačava kemotaktičnu aktivnost neutrofila dok je estrogen smanjuje.

Izgleda da E2 na neutrofile djeluje u cilju smanjenja upale dok progesteron u odnosu na neutrofile potiče upalu (26).

#### **g) NK stanice**

NK stanice obuhvaćaju oko 5 % ukupnih leukocita, usmjerene su na uništavanje virusom zaraženih stanica, te tumorskih stanica bez prethodne imunizacije odnosno suradnje s genima tkivne podudarnosti. U mogućnosti su razoriti ciljnu stanicu neposrednim dodiranjem bez prisustva protutijela ili putem citotoksičnosti ovisne o protutijelima (159).

Pored važnosti NK stanica u razvoju ranog imuniteta na određene viruse, unutarstanične bakterije i parazite zanimljiva je i njihova uloga u humanoj reprodukciji. Posebna podgrupa NK stanica u endometriju važna je za implantaciju blastocita i strukturnu organizaciju posteljice(137).

Zbog značaja u oplodnji važne su spoznaje o povezanosti spolnih hormona i perifernih NK stanica. Nije potvrđen utjecaj testosterona na broj NK stanica, dok je naprotiv jasno uočljiv utjecaj estrogena. Za vrijeme menstrualnog ciklusa NK stanice periferne krvi povećavaju svoj broj u kasnoj sekretornoj fazi menstrualnog ciklusa u odnosu na broj NK stanica u kasnoj proliferativnoj fazi. Za vrijeme primjene estrogena kao i tijekom trudnoće broj NK stanica se smanjuje (140).

Povećana aktivnost NK stanica u cilju razgradnje ciljnih stanica potvrđena je u muškaraca i žena u menopauzi u odnosu na žene generativne dobi. Očito je da estrogen i progesteron imaju supresivan učinak na litičku aktivnost NK stanica (139).

Pored razgradnje stanica druga važna aktivnost NK stanica je oslobađanje citokina a to su najčešće citokini tipa 1: IL 2 i interferon gama. Iako je za vrijeme trudnoće smanjeno stvaranje interferona gama u perifernim NK stanicama ( za što su



vjerojatno odgovorni drugi čimbenici osim estrogena) nije uočen utjecaj estrogena na otpuštanje citokina NK stanica (143).

## **h) Receptori**

Učinak spolnih hormona na tkiva ili stanice ostvaruje se vezanjem hormona za receptore u tkivima. Zbog svoje lipofilne prirode steroidni hormoni mogu difundirati preko stanične membrane. Klasični receptori steroidnih hormona češće su smješteni unutar stanice nego na staničnim membranama. Vezanje steroida za steroidne receptore u stanici omogućava prijenos ovih kompleksa u nukleus. Receptorni kompleks steroid/steroid u nukleusu se ponaša kao transkripcijski čimbenik, neposredno regulirajući ekspresiju gena koji sadrže vezna mjesta za ove komplekse (160).

Postoje dvije vrste estrogenih receptora alfa i beta, vezanje estrogena za jedan od ova dva receptora može imati različite učinke u istom organizmu. Estrogeni receptori su u limfocitnoj populaciji dokazani jedino na citotoksičnim T limfocitima dok na pomoćničkim T limfocitima nije sigurno dokazano vezanje steroida, što pretpostavlja nepostojanje steroidnih receptora na njima (161).

S druge strane mRNA za estrogene receptore izgleda da je prisutna u obje vrste T limfocita. U pomoćničkim T limfocitima se vjerojatno ne prenosi samostalno na receptor. Smatra se da i B limfociti izražavaju receptore za estrogen (162).

Više godina se zna da klasični unutarstanični receptori estrogena postoje u monocitima. Da li će doći do izražavanja alfa ili beta receptora estrogena u monocitima ovisi o stupnju stanične diferencijacije (152). Monociti ističu beta receptore estrogena, dok su magrofazi obilježeni alfa receptorima estrogena. Premda nije dovoljno poznato kakva je uloga receptora estrogena u monocita i

makrofaga, uočeno je smanjenje broja receptora estrogena u žena u menopauzi (163).

Za neutrofile se također zna da imaju alfa i beta receptore estrogena. Nema podataka o postojanju receptora estrogena u NK-a stanicama periferne krvi ljudi, dok štakorski NK periferne krvi ističu i beta i alfa receptore estrogena (159).

Progesteronski receptori nisu potvrđeni na odmarajućim T limfocitima, dok aktivirani T limfociti ističu receptore progesterona. Na B limfocitima, monocitima, neutrofilima i NK stanicama nisu dokazani progesteronski receptori (25,138).

Iako je učinak estrogena, testosterona i progesterona na imuni sustav neosporan, izgleda da u većini stanica imunog sustava nema receptora za testosteron. Dugo se smatralo da testosteron nema učinak na T limfocite budući da oni ne izražavaju klasične intracelularne androgene receptore. Međutim novije studije upućuje na postojanje membranskih receptora testosterona na limfocitima koji se bitno razlikuju od intracelularnih receptora (162).

Za razliku od T limfocita, B limfociti kao i humani monociti, neutrofil i NK stanice posjeduju intracelularne receptore za androgene (161).

Postoje i razmišljanja o drugim putovima djelovanja spolnih hormona na imuni sustav; moguće je da se zbog svoje lipofilne prirode steroidi mogu smjestiti u membranu te na taj način oštetiti svojstva membrane, što se zatim odražava na imuni sustav (164).

## 2. CILJ RADA I POSTAVKE

SLE je složena multisustavna autoimuna bolest koja se većinom javlja u žena, najčešće tijekom plodnog perioda žene. U SLE-u je zabilježena naglašena hidroksilacija estrona u feminizirajuće metabolite kao što je 16 alfa hidroksiestron i estriol (24 ). Utjecaj estrogena na tijek bolesti u oba spola potvrđen je brojnim istraživanjima. Poznato je da egzogeni estrogeni sadržani u raznim hormonalnim pripravcima mogu izazvati razvoj SLE-a u podložnih osoba, kao i pogoršanje tijeka bolesti (22). Pored toga što se u žena nalaze više razine imunoglobulina u odnosu na muški spol, «in vitro» je dokazano da estrogen potiče poliklonalnu aktivaciju B limfocita uz povećano stvaranje IgG i IgM protutijela (28 ).

Verthelyi i Anshar Ahmed su u mišjem modelu pokazali da estrogen nije odgovoran samo za prekomjerno stvaranje autoprotutijela već ima utjecaj na uključivanje pojedinih vrsta imunoglobulina (136).

Antifosfolipidna protutijela koja se nalaze se u skoro 40% SLE bolesnika mogu aktivirati endotelne stanice, monocite, neutrofile i trombocite te usloviti otpuštanje posrednika upale i prokoagulantnih čimbenika te tako prouzročiti tromboembolije (108). Dokazano je da primjena pripravaka estrogena u SLE bolesnika s povišenim titrom aPL ili aCL protutijela može doprinijeti tromboembolijskom događanju (103). Također je na mišjem modelu pokazano da se tretiranjem miša vanjskim estrogenima može potaknuti stvaranje antikardiolipinskih protutijela ( 136).

Iako snižene vrijednosti komplementa nisu uvrštene u kriterije SLE-a, drži se da su bitan parametar praćenja aktivnosti bolesti. Poznato je da prirodno prisutne niže razine ranih komponenti komplementa povećavaju sklonost razvoju SLE-a, što

se objašnjava oslabljenim klirensom komplementnog sustava naspram veće količine antigena (165,166).

Odnos estrogena i komponenti komplementa nedovoljno je istražen. Yilmazer i suradnici su opisali pozitivnu korelaciju serumskih razina C3 s razinama estrogena u žena na peroralnoj hormonalnoj terapiji (82). Također je na mišjem modelu pokazano da estrogeni mogu potaknuti sintezu C3 u lumenu maternice (81).

U novije vrijeme uloga komplementa u APS-u postaje sve zanimljivija. U mišjem modelu je pokazano da niske razine C3 i C4 ili primjena inhibitora komplementne aktivacije blokiraju prokoagulantnu aktivnost aCL protutijela te na taj način sprječavaju razvoj tromboembolija (80).

Postavka je da povišene razine estrogena u načelu pogoduju stvaranju autoprotutijela, pa tako i antikardiolipinskih protutijela u SLE-u. Povišene razine estrogena budući da su podloga za pojačano stvaranje aCL-a, doprinose razvoju tromboembolija u SLE-u. Dvojbena je povezanost komponenti komplementa u odnosu na tromboembolije i razinu estrogena u SLE bolesnica. Snižene razine komplementa koje obilježavaju aktivnost SLE-a, prema spoznajama iz mišjeg modela ne bi trebale pogodovati razvoju tromboembolija. Naspram estrogenu komplement bi se trebao ponašati kao i ostali reaktanti upale, što znači da više razine estrogena prate i više razine komplementa. Naprotiv brojne studije u ljudi pokazuju znatno niže razine komplementa za vrijeme tromboembolija u primarnom APS-u kao i u sekundarnom u sklopu SLE-a (167).

Cilj rada je prema postavci ispitati koliko su više razine estrogena prisutne u SLE bolesnica, te koliko je titar pojedinih klasa aCL-a povezan s razinama estrogena. Također je cilj istražiti koliko su povišene razine estrogena odnosno klasa aCL-a povezane s razvojem tromboembolija u SLE-u. Cilj je i usporedno istražiti

moću povezanost komponenti C3 i C4 komplementa sa serumskim razinama estrogena uz ispitivanje njihovih razina u tromboembolijama u SLE-u.

## 3. ISPITANICI I METODE

### 3.1 IZBOR ISPITANICA

U radu su uključene 124 ispitanice s SLE-om (odabir bolesnica je urađen prema revidiranim kriterijima Američkog reumatološkog društva, Tablica 2.) koje su liječene u KB Split od 2000. do 2005. godine uz njihovu suglasnost da sudjeluju u ispitivanju. U ispitivanje su uključene SLE bolesnice prosječne životne dobi  $33 \pm 7$  g., uzorak krvi se uzimao od 14.-og do 16.-og dana menstrualnog ciklusa.

U tih bolesnica su usporedno određivane razine estrogena, antikardiolipinskih protutijela i komponenti C3 i C4 komplementa uz praćenje aktivnost bolesti u smislu tromboembolijskih događanja.

U kontrolnoj skupini praćeno je 60 ispitanica, koje su po dobi i antropometrijski odgovarale skupini bolesnica, te su bile suglasne ispitivanju, uzorak krvi je također uziman 14.-og do 16.-og dana menstrualnog ciklusa. Srednja dob kontrolne skupine bila je  $34,8 \pm 2,84$  (raspon od 29 do 39).

**Tablica 2.** Revidirani kriteriji za klasifikaciju SLE-a iz 1997 godine (168).\*

1. Jagodični osip	Fiksni eritem u razini kože ili iznad nje preko malarne eminencije.
2. Diskoidni osip	Područja eritema iznad razine kože s adherentnim keratotičnim ljuškanjem i začepljenjem folikula; mogu nastati keratotični ožiljci.
3. Fotosenzitivnost	
4. Oralne ulceracije	Uključuje oralne i nazofaringealne ulceracije koje zamijeti liječnik.
5. Artritis	Neerozivni artritis koji zahvaća dva ili više perifernih zglobova, karakteriziran osjetljivošću, otokom ili izljevom
6. Serozitis	Pleuritis ili perikarditis potvrđen EKG-om, auskultatorno trenjem, ili ultrazvučni dokaz perikardijalnog izljeva.
7. Bolest bubrega	Proteinurija više od 0,5 g/dan ili više od 3+, ili stanični cilindri.
8. Neurološki poremećaj	Epileptični napadi ili psihoze bez drugog uzroka.
9. Hematološki poremećaji	Hemolitična anemija ili leukopenija (manje od 4000/mm <sup>3</sup> ) ili limfopenija (manje od 1500/mm <sup>3</sup> ) ili trombocitopenija (manje od 100 000/mm <sup>3</sup> ).
10. Imunološki poremećaji	Pozitivni test LE stanica ili anti-dsDNK ili anti-SM protutijela ili aCL IgG ili aCL IgM te LAC ili lažno pozitivan VDRL
11. Antinuklearna protutijela	Povišen titar ANA određen imunoflorescencom ili sukladnim testom u odsustvu lijeka za koji se zna da inducira stvaranje ANA.

\*Ako su prisutna 4 od nabrojenih kriterija u bilo koje vrijeme tijekom trajanja bolesti, dijagnoza sistemskog lupusa može se postaviti sa specifičnosti od 98% i osjetljivosti od 97%

### 3.2. ODREĐIVANJE ESTROGENA-ESTRADIOLA

Estrogen-estradiol (ng/l) je određivan metodom radioimunoeseja gdje antigen iz uzorka ili standarda kompetitira za vezna mjesta na protutijelu sa stalnim brojem tragača. Nakon inkubacije uz dodavanje supstrata protutijela i polietilen-glikola dolazi do precipitacije kompleksa antigen – protutijelo. Poslije izvršenog centrifugiranja, aspirira se supernatant čija se aktivnost očitava na gama brojaču. Pomoću

standardne krivulje određuje se koncentracija antigena u ispitivanom uzorku (148). Referentne vrijednosti estradiola za vrijeme ovulacije su od 0.37 do 1.56 ng/ml.

### 3.3 ODREĐIVANJE ANTIKARDIOLIPINSKIH PROTUTIJELA

Antikardiolipinska protutijela (aCL) određivana su metodom ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) reagensima tvrtke Hycor Biomedical Inc California 92841, USA (*Product code-DIM002*), na automatskom analizatoru miniBOS tvrtke Biomedica (Automatic microplate analyzer, Bomedica Gruppe, Wien, Austrija, 1999. godina). Rabljene su pločice obložene anionskim fosfolipidom-kardiolipinom kao antigenom pri čemu je dodavanjem uzorka s protutijelom došlo do vezanja protutijela za antigen. Nakon ispiranja puferom dodano je drugo enzimom obilježeno protutijelo, specifično za protutijelo u uzorku, te je tako stvoren novi kompleks antigena i protutijela.

Dodavanjem kromogenog supstrata dolazi do bojanja kompleksa protutijela i antigena. Stupanj obojenosti proporcionalan je razini antikardiolipinskih protutijela (48). Rezultati su izraženi u GPL, MPL i APL jedinicama što odgovara  $1\mu$  /ml afiniteta pročišćenog protutijela. Vrijednosti aCL-a izražene su u GPL, MPL i APL jedinicama. Pozitivne vrijednosti našeg laboratorija su za IgG aCL  $>20$  i.j./ml, IgM aCL  $>20$  i.j./ml, a za IgA aCL  $>20$  i.j./ml.



### 3.4 ODREĐIVANJE KOMPONENTI KOMPLEMENTA

Komponente C3 i C4 komplementa određivane su nefelometrijski. U radu je korišten standardni Behringov preparat-antiserum N na humane komponente C3 i C4 komplementa. Između komponenti komplementa i specifičnih protutijela došlo je do reakcije koja je završila stvaranjem imunih kompleksa. Koncentracija tih kompleksa koji titraju u otopini određena je pomoću rasapa upadnog svjetla nefelometra.

Jačina rasapnog svjetla proporcionalna je koncentraciji određene komponente komplementa. Rezultati su procijenjeni usporedbom s standardnim koncentracijama (169). Referentne vrijednosti u našem laboratoriju su za C3 0.9-1.8 g/l i C4 0.1-0.4 g/l.

### 3.5. STATISTIČKA OBRADA

Svi podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Za testiranje razlika između dvaju skupina podataka korišten je Studentov t test za neovisne uzorke. Za određivanje povezanosti među varijablama primijenjen je test značajnosti Pearsonovog koeficijenta korelacije, te test multiple regresije (ulazni model).

Vrijednost  $p < 0.05$  smatrana je statistički značajnom.

Za statističku obradu podataka poslužili smo se računalnim programom SPSS za operativni sustav *Windows*, verzija 15.0

## 4. REZULTATI

Ispitivane varijable svih ispitanica s SLE-om su prikazani u Tablici 3. Razlike u ispitivanim varijablama između ispitanica i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 4.

**Tablica 3.** Ispitivane varijable svih ispitanica s SLE-om.

Legenda:  $x \pm SD$ : aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija.

	$X \pm SD$		Minimum	Maksimum	Standardna greška
<b>C3 (g/L)</b>	0,96 $\pm$	0,36	0,17	2,44	0,032
<b>C4 (g/L)</b>	0,18 $\pm$	0,16	0,01	1,18	0,014
<b>IgA aCL (APL)</b>	13,54 $\pm$	21,43	1,00	207,00	1,920
<b>IgG aCL (GPL)</b>	37,90 $\pm$	27,40	2,00	120,00	2,460
<b>IgM aCL (MPL)</b>	20,25 $\pm$	24,96	0,00	109,00	2,260
<b>Estradiol (nmol/mL)</b>	0,74 $\pm$	0,58	0,02	2,49	0,052

**Tablica 4.** Razlike u ispitivanim varijablama između ispitanica i kontrolne skupine.

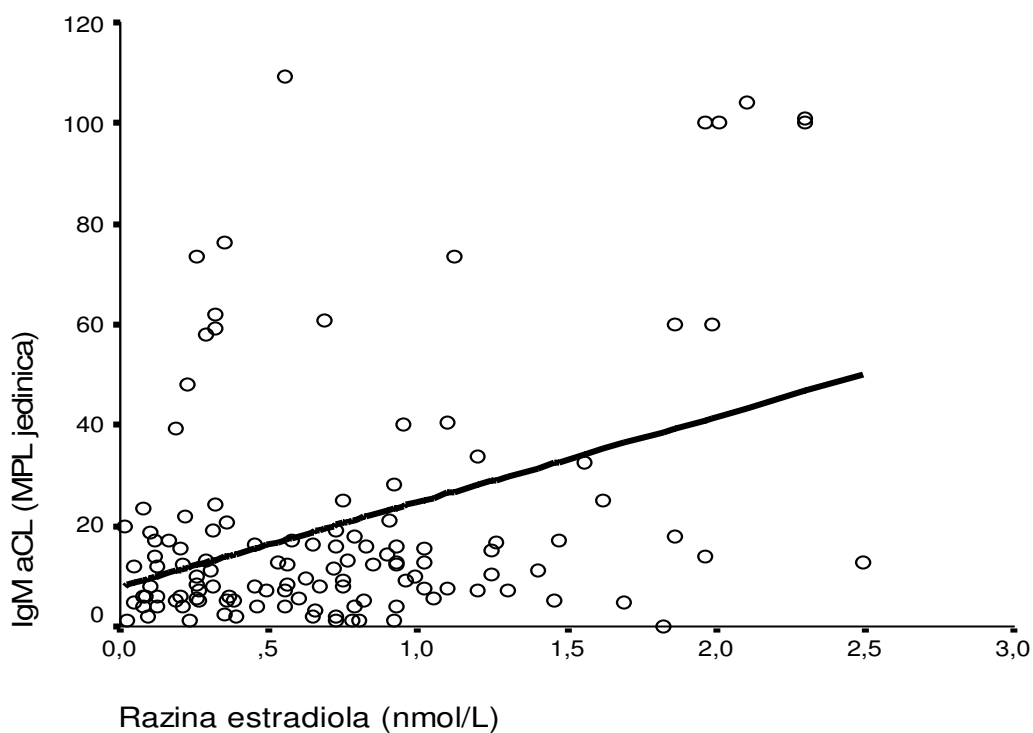
	ispitanice		Kontrolna skupina		značajnost
	$X \pm SD$		$X \pm SD$		
<b>C3 (g/L)</b>	0,96 $\pm$	0,36	1,07 $\pm$	0,18	0,030*
<b>C4 (g/L)</b>	0,18 $\pm$	0,16	0,22 $\pm$	0,07	0,030*
<b>IgA aCL (APL i.j./L)</b>	13,54 $\pm$	21,43	7,95 $\pm$	3,68	0,008*
<b>IgG aCL (GPL i.j./L)</b>	37,90 $\pm$	27,40	6,45 $\pm$	2,21	<0,001*
<b>IgM aCL (MPL i.j./ml)</b>	20,25 $\pm$	24,96	6,00 $\pm$	2,13	<0,001*
<b>Estradiol (ng/mL)</b>	0,74 $\pm$	0,58	0,59 $\pm$	0,29	0,046*

Legenda:  $x \pm SD$ : aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija

Korelacije između estrogena i ostalih ispitivanih varijabli kod svih SLE-ispitanica prikazane su na Tablici 5. Statistički značajna povezanost dokazana je između estrogena i IgG aCL-a ( $r=0,222$ ,  $p=0,007$ ), te estrogena i IgM aCL-a ( $r=0,392$ ,  $p<0,001$ ). Povezanosti između razine estrogena i klasa protutijela IgM aCL-a i IgG aCL-a prikazane su na Slici 16. i Slici 17.

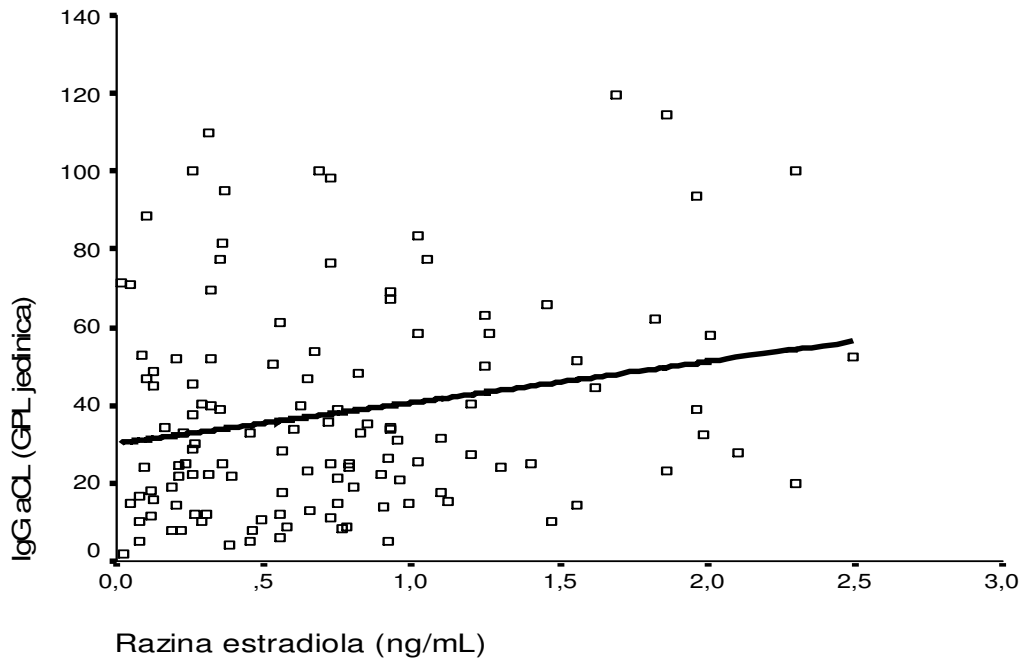
**Tablica 5.** Korelacija razine estrogena i ostalih varijabli kod svih SLE ispitanica (Pearsonov test korelacije).

	Pearsonov koeficijent korelacije (r)	p
<b>C3</b>	-0,099	0,138
<b>C4</b>	-0,063	0,245
<b>IgA aCL</b>	0,022	0,404
<b>IgG aCL</b>	0,222	0,007*
<b>IgM aCL</b>	0,392	<0,001*



$$y=7.84x+16.91$$

**Slika 16.** Krivulja linearne regresije između razine estrogena i klasa protutijela IgM aCL-a (r=0,392, p<0,001)



$$y=30.15x+10.51$$

**Slika 17.** Krivulja linearne regresije između razine estrogena i klasa protutijela IgG aCL-a ( $r=0,222$ ,  $p=0,007$ )

Modelom multiple regresije testirane su varijable ovisne o razinama estrogena (Tablica 6). Navedeni model (ulazni) bio je statistički značajan ( $F=5,754$ ,  $p<0,001$ ).

**Tablica 6.** Multipla regresija (ulazni model,  $F= 5,75$ ,  $p<,001$ )

	Koeficijent $\beta$	Značajnost
<b>C3</b>	-0,128	0,197
<b>C4</b>	0,127	0,215
<b>IgA aCL</b>	0,012	0,884
<b>IgG aCL</b>	0,185	0,033*
<b>IgM aCL</b>	0,382	<0,001**

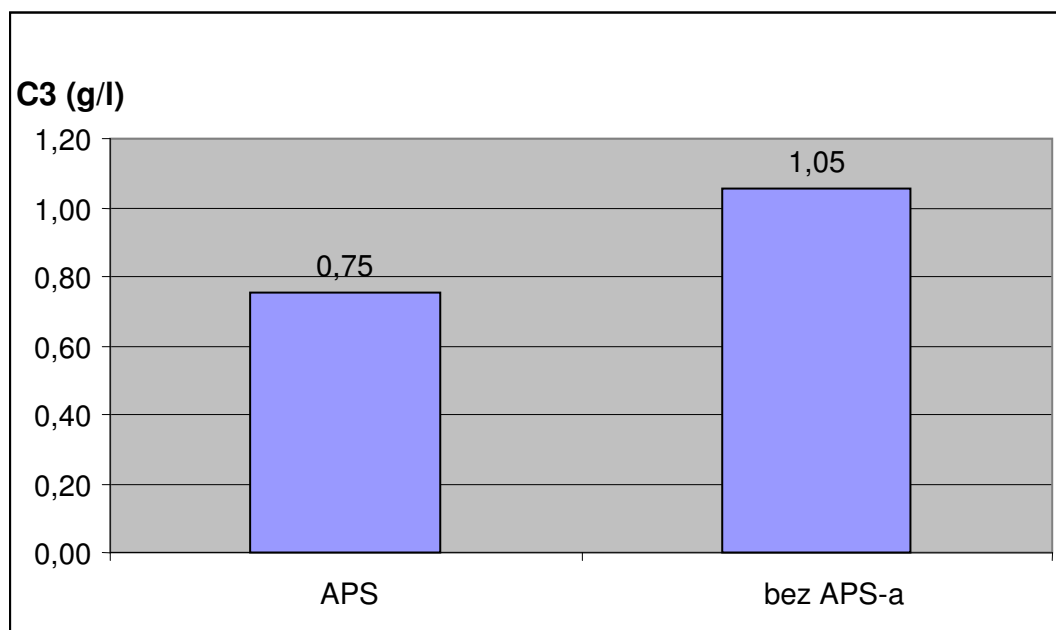
SLE ispitanice su podijeljene u 2. skupine, jedna bez prisutnog APS-a (85 ispitanica), a druga s prisutnim APS-om (39 ispitanica), testirana je razlika među

skupinama Studentovim t testom za neovisne uzorke, što je prikazano na Tablici 7, kao i na Slikama 18.-22. Rezultati nedvosmisleno pokazuju da je vrijednost C3 i C4 značajno niža u ispitanica s APS-om u odnosu na ispitanice bez APS-a ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,007$ ). Nadalje, dokazana je statistički značajna razlika u smislu povišenih vrijednosti IgG aCL-a, IgM aCL-a i estradiola u ispitanica s APS-om u odnosu na ispitanice bez APS-a ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$ ,  $p = 0,009$ ).

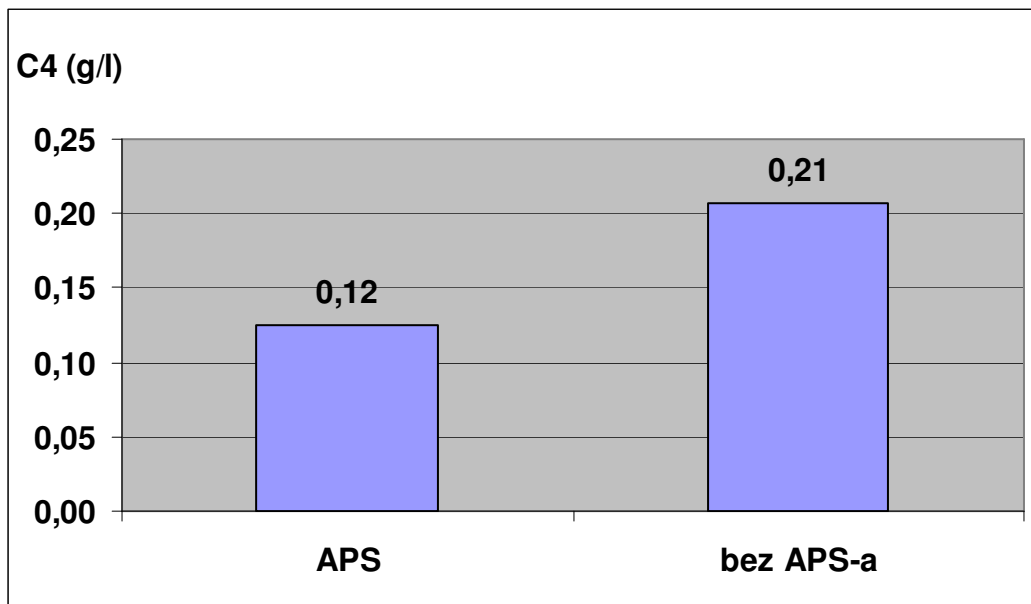
**Tablica 7.** Razlike u ispitivanim varijablama između SLE- ispitanica bez APS-a i s APS-om.

	bez prisustva APS-a		Prisutan APS		značajnost
	X±SD		X±SD		
<b>C3 (g/L)</b>	1,05±	0,35	0,75±	0,27	<0,001*
<b>C4 (g/L)</b>	0,21±	0,16	0,12±	0,14	0,007*
<b>IgA aCL (APL i.j./L)</b>	12,02±	22,75	16,84±	18,07	0,246
<b>IgG aCL (GPL i.j./L)</b>	30,60±	22,67	53,81±	30,25	<0,001*
<b>IgM aCL (MPL i.j./L)</b>	15,63±	18,10	30,47±	33,86	0,002*
<b>Estradiol (ng/mL)</b>	0,65±	0,53	0,93±	0,64	0,009*

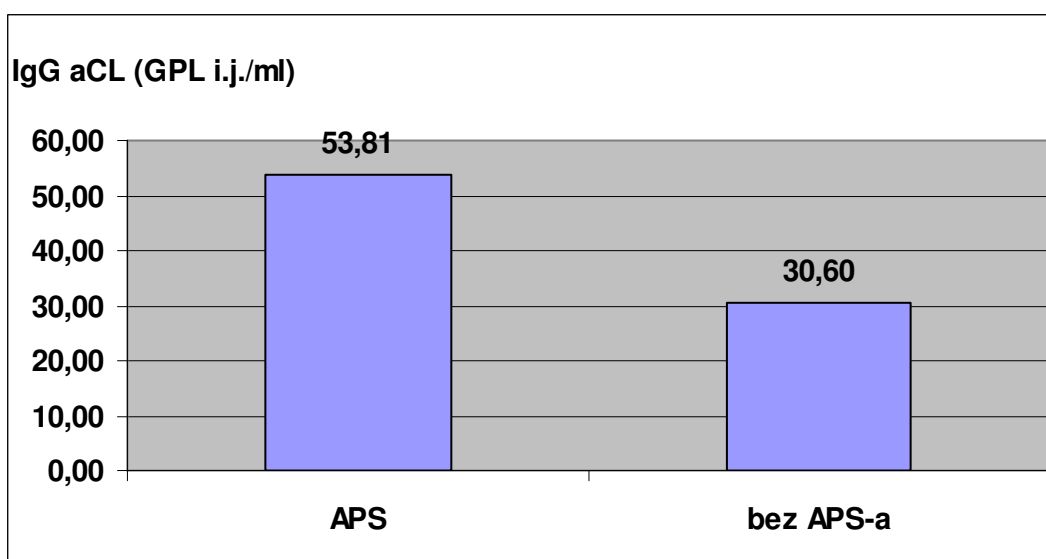
Legenda: x±SD: aritmetička sredina± standardna devijacija



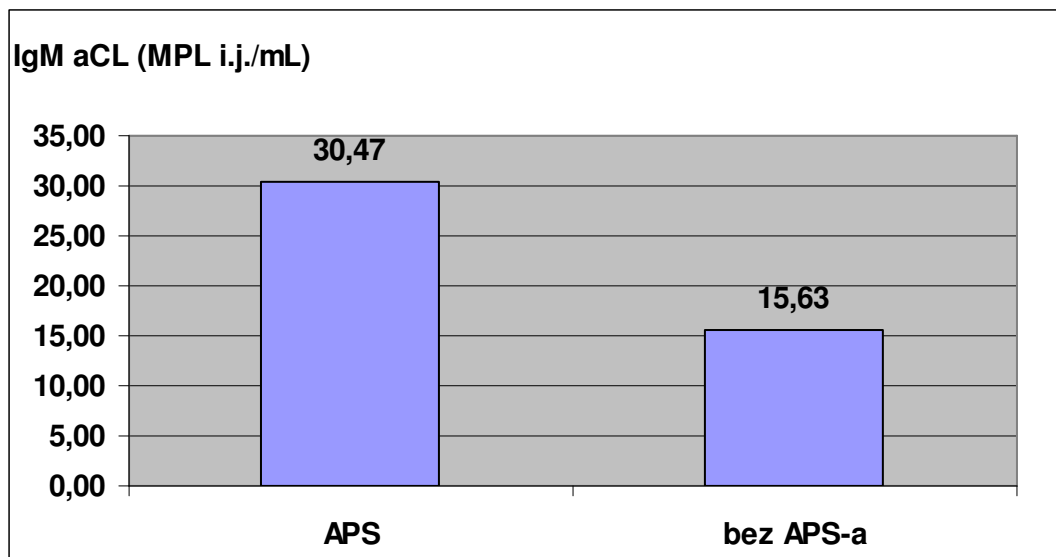
**Slika 18.** Razlike razina C3 između SLE- ispitanica bez APS-a i s APS-om



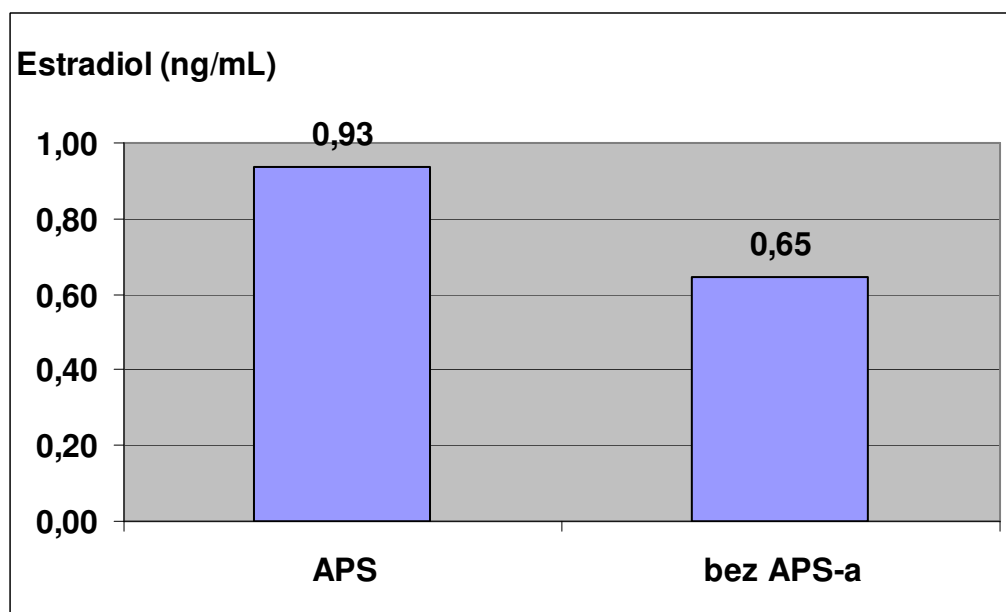
Slika 19. Razlike razina C4 između SLE- ispitanica bez APS-a i s APS-om



Slika 20. Razlike u IgG aCL-a između SLE- ispitanica bez APS-a i s APS-om



**Slika 21.** Razlike titra IgM aCL-a između SLE- ispitanica bez APS-a i s APS-om



**Slika 22.** Razlike razina estradiola između SLE- ispitanica bez APS-a i s APS-om

## 5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem potvrđena je postavka da povišene razine estrogena prate više razine IgG i IgM antikardiolipinskih protutijela u bolesnica s SLE-om. Pojačano stvaranje autoprotutijela u odnosu na više razine estrogena ima podlogu u prethodnim spoznajama o estrogenima i SLE-u.

Poznato je da se steroidni hormoni uključuju u imuni odgovor preko estrogena, koji pojačavaju posebice humoralni imuni odgovor dok androgeni, progesteron i glukokortikoidi djeluju kao prirodni imunosupresori (27, 141, 149).

Također se zna da SLE pored čitavog spektra događanja na brojnim organskim sustavima, obilježava i prekomjerno stvaranje protutijela sa čitavom paletom autoprotutijela (2). Prevalencija ženskog spola u SLE-u je neosporna kao i promjene aktivnosti bolesti tijekom različitih plodnih perioda žene (9).

Folomeev je u SLE bolesnika pokazao da E2 povećava stvaranje IgG i IgM klase imunoglobulina kroz poticanje aktivacije B limfocita preko interleukina 10 (175). U ovom radu potvrđeni su slični odnosi E2 i antikardiolipinskih protutijela, razina E2 ispitanica s SLE-om je statistički je značajno povezana s IgG aCL-om ( $p=0.007$ ) i IgM aCL-om ( $p<0.001$ ).

Drži se da estrogen remeti odnos T i B limfocita na način da uvjetuje smanjenu T staničnu aktivnost odnosno povećanu B aktivnost limfocita, što se odražava kroz povećanje broja B limfocita, uz naglašeno stvaranje protutijela i autoprotutijela (28,144).

U modelu neautoimunog miša, tretiranog estrogenima dokazano je stvaranje IgG protutijela na brojne vlastite i nevlastite antigene (138).



Također je u mišjem modelu pokazano da dugotrajan utjecaj estrogena smanjuje ukupan broj limfocita u slezeni, ali povećava broj plazma stanica, među njima i one koje stvaraju IgM protutijela (98). Pojedinačne plazma stanice miša tretiranog estrogenima stvaraju značajno veće količine imunoglobulina i specifičnih autoprotutijela od ostalih plazma stanica (17).

U ispitivanih SLE bolesnica praćeno je javljanje tromboembolija, bez obzira da li se radilo o prvom ili ponovljenom događanju. S obzirom na prisutnost tromboembolija podijelili smo ih u dvije skupine. U skupini SLE bolesnica s tromboembolijama u odnosu na one bez tromboembolija potvrđene su značajno više razine estrogena ( $p=0,009$ ). Također su u istoj skupini potvrđene i statistički značajno više razine u prvom redu IgG aCL-a ( $p<0,001$ ), zatim IgM aCL-a ( $p=0,02$ ), dok u odnosu na IgA aCL nije nađena statistički značajna povezanost.

Drži se da estrogeni nemaju utjecaj na selektivno stvaranje autoprotutijela već u načelu pojačavaju cjelokupnu produkciju protutijela i autoprotutijela (141).

Statistički neznačajna povezanost estrogena i IgA aCL-a mogla bi se s tog stajališta objasniti minornom prisutnosti IgA u serumu (5-15 %), budući da je većinom prisutan u sekretima.

Već dugo vremena se zna za povećanu učestalost tromboembolija u žena s SLE-om. Hughes i suradnici su prvi put 1983. doveli u vezu serološku prisutnost antifosfolipidnih protutijela s trombozama u primarnom i sekundarnom APS-u (102). Značajke APS-a su tromboembolije, ponavljajući gubitak ploda, blaga do umjerena trombocitopenija uz povišen titar antifosfolipidnih protutijela, što se u klinici odnosi na lupus antikoagulans ili antikardiolipinska protutijela (108).

Brojnim postavkama se pokušava objasniti na koji način antifosfolipidna protutijela potiču trombozu. Jasno je da je specifična antigena reaktivnost aPL-a

ključna u nastanku ozljede tkiva. Pretpostavka je da se aPL vežu za aktivirane endotelne stanice, monocite, neutrofile i trombocite što za posljedicu ima otpuštanje brojnih medijatora i prokoagulansa (106-110).

Ovim istraživanjem u bolesnica s SLE-om potvrđene su više razine estrogena u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0.046$ ). Unutar samih ispitanica više razine estrogena ( $p=0.009$ ) potvrđene su u bolesnica s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom.

Tromboembolije u SLE-u povezane su s višim razinama E2 na posredan ili neposredan način. Postavka je da E2 u naših SLE ispitanica na posredan način potiče razvoj APS-a, kroz stimulaciju stvaranja antikardiolipinskih protutijela, budući da smo kroz ovo istraživanje potvrdili da titar aCL-a (IgG, IgM) značajno raste s porastom razine estrogena.

Ovu postavku podupiru istraživanja na mišu. Verthley i Anshar Ahmed su u miša tretiranog estrogenima dokazali stvaranje protutijela da duplo savijenu DNA, kardiolipin, fosfatidil serin i aktin. Također su u ovog miša potvrdili značajno veći broj plazma stanica što pretpostavlja pojačanu aktivnost B limfocita. Patogenost ovih protutijela nije sigurno potvrđena, ali je spoznaja o načinu njihova nastanka bitna za razumijevanje SLE-a i APS-a (136).

Antifosfolipidna protutijela predstavljaju složenu skupinu autoprotutijela koja klinički potvrđujemo esejima kao što je lupus antikoagulans (LAC), odnosno solidnim esejima za anti-kardiolipin (aCL) i anti- beta2 glikoprotein1 (107).

Kardiolipin je anionski fosfolipid koji se stvara na unutrašnjoj membrani mitohondrija s kojom je povezan. S unutrašnje strane prebacuje se na ostale dijelove mitohondrijske membrane kao i na dijelove izvan mitohondrija. Moguće je da apoptoza, virusna ili bakterijska upala mogu pospješiti hidrolizu ili membranski

prijenos aCL-a. Na taj način razgradni metaboliti mogu izbjeći mitohondrijsku kontrolu lipidnog ciklusa, te tako postati dostupni na staničnoj površini u prvom redu stanicama imunog sustava (108).

Vjerojatno je uloga estrogena u tromboembolijama složenija od samog utjecaja na stvaranje aPL-a. Poznato je da i zdrave žena koje primaju hormone posebice estrogene imaju česta trombotska događanja (23,106).

U kulturi tkiva proučavan je učinak E2 i testosterona na staničnu proliferaciju i apoptozu, te je potvrđen važan upliv spolnih hormona na stanični rast i apoptozu (28, 32). Verthelyi i Anshar Ahmed su na mišjem modelu potvrdili da estrogen značajno smanjuje volumen koštane srži i timusa, organa gdje se pojavljuje brisanje autoreaktivnih stanica. Očito da se učinak estrogena ne smije zanemariti u posrednoj ili neposrednoj kontroli limfocitne apoptoze (32,155).

Poznato je da steroidni hormoni kao što su glukokortikoidi neposredno oštećuju apoptozu timocita, dok estrogeni mogu poremetiti apoptozu limfocita kao i ostalih ne limfatičnih stanica (32). U slezeni miša tretiranog estrogenima nađen je povećan broj apoptotičnih limfocita, za razliku od kontrolne skupine tretirane placeboom (97).

U jetri i slezeni ovog miša nađeni su prošireni hematopoetski centri gdje postoji mogućnost sazrijevanja limfocita. Upravo stvaranje B limfocita na atipičnim mjestima gdje nema stroge selekcija, nameće postavku da tretiranje miša estrogenima može imati za posljedicu pojavljivanje zabranjenih klonova (100). Na ovaj način se može objasniti javljanje autoreaktivnih stanica u perifernim tkivima (primjerice slezena), te naglašeno stvaranje autoprotutijela u miša tretiranog estrogenima. Estrogeni primijenjeni u velikim količinama u kastriranog miša mogu srušiti B-staničnu toleranciju i tako potaknuti autoimunost (97-100). Također i

prenatalno primijenjeni visoko potentni sintetički estrogene imaju poticajni učinak na B–staničnu populaciju.

Način na koji estrogene ostvaruju pojačanu aktivnost B limfocita nije u cijelosti jasan. Moguće je da se radi o neposrednom učinku na imuni sustav ili posrednom preko hipotalamično pituitarne osi (27).

Jedna od postavki je da estrogene preko svojih receptora na T limfocitima aktiviraju citokine koji zatim potiču B limfocite na aktivaciju. Nije zanemariv ni negativan učinak estrogena na NK stanice i T supresorske stanice što se odražava u naglašenoj aktivnosti B limfocita (142).

Zanimljivo je da B limfociti iz estrogenom tretiranog miša mogu biti aktivirani autoantigenima koji nastaju uslijed hormonima posredovane smrti stanice (28).

Ovo istraživanje je još jedan doprinos tvrdnji da je u osnovi brojnih događanja u SLE-u hiperestrogeno stanje. Pojedini autori naglašavaju važnost poremećenog metabolizama estrogena u SLE-u. U oba spola dokazana je pojačana hidroksilacija estrona u izrazito feminizirajuće metabolite kao što je 16 alfa-hidroksiestron i estriol, te naglašena oksidacija testosterona (20,24).

Kroz brojna istraživanja javlja se dvojba da li autoreaktivnosti u SLE-u više doprinose povišene razine E2 ili poremećaji u metabolizmu estrogena (11,12,21).

Prikazani rezultati kojima je potvrđena izravna veza E2 i aCL-a u SLE-u, podudaraju se s istraživanjima na životinjskom modelu gdje je dokazana neposredna veza između hiperestrogenog stanja i stvaranja antikardiolipinskih protutijela.

U gonadektomiranog mužjaka ili ženke autoimunog miša C57/BL6 nakon primjene estrogena dokazana su novonastala antikardiolipinska protutijela, koja su opstajala u cirkulaciji više mjeseci nakon prestanka davanja vanjskog E2. Unutar novonastalih aCL-a potvrđene su klase IgG aCL-a i IgM aCL-a, dok nije bilo IgA aCL-

a. U klasi IgG aCL-a dominirala je klasa IgG2b. Estrogenom inducirana mišja protutijela na kardiolipin imala su minimalnu križnu reakciju s DNK, aktinom i ovalbuminom (136).

Pored neosporne pozitivne korelacije E2 i aCL-a u SLE ispitanica u ovom radu je još značajnija potvrda povezanosti povišenih razina E2 i aCL-a sa sekundarnim APS-om.

Ova spoznaja je važna ne samo radi razumijevanja pojedinih događanja u SLE-u, već i zbog sagledavanja mogućih posljedica primjene estrogena.

Poznato je da se estrogeni koriste kao nadomjesna terapija u menopauznih žena, zatim u liječenju neplodnosti, te da su sastojci brojnih insekticida i pesticida (23,28).

Pored pozitivnog učinka E2 na plodnost i koštani sustav valja razumno procijeniti i negativne učinke, kao što je mogući podražajni utjecaj na imuni sustav.

Kliničkim istraživanjima u SLE-u potvrđen je značajan utjecaj estrogena u oba spola na tijek i pogoršanje bolesti. U ovih bolesnika nalaze se poremećene razine E2 i androgena, primjerice u žena i muškaraca s SLE-om nalaze se niže razine androgena u odnosu na normalnu populaciju (30).

Zanimljiva je uloga estrogena u odnosu na infekciju i autoimunost. Infekcijski čimbenici su dugo smatrani odgovornim za progresiju autoimunih bolesti, ali se danas zna da estrogeni mogu aktivirati prikrivenu infekciju, koja zatim može uvjetovati pogoršanje autoimune bolesti (28, 145).

U SLE ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu potvrđene su značajno niže vrijednosti C3 ( $p=0.03$ ) i C4 ( $p=0.03$ ), što je i očekivano budući da su snižene razine komplementa potvrđen parametar aktivnosti SLE-a (167).

Zna se da je komplementni sustav glavni upravljač našeg prirođenog imunog odgovora, te u tom smislu ima važnu ulogu u obrani od stranih organizama.

Sastavljen je od velikog broja proteina koji se nalaze u cirkulaciji, tkivima i ostalim tkivnim tekućinama u proenzimskom obliku (64).

Aktivacija brojnih komponenti komplementa u enzimsku kaskadu zbiva se različitim putovima; klasičnim, alternativnim i lecitinskim. Svi putovi vode prema centralnoj komponenti komplementnog sustava C3 (71).

Zajedno s ostalim fagocitnim stanicama komplementni sustav je snažan izvor obrane, premda u određenim okolnostima može biti usmjeren na vlastita tkiva te tako sudjelovati u oštećenju vlastitog (72).

Dobro je poznato da komplement ima važnu i višestruku ulogu u patogenezi SLE-a. Imuni kompleksi nastali u reakcijama autoprotutijela i vlastitih antigena aktiviraju klasični put komplementa koji oslobađa posrednike upale s posljedičnim oštećenjem tkiva (73,74).

Brojne funkcije komplementa su genski zadane. Poznato je da je genski ili stečeni manjak ranih komponenti komplementa C1q ili C4, nešto rjeđe C2, važan za podložnost SLE-u (60, 64).

SLE kao i SLE-u slične bolesti, povezane su s manjkom ranih komponenti klasičnog puta komplementa, dok su bakterijske infekcije povezane s manjkom C3 komponente, odnosno manjkom komponenti alternativnog i završnog puta (77, 78).

Aktivacija komplementa prirodan je odgovor na prisutnost mikroorganizma, cirkulirajućih imunih kompleksa i apoptoze, kao i što je neprimjerena aktivacija komplementa sastavni dio brojnih autoimunih bolesti (71, 75).

U tijeku imunih reakcija i sami proteini komplementa mogu postati cilj autoprotutijela što se može odraziti kao novi poremećaj imune upale. U nekim slučajevima protutijela na komponente komplementa interferiraju s njegovom funkcijom te tako nastaje dodatan manjak komplementa (70).

Stajališta da je manjak C4 komponente važan u patogenezi SLE-a podupiru studije na mišu. Mišji model s totalnim deficitom C4 lako stvara autoprotutijela i razvija imunim kompleksima posredovan glomerulonefritis (64, 72).

U humanoj populaciji opisan je homozigotni deficit komponenti C4a i C4b, te je u većine ovih osoba potvrđen SLE ili glomerulonefritis. Poznato je da se C4a vezuje za proteine imunih kompleksa s ciljem onemogućavanja precipitacije. Ova aktivnost je smanjena u SLE-u, naročito u bolesnika s niskom razinom C4 (171).

U svakom slučaju uloga C4 je složena: u pojedinih individua relativan manjak C4 odgovoran je za gubitak tolerancije na vlastito i podložnost razvoju lupusne bolesti, dok su u drugih povišene razine C4 pokretači složenog imunog tkivnog oštećenja (76, 172).

U SLE-u za vrijeme aktivacije komplementa dolazi do oslobađanja anafilatoksina i otpuštanja brojnih medijatora koji sudjeluju u kompleksnom imunom oštećenju tkiva. Komplementni sustav je snažan posrednik zaštite organizma od patogenih čimbenika i kao takav je posebno prikladan za pokretanje stečene imunosti, dovođenjem antigena u neposredan dodir s T i B limfocitima (73,74).

U ovom radu u SLE ispitanica s tromboembolijama pored povišenih razina E2, aCL IgG-a i aCL IgM-a, potvrđene su i statistički značajno niže razine C3 ( $p < 0.001$ ) i C4 ( $p = 0.007$ ) u odnosu na SLE ispitanice bez tromboembolija.

Snižene razine C3 i C4 u SLE ispitanica s tromboembolijama, koje su potvrđene ovim ispitivanjem sukladne su izvještajima o izrazitom sniženju komplementa u akutnom APS-u ljudi. Također se smatra da komplement ima važnu ulogu u poticanju trombotskog zbivanja u APS-u (79,80).

Ramos-Casals i suradnici istraživali su učestalost sniženih razina komplementa u SLE-u i primarnom APS-u, te su pratili povezanost ovih razina s

imunim i hematološkim značajkama bolesti u velikom uzorku ispitanika. U pola bolesnika s primarnim APS-om nađene su snižene razine komplementa koje su kao i u SLE-u bile povezane s *livedo reticularis*-om i trombocitopenijom (167).

Poznata je povezanost niskih vrijednosti komplementa s aktivnosti SLE-a, te povišenim titrom dsDNA i glomerulonefritisom (60,170,171). U novije vrijeme snižene razine komplementa povezuju se i s pojavom vaskulitisa kože i pridruženim APS-om (102). Još uvijek je teoretski sporno da li treba niske vrijednosti komplementa uvrstiti u kriterije SLE-a.

Snižene razine C3 i C4 u ispitanica s SLE-om i pridruženim APS-om upućuju na posrednu povezanost komplementa i E2, o čemu u literaturi postoje različita izvješća. Pojedini radovi upućuju na utjecaj spolnih hormona, posebice estradiola na sintezu komponenti komplementa (82).

Utjecaj estrogena na komplement najbolje je proučen na maternici štakora, budući da estrogen stimulira rast maternice i povećava ekspresiju mRNA za vezne proteine, te potiče sintezu i lučenje različitih proteina u maternici (81).

Glavno mjesto sinteze C3 komponente komplementa je jetra, međutim C3 se može stvarati i u drugim tkivima kao što su monociti i makrofazi (31). Sandstrom je pokazala da estrogen u štakora regulira lučenje proteina maternice koji je prepoznat kao C3 komponenta komplementa. Za prepoznavanje proteina poslužio je kozji serum za štakorsko C3 protutijelo, tako da je dodavanjem ovog protutijela došlo do imunoprecipitacije (81).

Epitelne stanice maternice štakora su pod utjecajem estradiola sintetizirale i lučile C3, koji je dalje aktivacijom razložen u C3a i C3b. Komponenta C3b vezala je stanice predviđene za razgradnju, dok je peptid niže molekularne težine C3a, koji



ima sposobnost leukocitne kemotaksije, bio odgovoran za priljev eozinofila u maternicu štakora (81).

Budući da su C3 i C4 reaktanti akutne faze teoretski bi se mogao očekivati porast ovih komponenti u korelaciji s estrogenom, što ovim istraživanjem nismo potvrdili.

Yilmazer i suradnici su dobili drugačije rezultate: oni su u menopauznih žena na hormonalnoj nadomjesnoj terapiji istraživali odnose estradiola naspram imunoglobulina i komponenti C3 i C4 komplementa. Pozitivna korelacija potvrđena je između estradiola i komponente C3 u žena na peroralnoj nadomjesnoj terapiji dok ova korelacija nije nađena u žena s transdermalnom primjenom estrogena (82).

Pored toga što je reaktant akutne faze, C3 je i citokin koji se stvara u aktiviranim makrofazima jetre i masnog tkiva, te je važan regulator humoralnog imunog odgovora i aktivnosti B limfocita (68). Zanimljivo je da je komponenta C3 uključena u metabolizam glukoze i lipida kroz fragment C3a-des-Arg (72).

Na osnovu ovog ispitivanja pretpostavljamo da su niske razine komplementa u tromboembolijama u SLE-u, u prvom redu posljedica potrošnje uslijed prekomjerne aktivacije komplementnog sustava.

Poznato je da je niskomolekularni heparin tradicionalna terapija trudnica s APS-om u sklopu kojeg se javlja učestali gubitak ploda. Pretpostavka je da primjenom heparina sprječavamo stvaranje mikrotromba posteljice, budući da je heparin potvrđen inhibitor aktivacije komplementnog sustava (103).

Važnost inhibicije komplementa u terapeutske svrhe pokazana je na životinjskom modelu. Nakon aplikacije poliklonalnih i monoklonalnih mišjih aPL-a modelu skotne mišice s APS-om, došlo je do smrti oko polovine embrija. U mišica

koje su imale manjak C3, ili su bile tretirane inhibitorima aktivacije komplementa nije došlo do smrti embrija (134).

Primjenom niskomolekularnog heparina skotnim mišicama s APS-om spriječio se gubitak ploda. U mišjem modelu kao i kod ljudi heparin remeti aktivaciju komplementa vezujući se za komponentu C3b (68).

*In vivo* heparin ne blokira vezanje aPL protutijela za tkivo posteljice. Većina autora je mišljenja da je heparin bitan u APS-u upravo zbog blokade aktivacije komplementa a ne radi svog antikoagulantnog učinka (167).

Salmon i suradnici su pokazali da antifosfolipidna protutijela usmjerena na posteljicu mogu lokalno aktivirati komplement. Pri tom dolazi do oslobađanja razgradnih proizvoda, koji posreduju u ozljedi placente, te tako dolazi do gubitka ploda ili zastoja u rastu (57).

Da bi dokazali ovu postavku oni su modelu skotne APS mišice aplicirali humani IgG koji je sadržavao antifosfolipidna protutijela. U mišica tretiranih inhibitorima aktivacije komplementa, te u onih u kojih su bile snižene komponente komplementa nije došlo do oštećenja ploda (57,134).

Iako u ozljedi tkiva sudjeluju brojni čimbenici ovim radom je pokazano da je aktivacija komplementa neposredno odgovorna za gubitak ploda (57).

Prepoznavanje komponenti komplementa kao bitnih sudionika aPL-om potaknute tkivne ozljede omogućilo je bolje razumijevanje patogeneze vaskularne i tkivne ozljede u SLE-u, te otvorilo put razmatranju novih terapijskih mogućnosti (63, 68).

U ukupnom uzorku od 124 ispitanice s SLE-om pokazana je sklonost negativne korelacije C3 i C4 u odnosu na estrogen ali bez statističke značajnosti, dok

je u 39 ispitanica unutar ovog uzorka sa pridruženim APS pokazana posredna negativna povezanost C3 ( $p < 0.001$ ) i C4 ( $p = 0.002$ ) s E2.

Pozitivna korelacija estrogena s aCL-om potvrđena je jednako u ukupnom uzorku (IgM aCL  $p < 0,001$ , IgG aCL  $p = 0,007$ ), kao i u dijelu ispitanica s tromboembolijama (IgG aCL  $p < 0,001$ , IgM aCL  $p = 0,002$ ).

Ovi rezultati potvrđuju postavku da estrogeni potiču stvaranje antikardiolipinskih protutijela te taj način doprinose prokoagulantnom stanju odnosno nastanku tromboembolija u SLE-u. Ostaje upitno koliko se pad razina komponenti komplementa može povezati s estrogenim učinkom, odnosno da li su ove niske vrijednosti C3 i C4, preteča ili posljedica samog tromboembolijskog zbivanja.

U više studija pokazana je indukcija APS-a u miša, imunizacijom s humanim monoklonskim antikardiolipinskim protutijelima (176). Štoviše u APS-u je in vitro dokazana ekspresija čimbenika endotelne stanične aktivnosti za koje se zna da pogoduju trombozi. S druge strane je upitno zašto svi bolesnici s pozitivnim aPL-om ne razvijaju tromboze (101,106).

Novije opservacije o ulozi komplementa u patogenezi APS-a proširuju ovo područje. Poznato je da blokada komplementne aktivacije primjenom inhibitora C3 konvertaze, ili gensko uklanjanje C3 štiti mišicu od učinka aPL-a na trudnoću (134).

Zadnje vrijeme pokušavaju se razlučiti komplement vezujuća aCL protutijela od onih koji ne vezuju komplement što bi trebalo biti važno za procjenu rizika vaskularnih događanja (134).

Shinzato i suradnici su ispitivali prisutnost komplement vezujućih aCL protutijela u skupini bolesnika s različitim razinama aCL-a, kako u primarnom APS tako i u sekundarnom APS-u u sklopu SLE-a.

Titar komplement vezujućih aCL-a uspoređivan je s trombotskim zbivanjima. U određivanju komplement fiksirajućeg aCL-a upotrijebili su iste eseje kao i za standardni aCL. Kao izvor komplementa poslužio je svježi serum, kojem je dodano kozje protutijelo na humani C3 (177).

U studiji nije dokazana značajna povezanost komplement fiksirajućih aCL-a i tromboze. Povišena razina aCL-a bila je jedini relevantni čimbenik tromboembolijskih zbivanja. U dvije trećine bolesnike koji su imali trombotska događanja potvrđen je IgG izotip aCL-a, te se smatra da je on bolji predskazatelj tromboembolijskog zbivanja od komplement fiksirajućeg aCL-a (177).

Iako je očito da je učinak estrogena složeniji od samog poticanja stvaranja protutijela, još su uvijek nejasni mehanizmi upliva na komplementni sustav kao i na stanice endotela .

Učinak estrogena u SLE-u s pridruženim APS-om važan je ne samo za razumijevanje stvaranja antikardiolipinskih protutijela već i za objašnjenje vaskularnog oštećenja (137).

Estrogen svoj učinak ostvaruje posredno kroz unutarstanične receptore alfa i beta, koji se javljaju i na stanicama imunog odgovora kao što su T i B limfociti, makrofazi i mononukleari periferne krvi (25). Biološki učinak estrogena na stanice imunosti ovisan je o promjenama u isticanju ovih receptora ili pak promjenama njihove strukture (154, 155).

Rezultati ovog istraživanja idu u prilog postavci da estrogeni potiču hiperaktivnost B stanica kroz povećanu produkciju protutijela i autoprotutijela, te na taj način sudjeluju u tromboembolijskim zbivanjima (156).

Pored potvrđenog upliva estrogena na antikardiolipinska protutijela i komplement u APS-u ispitanica s SLE-om, ne smije se zanemariti utjecaj estrogena

na trombocite i endotelne stanice. Poznato je da su E2 receptori prisutni na endotelnim stanicama, te je dokazano da i estrogen i progesteron potiču o endotelu ovisnu vazodilataciju (142,143).

Proizvodnja brojnih citokina ne samo u imunim stanicama već i ostalim stanicama kao što su trofoblasti, stanice endometrija i epitelne stanice, također je pod uplivom spolnih hormona (137).

Postoji veliko zanimanje za moguću selektivnu modulaciju estrogenih receptora u terapijskom cilju. Današnje spoznaje iz ovog područja su skromne premda studije na životinjskom modelu daju ohrabrujuće rezultate (141, 144).

Delgado i suradnici opisuju značajan porast aCL i aPL protutijela u žena na umjetnoj oplodnji nakon aplikacije hormonalne terapije. Oni razmatraju aPL i aCL protutijela kao posljedicu liječenja a ne kao čimbenike neplodnosti (58).

Ova protutijela nastala vjerojatno pod hormonalnim uplivom pokazuju *in vitro* sličnu aktivnost kao i ostala aCL protutijela.

Za razumijevanje prirode antifosfolipidnih protutijela neophodno je znati da se osim u autoimunim bolestima često nalaze i u brojnim patološkim stanjima kao što su maligni tumori i infekcije (100, 104).

Porast aCL protutijela opisan je i u kroničnim bolestima jetre kao što je kronični C hepatitis ili alkoholna bolest jetre. Zamijećeno je da titar aCL-a raste s stupnjem oštećenja jetre te je najviši u bolesnika s cirozom jetre.

Perney i suradnici su dokazali da u alkoholnoj bolesti jetre titar aCL-a raste sukladno histološkom stupnju oštećenja jetre i dnevnoj količini alkohola (131). Razmatrani su brojni čimbenici odgovorni za nastanak aCL-a, premda i ovdje valja uvažiti povišene razine estrogena (zbog povećane periferne konverzije androgena u estradiol i estron) kao mogući uzrok stvaranja aCL-a (174).

Većina kliničara je izrazito oprezna pri primjeni hormonalnih lijekova u SLE-u, čemu u prilog ide i ovo istraživanje. Nameće se općenito pitanje o posljedicama primjene estrogena budući da brojna autoprotutijela a među njima i aCL nalazimo i u zdravih osoba (106).

Smatra se da s starenjem raste učestalost apoptotičkih zbivanja što je jedan od razloga javljanja autoprotutijela. S druge strane snižene razine hormona u starosti uvjetuju i promjene imunog statusa (26, 100).

Starenje imunog sustava, pospješeno hormonalnim promjenama u menopauzi, drži se da ima važnu ulogu u neoplaziji, osteoporozi, poremećajima ponašanja te učestalim infekcijama ovih žena (23). Pored toga starenje se odražava u oslabljenom odgovoru na različite imune stimulanse, za što su odgovorni T limfociti. Izgleda da su promjene u samim T limfocitima važnije od smanjenja njihovog cjelokupnog broja (32).

Važno je ne zanemariti postupno nestajanje timusa, te prilagođavanje imunog odgovora promijenjenim hormonalnim odnosima (9).

U žena u menopauzi odnos između imunog i endokrinog sustava najbolje se odražava kroz snižene razine estrogena te povišen titar IL-6. Prekomjerno nastao IL-6 neprikladno potiče imuni sustav i remeti njegovu kontrolu. Upravo se IL-6 povezuje s povećanim brojem neoplastičnih događanja, razvojem osteoporoze (vjerojatno kroz stimulaciju osteoklasta) i povećanom učestalosti Alzheimer-ove bolesti u ovih žena. Dok se sniženje IL-2 povezuje s većim javljanjem autoprotutijela u zreloj dobi (157).

Promjene u funkciji B limfocita također su prisutne u procesu starenja imunog sustava tijekom menopauze (160). U žena koje primaju hormonalnu nadomjesnu terapiju nalazi se povećan broj B limfocita, izraženija mitogena proliferacija posredovana T limfocitima, te povećana razina TNF alfa u odnosu na žene u

menopauzi koje ne primaju terapiju (158). Epidemiološka istraživanja upućuju da je rizik SLE-a, kao i ostalih reumatskih bolesti povećan u žena koje primaju hormonalnu nadomjesnu terapiju (164).

Poznato je da kontraceptivne tablete mogu povećati rizik SLE-a te prouzročiti čitavu paletu autoimunih poremećaja. U već prisutnoj bolesti mogu pospješiti pogoršanje, pojačavajući autoimune reakcije, što ponekad može imati koban ishod (145).

Suprotno tome pojedine studije o aktivnosti SLE-a u menopauznih žena pokazuju da je utjecaj cirkulirajućih estrogena na tijek bolesti razmjerno zanemariv (144).

Pokazano je da su estrogeni u ovih bolesnica imali povoljan učinak na koštana događanja. Poremećaji koštanog sustava u sklopu SLE-a mogu nastati radi same bolesti ili kao posljedica liječenja, u prvom redu glukokortikoidima (19). Koštana događanja pored toga što smanjuju kvalitetu življenja mogu prouzročiti bolnost i nepokretnost u sklopu patoloških prijeloma kosti. Važno je stoga u SLE bolesnica procijeniti korist primjene E2 naspram mogućeg razvoj imunih poremećaja. Ovdje se ponovno nameće potreba selektivnog prilagođavanja receptora estrogena u terapijske svrhe (25).

Djelovanje spolnih hormona ne smije se generalizirati, poznato je da E2 može imati potiskujući ili poticajni učinak na imuni sustav, ovisno o razini hormona i trajanju hormonalnog utjecaja (23). Učinak je također ovisan o starosti jedinke, lokalizaciji, aktivnosti stanice te ekspresiji estrogenih receptora. Stoga nas ne treba zbunjivati činjenica da vanjski estrogeni mogu imati naizgled slične ali u naravi različite uplive na brojne autoimune bolesti (12).

U paleti zbivanja u SLE-u očito je da hiperestrogeno stanje ima značajnu ulogu ne samo u stvaranju autoprotutijela već i u uplivu na brojne citokine i komponente komplementa (28, 81).

Prema prikazanim rezultatima hiperestrogeni status u SLE-u doprinosi povećanom stvaranju IgM i IgG antikardiolipinskih protutijela, a samim tim nastanku prokoagulantnog stanja koje pogoduje razvoju tromboembolija ili Hughes-ovog sindroma.

Koliko su razine komponenti komplementa ovisne o E2 u ovom sindromu teško je procijeniti. Činjenica je da su razine C3 i C4 značajno niže u SLE ispitanica s Hughes-ovim sindromom u odnosu na ostale ispitanice, kao i to da one imaju značajno više razine E2. Mala je vjerojatnost neposrednog utjecaja E2 na komplement; komplement se pojačano razgrađuje u sklopu samog Hughes-ovog sindroma.

Jasno je da je u vaskularnu ozljedu uključeno više čimbenika od samog aCL-a i komplementa, ali je ovim ispitivanjem potvrđen značajan utjecaj E2 na stvaranje patogenog soja antikardiolipinskih protutijela odgovornih za razvoj prokoagulantnog stanja i Hughes-ovog sindroma. Također je neosporno potvrđena važna uloga komplementa u trombotskim događanjima u SLE-u.



## 6. ZAKLJUČAK

Ovim ispitivanjem potvrđena je postavka da estrogene potiču aktivnost B limfocita kroz pojačano stvaranje protutijela i autoprotutijela, pa tako i antikardiolipinskih protutijela, koja su odgovorna za razvoj prokoagulantnog stanja i tromboembolija.

U 124. ispitanice s SLE-om potvrđena je pozitivna korelacija razina estrogena s titrom IgG aCL-a ( $p=0,007$ ) i IgM aCL-a ( $p<0,001$ ), korelacija s titrom IgA nije potvrđena, što se može objasniti niskim titrom ukupnog IgA u serumu.

U SLE ispitanica nije potvrđena statistički značajna povezanost komponenti komplekta s estrogenom, dok su u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih žena potvrđene više razine estrogena ( $p=0,046$ ), niže serumske razine C3 (0,030) i C4 (0,030), te izrazito više razine aCL-a.

U SLE ispitanica (39) koje su imale pridruženi APS ili Hughes-ov sindrom potvrđene su više razine E2 ( $p=0,009$ ), paralelno s višim razinama IgG aCL-a ( $p<0,001$ ) i IgM aCL-a ( $p=0,002$ ), u odnosu na preostale SLE ispitanice (85) bez sekundarnog APS-a. Značajno viši titar aCL-a u ispitanica s Hughesov-ovim sindromom naspram SLE ispitanica bez ovog sindroma, potvrđuje da su upravo ova protutijela važan čimbenik razvoja tromboembolija.

Razine estrogena su također značajno više u ispitanica s tromboembolijama, što potvrđuje postavku da E2 potiče prekomjerno stvaranje antikardiolipinskih protutijela te na taj način pogoduje razvoju APS-a.

U ovom radu potvrđeno je izrazito sniženje C3 ( $p<0,001$ ) i C4 ( $p=0,009$ ) u SLE ispitanica s APS-om u odnosu na ispitanice bez APS-a, što bi se teško moglo

povezati estrogenim utjecajem, budući da u ukupnom broju SLE ispitanica nije potvrđena povezanost komplementa i E2.

Komplement se u novijim radovima navodi kao važan sudionik APS-a, budući da se blokadom njegove aktivacije sprječava razvoj tromboembolija. Ukoliko nema aktivacije komplementa bez obzira na titar i patogenost aCL-a, ne dolazi do razvoja APS-a. Stoga sam sklona mišljenju da su niske razine C3 i C4 u SLE ispitanica s Hughes-ovim sindromom u prvom redu posljedica naglašene aktivacije komplementnog sustava u sklopu tromboembolijskog zbivanja.

## 7. SAŽETAK

**Cilj:** Ovim istraživanjem se nastojalo utvrditi koliko povišene razine estrogena u SLE-u utiču na stvaranje antikardiolipinskih protutijela i razvoj tromboembolija u sklopu pridruženog APS-a. Pored toga ispitivana je i ovisnost komponenti komplemента o estrogenu u SLE-u, naročito u ispitanica s tromboembolijama.

**Ispitanice:** U radu su ispitivane 124 SLE bolesnice, prosječne životne dobi  $33 \pm 7$  godina. Kod ispitanica je praćena pojavnost tromboembolijskih zbivanja. Uzorak krvi je uziman 14-og do 16-og dana menstrualnog ciklusa: određivane su razine estradiola, antikardiolipinskih protutijela, komponenti C3 i C4 komplemента. Isti parametri su praćeni u 60 zdravih ispitanica u istom intervalu menstrualnog ciklusa.

**Metode:** Estrogen-estradiol je određivan metodom radioimunotesta. Antikardiolipinska protutijela određivana su metodom ELISA-e, rezultati su izraženi u GPL, MPL i APL jedinicama, što odgovara  $1 \mu/\text{ml}$  afiniteta pročišćenog protutijela. Komponente komplemента određivane su nefelometrijski uz korištenje standardnog Behringov-ovog antiseruma N na humane komponente C3 i C4.

**Rezultati:** Praćenjem povezanosti estrogena s ispitivanim varijablama potvrđena je značajna povezanost E2 i IgM aCL-a ( $p < 0,001$ ), kao i IgG aCL-a ( $p = 0,007$ ), dok nije potvrđena povezanost E2 i komplemента, kao ni E2 i IgA aCL-a. Ovisno o prisutnosti tromboembolijskih zbivanja ispitanice su podijeljene u dvije skupine: u skupinu s APS-om ( $n = 39$ ) i u skupinu bez APS-a ( $N = 85$ ). U skupini s APS-om u odnosu na skupinu bez APS-a potvrđene su značajno više razine estradiola ( $p = 0,009$ ), uz više razine IgG aCL-a ( $p < 0,001$ ), kao i IgM aCL-a ( $p = 0,002$ ). Osim toga, u skupini s APS-om potvrđene su i značajno niže razine C3 ( $p < 0,001$ ) i C4 ( $p = 0,007$ ).

**Zaključak:** U skupini od 124 ispitanice sa SLE-om potvrđena je pozitivna korelacija estrogena i antikardiolipinskih protutijela IgG i IgM (estrogeni potiču stvaranje antikardiolipinskih protutijela!). U ispitanica s prisutnim APS-om potvrđene su značajno više razine estrogena uz paralelno više razine IgG aCL-a i IgM aCL-a u odnosu na ispitanice bez APS-a (važna uloga estrogena u tromboembolijama u SLE-u!). Značajno niže razine C3 i C4 u ispitanica s APS-om u odnosu na one bez APS-a nisu pod uplivom estrogena (posljedica povećane potrošnje komplementa uslijed tromboembolijskih događanja?!).

## 8. SUMMARY

### **Influence of estrogens on the level of anticardiolipin antibodies in females with systemic lupus erythematosus**

**Objective:** The aim of this study was to explore the contribution of estrogenic level in systemic lupus erythematosus (SLE) female patients regarding the production of anticardiolipin antibodies by evaluating thrombotic events. The relationship between estrogen level and the titres of C3 and C4 components of complement (particularly in SLE patients with thrombosis) was studied, too.

**Subjects:** 124 female patients who fulfilled the SLE criteria with a mean age  $33\pm 7$  years were selected. The blood samples were tested for E2, aCL, C3, C4 between the 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> day of the menstrual cycle. The patients were clinically evaluated and the thrombotic events if emerged were noted. 60 healthy women of the same age were selected for the control group.

**Methods:** Estrogen-estradiol was tested by radioimmunoassay method during the menstrual period. Anticardiolipin antibodies were measured by ELISA, and the results were expressed in GPL, MPL and APL units, which equal  $1\mu\text{ml}$  affinity of purified antibody. The testing of complement's compounds was performed by nephelometry using standard Behring antiserum N on human C3 and C4.

**Results:** A significant relationship between E2 and IgM aCL-a ( $p<0.001$ ), and between E2 and IgG aCL-a ( $p=0.007$ ) were proven. There was no significant correlation between E2 and complement's compounds as well as between E2 and IgA aCL. The SLE patients depending on the thrombotic event were divided into two groups: with APS ( $n=39$ ) and without APS ( $n=85$ ). In patients with APS, comparing

with those with no APS, the estrogen levels were markedly higher ( $p=0.009$ ), as were the levels of IgG aCL ( $p<0.001$ ) and the levels of IgM aCL ( $p=0.002$ ), while the C3 levels ( $p<0.001$ ) and C4 levels ( $p=0.007$ ) were significantly lower.

**Conclusion:** In the group of 124 patients with SLE the positive significant correlation between estrogens and anticardiolipin antibodies IgG and IgM was proved (the estrogen stimulates the production of aCL!). Further, estrogen levels were significantly higher in the group of patients with secondary APS when compared to the group without APS (the important role estrogens in the thrombotic events in SLE!). The titres of C3 and C4 were also significantly lower in SLE patients with APS (the result of excessive complement activation due to the thrombotic event?!).

## 9. POPIS LITERATURE

1. Arnett FC, Reveille JD. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am* 1992;18:865-92.
2. Cabral AR, Alarcon-Segovia D. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9: 387-92.
3. Brekke OH, Michaelsen TE, Sandlie I. The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol Today* 1995;16:85-90.
4. Clark J, Bourne T, Salaman MR, Seifert MH, Isenberg DA. B lymphocyte hyperactivity in families of patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1996;9: 59-65.
5. Stern R, Fishman J, Brushman H, Kunkel HG. Systemic lupus erythematosus associated with Klinefelter's syndrome. *Arthritis Rheum* 1977;20:18-22.
6. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996; 85: 311-8.
7. Lahita RG. Early diagnosis of systemic lupus erythematosus in women. *J Women Health* 1992;1:117.
8. Koffler D, Agnello V, Carr RI, Kunkel HG. Variable patterns of immunoglobulin and complement deposition in the kidneys of patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Pathol* 1969;56:305-16.
9. Lahita RG. Gender and age in lupus. In: Lahita RG, ur. *Systemic lupus erythematosus*. San Diego: Academic Press, 1999:129-144.

10. Davies KA, Peters AM, Beynon HL, Walport MJ. Immune complex processing in patients with systemic lupus erythematosus. In vivo imaging and clearance studies. *J Clin Invest* 1992;90:2075-83.
11. Lahita RG, Bradlow HL, Fishman J, Kunkel HG. Estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus: patients and family members. *Arthritis Rheum* 1982;25:843-846.
12. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:233–249.
13. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;27;381:751-8.
14. Balow JE, Boumpas DT, Austin HA 3rd. New prospects for treatment of lupus nephritis. *Semin Nephrol* 2000;20:32-9.
15. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994;367:425-8.
16. Hartung K et al. Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of multicenter study. *J Clin Invest* 1992;90:1346-51.
17. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol Rev* 1981;55:179-216.
18. Carroll MC, Prodeus AP. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 1998;10:36-40.
19. Lash AA. Why so many women? Part 1. Systemic lupus erythematosus. *Medsurg Nurs* 1993;2:259-64.



20. Lahita RG, Bradlow HL, Fishman J, Kunkel HG. Estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus: patients and family members. *Arthritis Rheum* 1982;25:843-846.
21. Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S, New M. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987;30:241-8.
22. Garovich M, Augdelo C, Pisko E. Oral contraceptives and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1980;23:1396-8.
23. Porter VR, Greendale GA, Schocken M, Zhu X, Effros RB. Immune effects of hormone replacement therapy in post-menopausal women. *Exp Gerontol* 2001;36:311–326.
24. Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel Hg, Fishman J. Increased 16 alpha hydroxylation of estradiol insystemic lupus erthematosus. *J Clin Endocrinol Metabol* 1981;53 :174-8.
25. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392:49-53.
26. Verthelyi D, Petri M, Ylamus M, Klinman DM. Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus* 2001;10:352-8.
27. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;2:777-780.
28. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 2005;11:411-23.
29. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:352-6.

30. van Vollenhoven RF, Engleman EG, McGuire JL. An open study of dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994;37:1305-1310.
31. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 1998;188:2313-2320.
32. McMurray RW, Suwannaroj S, Ndebele K, Jenkins JK. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology* 2001;69:44-58.
33. Karp DR. Complement and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:538-42.
34. Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS, Goodman JR, Siiteri PK. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Exp Med* 1978;147:1568-83.
35. Sontheimer RD. Systemic lupus erythematosus of the skin. U: Lahita RG, ur. *Systemic lupus erythematosus*. San Diego: Academic Press, 1999;631-656.
36. Di Cesare PE, Zuckerman JD. Articular manifestations of systemic lupus erythematosus. U: Lahita RG, ur. *Systemic lupus erythematosus*. San Diego: Academic Press, 1999;793-812.
37. Yood RA, Smith TW. Inclusion body myositis and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1985 ;12:568-70.
38. Kashgarian M. The role of the kidney biopsy in the treatment of lupus nephritis. *Ren Fail* 1996;18:765-73.

39. van Why SK, Kim S, Geibel J, Seebach FA, Kashgarian M, Siegel NJ. Thresholds for cellular disruption and activation of the stress response in renal epithelia. *Am J Physiol* 1999;277:227-34.
40. Blanche P, Krebs S, Renaud B, Dusser D, Sicard D. Systemic lupus erythematosus presenting as iron deficiency anemia due to pulmonary alveolar hemorrhage. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:228.
41. Lawrence EC. Systemic lupus erythematosus and the lung. U: Lahita RG, ur. Systemic lupus erythematosus. San Diego: Academic Press, 1999;719-732.
42. Ziporen L, Goldberg I, Arad M, Hojnik M, Ordi-Ros J, Afek A, Blank M, Sandbank Y, Vilardell-Tarres M, de Torres I, Weinberger A, Asherson RA, Kopolovic Y, Shoenfeld Y. Libman-Sacks endocarditis in the antiphospholipid syndrome: immunopathologic findings in deformed heart valves. *Lupus* 1996;5:196-205.
43. Wu R, Shoenfeld Y, Sherer Y, Patnaik M, Matsuura E, Gilburd B, Koike T, Peter JB. Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations--possible immunomodulation of atherosclerosis. *Autoimmunity* 2003;36:91-7.
44. Hazeltine M, Rauch J, Danoff D, Esdaile JM, Tannenbaum H. Antiphospholipid antibodies in systemic lupus:evidence of an association with positive Coombs' and hypocomplementemia. *J Rheum* 1988;15:80-6.
45. Doria A, Shoenfeld Y, Wu R, Gambari PF, Puato M, Ghirardello A, Gilburd B, Corbanese S, Patnaik M, Zampieri S, Peter JB, Favaretto E, Iaccarino L, Sherer Y, Todesco S, Pauletto P. Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1071-7.

46. Kronberg A, Blank M, Kaufman S, Shonefeld Y. Induction of tissue factor activity in monocytes by anticardiolipin antibodies. *J immunol* 1994;153:1328-32.
47. Gerard NP, Gerard C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 1991;349:614-7.
48. Harris EN, Pierangeli SS, Birch D. Anticardiolipin wet workshop report. Vth International Symposium on antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol* 1994;101:616-24.
49. Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993;341:923-5.
50. Petri M, Jones RJ, Brodsky RA. High-dose cyclophosphamide without stem cell transplantation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:166-73.
51. Kohen M, Asherson RA, Gharavi AE, Lahita RG. Lupus psychosis: differentiation from the steroid-induced state. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:323-6.
52. Asherson RA, Harris NE, Gharavi AE, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus, antiphospholipid antibodies, chorea, and oral contraceptives. *Arthritis Rheum* 1986;29:1535-6.
53. West SG, Emlen W, Wener MH, Kotzin BL. Neuropsychiatric lupus erythematosus: a 10-year prospective study on the value of diagnostic tests. *Am J Med* 1995;99:153-63.
54. Amerio P, Frezzolini A, Abeni D, Teofoli P, Girardelli CR, De Pita O, Puddu P. Increased IL-18 in patients with systemic lupus erythematosus: relations

- with Th-1, Th-2, pro-inflammatory cytokines and disease activity. IL-18 is a marker of disease activity but does not correlate with pro-inflammatory cytokines. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:535-8.
55. Baron M, Brisson ML. Pancreatitis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1006-9.
  56. Runyon BA, LaBrecque DR, Anuras S. The spectrum of liver disease in systemic lupus erythematosus. Report of 33 histologically-proved cases and review of the literature. *Am J Med* 1980;69:187-94.
  57. Salmon JE, Girardi G, Holers VM. Activation of complement mediates antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *Lupus* 2003;12:535-8.
  58. Delgado Alves J, Radway-Bright EL, Lee S, Grima B, Hothersall J, Ravirajan CT, Isenberg DA. Antiphospholipid antibodies are induced by in vitro fertilization and correlate with paraoxonase activity and total antioxidant capacity of plasma in infertile women. *Lupus* 2005;14:373-80.
  59. Simantov R, Laurence J, nachman R. The cellular hematology of systemic lupus erythematosus. In: Lahita RG, ur. *Systemic lupus erythematosus*. San Diego: Academic Press, 1999:765-792.
  60. Siegert C, Daha M, Westedt ML, van der Voort E, Breedveld F. IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1991;18:230-4.
  61. Traynor AE, Schroeder J, Rosa RM, Cheng D, Stefka J, Mujais S, Baker S, Burt RK. Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high-dose chemotherapy and haemopoietic stem-cell transplantation: a phase I study. *Lancet* 2000 26;356:701-7.

62. Hu W, Liu Z, Chen H, Tang Z, Wang Q, Shen K, Li L. Mycophenolate mofetil vs cyclophosphamide therapy for patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *Chin Med J* 2002;115:705-9.
63. Thomas TC, Rollins SA, Rother RP, Giannoni MA, Hartman SL, Elliott EA, Nye SH, Matis LA, Squinto SP, Evans MJ. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol* 1996;33:1389-401.
64. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. Control of the complement system. *Adv Immunol* 1996;61:201-83.
65. Lachmann PJ, Nicol P. Reaction mechanism of the alternative pathway of complement fixation. *Lancet* 1973;1:465-7.
66. Lu JH, Thiel S, Wiedemann H, Timpl R, Reid KB. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J Immunol* 1990;144:2287-94.
67. Seelen MA, van der Bijl EA, Trouw LA, Zuiverloon TC, Munoz JR, Fallaux-van den Houten FC, Schlagwein N, Daha MR, Huizinga TW, Roos A. A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005;44:1111-9.
68. Ross GD, Polley MJ, Rabellino EM, Grey HM. Two different complement receptors on human lymphocytes. One specific for C3b and one specific for C3b inactivator-cleaved C3b. *J Exp Med* 1973;138:798-811.
69. Ahearn JM, Fearon DT. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol* 1989;46:183-219.

70. Waxman FJ, Hebert LA, Cornacoff JB, VanAman ME, Smead WL, Kraut EH, Birmingham DJ, Taguiam JM. Complement depletion accelerates the clearance of immune complexes from the circulation of primates. *J Clin Invest* 1984;74:1329-40.
71. Pepys MB. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J Exp Med* 1974;140:126-45.
72. Ochs HD, Wedgwood RJ, Heller SR, Beatty PG. Complement, membrane glycoproteins, and complement receptors: their role in regulation of the immune response. *Clin Immunol Immunopathol* 1986;40:94-104.
73. Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS, Carroll MC. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol* 1996;157:549-56.
74. Croix DA, Ahearn JM, Rosengard AM, Han S, Kelsoe G, Ma M, Carroll MC. Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. *J Exp Med* 1996;183:1857-64.
75. Walport MJ, Davies KA, Morley BJ, Botto M. Complement deficiency and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 1997;815:267-81.
76. Urowitz MB, Gladman DD, Minta JO. Systemic lupus erythematosus in a patient with C4 deficiency. *J Rheumatol* 1981;8:741-6.
77. Tappeiner G. Disease states in genetic complement deficiencies. *Int J Dermatol* 1982;21:175-91.

78. Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC, Schreuder WO, Felt-Bersma RJ, Abbink JJ, Thijs LG, Hack CE. Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. *J Clin Invest* 1989;84:443-50.
79. Munakata Y, Saito T, Matsuda K, Seino J, Shibata S, Sasaki T. Detection of complement-fixing antiphospholipid antibodies in association with thrombosis. *Thromb Haemost* 2000;83:728-31.
80. Holers VM, Girardi G, Mo L, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002;195:211-220.
81. Sundstrom SA, Komm BS, Ponce-de-Leon H, Yi Z, Teuscher C, Lyttle CR. Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J Biol Chem* 1989;264:16941-7.
82. Yilmazer M, Fenkci V, Fenkci S, Aktepe O, Sonmezer M, Kurtay G. Association of serum complement (C3, C4) and immunoglobulin (IgG, IgM) levels with hormone replacement therapy in healthy post-menopausal women. *Hum Reprod* 2003;18:1531-5.
83. Hunkapiller T, Hood L. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 1989;44:1-63.
84. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988;6:381-405.
85. Schumaker VN, Phillips ML, Hanson DC. Dynamic aspects of antibody structure. *Mol Immunol* 1991;28:1347-60.
86. Hill RL, Delaney R, Fellows RE, Lebovitz HE. The evolutionary origins of the immunoglobulins. *Pros Natl Acad Sci USA* 1966;56:1762-1769.
87. Hashimoto S, Chiorazzi N, Gregersen PK. The complete sequence of the human CD79b (Ig beta/B29) gene: identification of a conserved exon/intron



- organization, immunoglobulin-like regulatory regions, and allelic polymorphism. *Immunogenetics* 1994;40:145-149.
88. Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 1994;31:169-217.
  89. Papadea C, Check IJ. Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:27-58.
  90. Jackson J, Sim RB, Whaley K, Feighery C. Autoantibody facilitated cleavage of C1-inhibitor in autoimmune angioedema. *J Clin Invest* 1989;83:698-707.
  91. Uwatoko S, Aotsuka S, Okawa M, Egusa Y, Yokohari R, Aizawa C, Suzuki K. C1q solid-phase radioimmunoassay: binding properties of solid-phase C1q and evidence that C1q-binding IgG complexes in systemic lupus erythematosus are not bound to endogenous C1q. *J Immunol Methods* 1984;73:67-74.
  92. Helm B, Marsh P, Vercelli D, Padlan E, Gould H, Geha R. The mast cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 1988;331:180-3.
  93. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000 7;191:411-6.
  94. Gladman DD, Hussain F, Ibanez D, Urowitz MB. The nature and outcome of infection in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002;11:234-9.
  95. Villarreal GM, Drenkard C, Villa AR, Slor H, Shafrir S, Bakimer R, Shoenfeld Y, Alarcon-Segovia D. Prevalence of 13 autoantibodies and of the 16/6 and related pathogenic idiotypes in 465 patients with systemic lupus

- erythematosus and their relationship with disease activity. *Lupus* 1997;6:425-35.
96. Kikawada E, Lenda DM, Kelley VR. IL-12 deficiency in MRL-Fas(lpr) mice delays nephritis and intrarenal IFN-gamma expression, and diminishes systemic pathology. *J Immunol* 2003 1;170:3915-3925.
  97. Bloom RD, O'Connor T, Cizman B, Kalluri R, Naji A, Madaio MP. Intrathymic kidney cells delay the onset of lupus nephritis in MRL-lpr/lpr mice. *Int Immunol* 2002;14:867-871.
  98. Waters ST, Fu SM, Gaskin F, Deshmukh US, Sung SS, Kannapell CC, Tung KS, McEwen SB, McDuffie M. NZM2328: a new mouse model of systemic lupus erythematosus with unique genetic susceptibility loci. *Clin Immunol* 2001;100:372-383.
  99. Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P, Gilkeson GS. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J Clin Invest* 2003;111:539-552.
  100. Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 20;93:1624-1629.
  101. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:47-64.
  102. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986 Jun;13(3):486-489.
  103. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT i sur. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations

- and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:1019-1027.
104. Yoon KH, Wong A, Shakespeare T, Sivalingam P. High prevalence of antiphospholipid antibodies in Asian cancer patients with thrombosis. *Lupus* 2003;12:112-116.
  105. Diz-Kucukkaya R, Hacıhanefioğlu A, Yenerel M, Turgut M, Keskin H, Nalcaci M, İnanc M. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in patients presenting with immune thrombocytopenic purpura: a prospective cohort study. *Blood* 2001 15;98:1760-1764.
  106. Finazzi G. The epidemiology of the antiphospholipid syndrome: who is at risk? *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:271-276.
  107. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 2003 1;10:1827-1832.
  108. Sebastiani GD, Galeazzi M, Morozzi G, Marcolongo R. The immunogenetics of the antiphospholipid syndrome, anticardiolipin antibodies, and lupus anticoagulant. *Semin Arthritis Rheum* 1996;25:414-20.
  109. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Font J, Cervera R, Lopez-Soto A, Tolosa C, Franz J, Selva A, Ingelmo M, et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European Multicenter Study of 114 patients. *Am J Med* 1994;96:3-9.
  110. Amoroso A, Mitterhofer AP, Del Porto F, Garzia P, Ferri GM, Galluzzo S, Vadacca M, Caccavo D, Afeltra A. Antibodies to anionic phospholipids and

- anti-beta2-GPI: association with thrombosis and thrombocytopenia in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2003;64:265-273.
111. Bertolaccini ML, Sanna G, Ralhan S, Gennari LC, Merrill JT, Khamashta MA, Hughes GR. Antibodies directed to protein S in patients with systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical significance. *Thromb Haemost* 2003;90:636-641.
  112. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, Khamashta MA, Shoenfeld Y; Catastrophic Antiphospholipid Syndrome Registry Project Group. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003;12:530-534.
  113. Somers E, Magder LS, Petri M. Antiphospholipid antibodies and incidence of venous thrombosis in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002;29:2531-2536.
  114. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Ugalde J, Aguirre C. High impact of antiphospholipid syndrome on irreversible organ damage and survival of patients with systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 2004 12;164:77-82.
  115. Brey RL, Stallworth CL, McGlasson DL, Wozniak MA, Wityk RJ, Stern BJ i sur. Antiphospholipid antibodies and stroke in young women. *Stroke* 2002;33:2396-2400.
  116. Chapman J, Abu-Katash M, Inzelberg R, Yust I, Neufeld MY, Vardinon N, Treves TA, Korczyn AD. Prevalence and clinical features of dementia associated with the antiphospholipid syndrome and circulating anticoagulants. *J Neurol Sci* 2002 15;203-204.

117. Ziporen L, Shoenfeld Y, Levy Y, Korczyn AD. Neurological dysfunction and hyperactive behavior associated with antiphospholipid antibodies. A mouse model. *J Clin Invest* 1997 1;100:613-619.
118. Chapman J, Rand JH, Brey RL, Levine SR, Blatt I, Khamashta MA, Shoenfeld Y. Non-stroke neurological syndromes associated with antiphospholipid antibodies: evaluation of clinical and experimental studies. *Lupus* 2003;12:514-517.
119. Sanna G, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, Laing H, Khamashta MA, Mathieu A, Hughes GR. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: prevalence and association with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 2003;30:985-992.
120. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5-year period. A multicenter prospective study of 1,000 patients. European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:167-175.
121. 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;85:800-805.
122. Sasson Z, Rasooly Y, Chow CW, Marshall S, Urowitz MB. Impairment of left ventricular diastolic function in systemic lupus erythematosus. *Am J Cardiol* 1992 15;69:1629-1634.
123. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kuhl U. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 2003;3:127-135.

124. Leung WH, Wong KL, Lau CP, Wong CK, Liu HW. Association between antiphospholipid antibodies and cardiac abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1990;89:411-419.
125. Asherson RA, Cervera R. Review: antiphospholipid antibodies and the lung. *J Rheumatol* 1995;22:62-66.
126. Gertner E. Diffuse alveolar hemorrhage in the antiphospholipid syndrome: spectrum of disease and treatment. *J Rheumatol* 1999;26:805-807.
127. Moroni G, Ventura D, Riva P, Panzeri P, Quaglini S, Banfi G, Simonini P, Bader R, Meroni PL, Ponticelli C. Antiphospholipid antibodies are associated with an increased risk for chronic renal insufficiency in patients with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2004;43:28-36.
128. Godfrey T, Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid syndrome and renal artery stenosis. *QJM* 2000;93:127-129.
129. Huang JW, Wu MS, Chu TS, Tsai TJ. Hepatic aneurysm and portal vein thrombosis in a patient with lupus erythematosus on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:753-756.
130. Gharavi AE, Pierangeli SS, Harris EN. Viral origin of antiphospholipid antibodies: endothelial cell activation and thrombus enhancement by CMV peptide-induced APL antibodies. *Immunobiology* 2003;207:37-42.
131. Perney P, Biron-Andreani C, Joomaye Z, Fabbro-Peray P, Quenet F, Schved JF, Blanc F. Antiphospholipid antibodies in alcoholic liver disease are influenced by histological damage but not by alcohol consumption. *Lupus* 2000;9:451-455.

132. Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology(Oxford)* 1999;38:917-932.
133. Queyrel V, Ducloy-Bouthors AS, Michon-Pasturel U, Hachulla E, Dubucquoi S, Caron C i sur. .Antiphospholipid antibodies in HELLP syndrome: clinical and biological study in 68 women. *Rev Med Interne* 2003;24:158-164.
134. Salmon JE, Girardi G, Holers VM. Complement activation as a mediator of antiphospholipid antibody induced pregnancy loss and thrombosis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:46-50.
135. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Sugi T. Phospholipid binding plasma proteins required for antiphospholipid antibody detection: an overview. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 101-110.
136. Verhelyi D, Ansar Ahmed S. Characterization of estrogen-induced autoantibodies to cardiolipin in non-autoimmune mice. *J Autoimmun* 1997; 10: 115-125.
137. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 2001;1:983–993.
138. Ashar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases: mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 1985;121:531-551.
139. Giglio T, Imro MA, Filaci G, Scudeletti M, Puppo F, De Cecco L, Indiveri F, Costantini S. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life Sci* 1994;54:1305–1312.

140. Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Faas MM. Cytokine production by natural killer lymphocytes in follicular and luteal phase of the ovarian cycle in humans. *Am J Reprod Immunol* 2001;45:130–134.
141. Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:282–288.
142. Verthelyi D, Klinman DM. Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology* 2000;100:384-390.
143. Matalaka KZ. The effect of estradiol, but not progesterone, on the production of cytokines in stimulated whole blood, is concentration-dependent. *Neuroendocrinol Lett* 2003;24:185–191.
144. Ablin RJ. Modulatory effects of estrogen on immunologic responsiveness. *Am J Rep Immunol* 1981;1:206-209.
145. Bisset LR, Griffin JF. Humoral immunity in oral contraceptive users. I. Plasma immunoglobulin levels. *Contraception* 1998;38:567–572.
146. Pasma E, Moes H, Heineman MJ, Faas M. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:237–243.
147. Thongngarm T, Jenkins JK, Ndebele K, McMurray RW. Estrogen and progesterone modulate monocyte cell cycle progression and apoptosis. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:129–138.
148. Grudbacher FJ. Human X chromosome carries quantitative genes for immunoglobulin M. *Science* 1972;176:311-312.
149. Giltay EJ, Fonk JC, von Blomberg BM, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJ. In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and



- immunoglobulin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1648–1657.
150. Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect*. 1999;107 Suppl 5:681-686.
  151. Rogers A, Eastell R. Effects of estrogen therapy of postmenopausal women on cytokines measured in peripheral blood. *J Bone Miner Res* 1998;13:1577–1586.
  152. Ben Hur H, Mor G, Insler V, Blickstein I, Amir-Zaltsman Y, Sharp A, Globerson A and Kohen F. Menopause is associated with a significant increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes. *Am J Reprod Immunol* 1995;34:363–369.
  153. Giron-Gonzalez JA, Moral FJ, Elvira J, Garcia-Gil D, Guerrero F, Gavilan I, Escobar L. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *Eur J Endocrinol* 2000;143:31–36.
  154. Medina KL, Strasser A, Kincade PW. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood* 2000;95:2059–2067.
  155. Verthelyi DI, Ahmed SA. Estrogen increases the number of plasma cells and enhances their autoantibody production in nonautoimmune C57BL/6 mice. *Cell Immunol* 1998;189:125-134.

156. Weetman AP, McGregor AM, Smith BR, Hall R. Sex hormones enhance immunoglobulin synthesis by human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett* 1981;3:343–346.
157. Rachon D, Mysliwska J, Suchecka-Rachon K, Wieckiewicz J, Mysliwski A. Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Endocrinol* 2002;172:387–395.
158. Loy RA, Loukides JA, Polan ML. Ovarian steroids modulate human monocyte tumor necrosis factor alpha messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *Fertil Steril* 1992;58:733–739.
159. Sulke AN, Jones DB, Wood PJ. Hormonal modulation of human natural killer cell activity in vitro. *J Reprod Immunol* 1985;7:105–110.
160. Suenaga R, Evans MJ, Mitamura K, Rider V, Abdou NI. Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor transcripts similar to those of normal cells. *J Rheumatol* 1998;25:1305–1312.
161. Beato M and Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225–236.
162. Benten WP, Stephan C, Wunderlich F. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids* 2002;67:647–654.
163. Weusten JJ, Blankenstein MA, Gmelig-Meyling FH, Schuurman HJ, Kater L, Thijssen JH. Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;112:409–414.
164. Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Yasui T, Yamano S, Yamada M, Tezuka M, Kasai Y, Deguchi K, Ohmoto Y et al. B cell subsets in

- postmenopausal women and the effect of hormone replacement therapy. *Maturitas* 2001;37:173–179.
165. Ruddy S. Component deficiencies: the second component. *Prog Allergy*. 1986;39:250-266.
166. Davies KA, Peters AM, Beynon HL, Walport MJ. Immune complex processing in patients with systemic lupus erythematosus. In vivo imaging and clearance studies. *J Clin Invest* 1992;90:2075-2083.
167. Ramos-Casals M, Campoamor MT, Chamorro A, Salvador G, Segura S, Botero JC, Yague J, Cervera R, Ingelmo M, Font J. Hypocomplementemia in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: prevalence and clinical significance in 667 patients. *Lupus* 2004;13:777-783.
168. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
169. Scharfstein J, Rerreira A, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. Isolation and characterization. *J Exp Med* 1978;148:207-222.
170. Walport MJ, Davies KA, Botto M, Naughton MA, Isenberg DA, Biasi D, Powell RJ, Cheung NT, Struthers GR. C3 nephritic factor and SLE: report of four cases and review of the literature. *QJM* 1994;87:609-615.
171. Fujita T, Sumita T, Yoshida S, Ito S, Tamura N. C4 nephritic factor in a patient with chronic glomerulonephritis. *J Clin Lab Immunol*. 1987;22:65-70.
172. Yukiya Y, Tokunaga K, Takeuchi F. Genetic polymorphism of complement in patients with systemic lupus erythematosus II. The fourth (C4) and the seventh (C7) components of complement. *Jpn J Rheumatol* 1988;1:271-1276.

173. Halma C, Daha MR, Camps JA, Evers-Schouten JH, Pauwels EK, Van E. Deficiency of complement component C3 is associated with accelerated removal of soluble <sup>125</sup>I-labelled aggregates of IgG from the circulation. *Clin Exp Immunol* 1992;90:394-400.
174. Gluud C, Tage Jensen U, Bahnesen M, Dietrichson O, Svejgaard A. Autoantibodies, histocompatibility antigens and testosterone in males with alcoholic cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1981;44:31-38.
175. Folomeev MI, Dougados M, Beune J i sur. Plasma sex hormones and aromatase activity in tissues of patients with SLE. *Lupus* 1992;1:191-195.
176. Shoenfeld Y. Induction of experimental primary and secondary antiphospholipid syndrome in naive mice. *Am J Reprod Immunol* 1992;28: 219-221.
177. Shinzato MM, Bueno C, Trindade Viana VS, Borba EF, Goncalves CR, Bonfa E. Complement-fixing activity of cardiolipin antibodies in patients with or without thrombosis. *Lupus* 2005;14:953-958.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20.02.1953 u Splitu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala sam na medicinskom fakultetu u Beogradu 1978., obavezni liječnički staž obavila sam u KB Split. Stručni ispit sam položila sam 1979., zatim sam radila kao liječnik opće medicine u Splitu. Specijalizaciju iz Interne medicine započela sam 1983. u KB Split, te nastavila u KBC «Rebro», gdje sam 1987. položila specijalistički ispit.

Poslije diplomski studij iz Kliničke imunologije i alergologije pohađala sam u Zagrebu 1986./1987. Tijekom 1990. pod nadzorom prof.Y. Shoenfelda i M. Blank u Tel Avivu obavila sam edukaciju iz područja bazične i kliničke imunologije

Magistarski rad na temu «Utjecaj estrogena na imuni odgovor u muškaraca s cirozom jetre etilične etiologije» obranila sam pri medicinskom fakultetu u Zagrebu 1994.

Nakon položenog specijalističkog ispita radim na Odsjeku za reumatologiju, Interne klinike KB Split, sudjelujem u edukaciji studenata i specijalizanata. Aktivni sam član evropske udruge za sistemska sklerozu (EUSTAR), kao i član upravnog odbora HLZ-a u Splitu. Objavila sam 42 publikacije od čega 5 u Current Contentsu.