

EWA PILARSKA*, MAŁGORZATA LEMKA*, ALICJA BĄKOWSKA**

PRZECIWCIAŁA ANTYFOSFOLIPIDOWE ORAZ TROMBOMODULINA U DZIECI Z UDAREM NIEDOKRWIENNYM MÓZGU

ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES AND THROMBOMODULIN IN CHILDREN WITH ISCHEMIC STROKE

*Klinika Neurologii Rozwojowej Katedry Neurologii AM w Gdańsku

kierownik: dr hab. Walenty Nyka

**Zakład Immunopatologii AM w Gdańsku

kierownik: prof. dr Jan Stępiński

Celem pracy była próba analizy udziału przeciwciał antykardiolipinowych oraz trombomoduliny w patogenezie udarów niedokrwiennych mózgu u dzieci hospitalizowanych w Klinice Neurologii Rozwojowej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1997–2003. Badaniem objęto 30 dzieci w wieku od 4 do 15 lat po przebytych udarach niedokrwiennych, u których nie ustalono etiologii udaru oraz 30 zdrowych dzieci w tym samym wieku. Przeprowadzone badania wykazały, że w grupie z udarem średnie stężenia aCL oraz Thm były istotnie wyższe niż u dzieci w grupie kontrolnej, nie przekraczały jednak norm. Pozytywne wartości w klasie G immunoglobulin stwierdzono u 12 (40%) oraz u 11 (36%) w klasie IgM. Dodatkowo wartości Thm stwierdzono u 11 dzieci (36%). W grupie kontrolnej u żadnego z badanych dzieci nie obserwowano pozytywnych wartości aCl oraz Thm.

Pomimo tego że ostre choroby naczyniowe mózgu występują u dzieci znacznie rzadziej niż u ludzi dorosłych, ze względu na poważne następstwa, takie jak: zaburzenia ruchowe, obniżenie funkcji intelektualnych i padaczka stanowią jednak istotny problem diagnostyczny i terapeutyczny.

U dorosłych najczęstszymi czynnikami wystąpienia udarów niedokrwiennych są: nadciśnienie, cukrzyca i choroby serca. U dzieci są to choroby serca (wrodzone i nabyte wady serca, zaburzenia rytmu), infekcje, zaburzenia metaboliczne, hematologiczne, przyczyny genetyczne. Często znajduje się kilka czynników ryzyka u jednego pacjenta [3, 8].

Częstość występowania ostrych chorób naczyniowych mózgu u dzieci wynosi od 2,52 do 13,02 na 100.000 populacji dziecięcej w ciągu roku [14, 16].

Pomimo wykonywania wielu nowych badań (badania neuroobrazowe, genetyczne, metaboliczne), etiologia udaru u dzieci pozostaje nieustalona w około 30–50% zachorowań [12].

Obecnie coraz częściej zwraca się uwagę na nowy czynnik warunkujący wystąpienie udaru u osób młodych, a także u dzieci, jakim są przeciwciała antyfosfolipidowe. Najlepiej poznаныmi i najczęściej oznaczanymi przeciwciałami antyfosfolipidowymi (aPL) są antykoagulant tocznia (LA) i przeciwciała antykardiolipinowe (aCL) [6].

W piśmiennictwie opisywano występowanie przeciwciał antyfosfolipidowych w różnych schorzeniach, głównie w chorobach autoimmunologicznych [13]. W chorobach neurologicznych stwierdzono aPL w miastenii, w stwardnieniu rozsianym, zespole Guillain Barré, płasawicy, migrenie [6]. Pojawiły się doniesienia dotyczące występowania aPL w padaczkę [2]. Najczęściej jednak obserwuje się obecność aPL w chorobach niedokrwiennych mózgu.

W nielicznych ośrodkach badawczych obserwowano wzrost stężenia rozpuszczalnej trombotomoduliny w udarze mózgu, uznanego wskaźnika uszkodzenia naczyń oraz stanu prozakrzepowego [5].

Trombotomodulina (Thm) – białko błon komórkowych śródbłonna naczyniowego, jest receptorem dla trombiny oraz aktywuje białka C i S [5]. Związek pomiędzy poziomem trombotomoduliny w surowicy krwi a udarem niedokrwiennym mózgu nie jest wyjaśniony [5].

Wobec braku opracowań dotyczących tych zagadnień u dzieci, a także odmiennych wyników, podjęto własne badania. Celem ich była próba analizy udziału przeciwciał antykardiolipinowych oraz trombotomoduliny w patogenezie udarów niedokrwiennych mózgu u dzieci.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 60 dzieci, w tym 30 (14 dziewczynek i 16 chłopców) w wieku od 4. do 15. roku życia (średnia $10,7 \pm 4,3$ lat) hospitalizowanych w Klinice Neurologii Rozwojowej Katedry Neurologii Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1997–2003 po przebytych udarach niedokrwiennym mózgu, u których nie ustalono etiologii udaru oraz 30 (14 dziewczynek i 16 chłopców) zdrowych dzieci w wieku od 4 do 15 lat (średnia $11,5 \pm 3,5$ lat), bez chorób autoimmunologicznych.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Gdańsku. Rodzice dzieci zostali dokładnie poinformowani odnośnie prowadzonych badań i wyrazili zgodę na udział dzieci w badaniach.

Rozpoznanie udaru niedokrwiennego mózgu ustalono na podstawie wywiadu, objawów klinicznych i badań neuroobrazowych (tomografii komputerowej – TK, rezonansu magnetycznego – MRI i/lub rezonansu magnetycznego z programem naczyniowym – AMRI oraz angiografii naczyń mózgowych – AEG), a także badania dopplerowskiego tętnic zewnątrzczaszkowych i wewnątrzczaszkowych – TCD. U dzieci tych wykluczono choroby serca (EKG, ECHO serca tradycyjne i/lub w koniecznych przypadkach przezprzetykowe), choroby tkanki łącznej (brak objawów klinicznych, negatywny wywiad rodzinny, ujemne przeciwciała przeciwjądrowe, prawidłowe stężenie składowych komplementu C3 i C4) oraz zmiany przepływu w naczyniach wewnątrzczaszkowych (met. TCD). U wszystkich przeprowadzono podstawowe badania biochemiczne w Zakładzie Biochemii Klinicznej Akademii Medycznej w Gdańsku, obejmujące również oznaczenie lipidogramu, stężenia fibrynogenu, antytrombiny III oraz białek C i S. Badania te nie pozwoliły na pewne ustalenie etiologii udaru w grupie badanych dzieci.

Badania katamnesticzne u dzieci po przebytych udarach niedokrwiennym mózgu przeprowadzono w okresie od 6 miesięcy do 6 lat od ostrego okresu choroby.

Krew do badania pobierano w godzinach rannych, na czczo. Oznaczano stężenie przeciwciał antykardiolipinowych (aCL) w klasie A, M, G immunoglobulin oraz trombomoduliny. Badania wykonano w Zakładzie Immunopatologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Oznaczeń dokonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy zastosowaniu testów komercyjnych (Verelisa/Pharmacia & Upjohn – aCL; Diagnostoca Stago – Thm), stosując się ściśle do zaleceń producentów. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono dwukrotnie, uzyskując wskaźniki zmienności < 10% (CV: aCL IgA – 5%, aCL IgM – 6%, aCL IgG – 4%, Thm – 4%).

Wartości aCL przyjęto jako negatywne dla IgA < 10 U/ml, IgM < 6 U/ml, IgG < 12 U/ml. Jako pozytywne przyjęto wartości: IgA > 10 U/ml, IgM > 6 U/ml, IgG > 12 U/ml.

Dla Thm przyjęto wartości negatywne < 30 ng/ml, a pozytywne > 30 ng/ml.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programu STATISTICA 6.0. Opisu statystycznego zmiennych ilościowych dokonano z użyciem średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. W celu zastosowania odpowiednich statystyk sprawdzono normalność rozkładu zmiennych za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Porównania średnich poziomów stężeń aCL i Thm u pacjentów z udarem i grupą kontrolną dokonano za pomocą testu dla dwóch niezależnych próbek U Manna-Whitneya. Przy weryfikacji wszystkich hipotez przyjęto poziomy istotności $p \leq 0,05$

WYNIKI

Porównano wartości aCL w klasie G,M,A immunoglobulin oraz Thm w obu badanych grupach. W grupie z udarem średnie stężenia aCL oraz Thm były istotnie wyższe niż u dzieci

Tab. I

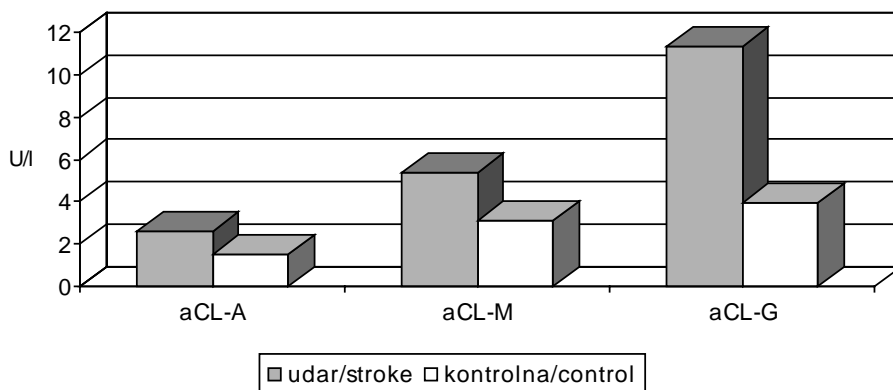
Różnice średnich stężeń aCL, Thm pomiędzy grupą z udarem i kontrolną
Differences of aCL, Thm in children with stroke and control group

Badana grupa Group examined	aCl [U/l]					Thm [ng/ml]			
		Średnia Mean	SD	U	p	Średnia Mean	SD	U	p
udar stroke	IgA	2,64	2,29	2,18 ^a	0,03	39,91	2,81	5,38 ^d	0,000001
	IgM	5,61	3,78	1,58 ^b	0,12				
	IgG	12,29	11,26	1,64 ^c	0,05				
kontrolna control	IgA	1,49	0,75			25,14	2,87		
	IgM	3,20	1,33						
	IgG	3,92	1,85						

- a – porównanie grupy z udarem i kontrolnej w klasie IgA / comparison of the stroke and control group in IgA class
 b – porównanie grupy z udarem i kontrolnej w klasie IgM / comparison of the stroke and control group in IgM class
 c – porównanie grupy z udarem i kontrolnej w klasie IgG / comparison of the stroke and control group in IgG class
 d – porównanie grupy z udarem i kontrolnej Thm / comparison of the stroke and control group in Thm

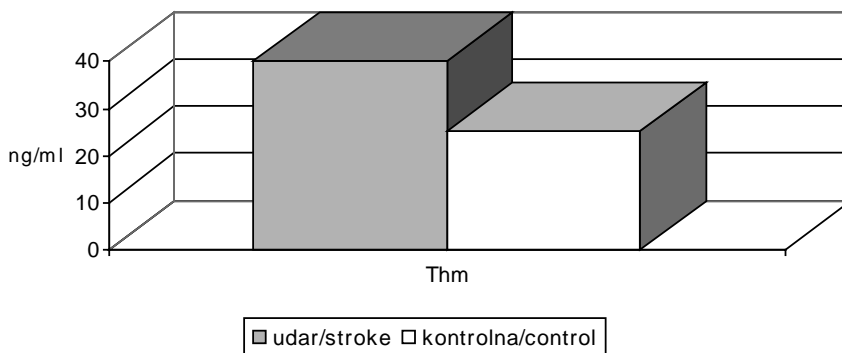
w grupie kontrolnej (aCL-A: 2,64 U/l; 1,49 U/l), (aCL-G: 12,29 U/l; 3,92 U/l), (Thm: 39,92 ng/ml; 25,14 ng/ml) ale nie przekraczały norm (tab. I)

Powyższe wyniki ilustrują ryciny 1, 2.



Ryc. 1. Średnie wartości aCL w udarze i grupie kontrolnej

Fig. 1. Mean values aCL in stroke and control group



Ryc. 2. Średnie wartości Thm w udarze i grupie kontrolnej

Fig. 2. Mean values Thm in stroke and control group

Pozytywne wartości w klasie G immunoglobulin stwierdzono u 12 (40%) oraz u 11 (36%) w klasie IgM. Podobnie u 11 dzieci (36%) z udarem stwierdzono pozytywne wartości Thm.

Natomiast w grupie kontrolnej u żadnego z badanych dzieci nie obserwowano pozytywnych wartości aCl oraz Thm (tab. II)

Tab. II

Częstość pozytywnych wartości aCL i Thm w grupie z udarem i kontrolnej
Frequency of positive values of aCL, Thm in stroke and control group

Badana grupa Group examined	aCL+ n (%)		Thm n (%)
	IgM	IgG	
udar / stroke	11 (36)	12 (40)	11 (36)
kontrolna / control	0	0	0
χ^2	13,37	14,61	13,37
p	0,0003	0,0001	0,0003

DYSKUSJA

W obecnym piśmiennictwie spotyka się doniesienia dotyczące przeciwciał antykardiolipidowych i udarów mózgu głównie u młodych dorosłych [4]. Rola tych przeciwciał w patogenezie udarów niedokrwiennych wydaje się być niepodważalna. W 1991 r. Roddy i Giang po raz pierwszy donieśli o wystąpieniu udaru niedokrwiennego u 8-miesięcznego dziecka z zespołem antyfosfolipidowym i dolichocephalią [13]. W następnych latach pojawiły się kolejne prace. Angelini w grupie 13 badanych dzieci u 10 (76%) stwierdził nieprawidłowości w zakresie przeciwciał antyfosfolipidowych [1]. Obecność aCL w surowicy jako przyczynę udarów niedokrwiennych stwierdzili także w grupie 9 dzieci Schoning i wsp. [15]. Barreirinho i wsp. również potwierdzają w swoich badaniach z 2003 r. rolę aPL jako czynnika ryzyka udaru niedokrwiennego [3]. W naszych badaniach u 12 dzieci (40%) po przebytym udarze niedokrwiennym obserwowano pozytywne wartości aCL w klasie G immunoglobulin oraz u 11 (36%) w klasie M. Natomiast nie notowano pozytywnych wartości u żadnego dziecka w grupie kontrolnej. Wyniki te sugerują, że aCL stanowią ważny czynnik warunkujący wystąpienie udaru niedokrwiennego.

Prac odnośnie znaczenia trombomoduliny w udarach niedokrwiennych mózgu jest niewiele i w większości dotyczą osób dorosłych. Nomuro i wsp w swoich pracach zwracają uwagę na związek stężenia Thm w zależności od czasu wykonania badania w stosunku do ostrego zachorowania [10]. Obserwowali oni niższe stężenie Thm na początku zachorowania. Nie ustalono związku pomiędzy poziomem Thm a przebiegiem lub etiologią udaru. Badania Olivot i wsp. prowadzone w 2004 roku w dużej grupie chorych sugerują, że Thm może być czynnikiem chroniącym przed udarem mózgu u osób nieobciążonych chorobami naczyniowymi [11]. Natomiast Johansson i wsp. nie znajdują związku Thm z wystąpieniem udaru. W naszych badaniach u 11 spośród 30 badanych dzieci (40%) uzyskano pozytywne wyniki stężenia trombomoduliny. Badania te były wykonywane u wszystkich pacjentów kilka miesięcy od ostrego zachorowania. Tylko u 7 dzieci badanie wykonano w ostrej fazie udaru. Uzyskano podobne wyniki. Zbyt mała grupa pacjentów nie pozwala na wyciągnięcie wniosków. Wyniki nasze wskazują, że potrzebne są dalsze badania, aby wyjaśnić mechanizmy wpływające na zmiany stężenia Thm w zależności od etiologii oraz czasu trwania choroby.

WNIOSKI

1. U 11 dzieci z udarem niedokrwiennym mózgu (36%) stwierdzono pozytywne wartości aCL.
2. Pozytywne wartości Thm zanotowano u 11 (36%) dzieci.
3. W grupie kontrolnej u żadnego z badanych nie obserwowano pozytywnych wartości aCL oraz Thm.

Praca została sfinansowana z grantu KBN nr 4 PO5E 150 18.

PIŚMIENNICTWO

1. Angelini L., Ravelli A., Caporali R., Rumi V., Nardocci N., Martini A.: High prevalence of antiphospholipid antibodies in children with idiopathic cerebral ischemia. *Pediatrics* 1994, 94, 4, 500.
- 2. Angelini L., Granata T., Zibordi F., Binelli S., Zarzi G., Besana C.: Partial seizures associated with antiphospholipid antibodies in childhood. *Neuropediatrics* 1998, 29, 5, 249.
- 3. Barreirinho S., Ferro A., Santos M., Costa E., Pinto-Basto J., Sousa.: Inherited and acquired risk factors and their combined effects in pediatric stroke. *Pediatr Neurol* 2003, 28, 2, 134.
- 4. Blohorn A., Guegan-Massardier E., Triqueton A., Onnient Y., Tron F., Botg J.Y., Mihout B.: Antiphospholipid antibodies in the acute phase of cerebral ischaemia in young adults: a descriptive study of 139 patients. *Cerebrovasc. Dis.* 2002, 13, 3, 156.
- 5. Boehme MW., Raeth U., Galle P.R., Stremmel W., Scherbaum W.A.: Serum thrombomodulin- a reliable marker of disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE): advantage over established serological parameters to indicate disease activity. *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 119, 1, 189.
- 6. Chamley L.W.: Antiphospholipid antibodies: biological basis and prospects for treatment. *J.Reprod. Immunol.* 2002, 57, 1, 185.
- 7. Kenet G., Sadetzki S., Murad H., Martinowitz U., Rosenberg B., Gitel S.: Factor V Leiden and antiphospholipid antibodies are significant risk factors for ischemic stroke in children. *Stroke* 2000, 31, 6, 1283.
- 8. Kirkham F.J., Prengler M., Hewes D.K., Ganesan V.: Risk factors for arterial ischemic stroke in children. *J. Child Neurol.* 2000, 15, 5, 299.
- 9. Johansson L., Jansson J.H., Boman K., Nilsson T.K., Stegmayr B., Hallmans G.: Prospective study on soluble thrombomodulin and von Willebrand factor and the risk of ischemic and hemorrhagic stroke. *Thromb. Haemost.* 2002, 87, 2, 211.
- 10. Nomura E., Kohriyama T., Kozuka K., Kajikawa H., Nakamura S., Matsumoto M.: Significance of serum soluble thrombomodulin level in acute cerebral infarction. *Eur. J. Neurol.* 2004, 11, 5, 329.
11. Olivot J.M., Labreuche J., Aiach M., Amarenco P.: Soluble thrombomodulin and brain infarction. *Stroke* 2004, 35, 8, 1946.
- 12. Olson J.C., Konkol R.J., Gill J.C., Dobyns W.B., Conll B.M.: Childhood stroke and lupus anticoagulant. *Pediatr. Neurol.* 1994, 10, 1, 54.
- 13. Roddy S.M., Giang D.W.: Antiphospholipid antibodies and stroke in an infant. *Pediatrics* 1991, 87, 6, 933.
- 14. Schoenberg B.S., Mellinger J.F., Schoenberg D.G.: Cerebrovascular disease in infants and children: a study of incidence, clinical features, and survival. *Neurology* 1978, 28, 8, 763.
- 15. Schoning M., Klein R., Krageloh-Mann I., Falck M., Bien S., Berg P.A., Michaelis R.: Antiphospholipid antibodies in cerebrovascular ischemia and stroke in childhood. *Neuropediatrics* 1994, 25, 1, 8.
- 16. de Veber G., Andrew J.: Canadian Paediatric Ischemic Stroke Registry: analysis of children with arterial ischemic stroke. *Ann. Neurol.* 2000, 48, 526.

E. Pilarska, M. Lemka, A. Bąkowska

ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES AND THROMBOMODULIN
IN CHILDREN WITH ISCHEMIC STROKE

Summary

In this study an analysis of the contribution of antiphospholipid antibodies (aPL) and thrombomodulin (Thm) in pathogenesis of strokes in children was evaluated.

Sixty children were included in the study: 30 children (14 girls and 16 boys, mean age: 10.7 ± 4.3 years) after ischemic stroke of unknown etiology and 30 healthy children (14 girls and 16 boys, mean age: 11.5 ± 3.5 years).

The statistical analysis showed the increased values of anticardiolipin antibodies (aCL) and thrombomodulin (Thm) in children with stroke than in control group. The obtained values were higher, but state at normal level.

Our results higher mean values of aCL and Thm in children with stroke in comparison with the control group- which suggests that aCL and Thm may be important factors in the occurrence ischemic stroke in children still. Further studies are needed.

Adres: dr Ewa Pilarska

Klinika Neurologii Rozwojowej AMG

ul. Dębinki 7, 80-952 Gdańsk

e-mail: pilar@amg.gda.pl

tel. 58-349-23-90, fax 58-349-23-95