

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA ŽIGON, univ. dipl. mikrobiol.

**ZNAČILNOSTI VEZAVE ANTIPROTROMBINSKIH  
PROTITELES *IN VITRO* TER *IN VIVO***

**CHARACTERISTICS OF ANTIPROTHROMBIN ANTIBODY  
BINDING *IN VITRO* AND *IN VIVO***

MAGISTRSKO DELO  
Univerzitetni podiplomski študijski program Biomedicina  
Klinična biokemija

Ljubljana, 2008

Magistrsko delo, ki predstavlja zaključek podiplomskega študija Biomedicine na Univerzi v Ljubljani smer Klinična biokemija sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, Kliničnega oddelka za revmatologijo, SPS Interne klinike Kliničnega centra pod mentorstvom izr.prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. Vezavo na celice sem merila s pretočnim citometrom v laboratoriju prof. dr. Takao Koike, dr. med., Department of Medicine II, Hokkaido University School of Medicine v Sapporu na Japonskem.

## **Zahvale**

Najlepše se zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Borutu Božiču, mag.farm. za nesebično posredovanje svojega znanja in izkušenj, za vsakokratno nemudno pomoč, za vodenje in strokovne nasvete.

Zelo sem hvaležna prof. dr. Takao Koike, dr. med. iz Sappora na Japonskem, ki me je vključil v svojo raziskovalno skupino, kjer sem pridobila ogromno strokovnega, pa tudi osebnega znanja.

Rada bi se zahvalila vodji laboratorija za imunologijo revmatizma dr. Tanji Kveder dipl. ing. kem. in tudi vsem sodelavcem s katerimi preživljam dneve v laboratoriju in so mi pri mojem raziskovalnem delu veliko pomagali.

Za pozorno branje magistrske naloge, tehtne pripombe in nasvete se zahvaljujem obema članoma komisije za oceno magistrske naloge prof. dr. Janku Kosu, univ. dipl. kem. in prof. dr. Jani Lukač Bajalo, univ. dipl. kem.

Iskreno se zahvaljujem svojim staršema za podporo, neizmerno spodbudo in veselje, ki mi jih nesebično podarjata celo življenje. Hvala Janiju in najini Neži za vse in še mnogo več.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag.farm.

Polona Žigon, univ.dipl.mikrobiol.

## **Komisija za oceno in zagovor:**

Mentor: izr. prof. dr. Borut Božič,

Predsednik komisije za zagovor magistrske naloge: prof. dr. Janko Kos

Član komisije za zagovor magistrske naloge: prof.dr. Jana Lukač Bajalo

Ljubljana, december 2008

## VSEBINA

VSEBINA.....	2
POVZETEK.....	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM OKRAJŠAV.....	6
<b>1 UVOD.....</b>	<b>7</b>
1.1 REAKCIJE MED PROTITELESI IN ANTIGENI.....	7
1.1.1 Afiniteta in avidnost.....	7
1.1.2 Merjenje afinitete in avidnosti.....	8
1.2 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM IN ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA.....	8
1.2.1 Lupusni antikoagulantni.....	10
1.2.2 Antikardiolipinska protitelesa.....	10
1.2.3 $\beta_2$ GPI in protitelesa proti $\beta_2$ GPI.....	10
1.3 PROTROMBIN.....	11
1.3.1 Molekulska struktura.....	11
1.3.2 Genska organizacija.....	11
1.3.3 Fiziološka vloga.....	11
1.4 PROTITELESA PROTI PROTROMBINU.....	13
1.4.1 Antikoagulantne in prokoagulantne lastnosti.....	13
1.4.2 Metode za določanje.....	13
1.4.3 Hematološke lastnosti.....	14
1.4.4 Imunološke lastnosti.....	15
1.4.5 Kliničen pomen.....	15
1.4.6 Patogena vloga protiteles proti protrombinu.....	17
1.5 VEZAVA ANTIFOSFOLIPIDNIH PROTITELES NA CELIČNE LINIJE.....	18
1.6 ORODJA ZA ŠTUDIJE INTERAKCIJ MED ANTIGENI IN PROTITELESI.....	19
1.6.1 ELISA.....	19
1.6.2 Afinitetna kromatografija.....	20
1.6.3 Pretočna citometrija.....	20
<b>2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA.....</b>	<b>21</b>
<b>3 MATERIALI IN OPREMA.....</b>	<b>22</b>
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL.....	22
3.1.1 Humani serumi.....	22
3.1.2 Interni standardi.....	22
3.1.3 Monoklonska protitelesa.....	23
3.1.4 Kontrolni mišji IgG imunoglobulini.....	23
3.1.5 Celične linije.....	24
3.2 REAGENTI.....	24
3.3 PUFRI IN RAZTOPINE.....	25
3.3.1 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim G proteinom.....	25
3.3.2 Pufri za pripravo kolone z vezanim protrombinom.....	26
3.3.3 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom.....	26
3.3.4 Pufri za ELISA.....	26
3.4 APARATURE IN PRIBOR.....	27
<b>4 METODE DELA.....</b>	<b>29</b>
4.1 DOLOČANJE ANITOFOSFOLIPIDNIH PROTITELES.....	29
4.1.1 ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT ELISA).....	29
4.1.2 ELISA za določanje protiteles proti protrombinu (aPT-A ELISA).....	30
4.1.3 ELISA za določanje protiteles proti kardiolipinu s standardno metodo (aCL ELISA).....	30

4.1.4	ELISA za določanje protiteles proti $\beta_2$ -GPI ( <i>anti-<math>\beta_2</math>-GPI ELISA</i> ).....	31
4.1.5	Kaotropna ELISA za določanje avidnosti protiteles proti protrombinu.....	31
4.2	IZDELAVA KOLONE Z VEZANIM PROTROMBINOM .....	31
4.3	AFINITETNA KROMATOGRAFIJA .....	32
4.3.1	Izolacija IgG protiteles na koloni z vezanim proteinom G .....	32
4.3.2	Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom .....	32
4.4	IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA .....	33
4.4.1	Razsoljevanje vzorcev z razsoljevalno kolono .....	33
4.5	GOJENJE CELIČNIH LINIJ .....	34
4.5.1	Precepljanje celičnih linij.....	34
4.5.2	Štetje celic.....	34
4.5.3	Izvedba poskusa.....	34
4.6	PRETOČNA CITOMETRIJA.....	35
4.7	TERMINOLOGIJA.....	35
4.8	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	35
4.9	OBDELAVA REZULTATOV APS/PT ELISA.....	35
<b>5</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
5.1	DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU <i>IN VITRO</i> .....	36
5.1.1	Kvalitativna primerjava dveh izvedb aPS/PT ELISA.....	36
5.1.2	Kvantitativna primerjava dveh izvedb aPS/PT ELISA.....	37
5.1.3	Opredelelitev praznih vrednosti pri aPS/PT ELISA in aPT-A ELISA .....	37
5.1.4	Primerjava aPS/PT ELISA z aPT-A ELISA .....	38
5.1.5	Primerjava aPS/PT, aCL in anti- $\beta_2$ GPI ELISA .....	39
5.1.6	Prevalenca aPS/PT.....	40
5.1.7	Klinični pomen aPS/PT v primerjavi z aCL in anti- $\beta_2$ GPI .....	42
5.1.8	Avidnost protiteles proti protrombinu .....	43
5.2	VEZAVA PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO CELIC.....	44
5.2.1	Vpliv lipopolisaharida .....	45
5.2.2	Vpliv kalcijevih ionov .....	47
5.2.3	Vpliv časa inkubacije celic s protrombinom in protitelesi.....	47
5.2.4	Vpliv koncentracije protrombina in protiteles.....	48
5.2.5	Pomen hkratne prisotnosti protrombina in protiteles.....	49
5.2.6	Vezava protiteles na površine različnih celičnih linij.....	49
5.2.7	Vezava poliklonskih protiteles .....	50
<b>6</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>52</b>
6.1	DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU <i>IN VITRO</i> .....	52
6.1.1	Različne izvedbe aPS/PT ELISA.....	52
6.1.2	Pražne vrednosti aPS/PT ELISA in aPT-A ELISA.....	53
6.1.3	Primerjava aPS/PT ELISA z aPT-A ELISA .....	54
6.1.4	Primerjava modificirane aPS/PT ELISA z aCL in anti- $\beta_2$ GPI ELISA .....	55
6.1.5	Klinični pomen aPS/PT .....	56
6.1.6	Avidnost protiteles proti protrombinu .....	58
6.1.7	Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom.....	59
6.2	VEZAVA PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA MEMBRANE CELIC <i>IN VIVO</i> .....	60
6.2.1	Iskanje optimalnih pogojev vezave protiteles proti protrombinu na viabilne monocite .....	61
6.2.2	Primerjava vezave monoklonskih protiteles proti protrombinu na različnih celičnih linijah..	64
6.2.3	Vezava poliklonskih protiteles .....	65
<b>7</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>68</b>

## POVZETEK

Veliko je znanega o značilnostih protiteles proti protrombinu (aPT) *in vitro*, vendar pa je njihova vloga *in vivo* še nejasna. Številne variacije, tako hišnih, kot komercialno dostopnih, encimsko imunskih testov (ELISA) za določanje aPT, so bile opisane v literaturi, vendar do danes še ni bilo nobene študije, ki bi poskusila standardizirati in poenotiti te metode. Prevladata dva načina; z eno izvedbo se določajo protitelesa proti samemu protrombinu (aPT-A), z drugo pa od fosfatidilserina odvisna aPT (aPS/PT). Mnogo avtorjev ugotavlja, da so aPS/PT močnejše povezana s trombozami v primerjavi z aPT-A.

Namen naše raziskave je bil ovrednotiti vezavo protrombina in aPT na fosfolipidne površine v *in vitro* ter *in vivo* modelih. V prvem delu smo analitsko in klinično ovrednotili našo modificirano izvedbo aPS/PT ELISA, kateri smo, zaradi hkratne prisotnosti protiteles in antigena v reakcijski mešanici, izboljšali analitsko občutljivost. Rezultate smo primerjali s standardnima, v literaturi že opisanima, izvedbama aPS/PT in aPT-A ELISA in tako ovrednotili značilnosti aPT *in vitro*. Ugotovili smo, da z našo modificirano aPS/PT ELISA določamo klinično pomembne subpopulacije aPT in opozorili, da bi ta metoda morebiti lahko nadomestila ločeno testiranje aPT-A in aPS/PT s standardnimi metodami. Zato v nasprotju z našimi začetnimi pričakovanji in prej objavljenimi hipotezami negiramo obstoj dveh različnih populacij aPT. Dokazali smo visoko stopnjo povezanosti aPS/PT, določenih z našo modificirano metodo s kliničnimi znaki APS. Pri aPS/PT smo med vsemi testiranimi antifosfolipidnimi protitelesi izmerili največje tveganje za razvoj arterijskih tromboz (OR=8,17) v primerjavi z antikardiolipinskimi protitelesi (aCL) (OR=4,94) ali protitelesi proti  $\beta_2$  glikoproteinu I (anti- $\beta_2$ GPI) (OR=3,57), kar pa predstavlja osnovo za študij morebitnih vzročnih povezav. V prihodnje bo smiselno opozarjati o vključitvi aPS/PT, poleg že uveljavljenih aCL in anti- $\beta_2$ GPI, v laboratorijske kriterije za postavitve diagnoze APS.

Za znane patogene učinke antifosfolipidnih protiteles v organizmu je nujna njihova vezava na membrane celice. Nekateri znanstveniki razlagajo, da vezava antifosfolipidnih protiteles na endotelijske celice sproži celično aktivacijo in vzpostavitev protrombotičnega stanja, kar posledično prispeva k hiperkoagulabilnosti, značilni za APS. V drugem delu magistrske naloge smo preučevali *in vivo* vezavo aPT na membrano različnih celičnih linij s pretočnim citometrom. Celice smo, pod fiziološkimi pogoji, inkubirali s protrombinom in protitelesi in optimizirali pogoje za njihovo vezavo na površino celic. Dokazali smo, da se aPT vežejo tudi na viabilne celice in ne le na apoptotične celice, kot je bilo do sedaj opisano v literaturi. Nekatere značilnosti aPT, ugotovljene *in vitro*, smo potrdili tudi *in vivo*. aPT potrebujejo hkratno prisotnost protrombina za vezavo na celične membrane in najverjetneje preprečijo njegovo disociacijo s površine celic, kot tudi iz drugih fosfolipidnih površin. Nasprotno z *in vitro* dognanji, pa smo *in vivo* opazili razliko v vezavi med aPS/PT in aPT-A, saj so se prva na vse proučevane celične linije vezala močnejše. Vezava aPT je bila najintenzivnejša na membrane prokoagulantne celične linije, medtem ko je na bila na ne-prokoagulantnih celičnih linijah znatno nižja.

Patofiziološki mehanizmi aPT so predmet številnih študij in vedno več je dokazov, da imajo pomembno vlogo v hiperkoagulabilnem stanju, značilnem za APS. Tudi z našimi rezultati smo potrdili pomembno pogostejšo prisotnost aPT pri bolnikih z APS. Poleg tega pa smo s poskusi *in vivo* dokazali, da se aPT vežejo na površine celic in s tem podkrepili nekatere hipoteze o patofiziologiji aPT, saj se patologija antifosfolipidnih protiteles v veliki meri povezuje z njihovo potencialno reaktivnostjo s celičnimi membranami.

## ABSTRACT

Much is known about characteristics of antiprothrombin antibodies (aPT) *in vitro*, while their role *in vivo* is still very unclear. Several different in house and commercial enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of aPT has been described, but so far the lack of appropriate standardization is their main weakness. Two different approaches are most common; one assay detects antibodies against prothrombin alone (aPT-A) while in the other phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies (aPS/PT) are detected. According to many authors aPS/PT more strongly correlate with thrombosis comparable to aPT-A.

The purpose of our research was to evaluate *in vitro* and *in vivo* binding of prothrombin and aPT on the phospholipids surfaces. In the first part of our study we have analytically and clinically evaluated our modified aPS/PT ELISA, whose analytical sensitivity was improved due to simultaneous presence of prothrombin and antibodies. In order to evaluate characteristics of aPT *in vitro* the results from our assay were compared with the results measured with standard previously described aPS/PT and aPT-A protocols. With our modified assay we have detected clinically important subpopulations of aPT and therefore notified that it might be a possible substitute for both aPS/PT and aPT-A standard methods. Opposite to our expectations and to previously published hypothesis we therefore could not confirm the existence of two different populations of aPT. aPS/PT measured with our modified assay proved to be highly correlated with clinical manifestations of APS. Among all tested antiphospholipid antibodies aPS/PT presented the highest risk factor for arterial thrombosis (OR=8,17) compared to anticardiolipin (aCL) (OR=4,94) and anti- $\beta_2$  glycoprotein I (anti- $\beta_2$ GPI) (OR=3,57) antibodies, which is fundamental for causality studies. In future, it would be rational to consider the inclusion of aPT in the APS laboratory classification criteria beside already included aCL and anti- $\beta_2$ GPI.

For all known pathogenic effects of antiphospholipid antibodies their binding to the cell membrane is necessary. Some scientists suggest that binding of antiphospholipid antibodies to the surface of endothelial cells triggers cell activation and induction of prothrombotic state, which contributes to hypercoagulability, the main characteristics of APS. In the second part of our study we have investigated *in vivo* binding of aPT to the surface of different cell lines with flow cytometry. Cells were incubated with prothrombin and aPT under physiological conditions and optimal terms for binding were investigated. We have proved that aPT bind not only to apoptotic, as published so far, but also to the surface of viable cells. Some characteristics determined *in vitro* tests were confirmed also *in vivo* models. aPT require the co-existence prothrombin to bind to the cell membrane and they most probably prevent its dissociation from the cell surface as well as from other phospholipid surfaces. *In vivo* we have, inconsistent to *in vitro* findings, detected difference in binding between aPS/PT and aPT-A since monoclonal aPS/PT were more potent to bind to the membrane of all investigated cell lines. aPT bound strongly to the surface of procoagulant cells whereas the binding to non procoagulant cells was weaker.

The pathophysiologic mechanisms of aPT are subject of many studies and there is increasing evidence that they play a role in the hypercoagulable state of APS. With our results we have confirmed the statistically important elevated levels of aPT in patients with APS. Furthermore our *in vivo* experiments showed that aPT bind to the cell surface which proves some hypothesis about pathogenic role of aPT including their potential reactivity with the cell membranes.

## SEZNAM OKRAJŠAV

$\beta_2$ GPI	$\beta_2$ glikoprotein I
anti- $\beta_2$ GPI	protitelesa proti $\beta_2$ GPI
anti- $\beta_2$ GPI ELISA	ELISA za določanje protiteles proti $\beta_2$ GPI
aCL	antikardiolipinska protitelesa <sup>1</sup> ( <i>anticardiolipin antibody</i> )
aCL ELISA	ELISA za določanje protiteles proti kardiolipinu
aPS	antifosfatidilserinska protitelesa
APS	antifosfolipidni sindrom <sup>1</sup> ( <i>antiphospholipid syndrom</i> )
aPT	antiprotrombinska protitelesa
aPT-A	antiprotrombinska protitelesa, usmerjena proti samemu protrombinu (angl. antiprothrombin antibodies against prothrombin alone)
aPT-A ELISA	ELISA za določanje protiteles proti protrombinu
aPS/PT	od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu
aPS/PT ELISA	ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu
BSA	goveji serumski albumin
CL	kardiolipin
DEA	dietanolaminski pufer
ELISA	encimsko imunsko metoda na trdnem nosilcu (enzyme linked immunosorbent assay)
IgA	imunoglobulini razreda A
IgG	imunoglobulini razreda G
IgM	imunoglobulini razreda M
LA	lupusni antikoagulant <sup>1</sup> ( <i>lupus anticoagulant</i> )
MoAb	monoklonska protitelesa
mIgG	IgG frakcija izolirana iz seruma zdrave miši
pAPS	primarni antifosfolipidni sindrom
sAPS	sekundarni antifosfolipidni sindrom
SLE	sistemski lupus eritematozus ( <i>systemic lupus erythematosus</i> )
TBS	s Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol) pufrana fiziološka raztopina (tris buffered saline)
PBS	pufrana fiziološka raztopina (phosphate buffered saline)
IS	interni standard
LPS	lipopolisaharid

---

<sup>1</sup> Okrajšave dogovorjene na 4. Mednarodnem simpoziju o antifosfolipidnih protitelesih (Sirmione, Italija, april 1990)

## 1 UVOD

### 1.1 REAKCIJE MED PROTITELESI IN ANTIGENI

Vezanje protitelesa (Ab) z antigenom (Ag) je osnova imunske reakcije. Protitelo ima dve enaki vezišči - paratopa, ki se povežeta z epitopom na antigenu. Reakcija med antigenom in protitelesom je bimolekulsko vezanje, ki ne vodi do kemične spremembe ne antigena ne protiteles. Pri imunski reakciji gre za nekovalentne interakcije med antigensko determinanto in variabilno regijo ( $V_H / V_L$ ) protitelesne molekule: vodikove vezi, elektrostatske interakcije, Van der Waalsove ter hidrofobne interakcije. Te vezi so šibke, vendar veliko število interakcij pomeni veliko skupno energijo vezave (1). Protitelesa so epitopsko specifična, ne pa tudi antigensko, saj se lahko ista površina molekule pojavlja kot del različnih molekul. Specifičnost povezave med epitopom in paratopom je odvisna od vsote energij medsebojne privlačnosti, medsebojne odbojnosti in njune prilagodljivosti (konformacijskih sprememb). Protitelesa z zelo visoko vezavno energijo za nek epitop se lahko vežejo na podoben epitop z nižjo energijo (2).

#### 1.1.1 Afiniteta in avidnost

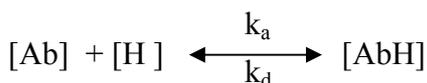
Afiniteta je jakost vezave enega protitelesnega paratopa s pripadajočim epitopom na antigenski molekuli in jo lahko izmerimo samo ob uporabi posamičnega monovalentnega fragmenta Fab. Afinitetno konstanto opišemo s standardnimi termodinamskimi pojmi,

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

pri čemer je  $G^\circ$  standardna prosta entalpija ali prosta standardna Gibbsova energija, R plinska konstanta, T absolutna temperatura in  $\ln K$  naravni logaritem ravnotežne konstante ali konstantne reakcije.

Avidnost je merilo jakosti vezave večvalentnega protitelesa na večvalentni antigen. Izmerjena vezavna energija med protitelesom in njegovim ustreznim antigenom odraža avidnost protitelesa. Slednje ne moremo opisati s termodinamskimi pojmi ampak jo ovrednotimo s kinetičnimi merjenji. Avidnost posameznega protitelesa je odvisna od afinitet posameznih vezišč za vezavo na antigen in je večja od vsote posameznih afinitet. V fizioloških procesih je avidnost pomembnejša od afinitete, ker so naravni antigeni multivalentni (3).

V najbolj preprosti reakciji se majhen enovalenten haptent (H) ali antigen z eno determinanto veže reverzibilno s specifičnim veziščem na protitelesu (Ab). V raztopini kompleksi H-Ab neprestano nastajajo in spontano disociirajo. Po določenem času se dože stanje dinamičnega ravnotežja. Reakcijo lahko zapišemo s masnim zakonom:



kjer je

[Ab] koncentracija prostega protitelesa

[H] koncentracija prostega haptena

[AbH] koncentracija protitelesa in haptena v kompleksu

$k_a$      konstanta asociacije  
 $k_d$      konstanta disociacije

Ravnotežna konstanta ( $K_{eq}$ ), imenovana tudi afinitetna konstanta, predstavlja koncentracijsko razmerje med vezanim in nevezanim monovalentnim protitelesom in haptenom,

$$K_{eq} = k_a / k_d = [AbH] / [Ab] [H]$$

### 1.1.2 Merjenje afinitete in avidnosti

V osnovi ločimo tri pristope merjenja afinitete in avidnosti (4):

1. metode v tekoči fazi: ravnotežna dializa, ultrafiltracija ali ultracentrifugiranje (spektrofotometrična ali encimsko imunska izvedba meritve prostega analita), ravnotežna sedimentacija, označevanje antigena, spektrofluorometrične metode (fluorescentna polarizacija, fluorescentno bledenje, ojačana fluorescenca);
2. metode na trdni fazi: encimsko imunska metoda (standardna nekompetitivna in sendvič izvedba), kaotropna metoda, površinska plazmonska resonanca;
3. kombinacija metode v tekoči in trdni fazi: ravnotežna titracijska metoda

Afinitete in avidnost ter posledično specifičnost protiteles so osnova za meritev klinično pomembnih parametrov in jih moramo pri uvajanju laboratorijske metode upoštevati. V meritvah avtoprotiteles pa ima podatek o afiniteti oziroma avidnosti (npr. avtoprotitelesa proti dvojnovijačni DNK, protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I (2) tudi neposredno klinično uporabnost (5).

## 1.2 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM IN ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA

Antifosfolipidni sindrom (APS) je avtoimunska motnja, prvič opisana leta 1983 (6). Opredeljujeta ga prisotnost vsaj enega kliničnega in enega laboratorijskega kriterija. V skupino kliničnih kriterijev spadajo venske in/ali arterijske tromboze, ponavljajoče se izgube plodu, nevrološke motnje in trombocitopenija. V skupini laboratorijskih kriterijev pa so za postavitev diagnoze APS pomembna tudi trajno povišana in laboratorijsko določena antifosfolipidna protitelesa (7). Mednarodno sprejeti kriteriji natančno določajo pogoje za določitev diagnoze APS (Preglednica 1) (8, 9).

Antifosfolipidna protitelesa so velika in heterogena družina imunoglobulinov razreda G, M in redkeje A. Njihovo poimenovanje združuje protitelesa proti fosfolipidom, kompleksom fosfolipidov s serumskimi proteini in nekaterim serumskim proteinom (10). Kljub svojemu imenu večinoma niso usmerjena proti anionskim fosfolipidom, kot so sprva domnevali, ampak proti številnim proteinom, ki se vežejo na negativno nabite fosfolipide (11). Najpogostejši in najboljše proučevani antigenski tarči teh protiteles sta  $\beta_2$ -glikoprotein I ( $\beta_2$ GPI) (12, 13) in protrombin (14), ki sta oba vključena v proces hemostaze. V zadnjih letih odkrivajo vedno nova protitelesa proti različnim lipidno-proteinskim kompleksom in sestavinam endoteljskih celic, med njimi proti aktiviranemu proteinu C, proteinu S, aneksinu V, fosfolipazi A<sub>2</sub> in številnim drugim, ki jih pogosto zasledimo pod nazivom "antifosfolipidni kofaktorji".

Metode, ki se trenutno uporabljajo za določanje antifosfolipidnih protiteles, lahko delimo v dve kategoriji: encimsko imunski testi, s katerimi določamo protitelesa proti kardiolipinu (aCL), protitelesa proti  $\beta_2$ GPI (anti- $\beta_2$ GPI), in protitelesa proti protrombinu (aPT) ter testi koagulacije, s katerimi določamo lupusne antikoagulate (LA). Po mednarodno sprejetih kriterijih za klasifikacijo APS (8, 9) štejejo za laboratorijski kriterij, v razmaku najmanj 12 tednov določeni, LA, aCL in pred kratkim v kriterij vključen še anti- $\beta_2$ GPI (8). Tudi druga protitelesa so zelo pogosta pri APS, vendar je njihova specifičnost pri APS še vprašljiva, tako še ne predstavljajo samostojnega laboratorijskega kriterija za diagnozo APS (preglednica I). Med slednjimi so tudi aPT, protitelesa proti fosfatidilserinu (aPS) in protitelesa proti fosfatidiletanolaminu (8).

#### **Preglednica 1: Kriteriji za diagnozo APS.**

---

##### Klinični kriteriji

###### Tromboza:

1 potrjena epizoda: venska, arterijska ali malega žilja  
Odsotnost/prisotnost dodatnih faktorjev tveganja za srčno žilne bolezni  
izključitev drugih vzrokov

###### Nosečnost:

Ena/več nepojasnenih smrti morfološko normalnega plodu po 10. tednu  
Ena/več eklampsij/preklampsij pred 34. tednom  
Trije nepojasnjeni spontani splavi pred 10. tednom

##### Laboratorijski kriteriji

LA: prisotni v plazmi dvakrat/večkrat v razmaku >12 tednov

aCL: IgG in/ali IgM prisotni v plazmi ali serumu v srednjem ali visokem titru (>99 percentil), dvakrat/večkrat v razmaku >12 tednov

anti- $\beta_2$ GPI: IgG in/ali IgM prisotni v plazmi ali serumu v srednjem ali visokem titru (>99 percentil), dvakrat/večkrat v razmaku >12 tednov

---

\*LA, lupusni antikoagulant; aCL, protitelesa prot kardiolipinu; anti- $\beta_2$ GPI, protitelesa proti  $\beta_2$ GPI

Antifosfolipidna protitelesa se pojavljajo tudi prehodno, na primer pri nekaterih infekcijskih boleznih (sifilisu, tuberkulozi, gobavosti, hepatitisu A in drugih). V splošnem velja, da njihova prisotnost v plazmi ne predstavlja tveganja za razvoj kliničnih težav, povezanih z APS (predvsem tromboze), zato so opredeljena kot netrombogena protitelesa. Pri infekcijskih boleznih se antifosfolipidna protitelesa vežejo neposredno na fosfolipide (kardiolipin, fosfatidilserin), neodvisno od plazemskega proteina, t.i. kofaktorja. Kofaktor za njihovo vezavo ni potreben, nasprotno z njim celo tekmujejo za vezavno mesto na fosfolipidu (15).

Samo antifosfolipidna protitelesa, ki za vezavo na fosfolipide potrebujejo še kofaktor, naj bi imela patogenično vlogo pri nastanku APS (16). Ta patogenično pomembna antifosfolipidna protitelesa določamo s standardno metodo ELISA, pri kateri pred nanosom preiskovanega vzorca, testne plošče, na katere je nanesen kardiolipin, inkubiramo še z raztopino, ki vsebuje mešanico serumski proteinov. Tako določimo aCL, medtem ko anti- $\beta_2$ GPI, določamo na testnih ploščah z visoko afiniteto vezave, pri katerih je  $\beta_2$ GPI vezan neposredno na površino brez prisotnosti fosfolipidov.

### 1.2.1 Lupusni antikoagulantni

LA so avtoprotitelesa, ki so določena funkcionalno po njihovi sposobnosti podaljševanja časa strjevanja *in vitro*, vendar pa so *in vivo* povezana s trombozami (17, 18). Pravimo, da imajo t.i. lupusno antikoagulantno aktivnost, za katero je značilno podaljšanje časa strjevanja v vsaj enem ali v več, fosfolipidno odvisnih, standardnih testih koagulacije. Ta protitelesa, enako kot aCL, niso usmerjena proti samim fosfolipidom, ampak na proces koagulacije vplivajo preko lipidno vezanega proteina, najpogosteje  $\beta_2$ GPI in/ali protrombina (14). Aktivnost LA se v testih inhibira z dodatkom prebitka fosfolipidov kar omogoči normalno delovanje koagulacijskih faktorjev. LA posegajo v procese koagulacije, ker tekmujejo s koagulacijskimi faktorji za vezavno mesto na fosfolipidih. Pri večini bolnikov je izmerjena LA aktivnost povzročena z anti- $\beta_2$ GPI in/ali aPT, vendar so, čeprav oboji vplivajo na iste kaskadne reakcije, mehanizmi verjetno različni (19). LA veljajo danes za najpomembnejši faktor tveganja za razvoj tromboze ali izgubo plodu (20).

### 1.2.2 Antikardiolipinska protitelesa

V letu 1990 so tri skupine neodvisno poročale, da se aCL ne vežejo na kardiolipin brez prisotnosti serumskih proteinov (povzeto v (21)). Samo poimenovanje je tako zavajajoče, kajti aCL so skupina antigensko nedefiniranih protiteles, ki se vežejo:

1. direktno na CL
2. na različne serumske proteine, vezane na CL

V prvi skupini so od  $\beta_2$ GPI neodvisna aCL, ki za svojo vezavo na CL ne potrebujejo kofaktorja in so značilna so za infekcijska obolenja. Infekcijska aCL ne predstavljajo tveganja za pojav kliničnih znakov, povezanih z APS, predvsem tromboz in so t.i. netrombogene protitelesa. V drugi skupini prevladajo protitelesa proti  $\beta_2$ GPI. To so od  $\beta_2$ GPI odvisna antikardiolipinska protitelesa (aCL/ $\beta_2$ GPI), ki za svojo vezavo na CL potrebujejo prisotnost kofaktorja  $\beta_2$ GPI. Značilna so za avtoimunska obolenja, saj visok titer teh protiteles v plazmi predstavlja tveganje za nastanek tromboemboličnih zapletov.

### 1.2.3 $\beta_2$ GPI in protitelesa proti $\beta_2$ GPI

$\beta_2$ -GPI je glikozilirani plazemski protein z molekulsko maso 50kDa. Ima pet ponavljajočih se predelov, imenovanih konsenzusne ponovitve ali "sushi domene". V petem predelu se nahaja področje, s katerima se  $\beta_2$ GPI veže na anionske fosfolipide (22). Ogljikovi hidrati predstavljajo kar 17% njegove molekulske mase. Sinteza  $\beta_2$ GPI poteka v jetrih, normalna koncentracija v plazmi je približno 200 mg/L. Kar 40%  $\beta_2$ GPI se nahaja v različnih lipoproteinskih frakcijah, zato ga imenujemo tudi apolipoprotein H.

Vezava protiteles proti  $\beta_2$ GPI (anti- $\beta_2$ GPI) z  $\beta_2$ GPI je v tekoči fazi šibka, kar podpira hipotezo, da je epitop na  $\beta_2$ GPI skrit in se izpostavi šele z njegovo konformacijsko spremembo; ali pa se neo-epitop z njo šele oblikuje. *In vivo* se takšne spremembe dogajajo z vezavo  $\beta_2$ GPI na ustrezno negativno nabito površino (na anionske fosfolipide poškodovane celične površine endotelija, aktiviranih trombocitov...).

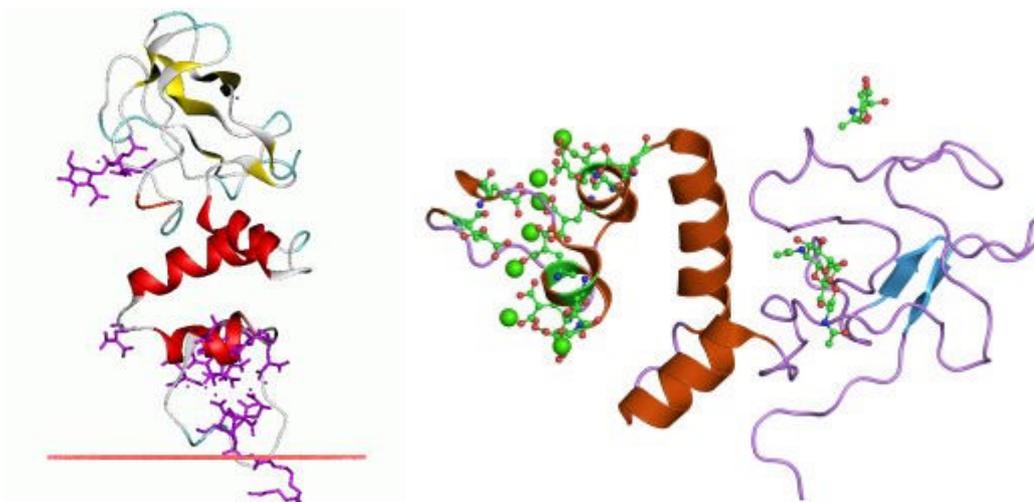
V testih *in vitro*, pride do konformacijske spremembe  $\beta_2$ GPI, po njegovi vezavi na fosfolipid, predhodno nanešen na polistirensko ploščo, ali pa z nanosom  $\beta_2$ GPI na negativno nabito površino, značilno za visoko vezavne plošče (23). Z vezavo  $\beta_2$ GPI na ustrezno površino se poveča njegova površinska gostota in s tem je omogočena dvovalentna povezava anti- $\beta_2$ GPI preko njihovega Fab dela z dvema molekulama  $\beta_2$ GPI (24).

### 1.3 PROTROMBIN

#### 1.3.1 Molekulska struktura

Protrombin je beljakovina z enojno verigo, ki je odvisna od vitamina K. Njegova sinteza poteka v jetrih, znotraj hepatocitov, kjer pride tudi do sekundarne modifikacije proteina. V krvni obtok se sprosti glikoprotein z 579 amino kislinami in molekulsko težo 72.000. Plazemska koncentracija je 1,4  $\mu\text{M}$  (100 mg/L) in  $t_{1/2}$  *in vivo* je 2 - 4 dni.

Sestavljen je iz treh predelov: "kringel" domena, Gla domena (bogata z karboksiglutaminsko kislino) in katalitična domena serinske proteaze (Slika 1). Posttranslacijska modifikacija protrombina poteka na predelu Gla; to je od vitamina K odvisna karboksilacija ostankov glutaminske kisline v  $\gamma$ -karboksi glutamatamske ostanke. To reakcijo katalizira od vitamina K odvisna  $\gamma$ -glutamilna karboksilaza. Ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  se protrombin veže na negativno nabite fosfolipide s predelom Gla (25) in ta vezava je nujna za pretvorbo protrombina v biološko aktiven  $\alpha$ -trombin. "Kringel" domena ima tri karakteristične disulfidne vezi. Imajo jo številni proteini, vendar so njihove funkcije različne. Pri protrombinu je kringel domena odgovorna za vezavo trombina na fibrin.



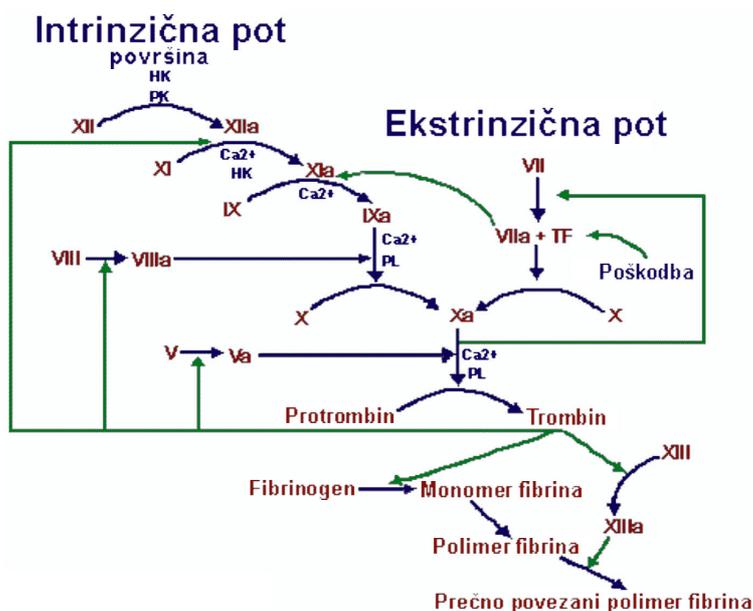
Slika 1. Struktura protrombina (25). Na levi strani slike je protrombin usidran v membrano, na desni strani pa je prikazana struktura govejega protrombinskega fragmenta 1 s kalcijevimi ioni (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdlite/atlas/visualization/1n11.html>).

#### 1.3.2 Genska organizacija

Gen protrombina je lociran na kromosomu 11, blizu centromere in je dolg 21 000 baznih parov (26). Sestavljen je iz 14 eksonov in 13 intronov. Introni predstavljajo do 90% gena. Trije aminokislinski ostanki, ki predstavljajo aktivno mesto protrombina, so locirani na 3 različnih eksonih. Značilna je homologija z drugimi od vitamina K odvisnimi kofaktorji strjevanja krvi.

#### 1.3.3 Fiziološka vloga

Protrombin, ali tudi F-II, je pomemben faktor v verižni reakciji strjevanja krvi (Slika 2). Faktorji strjevanja so označeni z rimskimi številkami (I-XIII) in sinteza večine poteka v jetrih. Tudi nekateri drugi faktorji so odvisni od vitamina K, vendar le-ta ne vpliva na njihovo sintezo, pač pa jih spremeni v biološko aktivno obliko.



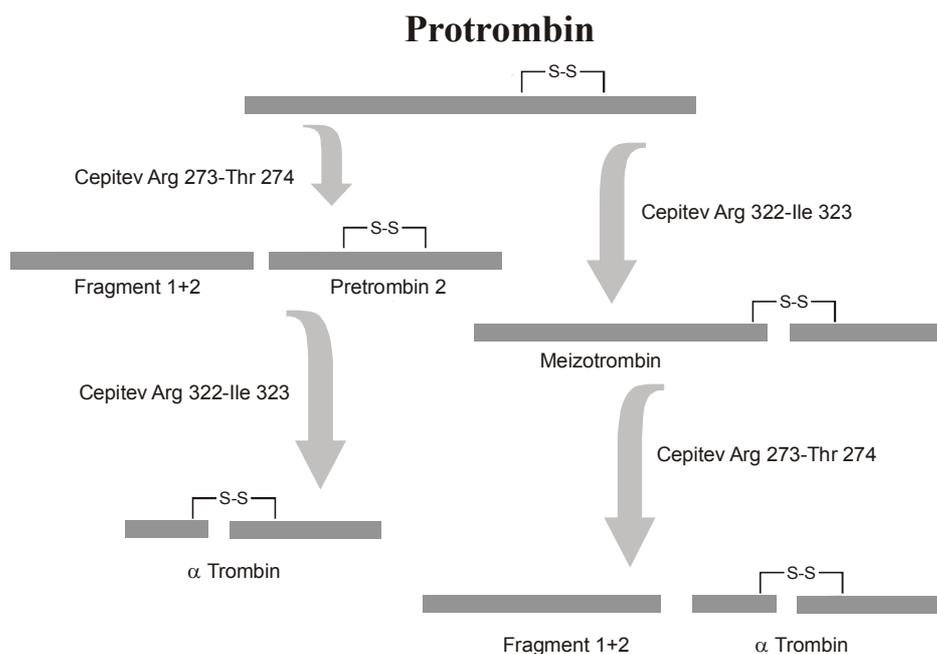
Slika 2. Verižna reakcija strjevanja krvi.

Aktivirani faktor X (Xa) se ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  združi s faktorjem V in fosfolipidom trombocitov (F-3) v protrombinazni kompleks. Ta cepi dve peptidni vezi na fosfolipidno vezanem protrombinu v aktivni  $\alpha$ -trombin (serinska proteaza, faktor IIa), pri tem se sprosti velik peptid, fragment 1+2 (Slika 3). Ta fragment vsebuje predel Gla, zato preostali fragment  $\alpha$ -trombin ni sposoben vezave na fosfolipide. Trombin je aktivni encim, ki odcepi fibrinopeptida A in B od fibrinogena, pri tem nastane netopni fibrin, ki je končni proizvod strjevanja krvi.

Trombin v krvi:

- pretvori fibrinogen v fibrin
- aktivira plazmatke
- modificira faktorja V ter VII in protein S (pozitivna povratna zanka svoje lastne produkcije)
- aktivira protein C (deaktivira Va in VIIIa ob prisotnosti trombomodulina)
- veže se na tromboglobulin (negativna povratna zanka svoje lastne produkcije)
- aktivira faktor XIII (XIIIa-transglutaminaza) (navzkrižno poveže fibrin, da se oblikuje fibrinski strdek)
- zaščiti fibrinske strdke pred fibrinolizo

Prisotnost endotelijske receptorske molekule, trombomodulina, odloča o prevladi prokoagulantne ali antikoagulantne aktivnosti trombina, ker trombin vezan na trombomodulin izgubi svoj protrombozni učinek (27).



Slika 3. Pretvorba protrombina v trombin (28).

## 1.4 PROTITELESA PROTI PROTROMBINU

### 1.4.1 Antikoagulantne in prokoagulantne lastnosti

Že leta 1984 so s protitočno imunoelktroforezo prvič potrdili obstoj kompleksov protrombin-aPT v plazmi bolnikov z LA (29). Kasneje je Fleck s sodelavci (17) potrdil te ugotovitve in pokazal, da imajo aPT aktivnost LA. Kako pomembna so aPT za LA aktivnost, je pokazal Bevers s sodobniki (14), ko je proučeval 16 bolnikov s aCL in LA in pokazal, da se LA 11 bolnikov vežejo na lipidno površino samo v prisotnosti protrombina in kalcija. Kasneje pa so Oosting s sodelavci (30) še pokazali, da se IgG frakcije z aktivnostjo LA vežejo na kompleks fosfolipid-protrombin in tudi, da LA inhibirajo aktivnost protrombinaznega kompleksa.

Številne študije so potrdile, da je večina aktivnosti LA je posledica protrombina in  $\beta_2$ GPI vezanih na fosfolipide (pregled v (31)). Nekateri raziskovalci (32, 33) pa so celo poročali o obstoju dveh, tipov krožečih aPT, ki jih lahko ločimo na osnovi njihovih učinkov v koagulacijskih sistemih: 1) funkcionalna; ta povzročajo aktivnost LA in 2) nefunkcionalna; ta ne prispevajo k aktivnosti LA. Razlike v učinkih so verjetno posledica epitopske specifičnosti različnih aPT (34).

### 1.4.2 Metode za določanje

Dvojna imunodifuzija in protitočna imunoelktroforeza sta bili prvi tehniki, uporabljeni za detekcijo aPT (17, 29, 35). Njuna glavna prednost je bila v detekciji protrombinsko antiprotrombinskih imunskih kompleksov. Ta *in vitro* odkritja razumno pokažejo, da takšni kompleksi verjetno obstajajo tudi v plazmi *in vivo*, vendar pa te metode ne pokažejo kvantitativne ocene protiteles. V večini primerov je titer ali afiniteta aPT celo prenizka, da bi dala jasne precipitacijske linije. Druge tehnike temeljijo na oslabitvi encimske aktivnosti

protrombina po vezavi z aPT (30, 36). Potreba po izolaciji aPT in očiščenju faktorjev strjevanja krvi naredi te metode neprimerne za rutinsko delo.

V zadnjih nekaj letih je več skupin raziskovalcev razvilo različne encimsko imunske metode na trdnem nosilcu (ELISA), ki so do danes daleč najbolj uporabljane tehnike določanja aPT. Omogočajo hitro določitev titra in izotipa aPT. Arvieux in sodelavci (37) so prvi določili aPT z ELISA, pri kateri je protrombin kot antigen nanesen na mikrotitrski plošče z visoko afiniteto vezave. Na ta način so določali aPT, usmerjena proti samemu protrombinu, ki jih danes poimenujemo aPT-A (angl. antiprothrombin antibodies against prothrombin alone). Pri tem je zanimivo, da način predstavitve protrombina na trdnem nosilcu močno vpliva na njegovo prepoznavo s strani aPT (38). aPT se vežejo na protrombin, imobiliziran na  $\gamma$ -obsevanih ali na PVC mikrotitrskih ploščah, z visoko afiniteto vezave. Nasprotno, pa se na protrombin, nanesen na navadne polistirenske mikrotitrski plošče, aPT ne vežejo (37). V tem pogledu je reaktivnost aPT v ELISA močno podobna reaktivnosti anti- $\beta_2$ GPI (37, 39, 40).

Kasneje so Matsuuda in sodobniki (41) pokazali, da se lahko aPT ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  ionov določijo tudi z ELISA, pri kateri je protrombin vezan na fosfatidilserin. Slednja so danes poimenovana od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu (aPS/PT). Z uporabo ELISA z vezanim kompleksom protrombin-fosfatidilserin (aPS/PT ELISA) so Galli in sodobniki (32) učinkoviteje določili aPT v primerjavi z ELISA, kjer so določali aPT-A (aPT-A ELISA). Ta pojav je mogoče razložiti na več načinov: 1.) Protrombin, vezan na fosfatidilserin, ni omejen v svojem lateralnem gibanju, za razliko od protrombina, vezanega na PVC. To omogoča kopičenje in pravilno orientacijo protrombina, in s tem nastanejo boljši pogoji za vezavo protiteles. 2.) Na fosfatidilserin se lahko s pomočjo  $\text{Ca}^{2+}$ , ujamejo tudi krožeči deli membran s pritrjenimi kompleksi protrombina in aPT, ki so lahko prisotni v nekaterih primerih. 3.) aPS/PT mogoče reagirajo z neoepitopi, ki se pojavijo na protrombinu šele, ko se ta veže na fosfatidilserin. Seveda pa se z aPS/PT ELISA tudi bolje imitira samo *in vivo* vezavo protrombina in protiteles.

Na splošno je vedenje aPT v ELISA močno podobno vedenju aCL (38). Slednja prepoznajo  $\beta_2$ GPI, le kadar je vezan na anionske fosfolipide ali na  $\gamma$ -obsevane ali na PVC mikrotitrski plošče, z visoko afiniteto vezave, medtem ko je vezava na  $\beta_2$ GPI v tekoči fazi minimalna.

Pomembno je tudi odkritje Atsumija s sodelavci (42), da so aPS/PT močneje povezana z aktivnostjo LA. Ta skupina raziskovalcev v svoji študiji ni našla korelacije med nivoji aPS/PT in aPT-A pri bolnikih z APS in zato meni, da se z aPS/PT ELISA določajo vsaj deloma različna protitelesa v primerjavi z aPT-A ELISA.

### 1.4.3 Hematološke lastnosti

Mehanizem, po katerem aPT povzročajo aktivnost LA, še ni popolnoma poznan. Po eni izmed teorij naj bi aPT povzročila podaljšano koagulacijo *in vitro* z inhibiranjem aktivacije protrombina v trombin (43). Vendar je to malo verjetno, kajti takšen mehanizem ne more razložiti nevtralizacije aktivnosti LA ob dodatku višje koncentracije fosfolipidov. Leta 2001 je Simmelink s sodelavci (44) dokazal, da dodatek afinitetno očiščenih aPT plazmi zdravega človeka, sproži LA aktivnost, ki jo je mogoče nevtralizirati z dodatkom prebitka fosfolipida. Pokazali so tudi, da so kompleksi protrombina in aPT z aktivnostjo LA, inhibirali tako protrombinazni kot tenazni kompleks. Zatorej, aPT morebiti povečajo

afiniteto protrombina za negativno nabite fosfolipide in tako tekmujejo s koagulacijskimi faktorji za dostopno katalitično fosfolipidno površino (28). Ta mehanizem pojasni tudi, zakaj dodatek fosfolipidov izniči aktivnost LA, ki jo povzročijo aPT.

#### 1.4.4 Imunološke lastnosti

Z različnimi metodami določamo različna aPT, kar je verjetno posledica prepoznavne različnih epitopov na protrombinu. aPT se ne vežejo na protrombin v raztopini, ker 1.) ali reagirajo z neoepitopi, ki se pojavijo šele, ko se protrombin veže na anionske fosfolipide ali pa 2.) so nizko afinitetna protitelesa, ki se vežejo bivalentno na imobiliziran protrombin.

Že leta 1994 sta Wu in Lentz (45) pokazala, da se protrombin konformacijsko spremeni po vezavi na fosfatidilserin. Kasneje je Galli (32) s sodelavci pokazala, da je protrombin v ELISA prepoznan učinkoviteje, če je vezan na fosfatidilserin in predlagala, da je v teh pogojih antigen bolj nakopičen in pravilno orientiran, kar omogoči optimalne pogoje za vezavo protiteles.

Nekateri raziskovalci (46) pa so poročali o bivalentni vezavi aPT na kovalentno povezane dimere in multimerne protrombina na površini mikrotitrne plošče. Navzkrižno povezani dimeri in multimeri olajšajo vezavo nizko afinitetnih protiteles. Ta odkritja pa nakazujejo, da so aPT prej nizko afinitetna protitelesa, kot pa antineoepitopna protitelesa. V eni izmed študij so pokazali, da je interakcija med monovalentnimi fragmenti Fab, pripravljenimi iz IgG frakcije bolnika z LA, in protrombinom zanemarljiva. Iz kinetičnih merjenj asociacije in disociacije je razvidno, da pride do bivalentne vezave med protrombinom in aPT na lipidni membrani (47).

Velik delež aPT je specifičen za humani protrombin (14) in samo majhen delež le-teh reagira tudi z govejim protrombinom (48). Večinoma najdemo pri bolnikih z APS le protitelesa proti humanemu protrombinu. Nekatere plazme celo vsebujejo samo aPT proti govejemu protrombinu, vendar je klinična slika teh bolnikov nejasna (27).

Epitop na protrombinu, kamor se vežejo aPT, še ni bil identificiran. Iz seruma bolnikov z LA izolirane IgG frakcije so se vezale tako na cel protrombin kot tudi na pretrombin in na fragment 1 (49). Vendar pa nobeno od izoliranih protiteles ni reagiralo z imobiliziranim trombinom. Dominantni epitopi so precej verjetno locirani blizu vezavnega mesta za fosfolipide, čeprav so lahko zelo heterogeno razporejeni. Pred kratkim so proučevali epitope na protrombinu z uporabo rekombinantnih protrombinskih fragmentov. Pokazali so, da je 61,5% aPT prepoznalo fragment 1 in 38,4% aPT je prepoznalo pretrombin (fragment 2 +  $\alpha$ -trombin) (50).

#### 1.4.5 Kliničen pomen

V zadnjih desetih letih narašča zanimanje za aPT in izkazalo se je, da so njihove imunološke in funkcionalne lastnosti zelo raznolike in odvisne od afinitete teh protiteles do protrombina. Klinični pomen aPT je še vedno nejasen in se o njem mnogo razpravlja, predvsem zaradi domnevnega obstoja dveh vrst aPT, ki ju določamo z različnimi ELISA.

Več študij, ki jih je povzela Galli s sodelavci (51), je proučevalo klinični pomen aPT, določenih z ELISA. Različni laboratoriji po svetu izvajajo svoje variacije hišnih ELISA za določanje aPT, vendar mednarodne študije v katerih smo poskusili standardizirati in poenotiti te metode do danes niso dale pričakovanih rezultatov (31, 52, 53). Razlika v

uporabljenih reagentih, kalibratorjih, v samem postopku in pogojih metode ter v končnem izračunu rezultatov, so glavni razlogi za velike razlike med objavljenimi študijami o aPT encimsko imunskih testih. Za oris, kako velike razlike so med metodami, smo v 2. preglednici prikazali diagnostične občutljivosti in specifičnosti posameznih metod za določanje antifosfolipidnih protiteles treh objavljenih študij.

**Preglednica 2: Pregled v literaturi objavljene diagnostične občutljivosti in specifičnosti posameznih hišnih izvedb ELISA za določene klinične motnje.**

	Oblike APS brez trombocitopenije Atsumi in sodobniki (42)		Arterijske tromboze Nojima in sodobniki (54)		Tromboze Tsutsumi in sodobniki (55)	
	občutljivost	specifičnost	občutljivost	specifičnost	občutljivost	specifičnost
aPS/PT	25,8%	91,1%	84,4%	65,7%	50,0%	82,1%
aCL	43,5%	77,3%	75,0%	71,3%	31,3%	90,2%
anti- $\beta_2$ GPI	22,6%	90,6%	71,9%	77,6%	62,5%	81,3%

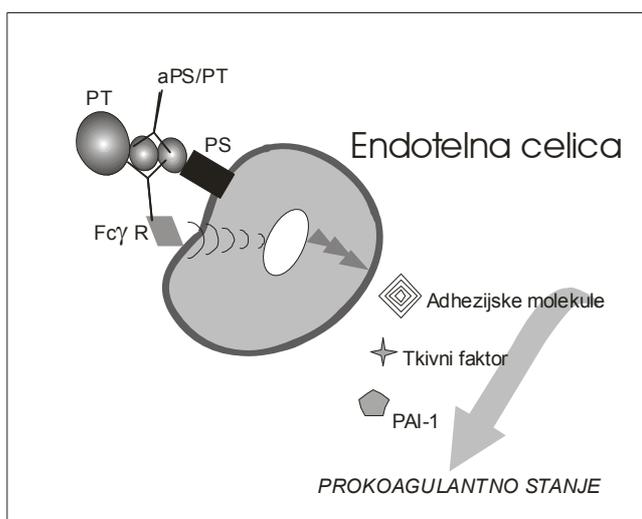
V sistematskem pregledu (28) vseh objav z aPT-A in njihovi povezavi s trombozami so pokazali, da je 7 raziskovalnih skupin potrdilo korelacijo med prisotnostjo aPT-A in trombozami in/ali APS, medtem ko drugih 8 raziskovalnih skupin, te korelacije ni našlo. Metode v povzetih študijah so med seboj nestandizirane in retrospektivno izvedene, kar onemogoča izpeljavo kakršnihkoli zaključkov v zvezi s kliničnim pomenom teh protiteles. Nedavno je bila objavljena edina longitudinalna študija o napovedni vrednosti aPT pri bolnikih s SLE, ki je pokazala da so aPT bolj diagnostično specifična za tromboze kot aCL in anti- $\beta_2$ GPI in so bila poleg LA najboljši napovedni kazalec trombotičnih dogodkov pri bolnikih s SLE (56).

Prevalenca aPT variira od 50-90% glede na način predstavitve protrombina v ELISA sistemih in le-ta je učinkoviteje prepoznan, če je v kompleksu s fosfatidilserinom (38). Atsumi je s sodelavci (42) pokazal, da so aPS/PT povezana s kliničnimi znaki APS, medtem, ko za aPT-A, tega niso odkrili. V zadnjih letih so štiri raziskovalne skupine primerjale klinični pomen protiteles določenih po obeh metodah. Bertolaccini in sodobniki (57) so našli večjo korelacijo med aPS/PT in trombozami, predvsem venskimi, v primerjavi z korelacijo med aPT-A in trombozami. V drugi študiji (55) je med 16 bolniki s trombozami samo 5 bolnikov imelo hkrati tako aPT-A, kot tudi aPS/PT. Avtorji zato predlagajo, da je za odkritje klinično pomembnih aPT, potrebno izvajanje obeh metod. V naslednji študiji (54) so bila aPS/PT najmočnejše povezana z LA v primerjavi z aCL, anti- $\beta_2$ GPI in aPT-A. V tej študiji so bila aPS/PT tudi najmočnejši faktor tveganja za arterijsko in vensko trombozo. Pred kratkim je bila objavljena tudi ena multicentrična študija (58), kjer so primerjali tako hišne kot komercialno dostopne aPT-A in aPS/PT ELISA. Avtorji so odkrili veliko med-laboratorijsko variabilnost, kljub uporabi enakih metod in sicer tako aPT-A kot aPS/PT ELISA. Primerjava dveh različnih komercialno dostopnih analiznih kompletov je pokazala zelo nasprotujoče si rezultate, prav tako je bila precej velika razlika med aPT-ELISA in aPS/PT ELISA. Največjo korelacijo s trombozami in izgubami plodu so dali rezultati, izmerjeni z komercialno dostopnim analiznim kompletom aPS/PT ELISA. Avtorji zaključujejo, da nobena od primerjanih metod ni bila popolnoma zanesljiva, zato v tej fazi odsvetujejo rutinsko določanje aPT v klinične namene.

#### 1.4.6 Patogena vloga protiteles proti protrombinu

Patofiziološki mehanizmi aPT niso popolnoma znani, vendar je vedno več dokazov, da imajo aPT pomembno vlogo v hiperkoagulabilnem stanju, značilnem za APS. Možnih je več učinkov, ki jih povzročijo v plazmi krožeča aPT:

- 1) inhibirajo s trombinom posredovano sproščanje prostaciklina iz endotelijskih celic in s tem vplivajo na aktivacijo proteina C (10).
- 2) prepoznajo kompleks protrombina in anionskih fosfolipidov na membrani endotelijskih celic in tako aktivirajo celice, da sprostijo prokoagulantne substance (59) (Slika 4).
- 3) povečajo afiniteto protrombina za negativno nabite fosfolipide (49).



Slika 4: Možen mehanizem delovanja aPT na endotelne celice.

Tako mišja monoklonska aPT, kot tudi izolirane IgG frakcije z aktivnostjo LA, so povečala vezavo protrombina na fosfolipidne vezikle (60). Prav tako so monoklonska protitelesa in frakcije IgG vplivala na prečiščene komponente protrombinaznega kompleksa in povečala produkcijo trombina. Ta *in vitro* opazovanja pa so prisotna tudi *in vivo*, saj je produkcija trombina povečana pri bolnikih z LA (61) ali antifosfolipidnimi protitelesi (62). Natančen mehanizem, s katerim LA povečajo vezavo protrombina na fosfolipidne vezikle, ni poznan, verjetno pa je, da imata pri tem pomembno vlogo tako bivalentna vezava protiteles na dve molekuli protrombina, kot tudi povečana lokalna koncentracija protrombina na površini fosfolipidnih veziklov (63). Povečana vezava protrombina je posledica zmanjšane disociacije protrombina s površine fosfolipidnih veziklov. Frakcije IgG, izolirane iz serumov z aktivnostjo LA, povečajo vezavo protrombina na endotelijske celice in zvišajo kopičenje trombina na teh celicah (17, 49), kar lahko vodi v hiperkoagulabilno stanje.

K razvoju tromboz lahko prispevajo tudi drugi prirojeni ali pridobljeni dejavniki (mutacija protrombinskega gena, prisotnost faktorja V Leiden, hiperhomocisteinemija, povečan nivo protrombina, faktorja VIII in Willebrandovega faktorja v plazmi ter zmanjšana aktivnost proteina C in proteina S) (38). Malo verjetno je, da bi antifosfolipidna protitelesa sama lahko bila sprožilni dejavnik tromboz pri bolnikih z APS, lahko pa jih pospešijo oziroma zadržijo trombozo, ki so jo sprožili drugi dejavniki.

Med drugimi izražani APS je pogosto omenjena tudi trombocitopenija. Po eni izmed teorij se aPT lahko vežejo tudi na trombocite in povzročijo trombocitopenijo, čeprav so pri bolnikih z antifosfolipidnimi protitelesi odkrili specifična protitelesa proti glikoproteinom trombocitov (64). Ti podatki namigujejo da so za trombocitopenijo pri bolnikih z antifosfolipidnimi protitelesi verjetno odgovorni drugi mehanizmi. Patološka vloga aPT pri izgubah plodu med nosečnostjo pa je sploh še nejasna.

## 1.5 VEZAVA ANTIFOSFOLIPIDNIH PROTITELES NA CELIČNE LINIJE

Patologija antifosfolipidnih protiteles se v veliki meri navezuje na njihovo potencialno reaktivnost s celičnimi membranami. Najprej je veljalo vsesplošno prepričanje, da antifosfolipidna protitelesa reagirajo neposredno s fosfolipidi, vendar so se po odkritju proteinov, ki se vežejo na fosfolipide, raziskave osredotočile na le-te in na njihove interakcije s anionskimi fosfolipidi (65) (slika 5). Med celičnimi anionskimi fosfolipidi je fosfatidilserin lociran skoraj izključno na notranji citoplazemski strani membrane, medtem ko je kardiolipin lociran primarno v mitohondrijski membrani (66). Oba tipa celičnih anionskih fosfolipidov sta tako nedostopna za krožeča antifosfolipidna protitelesa, ki z nedotaknjenimi celicami ne reagirajo. Šele vznemirjenje celične membrane privede do izpostavitve anionskih fosfolipidov, kar posledično omogoči vezavo antifosfolipidnih protiteles (67, 68). Porušenje membranske asimetrije se zgodi pri nekaterih fizioloških stanjih:

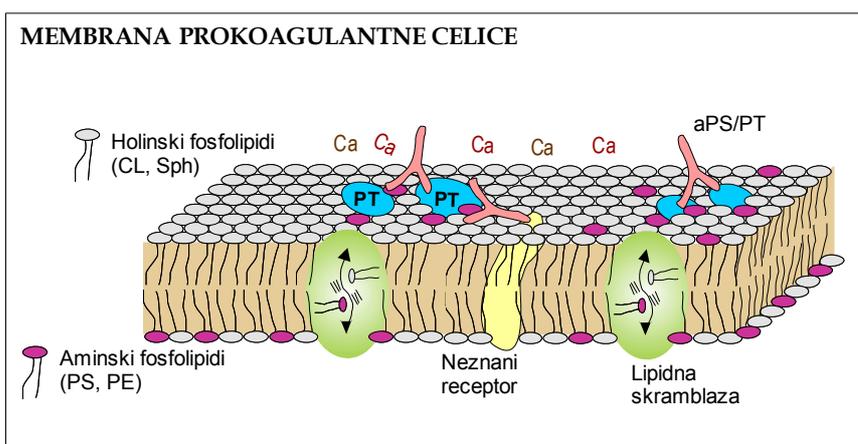
1. aktivacija trombocitov, kjer je izpostavitve negativno nabitih fosfolipidov nujna za začetek kaskadne reakcije strjevanja krvi (69);
2. poškodba žilja ali vnetje aktivira endotelijske celice, ki imajo pomembno vlogo pri sprožitvi koagulacije (70).
3. poškodovani eritrociti in srpastocelična anemija (71) ter
4. apoptotične celice (72, 73).

Po indukciji apoptoze se fosfatidilserin prerazporedi iz notranje v zunanjo plast membrane. To se zgodi že zelo zgodaj v procesu apoptoze, sledi pa kondenzacija jedra in brstenje membrane v manjša apoptotična telesca (74). V normalnih pogojih se asimetrija membrane (75) vzdržuje s tremi encimi:

1. aminofosfolipidna translokaza, ki transportira fosfatidilserin iz zunanje v notranjo plast membrane (76, 77),
2. flopaza, ki nespecifično črpa fosfolipide v zunanjo plast membrane (78) in
3. lipidna skramblaza (79), ki nespecifično omogoča fosfolipidom dvosmerno migracijo preko lipidnega dvosloja.

Omejena kapaciteta aminofosfolipidne translokaze nakazuje, da je njena glavna vloga vzdrževanje, ne pa ponovna vzpostavitev membranske asimetrije. Ta encim je v procesu apoptoze zmanjšano aktiven, vendar tudi njegova popolna inhibicija ne zruši membranske asimetrije (76). Verjetno se pri apoptozi hkrati aktivira tudi nespecifična lipidna skramblaza, kar vodi v dvosmerno transmembransko mešanje (angl. scramble) lipidov (74). Fosfolipidne skramblaze so skupina homolognih proteinov, ki so ohranjene v vseh evkariontskih organizmih. Znano je, da sodelujejo pri rušenju membranske asimetrije pri nekaterih kritičnih celičnih dogodkih, kot so aktivacija celice, poškodba in apoptoza (79). Fenomen lipidnega mešanja so odkrili tudi pri aktivaciji trombocitov in eritrocitov ob povišani koncentraciji citoplazemskega  $Ca^{2+}$  (80, 81).

Rauch in sodelavci so pokazali, da se tako  $\beta_2$ GPI in posledično tudi anti- $\beta_2$ GPI selektivno vežejo le na apoptotične celice, medtem ko te vezave na viabilnih celicah niso zaznali (82). Sama interakcija  $\beta_2$ GPI z apoptotičnimi celicami izpostavi epitop, ki je tako antigen (83) za antifosfolipidna protitelesa kot tudi imunogen (84) v zdravih miškah. Pred kratkim so ti raziskovalci pokazali še, da enak vzorec velja tudi za protrombin in aPT (85). V drugi raziskavi pa so Chen in sodelavci (86) pokazali, da se antifosfolipidna protitelesa ne vežejo na mirujoče endotelijske celice in jih prav tako ne aktivirajo. Potreben je neodvisen sprožilni dogodek, ki aktivira endotelijske celice, kar posledično omogoči antifosfolipidnim protitelesom, da se vežejo na aktivirane celice in sprožijo trombogeni proces.



Slika 5: Shematski prikaz vezave antifosfolipidnih protiteles na membrane celic.

## 1.6 ORODJA ZA ŠTUDIJO INTERAKCIJ MED ANTIGENI IN PROTITELESI

Široka paleta analitičnih in preparativnih orodij, namenjenih analizi interakcij med ligandi, omogoča natančno določanje nivojev imunoglobulinov in njihovih mehanizmov vezave (87).

### 1.6.1 ELISA

S to metodo lahko v preiskovanem serumu določamo tako protitelesa kot antigene, za detekcijo pa uporabimo encimski sistem s kromogenim substratom. Določevanje temelji na principu pritrditve različnih encimov na protitelesa ali na antigene, pri čemer se reaktivnost protiteles ne spremeni.

Določanje protiteles z indirektno ELISA: Na trdno podlago (polistirensko mikrotitrsko ploščo) vežemo antigen in v dveh paralelah dodamo preiskovani vzorec seruma. Specifična protitelesa za imobiliziran antigen, prisotna v preiskovanem serumu, se vežejo na antigen. Po inkubaciji spiranje z ustreznim spiralnim pufrom odstrani na podlago šibko vezane snovi in vse snovi, ki niso reagirale s podlago ali antigenom. V naslednjem koraku nanese encimsko označena izotipsko specifična protitelesa proti človeškim imunoglobulinom, katera se vežejo na predhodno vezana specifična protitelesa ustreznega izotipa. Po ponovnem izpiranju dodamo encimsko kromogeni substrat, pri čemer encim reagira s substratom. Ta interakcija povzroči spremembo barve substrata. Intenzivnost barvne reakcije in s tem stopnjo razgradnje substrata merimo spektrofotometrično z mikrotitrskim čitalcem.

### 1.6.2 Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je metoda, ki za ločevanje in/ali izolacijo posameznih vrst molekul izkorišča selektivne interakcije med biološkimi molekulami. Interakcije med protitelesom in antigenom so osnova afinitetne kromatografije (88).

Antigen je kovalentno vezan na trdnem nosilcu, ki se nahaja v koloni in predstavlja stacionarno fazo kromatografskega sistema. Vzorec, ki vsebuje protitelesa predstavlja mobilno fazo. Pri prehodu seruma skozi kolono se specifična protitelesa vežejo na antigen. Ostali proteini in protitelesa se sperejo. Specifična protitelesa, ki so na antigen vezana nekovalentno nato speremo z mobilno fazo, ki ima različno molarnost ali pH.

S spreminjanjem molarnosti pufra lahko selektivno najprej izperemo nizko avidna protitelesa in nato še visoko avidna protitelesa. To je mogoče zaradi različne jakosti interakcij med nizko avidnimi ter visoko avidnimi protitelesi in antigenom. Nizko avidna anti- $\beta_2$ GPI izperemo s pufrom nizke molarnosti, visoko avidna anti- $\beta_2$ GPI pa s pufrom visoke molarnosti in spremembo pH. Tako lahko ločeno izoliramo obe vrsti anti- $\beta_2$ GPI.

### 1.6.3 Pretočna citometrija

V pretočnem citometru celice druga za drugo potujejo skozi ozek snop svetlobe. Vir svetlobe, ki obseva celice je navadno laserski žarek in na celičnih strukturah pride do sipanja svetlobe, te signale pa zbirajo fotodetektorji. Dva fotodetektorja merita količino razpršene svetlobe, t.i. FALS meri sipanje naprej in daje podatke o velikosti celic, t.i. RALS pa sprejema svetlobo pravokotno od smeri laserskega žarka in meri zrnatost (granuliranost) celice. Fluorescenčni detektorji merijo svetlobo večjih valovnih dolžin in merijo signal, ki ga oddaja določeno fluorescenčno barvilo uporabljeno za označevanje posameznih populacij celic oziroma proteinskih molekul na površini celice. Računalniški program potem obdela podatke in jih matematično in grafično prikaže.

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Različni laboratoriji v svetu izvajajo svoje variacije hišnih ELISA za določanje aPT in do danes so vse študije, ki so poskusile standardizirati in poenotiti te metode, dale nezadovoljive rezultate (52, 53, 58). Raziskovalci določajo aPT v dveh različnih izvedbah ELISA. Z eno izvedbo določajo aPT-A, z drugo pa aPS/PT. Mnogo avtorjev ugotavlja, da so aPS/PT močnejše povezana s trombozami v primerjavi z aPT-A. V magistrski nalogi bomo v prvem delu analitsko in klinično ovrednotili našo izvedbo aPS/PT ELISA in rezultate primerjali z drugimi izvedbami aPS/PT ELISA in aPT-A ELISA. S tem nameravamo preučiti značilnosti aPT *in vitro*.

Pri tem predvidevamo, da:

- bo vezava aPT na prosti protrombin v raztopini minimalna;
- bodo aPT povečala nalaganje protrombina na negativno nabite fosfolipide;
- bomo v preiskovanih serumih odkrili ločeno aPT-A in aPS/PT v različnih ELISA testih in potrdili obstoj dveh populacij protiteles;
- bomo potrdili korelacijo med aPS/PT in trombozami;
- bomo poleg nizko avidnih aPT določili tudi prisotnost visoko avidnih aPT.

V drugem delu magistrske naloge nameravamo naše ugotovitve v *in vitro* sistemih podkrepiti tudi z *in vivo* modeli. Nekaj raziskovalnih skupin je proučevalo vezavo antifosfolipidnih protiteles na celice, kar naj bi posledično vodilo v trombogeno stanje. Rauch in sodelavci so pokazali, da se tako protrombin in posledično tudi aPT selektivno vežejo le na apoptotične celice, medtem ko te vezave na viabilnih celicah niso zaznali (85). Chen in sodelavci (86) pa so pokazali, da se antifosfolipidna protitelesa ne vežejo na mirujoče endotelijske celice in da je potreben neodvisen sprožilni dogodek, ki aktivira endotelijske celice, kar posledično omogoči vezavo na tako aktivirane celice in sprožitev trombogenicih procesov. Na osnovi teh ugotovitev pa so naši cilji:

- pokazati vezavo aPT in protrombina na membrano viabilnih celic prokoagulantne celične linije s pretočnim citometrom;
- preveriti, kako stimulacija celic z lipopolisaharidom (LPS) ali s kalcijevimi ioni vpliva na vezavo aPT na površino celic;
- določitev optimalnih pogojev za vezavo aPT na površino celic;
- po ugotovljenih ustreznih pogojih vezave, preveriti vezavo še na drugih celičnih linijah;
- določiti vezavo poliklonskih aPT, izoliranih iz bolnikov z APS na membrano celic.

V *in vivo* poskusih pričakujemo, da:

- bomo dokazali, da se aPT vežejo tudi na stimulirane viabilne in ne samo na apoptotične celice, kot je do sedaj veljalo v literaturi,
- bo vezava aPT pogojena s hkratno prisotnostjo protrombina in tudi, da bodo aPT povečala nalaganje protrombina na površine proučevanih celičnih linij;
- bo vezava na prokoagulantne celične linije, izrazitejša v primerjavi z ne-prokoagulantnimi celičnimi linijami.

### 3 MATERIALI IN OPREMA

#### 3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

##### 3.1.1 Humani serumi

###### 3.1.1.1 Normalni serumi

Serume klinično zdravih oseb smo dobili iz krvne banke Zavoda za transfuzijo krvi. Pri izbiranju vzorcev smo upoštevali starost od 18. do 65. let ter dobro zdravje oseb. Skupina je vsebovala 150 krvodajalcev (88 moških in 62 žensk starih od 18-59 let, povprečna starost 28 let) Komisija za medicinsko etiko je v sklepu št.:201/10/07 ocenila, da je raziskava etično neproblematična.

###### 3.1.1.2 Serumi bolnikov s SLE in APS

Humane serume bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi (SAB) smo dobili iz obstoječih bank Kliničnega oddelka za revmatologijo SPS Interne klinike KC Ljubljana. Bolniki so ob sprejemu pisno potrdili, da ne nasprotujejo uporabi preostanka seruma v raziskovalne namene. Skupina je vsebovala 98 bolnikov: 2 moška in 96 žensk, starih od 18-73let, povprečna starost 38 let.

- 61 bolnikov s SLE
- 6 bolnikov s primarnim APS
- 31 bolnikov s sekundarnim APS (SLE+APS)

SLE je bil diagnosticiran po kriterij American Rheumatology Association (89).

###### 3.1.1.3 Serumi bolnikov z APS, izbrani za izolacijo IgG in aPT

Serume bolnikov z APS smo dobili iz obstoječih bank Department of Medicine II, Hokkaido University School of Medicine (Univerza Hokkaido, Sapporo, Japonska), katerega vodja je prof. Takao Koike. Izbrali smo 11 serumov, ko niso imeli aCL, razlikovali pa so se na osnovi prisotnosti aPT:

- 3 negativni serumi,
- 2 seruma s pozitivnimi aPT-A,
- 3 serumi s pozitivnimi aPS/PT,
- 3 serumi s pozitivnimi aPT-A in pozitivnimi aPS/PT.

Iz obstoječih bank Kliničnega oddelka za revmatologijo SPS Interne klinike KC Ljubljana smo izbrali dva bolnika z APS in z visoko pozitivnimi aPS/PT in aPT-A. Oba seruma smo uporabili, najprej za izolacijo IgG, iz katere pa smo nato izolirali še aPT.

##### 3.1.2 Interni standardi

Za interne standarde (IS) smo iz serumske banke Interne klinike, Oddelka za revmatologijo izbrali predhodno večkrat preiskovane serume bolnikov s SLE in APS. Služili so nam za kontrolo ponovljivosti med posameznimi analizami, hkrati pa smo jih serijsko redčili, da smo dobili standardno krivuljo za ELISA.

#### 3.1.2.4 Interni standard za aPS/PT ELISA

Za IS IgG izotipa imunoglobulinov smo uporabili IgG frakcijo imunoglobulinov, ki smo jo, iz izbranega seruma bolnika, izolirali na G koloni, z metodo afinitetne kromatografije. Za IS IgM izotipa imunoglobulinov smo uporabili neprečiščen serum izbranega bolnika.

#### 3.1.2.5 Interni standard za aPT ELISA

Izbrali smo dva predhodno preiskovana seruma z visokimi nivoji protiteles proti protrombinu. Uporabili smo ju ločeno za IgG in IgM izotipa imunoglobulinov.

#### 3.1.2.6 Interni standard za aCL ELISA

Absorpcije uporabljenih IS za aCL so bile standardizirane na vrednosti originalnih standardov KAPS (*Kingston Antiphospholipid study*) (90) in dobljene absorpcije vzorcev pretvorjene v arbitrarne enote.

### 3.1.3 Monoklonska protitelesa

Za vezavo na celične linije smo uporabili dve antiprotrombinski mišji monoklonski protitelesi. Med seboj se razlikujeta v vezavi različnega epitopa na protrombinu. Obe monoklonski protitelesi smo dobili v raziskovalni skupini prof. Takao Koike (Univerza Hokkaido, Sapporo, Japonska) in nista komercialno dostopni (91).

- 51A6: aPT-A; mišje protitelo izotipa IgG, ki prepozna protrombin imobiliziran na  $\gamma$ -obsevanih ali na PVC mikrotitrskih ploščah, z visoko afiniteto vezave, slabše pa se veže na kompleks fosfatidilserin-protrombin. Pridobili so ga z imunizacijo miši s humanim pretrombinom-1, ki je brez predela Gla potrebnega za vezavo na fosfatidilserin.
- 231D: aPS/PT; mišje protitelo izotipa IgG, ki dobro prepozna kompleks fosfatidilserin-protrombin. Na protrombin imobiliziran na  $\gamma$ -obsevanih ali na PVC mikrotitrskih ploščah se ne, oziroma se zelo šibko, veže.

Obe antiprotrombinski monoklonski protitelesi imata aktivnost LA, vendar ima 231D močnejše antikoagulantne lastnosti.

Pri anti- $\beta_2$ -GPI ELISA smo v izvedbi ELISA za pripravo standardne krivulje uporabili dve monoklonski protitelesi, ki smo ju dobili od prof. Takao Koike (Univerza Hokkaido, Sapporo, Japonska).

- HCAL je himerno IgG MoAb, ki vsebuje humani  $\kappa$  in  $\gamma$  1 konstantni regiji in variabilne regije iz WBCAL-1 (mišje monoklonsko aCL). Pridobili so ga iz NZW x BXS F1 miši z APS (92).
- EY2C9 je IgM MoAb, ki so ga pridobili iz bolnika z APS. Prepozna epitope na  $\beta_2$ -GPI, ki je vezan na kardiolipin ali na oksigenirano polistirensko površino (93).

### 3.1.4 Kontrolni mišji IgG imunoglobulini

Iz seruma zdrave miši izolirana IgG frakcija imunoglobulinov, Sigma, St. Louis, ZDA

### 3.1.5 Celične linije

- **RAW 264.7:** Mišji makrofagi, izolirani iz tumorja, inducirane z virusom Abelsonove mišje levkemije, ATCC, Manassas, USA
- **THPI:** Humani monociti, izolirani iz periferne krvi bolnika z akutno levkemijo monocitov, ATCC, Manassas, USA
- **DAUDI:** Humani B limfoblasti, izolirani iz periferne krvi bolnika z Burkittovega limfoma, ATCC, Manassas, USA
- **3T3-L1:** embrionalni mišji fibroblasti razviti z izolacijo klonov, ATCC, Manassas, USA

### 3.2 REAGENTI

- Antibiotik: penicilin-streptomycin solution (100x), Sigma, St. Louis, ZDA
- Agaroz, aktivirana s CNBr, Sigma, Taufkirchen, Nemčija
- $\beta_2$ -GPI (8,1 g/L) afinitetno prečiščen iz človeškega seruma, Univerza Hokkaido, Sapporo, Japonska
- Dietanolamin ( $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2$ ) analitske čistoče, Sigma, St. Louis, ZDA
- Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Etanol absolutni, 96%, analitske čistoče, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- Fetalni goveji serum (FBS) Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- Fosfatidilserin (2 g/L), Sigma, St. Louis, ZDA
- Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), Lex, Portorož, Slovenija
- Glicin ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ ), analitske čistoče, Sigma, St. Louis, ZDA
- Gojišče za RAW 264.7 in 3T3-L1 celični liniji: DMEM-1640, Sigma, St. Louis, ZDA
- Gojišče za THP1 in Daudi celični liniji: RPMI-1640, Sigma, St. Louis, ZDA
- Goveji serumski albumin brez maščobnih kislin, Sigma, St. Louis, ZDA
- Hank's balanced salt solution (HBSS) brez kalcija in magnezija, Sigma, St. Louis, ZDA
- Humani protrombin:
  - a) purified prothrombin (activity: 5,4 PEU<sup>2</sup>); Diagnostica Stago
  - b) human prothrombin (activity: n/a); Enzyme Research Laboratories
- Kalijev dihidrogenfosfat, ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), analitske čistoče, E. Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kardiolipin (natrijeva sol kardiolipina v absolutnem etanolu, 5,2 g/L) Sigma, St. Louis, ZDA
- Kloroform analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Klorovodikova kislina (HCl), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Magnezijev klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), analitske čistoče, E. Merck, Darmstadt, Nemčija
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) analitske čistoče, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Nemčija
- Natrijev hidrogen karbonat  $\text{NaHCO}_3$ , Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev acetat brezvodni, ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), analitske čistoče, E. Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) ekstra čist, E. Merck, Darmstadt, Nemčija

---

<sup>2</sup> PEU: Plasma Equivalent Unit

- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev hidroksid (NaOH) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev klorid (NaCl) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Nonidet P40, neionski detergent, Sigma, St. Louis, ZDA
- Ocetna kislina min 99,5%, ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Para-nitrofenil-fosfat 5mg tablete, Sigma Chemical, St. Louis, ZDA
- Razkužilo (Kohrsolin FF), Bode Chemie, Hamburg, Nemčija
- Sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG in IgM, konjugirana z alkalno fosfatazo, Accurate Chemical & Scientific Corporation (ACSC), Westbury, ZDA
- Sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena oslova protitelesa, usmerjena proti mišjim IgG konjugirana s fluoresceinom (FITC), Jackson Immunoresearch, Baltimore Pike, ZDA
- Sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena oslova protitelesa, usmerjena proti humanim IgG konjugirana s fluoresceinom (FITC), Jackson Immunoresearch, Baltimore Pike, ZDA
- Serum plodu goveda (FCS), Sigma St. Louis, ZDA
- Tripano modri (Trypan Blue Stain), BioWhittaker, Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- Tripsin 10x (Trypsin/Versene EDTA), Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- Tris (3-amino-2-hidroksimetil-1, 3-propandiol) analitske čistoče, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- Tween-20 (polioksietilen sorbitan monolavrat) EIA čist, Bio-Rad, Richmond, ZDA

### 3.3 PUFRI IN RAZTOPINE

#### 3.3.1 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim G proteinom

- Pufrana fiziološka raztopina (PBS), pH = 7,4

natrijev klorid	137 mM
kalijev klorid	2,7 mM
dinatrijev hidrogenfosfat	6,5 mM
kalijev dihidrogenfosfat	1,5 mM

pH uravnavamo z 1M klorovodikovo kislino.
- 0,05 M acetatni pufer (vezavni pufer), pH = 5,2

Raztopina A : ocetna kislina	0,05 M
Raztopina B : brezvodni natrijev acetat	0,05 M

Raztopini A dodajamo raztopino B do pH = 5,2. Končnemu volumnu acetatnega pufra dodamo 650 mM NaCl.
- 1 M ocetna kislina, (izpiralni pufer)
- 1 M TRIS baza
- 0,02-odstotni natrijev azid za konzerviranje kolon

### 3.3.2 Pufri za pripravo kolone z vezanim protrombinom

- 1 mM klorovodikova kislina
- 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH=8,3 (vezavni pufer)
- 0,1 M acetatni pufer 0,5M NaCl, pH = 4  

Raztopina A : očetna kislina	0,1 M
Raztopina B : brezvodni natrijev acetat	0,1 M

 Raztopini A dodajamo raztopino B do pH = 5,2. Končnemu volumnu acetatnega pufera dodamo 500 mM NaCl.
- 0,2 M glicin pH=8
- Pufrana fiziološka raztopina (PBS), pH = 7.4
- PBS 0,5M NaCl 0,05% NP40 (vezavni pufer – pufer A)
- 0,1M glicin 0,5m NaCl 0,05% NP40 pH=2,5 (izpiralni pufer – pufer B)

### 3.3.3 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom

- 0,1-odstotni Tween 20 v pufrani fiziološki raztopini (TBS-Tween); pH=7,4 (spiralni pufer)  

natrijev klorid	136 mM
kalijev klorid	2,7 mM
tris	25 mM

 pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino.  
 0,1% Tween 20
- 0,5 M NaCl v pufrani fiziološki raztopini (TBS-Tween) (izpiralni pufer za nizko avidna protitelesa)
- 4 M NaCl v 0,1 M glicinu; pH = 2,5 (izpiralni pufer za visoko avidna protitelesa)  

glicin	0,1 M
--------	-------

 pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino.  

natrijev klorid	4 M
Tween 20	0,1 %

### 3.3.4 Pufri za ELISA

- Metanol/kloroform (4:1)
- Pufrana fiziološka raztopina (TBS); pH=7,4  

natrijev klorid	136 mM
kalijev klorid	2,7 mM
tris	25 mM

 pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino

- Pufrana fiziološka raztopina s kalcijem (TBS-Ca)
  - kalcijev klorid 5 mM
  - pufrana fiziološka raztopina (TBS); pH=7,4
- 0,05% Tween 20 v pufrani fiziološki raztopini (0,05% Tween/TBS-Ca)
- 1-odstotni goveji serumski albumin v pufrani fiziološki raztopini (1% BSA/TBS-Ca)
- Dietanolaminski pufer (DEA); pH=9,8
  - dietanolamin 970 mM
  - magnezijev klorid 0,49 mM
  - natrijev azid 3,1 mM
  - pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino
- Pufrana fiziološka raztopina (PBS), pH = 7,4
  - natrijev klorid 137 mM
  - kalijev klorid 2,7 mM
  - dinatrijev hidrogenfosfat 6,5 mM
  - kalijev dihidrogenfosfat 1,5 mM
  - pH uravnavamo z 1 M klorovodikovo kislino.
- 0,05-odstotni Tween 20 v pufrani fiziološki raztopini (0,05% Tween/PBS)
- Pufrana fiziološka raztopina (PBS), pH = 7,2
  - natrijev klorid 137 mM
  - kalijev klorid 2,7 mM
  - dinatrijev hidrogenfosfat 6,5 mM
  - kalijev dihidrogenfosfat 1,5 mM
  - pH uravnavamo z 1 M klorovodikovo kislino.
- 1-odstotni plodovni serum goveda v pufrani fiziološki raztopini (1% FCS/PBS)

### 3.4 APARATURE IN PRIBOR

- 15 in 50 ml-centrifugirne epruvete (Centrifuge tubes), TPP, Trasadingen, Švica
- 25 in 75 cm<sup>2</sup>-plastenke za tkivne kulture (Tissue cultured flask), TPP, Trasadingen, Švica
- 6, 12, 24-prekatne plošče (Tissue cultured flask), TPP, Trasadingen, Švica
- Analitska tehtnica, Mettler Toledo, Švica
- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka: model S2010, 1.2, Heto Holten, Allerød, Danska
- Avtoklav A-11, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- Avtomatski spiralnik mikrotitrskih plošč, PW96 73773, Tecan, Austria
- Centrifuga: Minifuge T, Heraeus sepatech, Osterode/Harz, Nemčija
- Droben laboratorijski material in oprema: nastavki za pipete (z in brez filtrov), steklovina, plastične kadičke,...
- Hemocitometer 1/10 mm deep, Bürker-Türk, Nemčija

- Indikatorski pH lističi, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Inkubator: Heto Holten Cellhouse tip 154, Astel, Francija
- Kolona z imobiliziranim G proteinom, Pierce, Rockford, ZDA
- Kolona za afinitetno kromatografijo; 1,5\*20 cm, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- Koncentratorji Centriprep-30, Amicon, Beverly, ZDA
- Magnetno mešalo, IKAMAG<sup>®</sup> RET control-visc C, IKA<sup>®</sup>-WERKE, Nemčija
- Membranski filtri za enkratno uporabo 0,45 µm in 0,20 µm, Sartorius, Goettingen, Nemčija
- Mikroskop BH-2, Olympus, Tokio, Japonska
- Multipipete 8-kanalne (10-100 µL, 20-200 µL), Eppendorf Research
- Oprema za nizekotlačno kolonsko kromatografijo, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- pH meter, Seveneasy, Mettler Toledo, Švica
- Pipete (0,5-10 µL), Eppendorf Research
- Polistirenske mikrotitrne plošče:  
*Costar high binding EIA/RIA plates, Cambridge, ZDA*  
*Costar medium binding EIA/RIA plates, Cambridge, ZDA*
- Razsoljevalne kolone, Pierce, Rockford, ZDA
- Ročni spiralec za mikrotitrne plošče, SL washer, SLG, Danska
- Rotacijsko mešalo Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija
- Sistemi za pripravo ultra čiste vode, Čiščenje vode z rezervno osmozo in elektrodeionizacijo – Elix3, Millipore, Billerica, ZDA
- Spektrofotometer Camspec M-501, Cambridge, Velika Britanija
- Spektrofotometerski čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Sunrise Remote, Grödig, Austria
- Vakuumska črpalka za odsesavanje gojišča: Millivac<sup>™</sup> Miniature Vacuum pump XF54 230 50, Millipore, Schwalbach, Nemčija
- Vakuumska črpalka, 220V, KNF Neuberger GmbH, Freiburg-Munzingen, Nemčija
- Vodna kopel TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija

## 4 METODE DELA

### 4.1 DOLOČANJE ANITOFOSFOLIPIDNIH PROTITELES

Antifosfolipidna protitelesa smo določali z indirektno ELISA. Plošče smo zaporedoma večkrat pomerili, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorpcijam IS. Njihove predhodno določene referenčne vrednosti smo uporabili za izračun korekcijskega faktorja (korekcijski faktor IS = izmerjena absorpcija/ocenjena referenčna absorpcija). Absorpcije vzorcev smo nato pomnožili s korekcijskim faktorjem plošče, ki je povprečje vseh korekcijskih faktorjev IS.

Vsak vzorec smo testirali v dveh paralelah in računali koeficient variabilnosti obeh paralel, ki ni smel preseči 10% pri aPT ELISA in anti- $\beta_2$ -GPI ELISA oziroma 18% pri aPS/PT ELISA in aCL ELISA. Sočasno z preiskovanimi serumi smo na vsako mikrotitrsko ploščo nanašali tudi standarde in kontrole.

#### 4.1.1 ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT ELISA)

IgG in IgM protitelesa proti kompleksu fosfatidilserin-PT smo določali po dveh metodah, ki smo ju med seboj tudi primerjali. Prva je metoda, ki jo je opisal Atsumi s sodelavci (42) in smo jo v naši nalogi poimenovali osnovna aPS/PT ELISA. Osnovno metodo smo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma nekoliko spremenili in jo poimenovali modificirana aPS/PT ELISA {ŽIGON, 2002 48 /id}.

Pri obeh izvedbah aPS/PT ELISA smo v vdolbinice polistirenske mikrotitrne plošče (Costar medium binding EIA/RIA plates) nanesti 40  $\mu$ l fosfatidilserina koncentracije 50 mg/L v raztopini kloroform:metanol (1:4) in nepokrite plošče inkubirali čez noč na +4°C, da je raztopina kloroform:metanol izhlapela. Naslednji dan smo nanesti 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4), inkubirali eno uro, plošče dvakrat spirali in otresli. Nato smo pri osnovni metodi nanesti 50  $\mu$ l protrombina (Diagnostica Stago) [10 mg/L v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4) v vzorčne vdolbinice in 50  $\mu$ l samega 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4) v slepe vdolbinice (slepi vzorec). Inkubirali eno uro, štirikrat spirali in otresli in nanesti IS in vzorce redčene 1:100 v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4) ter jih inkubirali eno uro. Pri modificirani metodi pa smo protrombin in vzorce nanesti neposredno drugega za drugim in skupaj inkubirali eno uro. Najprej smo nanesti po 25  $\mu$ l protrombina (Diagnostica Stago) [20 mg/L v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4) v vzorčne vdolbinice in 25  $\mu$ l samega 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4) v slepe vdolbinice (slepi vzorec). Takoj nato smo v vzorčne in slepe vdolbinice nanesti še 25  $\mu$ l IS in vzorcev redčenih 1:50 v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4). Tako je bila v posamezni vdolbinici končna redčitev posameznega vzorca 1:100, koncentracija protrombina pa 10 mg/L. Inkubirali smo eno uro, štirikrat spirali in otresli. Pri obeh izvedbah aPS/PT ELISA smo nato nanesti po 50  $\mu$ l sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti človeškim IgG in IgM označena z alkalno fosfatazo) redčenih 1:3000 v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4). Inkubirali smo eno uro ponovno plošče štirikrat spirali, otresli in nanesti 100  $\mu$ l substrata para-nitrofenil fosfata v DEA pufri s koncentracijo 1 g/L. Inkubirali smo 5 min in merili absorpcijo s čitalcem mikrotitrskih plošč pri 405 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorpcijam IS.

Spirali smo s pufrano fiziološko raztopino 0.05% Tween/TBS-Ca pH (7,4) in vse inkubacije, razen začetne, so potekale na sobni temperaturi (22 do 26°C).

#### 4.1.2 ELISA za določanje protiteles proti protrombinu (aPT-A ELISA)

IgG in IgM protitelesa proti samemu protrombinu smo določili po metodi, ki jo je prvi opisali Bertollacini ML s sodelavci (95). Humani protrombin in preiskovančev serum po tej metodi inkubiramo ločeno.

V vdolbinice polistirenske mikrotitrne plošče (Costar high binding EIA/RIA plates) smo nanесли neposredno 50  $\mu$ l protrombina (Diagnostica Stago) [50 mg/L] raztopljenega v TBS-Ca<sup>2+</sup> in inkubirali preko noči na +4°C. Naslednji dan smo plošče trikrat spirali, otresli in nanесли 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4). Inkubirali smo eno uro na sobni temperaturi, nato plošče trikrat spirali, otresli in nanесли po 100  $\mu$ l IS in serumov redčenih 1:100 v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4). Po enourni inkubaciji na 37°C smo štirikrat spirali, otresli in nanесли po 100  $\mu$ l sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti človeškemu IgG in IgM označena z alkalno fosfatazo) redčenih 1:3000 v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> pH (7,4). Inkubirali smo eno uro na 37°C, ponovno trikrat spirali, otresli in po dodatku 100  $\mu$ l substrata (p-nitrofenol-fosfat v DEA pufru) merili absorpcijo pri 405 nm s čitalcem mikrotitrskih plošč, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorpcijam IS.

Spirali smo s pufrano fiziološko raztopino 0,05% Tween/TBS-Ca pH (7,4).

#### 4.1.3 ELISA za določanje protiteles proti kardiolipinu s standardno metodo (aCL ELISA)

Uporabili smo standardno metodo za določanje aCL, ki se v Laboratoriju za imunologijo revmatizma za rutinsko uporablja (90, 96, 97). Z njo smo določali aCL izotipa IgG in IgM.

V vdolbinice polistirenske mikrotitrne plošče (Costar medium binding EIA/RIA plates) smo nanесли po 40  $\mu$ l kardiolipina [57 mg/L], raztopljenega v absolutnem etanolu in nepokrite plošče inkubirali preko noči na +4°C, da je etanol izhlapel. Naslednji dan smo v vdolbinicah eno uro inkubirali 120  $\mu$ l 10% FCS/PBS pH (7,2) in enkrat spirali z avtomatskim spiralnikom mikrotitrskih plošč. Po prej načrtovani shemi smo nanесли po 100  $\mu$ l standardov in vzorcev redčenih 1:100 v 10% FCS/PBS pH (7,2) ter inkubirali dve uri in pol. Nato smo plošče štirikrat spirali, otresli in nanесли po 100  $\mu$ l sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti človeškemu IgG in IgM označena z alkalno fosfatazo) redčenih 1:2300 anti-IgG in 1:1929 anti-IgM v 10% FCS/PBS pH (7,2). Inkubirali smo eno uro ponovno plošče štirikrat spirali, otresli in nanесли 100  $\mu$ l substrata para-nitrofenil fosfata v DEA pufru s koncentracijo 1g/L. Inkubirali smo 5 min in merili absorpcijo s čitalcem mikrotitrskih plošč pri 405 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorpcijam IS. Absorpcije uporabljenih IS za aCL so bile standardizirane na vrednosti originalnih KAPS (*Kingston Antiphospholipid study*) standardov (90) in dobljene absorpcije vzorcev pretvorjene v arbitrarne enote.

Spirali smo s pufrano fiziološko raztopino PBS pH (7,2) in vse inkubacije, razen začetne, so potekale na sobni temperaturi (22 do 26°C).

#### 4.1.4 ELISA za določanje protiteles proti $\beta_2$ -GPI (anti- $\beta_2$ -GPI ELISA)

IgG in IgM protitelesa proti človeškemu  $\beta_2$ -GPI smo določali po protokolu, ki ga uporabljamo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma za rutinsko določanje anti- $\beta_2$ GPI (98, 99).

V vdolbinice polistirenskih mikrotitrskih plošč (Costar high binding EIA/RIA plates) smo nanесли po 50  $\mu$ l  $\beta_2$ -GPI [10 mg/L] raztopljenega v PBS pH (7,4) in inkubirali dve uri. Po enkratnem spiranju in otresanju smo nanесли po 50  $\mu$ l ustrezno redčenih monoklonskih protiteles ter vzorcev redčenih 1:100 v 0,05% Tween/PBS pH (7,4). Inkubirali smo 30 minut, plošče štirikrat spirali in otresli. Sekundarna protitelesa (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti človeškim IgG in IgM označena z alkalno fosfatazo) smo redčili v 0,05% Tween/PBS pH (7,4) 1:3000, nanесли smo po 50  $\mu$ l in inkubirali 30 minut. Po štirikratnem spiranju smo plošče otresli in nanесли 100  $\mu$ l substrata para-nitrofenil fosfata v DEA pufru s koncentracijo 1 g/l. Inkubirali smo 5min in merili absorpcijo s čitalcem mikrotitrskih plošč pri 405 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorpcijam IS. Za standarde smo uporabili monoklonska protitelesa (98). Absorpcijam serijsko redčenih standardov smo pripisali arbitrarne enote ter tako pridobili umeritveno krivuljo. Iz nje smo lahko odčitali pripadajoče arbitrarne enote vsakemu vzorcu.

Spirali smo s pufrano fiziološko raztopino 0,05% Tween/PBS pH (7,4) in vse inkubacije so potekale na sobni temperaturi (22 do 26°C).

#### 4.1.5 Kaotropna ELISA za določanje avidnosti protiteles proti protrombinu

Za določitev avidnosti protiteles proti protrombinu smo pri zgoraj opisani aPT-A ELISA metodi v fazi vezave protiteles zagotovili kaotropne pogoje. Vzorce smo redčili v 1% BSA/TBS- $\text{Ca}^{2+}$  pH (7,4) z naraščajočimi koncentracijami NaCl: 0,15; 0,25; 0,5; 1; 2 in 4 M. Vsi ostali pogoji so bili enaki aPT ELISA.

## 4.2 IZDELAVA KOLONE Z VEZANIM PROTROMBINOM

Protrombin smo na aktivirano agarozo vezali po prirejenem postopku proizvajalca agaroze (100). 4g agaroze aktivirane s CNBr smo 30 minut nabrekli s 50 ml 1 mM HCl na sobni temperaturi. Nastali gel smo prenesli v avtoklavirano in na stojalu vpeto Bio-Radovo kolono (1,5x20 cm). Kolono smo sprali najprej z 250 ml 1 mM HCl in spodaj odsesavali z vodno črpalko (povprečni tok 200 ml/h), potem pa še z 12 ml 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M NaCl (pH 8,3). Med tem smo 24 mg liofiliziranega protrombina raztopili v 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8,3) 0,5M NaCl in ga nato nanесли na kolono, jo zaprli in rahlo pretresli. Kolono smo dve uri na sobni temperaturi vrteli diagonalno na vrtalniku, jo nato vpeli v stojalo in s prostim padom odsesavali raztopino nevezanega protrombina. Mesta na nosilcu, ki so ostala nevezana, smo blokirali z 20 ml 0,2 M glicina (pH 8) in raztopino iz kolone prenesli v plastično 50 ml centrifugirno epruveto ter jo vertikalno vrteli na krožilniku preko noči. Naslednji dan smo prelili raztopino gela iz centrifugirne epruvete nazaj v vpeto kolono. Centrifugirno epruveto smo sprali z glicinom in vse ponovno nanесли na kolono, ki smo jo spodaj odsesavali s prostim padom. Kolono smo postavili v hladno sobo na +4°C in spodaj priklopili rotacijsko črpalko. S hitrostjo pretoka 150 ml/h smo odsesali preostalo raztopino glicina iz kolone. Gel v koloni smo 10-krat spirali s po 2-kratnim volumnom kolone (v našem primeru 20 ml) izmenično vezavni pufer/acetatni pufer. Nato smo kolono z gelom

izmenično sprali še s 30 ml pufru A, nato 30 ml pufru B in na koncu še s 30 ml pufru A. Kolono smo konzervirali s 0,02% NaN<sub>3</sub> v pufru A, jo zaprli in vpeto v stojalo shranili na +4°C.

### 4.3 AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

#### 4.3.1 Izolacija IgG protiteles na koloni z vezanim proteinom G

Izolacija IgG na G koloni je potekala po prirejenem postopku proizvajalca (101). Vse pufre smo pred nanosom na kolono filtrirali skozi filter z velikostjo por 20 µm. Tako smo zmanjšali možnost kontaminacije kolon in jim podaljšali rok uporabe. Kolone z vezanim proteinom G smo po izolaciji shranili v hladilnik pri temperaturi 4°C. Eno kolono smo uporabili za 13 izolacij IgG.

- Iz nove kolone smo najprej zlili konzervacijsko raztopino in kolono vpeli v kovinsko stojalo.
- Kolono smo spirali s 5 ml 50 mM acetatnega pufru (pH 5,2) z dodanim NaCl. Pazili smo, da je bila kolona vedno omočena. Tako smo preprečili vdor zraka in tvorbo zračnih mehurčkov v koloni.
- Z acetatnim pufrom smo omočili filter z velikostjo por 45 µm in ga pripravili za filtriranje vzorca.
- Na kolono smo nanegli 1,2 ml mikrobiološko filtriranega vzorca, ki je bil razredčen z enakim volumnom acetatnega pufru.
- Ko je vzorec stekel v kolono, smo kolono izpirali s 5 x 2 ml acetatnega pufru. Pri tem izpiranju dobimo frakcije, ki ne vsebujejo IgG in jih lahko zavržemo.
- Sledilo je izpiranje IgG s 3 x 2 ml 1 M očetne kisline. Frakcije smo lovili v Eppendorf epruvetke do volumna 0,5 ml. Z indikatorskimi pH lističi smo preverjali pH vrednosti zbranih frakcij in jim po potrebi uravnali pH do vrednosti 6-8 z 1 M TRIS bazo.
- Zbranim frakcijam smo izmerili absorpcijo na spektrofotometru pri valovni dolžini 280 nm. Za analizo ozadje smo uporabili acetatni pufer. Frakcije z najvišjimi absorpcijami smo združili.
- Na koncu smo kolono izprali s 5 ml 1 M očetne kisline in jo regenerirali s 5 x 2 ml acetatnega pufru. Kolono smo po končanem delu konzervirali z 0,02-odstotno raztopino natrijevega azida.

#### 4.3.2 Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom

Izolacijo aPT smo izvedli v hladni sobi pri temperaturi 4°C. Uporabili smo predhodno pripravljeno afinitetno kolono, ki ima na stacionarno fazo vezan protrombin. Notranji premer kolone je bil 1,5 cm. S kolono smo delali pazljivo in vzdrževali konstantni tlak črpalke. Pazili smo, da zrak ni prišel v stik s stacionarno fazo kolone.

- Najprej smo pripravili črpalko za črpanje raztopin. Pretok na črpalki smo nastavili na 140-160 ml/h ( $v = 25$  oz.  $2,5 \times 10$ ). Za črpanje tekočin smo uporabili cevko s premerom Ø 3,1 mm.
- Kolono z vezanim protrombinom smo vpeli v stojalo in jo s cevkami povezali s črpalko. Odprli smo ventile na afinitetni koloni in vključili črpalko.
- Kolono smo spirali s 100 ml 136 mM TBS z 0,1%-Tweena 20 (pH 7,4)

- Na kolono smo nanegli mikrobiološko filtriran (0,45  $\mu\text{m}$  filter) vzorec IgG frakcije dializiran v TBS ( $V=15$  ml). Vzorec smo pustili krožiti skozi kolono 90 minut.
- Kolono smo izpirali s 100 ml 136 mM TBS z 0,1%-Tweena 20 (pH=7,4)
- Pripravili smo kolektor z oštevilčenimi epruvetami. Čas zbiranja frakcij smo nastavili tako, da je bila velikost frakcije približno 1 ml.
- Nizko avidna protitelesa smo izpirali s 0,5 M TBS z 0,1% Tweena 20 (pH 7,4). Zbirali smo 30 frakcij. Pretok na črpalki smo nastavili na 120 ml/h ( $v = 20$  oz.  $2,0 \times 10$ ).
- Visoko avidna protitelesa smo izpirali s 4 M NaCl v 0,1M glicinu, pH=2,5 z dodatkom 0,1% Tween 20. Zbirali smo nadaljnjih 30 frakcij. Pretok na črpalki smo nastavili na 120 ml/h ( $v = 20$  oz.  $2,0 \times 10$ ).
- Zbranim frakcijam smo preverili pH z indikatorskimi lističi in pH po potrebi uravnali na vrednosti 6-8 z 1 M TRIS bazo.
- Nato smo frakcijam izmerili absorpcijo pri 280 nm valovne dolžine in jih shranili v hladilniku pri 4°C.
- Kolono smo izpirali s 100 ml 136 mM TBS z 0,1% Tweena 20 (pH 7,4).
- Na koncu smo kolono konzervirali z 0,02-odstotno raztopino natrijevega azida. Zaprli smo vse ventile in kolono shranili pri temperaturi 4°C.

#### 4.4 IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA

##### 4.4.1 Razsoljevanje vzorcev z razsoljevalno kolono

S pomočjo razsoljevalne kolone, ki je bila del proizvajalčevega kompleta za izolacijo IgG, smo zamenjali pufer, v katerem so se nahajale frakcije IgG. Imunoglobuline smo iz kolone z vezanim proteinom G izpirali z očetno kislino in nato nevtralizirali s TRIS bazo.

Izključitvena kromatografija nam je omogočala, da zamenjamo pufer izoliranim frakcijam IgG s takšnim, ki je bil bližje fiziološkemu pogojem.

- Največji volumen vzorca, ki smo ga lahko nanegli na razsoljevalno kolono, je znašal 2 ml. Zato smo vzporedno uporabili dve razsoljevalni koloni. Na vsako smo nanegli polovico vzorca.
- Razsoljevalno kolono smo najprej sprali s 5 x 2 ml 150 mM PBS (pH 7,4)
- Na vsako kolono smo nanegli približno 1,8 ml izoliranih IgG imunoglobulinov.
- Takoj smo lovili frakcije velikosti 1,5 ml.
- Obe koloni smo izpirali s 5 x 1,5 ml 150 mM PBS (pH 7,4).
- Zbranim frakcijam smo izmerili absorpcijo na spektrofotometru pri valovni dolžini 280 nm. Združili smo frakcije z najvišjimi vrednostmi absorpcij.
- Koloni smo regenerirali s 5 x 2 ml 150 mM PBS (pH 7,4).
- Na koncu smo koloni konzervirali z 0,02-odstotno raztopino natrijevega azida in jih shranili v hladilnik pri temperaturi 4°C.
- Združene frakcije pa smo shranili pri temperaturi -80°C.

## 4.5 GOJENJE CELIČNIH LINIJ

### 4.5.1 Precepljanje celičnih linij

Celične linije smo gojili v plastenkah za tkivne kulture v inkubatorju pri pogojih 37°C, 5% atmosferi CO<sub>2</sub> in 100% relativni vlažnosti. Celicam smo na dva do tri dni menjali gojišče v komori z laminarnim pretokom zraka pod aseptičnimi pogoji. Rast in okuženost smo opazovali pod inverznim mikroskopom. Uporabili smo gojišča in rastne faktorje kot jih predpisuje prodajalec (102, 103) in jih vedno predhodno ogreli na 37°C.

Celične kulture smo precepljali ali uporabili za poskus, ko so le-te zasedle 80 do 95% površine plastenke. Pri na podlago pritrjenih celičnih linijah smo iz plastenk z vakuumsko črpalko odstranili staro gojišče in celice sprali s pufrom HBSS. Nato smo HBSS odstranili in celice prekrili z na 37°C ogretim Tripsin/EDTA (1x). V nekaj minutah so se celice odlepili od podlage med tem smo plastenko rahlo potresli. Nevtralizirali smo z ogretim gojiščem in suspenzijo prenesli v 50 ml-centrifugirne epruvete. Ne pritrjene celične smo takoj prenesli v 50 ml centrifugirne epruvete in uporaba Tripsin/EDTA ni bila potrebna. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 218 x g. Z vakuumsko črpalko smo odstranili supernatant in dodali svežo gojišče. Ustrezen volumen celične suspenzije smo nato prenesli v prej pripravljene in segrete plastenke z gojiščem ter jih prenesli v inkubator.

### 4.5.2 Štetje celic

Pred vsako novo nasaditvijo ali poskusom smo celični suspenziji določili število celic. Po centrifugiranju smo celični usedlini dodali 5-10 ml svežega gojišča in celice ponovno suspendirali. Vzeli smo 10 ul celične suspenzije, ki smo ji dodali 10 ul barvila Tripansko modrilo. S hemocitometrom smo prešteli število živih neobarvanih celic. Poškodovane in mrtve celice se zaradi porušene membranske integritete z tripanskim modrilom barvajo modro. Izračunali smo koncentracijo celic v 1 ml in volumen celične suspenzije, ki ga potrebujemo za želeno nasaditveno gostoto ali za poskus.

### 4.5.3 Izvedba poskusa

V posameznih poskusih, izvedenih na mišjih monocitih RAW 264.7, smo spreminjali pogoje in preverjali vplive različnih dejavnikov na vezavo protiteles na površino celic. Po večkratnih ponovitvah smo vzpostavili optimalne pogoje.

Ustrezno število celic (0,8-1 x 10<sup>6</sup> celic) smo prenesli v 6, 12 ali 24-prekatne plošče. Takoj nato smo, v vsak prekat, dodali ustrezno količino Ca<sup>2+</sup> in/ali protrombina in/ali protiteles glede na predhodno določene pogoje poskusa. Po štirih urah inkubacije v pogojih, ki so zagotavljali viabilnost, smo celice postrgali iz posameznih prekatov in jih ločene v 15 ml centrifugirnih epruvetah centrifugirali. Supernatant smo odstranili, celice dvakrat sprali s 1%BSA HBSS 2,5mM CaCl<sub>2</sub> in vmes vsakokrat centrifugirali. Ponovno suspendirane celice smo inkubirali s sekundarnimi protitelesi (afinitetno prečiščena oslova protitelesa, usmerjena proti mišjim/humanim IgG konjugirana s fluoresceinom) 30 min in jih nato dvakrat sprali s 1%BSA HBSS 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> in vmesnim centrifugiranjem. Na koncu smo v 1% BSA HBSS 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> ponovno suspendiranih celičnih suspenzijah merili vezavo protiteles na površino celic s pretočnim citometrom najkasneje po dveh urah.

#### 4.6 PRETOČNA CITOMETRIJA

Vezavo aPT na površino celice smo določili po metodi indirektne imunofluorescence s fluorescenčno označenimi komercialno dostopnimi sekundarnimi protitelesi, ki specifično prepoznajo mišje ali pa humane IgG. Vezavo smo merili na pretočnem citometru.

#### 4.7 TERMINOLOGIJA

Nekatera novejša spoznanja so ovrgla teorije o antifosfolipidnih protitelesih, ki so veljale predhodno. Tako so za antifosfolipidna protitelesa so prvotno menili (104), da so specifična za anionske in nevtralne fosfolipide, odtod tudi njihovo poimenovanje. Kasnejše študije so razodele serološko heterogenost antifosfolipidnih protiteles. Med njimi so imunoglobulini, ki vežejo negativno nabite fosfolipide ali fosfolipidno proteinske komplekse, ali pa so specifična za določene plazemske proteine (10). Terminologija antifosfolipidnih protiteles je ostala zavajajoča in se ni spreminjala v skladu z novimi spoznanji. Še več, veliko avtorjev se poslužuje svojih internih oznak, kajti do danes še ni bilo sprejete direktive, ki bi uredila to področje.

Enako kot za ostala antifosfolipidna protitelesa, tudi poimenovanje protiteles proti protrombinu v literaturi ni enotno. V magistrskem delu smo uporabili poimenovanje, ki najbolj ponazori značilnost določene skupine protiteles in katerega so v zadnjih nekaj letih največkrat uporabili drugi avtorji. Celotno skupino protiteles proti protrombinu smo označili z aPT. Ta skupina se arbitrarno, na osnovi različnih izvedb ELISA, deli na aPT-A (antiprotrombinska protitelesa usmerjena proti protrombinu vezanem na ploščah z visoko afiniteto vezave) in na aPS/PT (od fosfatidilserina odvisna antiprotrombinska protitelesa). Z aPS smo poimenovali protitelesa, ki se vežejo neposredno na fosfatidilserin in s protrombinom tekmujejo za vezavno mesto na fosfatidilserinu.

#### 4.8 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Vse dobljene rezultate smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Office Excel 2003 ali SPSS 15,0. Delež linearne povezanosti med nivoji aPT in aPS/PT smo določili s Spearmanovim koeficientom korelacije rangov. Razliko v srednjih vrednostih smo analizirali s testom Mann-Whitney. Relativno tveganje smo ocenili z razmerji obetov in njim pripadajočimi 95% intervali zaupanja (OR [95%]). Verjetnosti so bile statistično značilne, kadar je bila  $p < 0,05$ .

#### 4.9 OBDELAVA REZULTATOV aPS/PT ELISA

Pri merjenju absorpcije vsakega vzorca v [mOD] smo morali upoštevati tudi absorpcijo, ki jo izmerimo v slepi vdolbinici brez prisotnosti protrombina. V tej vdolbinici določamo aPS, ki niso značilna za APS in motijo odčitek aPS/PT v vzorčni vdolbinici s prisotnim protrombinom. Vsakemu vzorcu smo zato izmerili absorpcijo vzorčne in slepe vdolbinice ter meritev obeh upoštevali za končni rezultat, kar je natančneje opisano v poglavju opredelitev praznih vrednosti pri rezultatih.

Vzorec: vsi reagenti + antigen + serum  
Slepi vzorec: vsi reagenti + 0 + serum

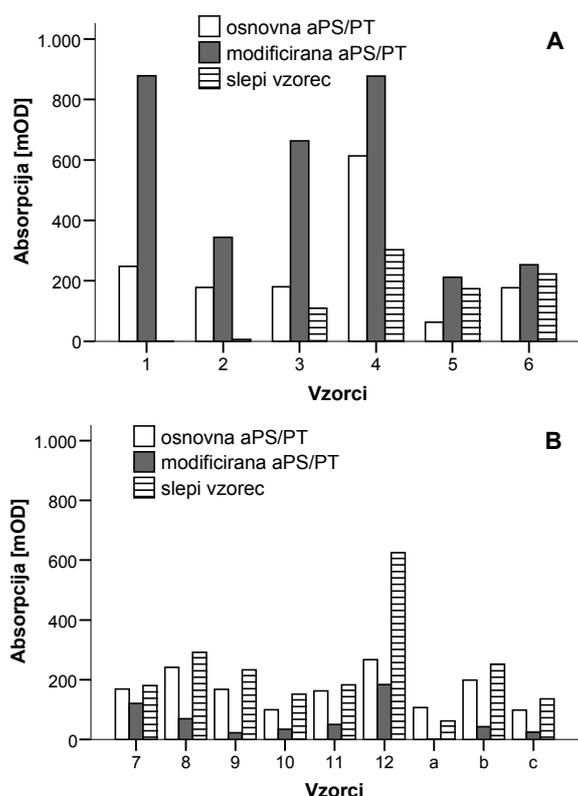
## 5 REZULTATI

### 5.1 DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU *IN VITRO*

#### 5.1.1 Kvalitativna primerjava dveh izvedb aPS/PT ELISA

Osnovno in modificirano metodo aPS/PT ELISA smo hkrati izvedli na eni mikrotitrski plošči. Pri osnovni metodi smo ločeno eno uro inkubirali protrombin in po spiranju še eno uro vzorce. Pri modificirani metodi pa smo podaljšali inkubacijo blokade za eno uro in v naslednji uri skupaj inkubirali PT in vzorce. Skupaj smo testirali 12 naključno izbranih bolnikov s SLE in/ali APS in 3 krvodajalce. Koncentracija antigena v poskusu je bila konstantna 10 mg/L, vzorci pa so bili redčeni 1:100. Določali smo imunoglobuline razreda IgG.

Pri nekaterih serumih, ki smo jih kasneje definirali za pozitivne, smo izmerili najvišje vrednosti absorpcije po modificirani metodi. Vrednosti izmerjene po osnovni metodi so pri teh serumih precej nižje, najnižje so vrednosti slepih vzorcev (slika 6A). Pri drugih serumih pa smo z modificirano metodo izmerili najnižje vrednosti, najvišje pa so bile absorpcije slepih vzorcev (slika 6B). V tej skupini, so skupaj s tremi krvodajalci, glede na kasneje določene prazne vrednosti, vzorci negativni.

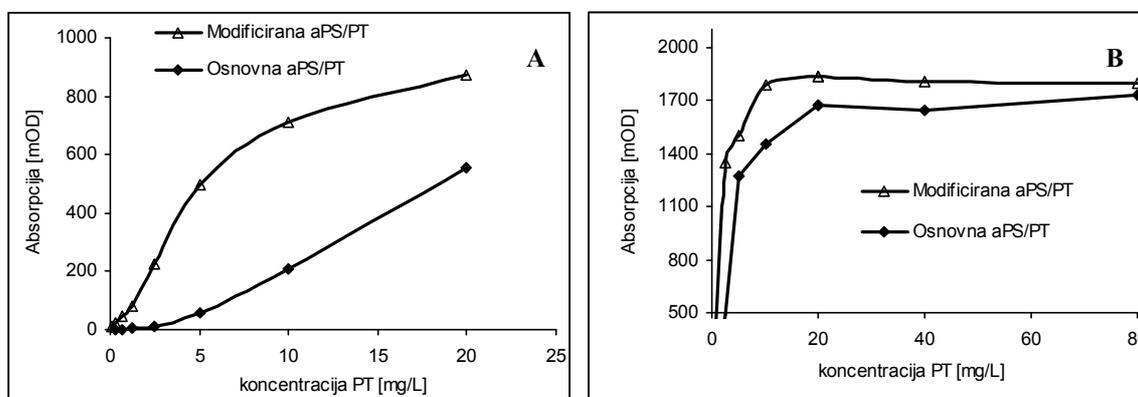


Slika 6: Primerjava osnovne in modificirane izvedbe aPS/PT ELISA pri 12 preiskovanih serumih bolnikov (1-12) in treh krvodajalcih (a-c). Vzorci smo razdelili v pozitivno (A) in negativno (B) skupino, glede na kasneje določene prazne vrednosti.

### 5.1.2 Kvantitativna primerjava dveh izvedb aPS/PT ELISA

Na eni mikrotitrski plošči smo izvedli obe metodi hkrati z visoko pozitivnim serumom, redčenim 1:100. Spreminjali smo koncentracijo antigena, da bi ugotovili optimalno koncentracijo antigena pri obeh izvedbah aPS/PT ELISA. Določali smo imunoglobuline razreda IgG. Koncentracije antigena so bile naslednje: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0 mg/L (slika 7A) in 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0 mg/L (slika 7B).

Absorpcije izmerjene pri določeni koncentraciji protrombina so pri modificirani metodi primerljive z absorpcijami osnovne metode pri štirikrat višjih koncentracijah protrombina. Iz slike 7 je tudi razvidno, da smo pri koncentraciji protrombina 10 mg/L pri modificirani metodi že na platoju krivulje in se meritve v mOD, kljub nanosu višjih koncentracij protrombina, ne spremenijo več bistveno. Pri osnovni metodi je pri isti koncentraciji protrombina krivulja še vedno na strmem delu, zato lahko majhna nihanja v koncentraciji protrombina v tem delu krivulje močneje vplivajo na meritve absorpcije.

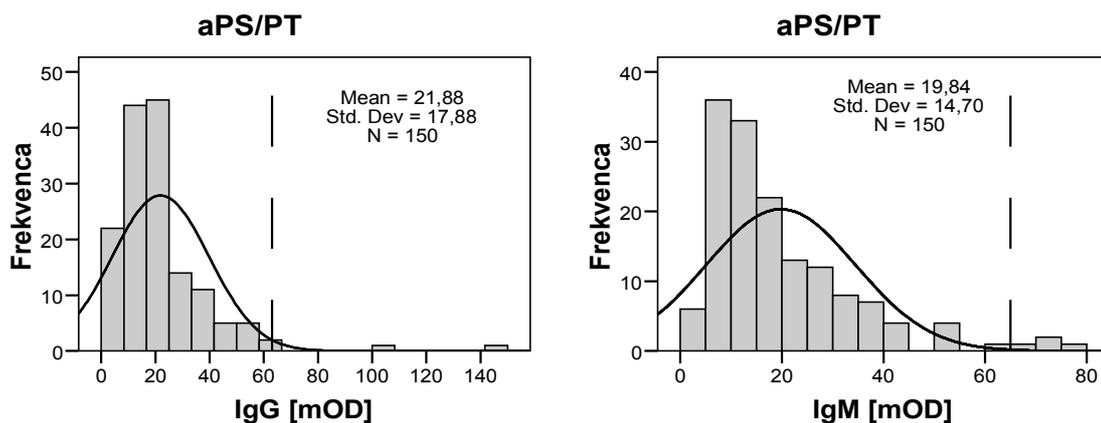


Slika 7: Primerjava osnovne in modificirane izvedbe aPS/PT ELISA pri različnih koncentracijah protrombina. Koncentracije protrombina (A): 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0 mg/L in (B): 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0 mg/L.

### 5.1.3 Opredelitev praznih vrednosti pri aPS/PT ELISA in aPT-A ELISA

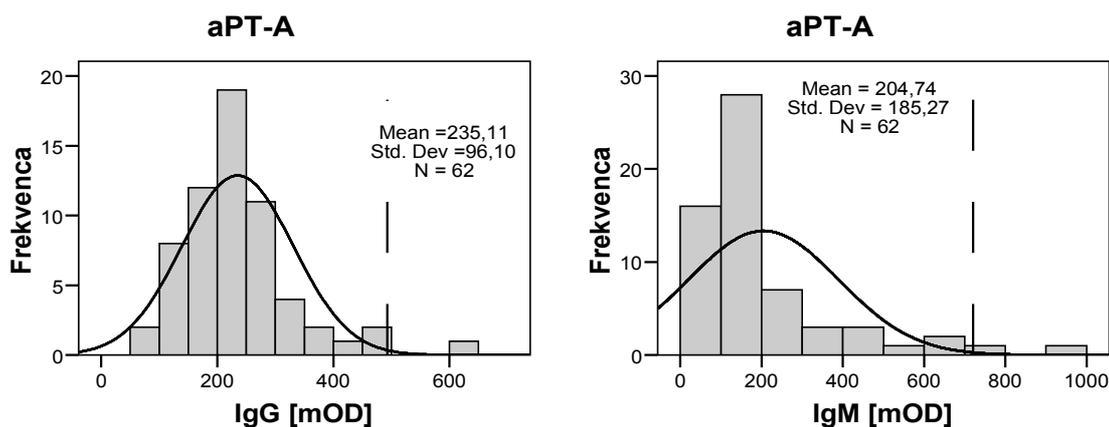
Pražne vrednosti za IgG in IgM aPS/PT smo določili na osnovi izmerjenih absorpcij pri skupini 150 krvodajalcev in na osnovi njihove frekvenčne porazdelitve. Pri vsaki analizi smo meritev umerili na IS, ki smo ga serijsko redčili. IS so omogočili tudi izdelavo umeritvene krivulje in preračun izmerjenih absorpcij v arbitrarne enote.

Za prazno vrednost smo izbrali 98 percentil frekvenčne porazdelitve, ker izmerjena absorpcija pri krvodajalcih ni bila normalno porazdeljena (slika 8). Pražne vrednosti aPS/PT sta bili 63 mOD in 65 mOD za IgG in IgM, oziroma 4,15 in 4,55 arbitrarnih enot. Vzorci z rezultatom višjim od te vrednosti so bili pozitivni ob pogoju, da so vrednosti vzorčne vdolbinice s prisotnim protrombinom (aPS/PT) presegle vrednosti izmerjene v slepi vdolbinici brez prisotnosti protrombina (aPS). Vsi krvodajalci so imeli višje izmerjene vrednosti aPS in nižje aPS/PT in so zato bili negativni.



Slika 8: Porazdelitev izmerjenih absorpcija IgG in IgM aPS/PT v mOD pri skupini 150 krvodajalcev. Prekinjena črta predstavlja pražno vrednost.

Pražno vrednost aPT-A smo določili na skupini 62 krvodajalcev. Absorpcije niso bile normalno porazdeljene (slika 9). Za pražno vrednost izbran 98 percentil je bil pri IgG 493 mOD in 721 mOD pri IgM.



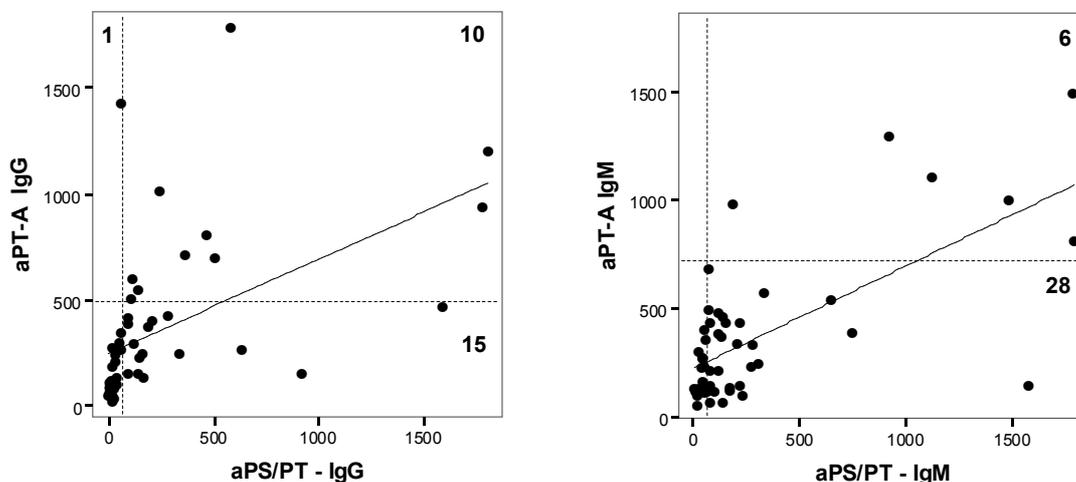
Slika 9: Porazdelitev izmerjenih absorpcija IgG in IgM aPT-A v mOD pri skupini 62 krvodajalcev. Prekinjena črta predstavlja pražno vrednost.

#### 5.1.4 Primerjava aPS/PT ELISA z aPT-A ELISA

Primerjali smo izmerjene absorpcije pri aPS/PT ELISA z absorpcijami pri aPT-A ločeno za IgG in IgM izotip protiteles v skupini 50 naključno izbranih bolnikov s SLE in/ali APS. Odnos med obema metodama je prikazan na sliki 10. Mero povezanosti med obema meritvama smo določili s Spearmanovim testom korelacije.

Primerjava rezultatov po obeh metodah je pokazala visoko mero povezanosti s Spearmanovim koeficientom korelacije rangov  $r_o=0,773$  z verjetnostjo  $p<0,001$  za IgG ter  $r_o=0,51$  in  $p<0,001$  za IgM. Pri velikem deležu bolnikov smo izmerili pozitivne rezultate s samo eno od obeh metod; pri IgG (32%) in IgM (56%). Znotraj tega deleža je samo en

bolnik imel pozitivna aPT-A in negativna aPS/PT (samo IgG izotip), medtem ko so vsi ostali imeli obraten rezultat (pozitivna aPS/PT in negativna aPT-A).

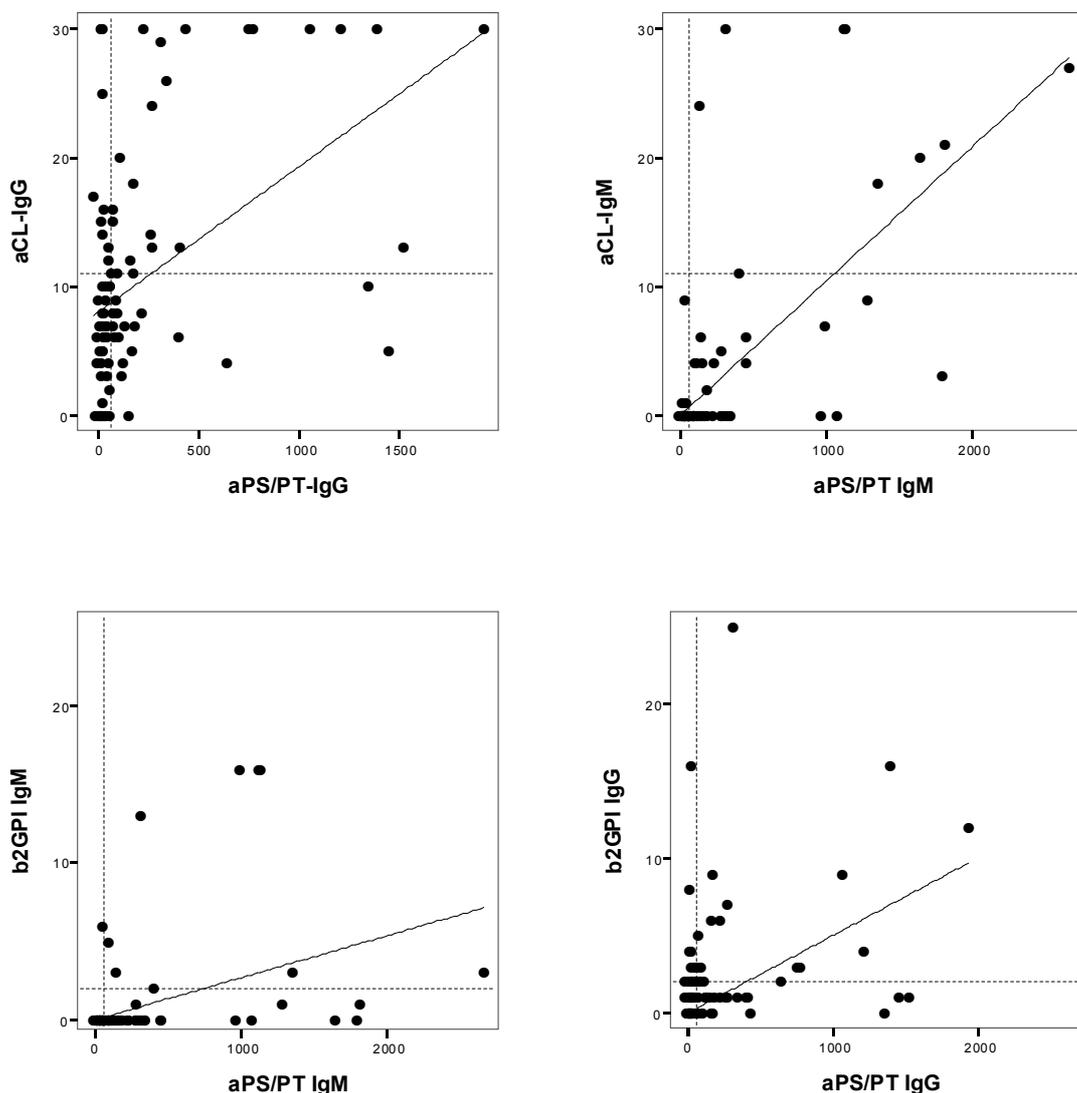


Slika 10: Korelacija med višino aPS/PT in aPT ločeno za IgG in IgM izotip protiteles pri skupini 50 bolnikov s SLE in/ali APS. Osi predstavljajo absorpcije [mOD], črtkane linije pa prazne vrednosti (98 percentila).

### 5.1.5 Primerjava aPS/PT, aCL in anti- $\beta_2$ GPI ELISA

Mero povezanosti med višino aPS/PT in aCL ter med višino aPS/PT in anti- $\beta_2$ GPI pri istem bolniku smo določili s Spearmanovim testom korelacije.

Test je pokazal nizko mero povezanosti med višino aPS/PT in aCL ( $r_o=0,469$ ;  $p<0,001$  za IgG in  $r_o=0,520$ ;  $p<0,001$  za IgM) ter med aPS/PT in anti- $\beta_2$ GPI ( $r_o=0,367$ ;  $p<0,001$  za IgG in  $r_o=0,428$ ;  $p<0,001$  za IgM) pri skupini 98 bolnikov s SLE in/ali APS. Velik delež bolnikov je imel pozitivne vrednosti izmerjene samo v eni metodi pri obeh izotipih protiteles (slika 11).



Slika 11: Korelacija med višino aPS/PT in aCL ter aPS/PT in anti- $\beta_2$ GPI ločeno za IgG in IgM izotip protiteles pri skupini 98 bolnikov s SLE in/ali APS. Osi predstavljajo absorpcije [mOD], črtkane linije pa prazne vrednosti.

V skupini 98 bolnikov je 14 (14,3%) bolnikov imelo pozitivna samo aPS/PT, medtem ko so imeli tako aCL kot anti- $\beta_2$ GPI negativna. Med njimi jih je 7 doživelo vensko ali arterijsko trombozo ena bolnica pa je imela eno ali večkratno izgubo plodu v nosečnosti.

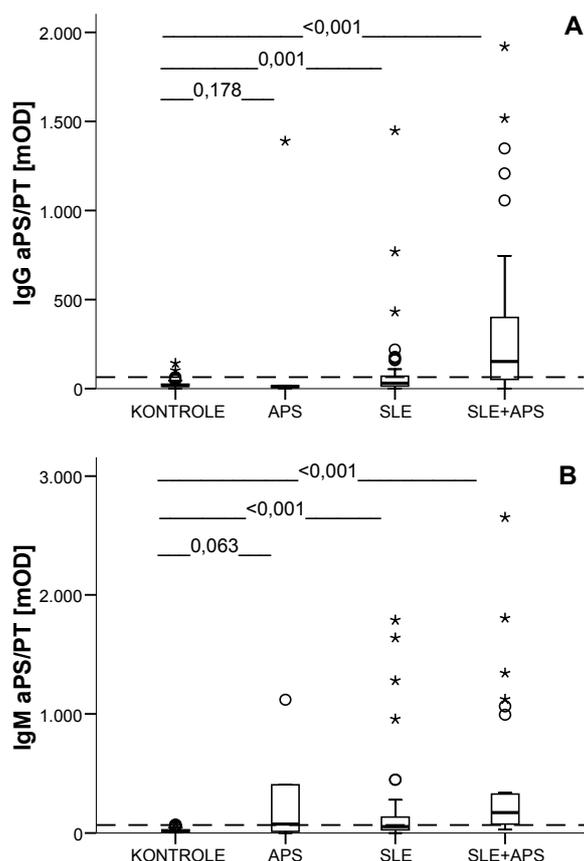
### 5.1.6 Prevalenca aPS/PT

aPS/PT so bili pozitivna pri 44 od 98 (45%) bolnikov s SLE in/ali APS. Štirje (4,1%) so imeli samo IgG izotip in 22 (22,5%) jih je imelo samo IgM izotip protiteles. Pri 18 bolnikih (18,4%) sta bila oba izotipa povišana. Nihče od kontrolnih vzorcev krvodajalcev ni bil pozitiven (n=150) Prevalenca aPS/PT pri posamezni skupini bolnikov je prikazana na sliki 12.

Pri skupini bolnikov s SLE in/ali APS so statistično pogosteje pozitivna aPS/PT v primerjavi s kontrolno skupino (OR 121.4 [95%CI 16.3-902.9],  $p < 0.001$ ). Statistično pomembna razlika je bila dokazana tudi ločeno za IgG (OR 43.132 [95%CI 5.7-326.1],  $p < 0.001$ ) in IgM (OR 102.3 [95%CI 13.8-764.9],  $p < 0.001$ ) izotip protiteles.

Absorpcije, izmerjene z aPS/PT ELISA, so bile statistično značilno višje pri bolnikih s SLE in/ali APS v primerjavi s krvodajalci ( $190 \pm 377$  mOD proti  $22 \pm 18$  mOD;  $p < 0,001$  za IgG in  $255 \pm 462$  mOD proti  $20 \pm 15$  mOD;  $p < 0,001$  za IgM). Skupini bolnikov s SLE in SLE+APS sta imeli statistično značilno višje izmerjene absorpcije v primerjavi s krvodajalci ( $p < 0,001$  oba izotipa protiteles), medtem ko se skupina bolnikov z APS ni razlikovala od skupine krvodajalcev ( $p = 0,178$  za IgG in  $p = 0,063$  za IgM) (slika 12).

Znotraj skupine bolnikov s SLE in/ali APS jih je 43 doživelo arterijsko ali vensko trombozo. Pri slednjih so bili nivoji aPS/PT statistično značilno povišani v primerjavi s skupino, ki tromboz ni doživela ( $317 \pm 490$  mOD proti  $122 \pm 283$  mOD;  $p = 0,011$  za IgG in  $398 \pm 586$  mOD proti  $180 \pm 365$  mOD;  $p < 0,001$  za IgM).



Slika 12: Prevalenca aPS/PT pri skupinah bolnikov s sistemskimi avtoimunimi boleznimi in kontrolni skupini zdravih krvodajalcev. Rezultati aPS/PT ELISA v [mOD] so prikazani ločeno za IgG (A) in IgM (B) izotip protiteles. Prekinjena črta prikazuje prazno vrednost,  $\circ$  so osamelci in  $*$  ekstremne vrednosti. Razlike v srednjih vrednostih med posameznimi skupinami preiskovancev so izračunane s testom Mann Whitney in na grafu prikazane kot verjetnosti (p).

### 5.1.7 Klinični pomen aPS/PT v primerjavi z aCL in anti- $\beta_2$ GPI

Vsakemu preiskovanemu serumu smo poleg aPS/PT izmerili tudi aCL in anti- $\beta_2$ GPI za oba izotipa IgG in IgM protiteles. aPS/PT so bila pozitivna pri 45%, aCL pri 33%, anti- $\beta_2$ GPI pa pri 31% bolnikov s SLE in/ali APS.

Klinični pomen posameznih protiteles je prikazan v preglednici 3. aPS/PT so bila statistično značilno višja pri bolnikih z arterijsko trombozo in z značilno višjim razmerjem obetov (OR=8,17) v primerjavi z razmerjem obetov pri aCL (OR=4,94) ali anti- $\beta_2$ GPI (OR=3,57). Nobena skupina protiteles ni bila statistično značilno povišana pri venskih trombozah, izgubah plodu in trombocitopeniji. aPS/PT so bila v obravnavani skupini bolnikov diagnostično najbolj občutljiva za vse klinične znake APS, vendar pa je njihova specifičnost nižja v primerjavi z aCL in anti- $\beta_2$ GPI.

**Preglednica 3: Multivariantna logistična analiza; pojavnost aPS/PT, aCL in anti- $\beta_2$ GPI pri APS in pri posameznih kliničnih motnjah značilnih za APS (arterijske in venske tromboze, izguba ploda, trombocitopenija) (OR- razmerje obetov; IZ-interval zaupanja)**

	APS*		p	OR	95% IZ	Občutljivost %	Specifičnost %	
	-	+						
aPS/PT	-	46	8	0,000	9,12	4,61-32,93	78,9%	76,7%
	+	14	30					
aCL	-	51	15	0,000	8,69	3,32-22,74	60,5%	85,0%
	+	9	23					
anti- $\beta_2$ GPI	-	50	18	0,000	5,56	2,19-14,09	52,6%	83,3%
	+	10	20					

	Arterijska tromboza		p	OR	95% IZ	Občutljivost %	Specifičnost %	
	-	+						
aPS/PT	-	49	5	0,000	8,17	2,73-24,41	80,0%	67,1%
	+	24	20					
aCL	-	56	10	0,001	4,94	1,88-12,99	60,0%	76,7%
	+	17	15					
anti- $\beta_2$ GPI	-	56	12	0,009	3,57	1,37-9,26	52,0%	76,7%
	+	17	13					

	Venska tromboza		p	OR	95% IZ	Občutljivost %	Specifičnost %	
	-	+						
aPS/PT	-	51	3	0,062	3,78	0,94-15,23	72,7%	58,6%
	+	36	8					
aCL	-	61	5	0,111	2,82	0,79-10,05	54,5%	70,1%
	+	26	6					
anti- $\beta_2$ GPI	-	63	5	0,078	3,15	0,88-11,29	54,5%	72,4%
	+	24	6					

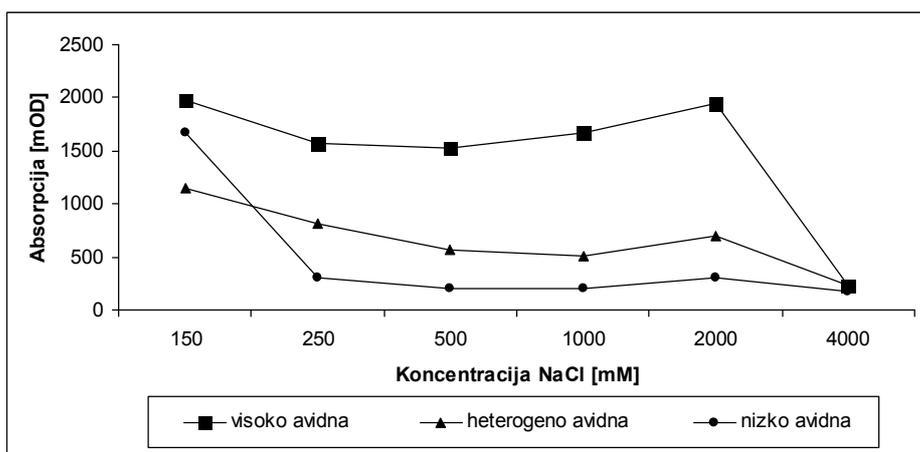
	Izguba plodu		p	OR	95% IZ	Občutljivost %	Specifičnost %	
	-	+						
aPS/PT	-	51	3	0,106	3,22	0,78-13,27	70,0%	58,0%
	+	37	7					
aCL	-	61	5	0,226	2,26	0,60-8,46	50,0%	69,3%
	+	27	5					
anti- $\beta_2$ GPI	-	64	4	0,044	4,00	1,04-15,42	60,0%	72,7%
	+	24	6					

	Trombocitopenija		p	OR	95% IZ	Občutljivost %	Specifičnost %	
	-	+						
aPS/PT	-	47	7	0,477	1,49	0,50-4,50	53,3%	56,6%
	+	36	8					
aCL	-	56	10	0,951	1,04	0,32-3,33	33,3%	67,5%
	+	27	5					
anti- $\beta_2$ GPI	-	59	9	0,394	1,64	0,53-5,12	40,0%	71,1%
	+	24	6					

\*Diagnoza antifosfolipidni sindrom APS je bila postavljena glede na priporočene kriterije klasifikacije (8).

### 5.1.8 Avidnost protiteles proti protrombinu

Avidnost posameznega vzorca smo določili arbitrarno. Vezava, izmerjena pri fizioloških pogojih (0,15 mM NaCl), je veljala za 100% vezavo nekega vzorca. Vezavo, izmerjeno pri 0,5 mM NaCl, smo primerjali z vezavo pri fizioloških pogojih in vzorce uvrstili v visoko, heterogeno ali nizko avidne skupine (slika 13). Vzorca so vsebovali visoko avidna protitelesa, če smo pri 0,5 mM NaCl izmerili več kot 70% vezave, izmerjene pri fizioloških pogojih. Nizko avidna protitelesa so imeli vzorca, pri katerih smo pri 0,5 mM NaCl izmerili manj kot 25% vezave izmerjene pri fizioloških pogojih. Ostali vzorca so imeli heterogeno avidna protitelesa. S kaotropno aPT ELISA smo testirali 10 bolnikov s SLE in/ali APS, ki so imeli povišana protitelesa proti protrombinu.



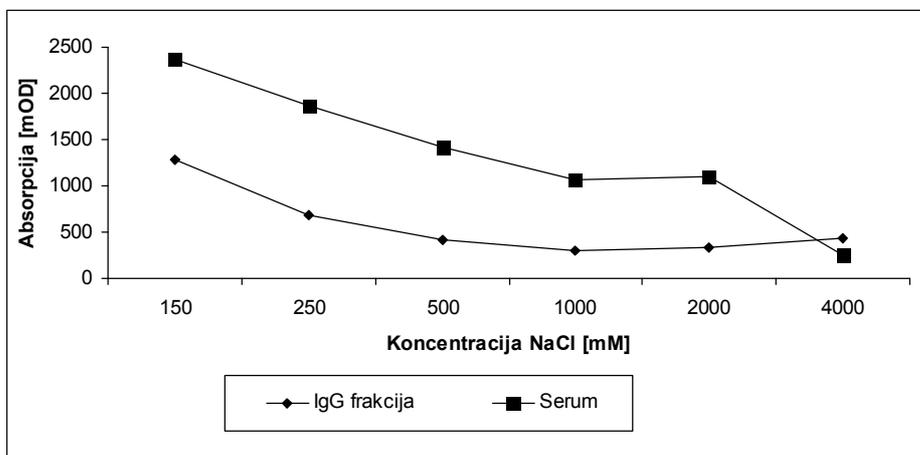
Slika 13: Primer visoko, heterogeno in nizko avidnih protiteles proti protrombinu.

V testirani skupini bolnikov je eden imel visoko avidna protitelesa proti protrombinu, 5 jih je imelo heterogeno avidna in 4 so imeli nizko avidna protitelesa proti protrombinu. Skupina vzorcev z visoko in heterogeno avidnimi protitelesi je pripadala pretežno bolnikom z APS (4 od 6). V skupini z nizko avidnimi protitelesi nihče ni imel APS, prevladovali so bolniki s SLE + APS (preglednica 4).

Preglednica 4: Pojavnost različno avidnih protiteles proti protrombinu pri določeni skupini bolnikov

	APS	SLE+APS	SLE
Visoko avidna (1)	1	0	0
Hetero avidna (5)	3	1	1
Nizko avidna (4)	0	3	1

Vpliv medija smo preverili tako, da smo serum in izolirano IgG frakcijo iz istega vzorca krvi testirali hkrati s kaotropnim testom. Izmerili smo primerljive rezultate pri obeh; krivulji na sliki 14 sta paralelni, razen pri najvišji koncentraciji NaCl (4M), kjer se skleneta. Krivulja izolirane IgG frakcije teče pri nižjih vrednostih.



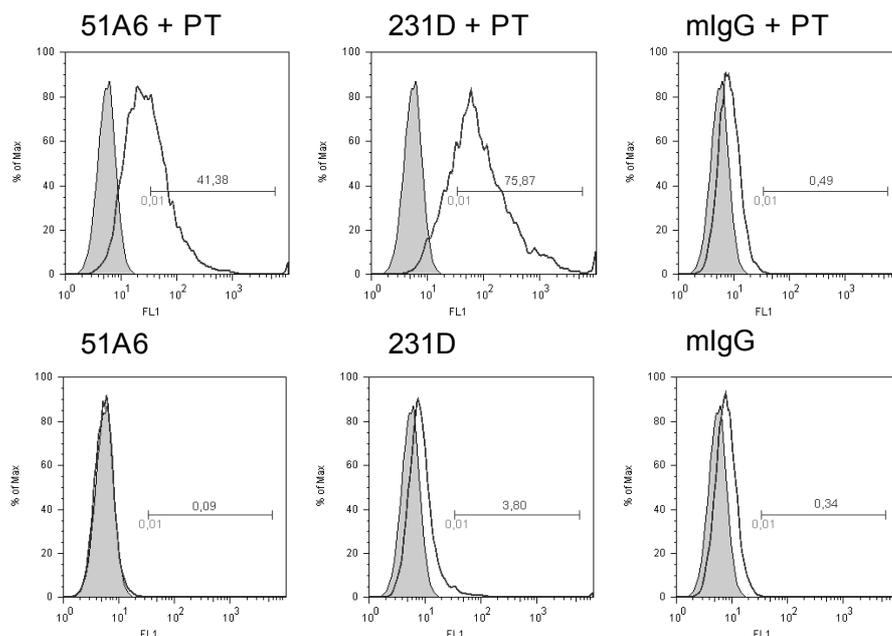
Slika 14: Vpliv medija na avidnost protiteles proti protrombinu.

## 5.2 VEZAVA PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO CELIC

Vezavo monoklonskih protiteles proti protrombinu in iz serumov bolnikov izoliranih poliklonskih protiteles proti protrombinu smo merili s pretočnim citometrom na različnih celičnih linijah. Vse poskuse smo zaradi variabilnosti bioloških sistemov ponovili vsaj trikrat in tako zadostili kriterijem nadzora ponovljivosti. Preverili smo več spremenljivk in ob zagotovitvi optimalnih pogojev pokazali vezavo protiteles proti protrombinu na površino viabilnih celic.

Optimalne pogoje vezave smo iskali najprej na mišji monocitni celični linij RAW264.7 z mišjimi monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti protrombinu; 51A6 in 231D ter s kontrolnimi IgG protitelesi izoliranimi iz zdrave miši (mIgG). Vezavo ozadja smo izmerili v vzorcu, kjer ni bilo prisotnih protiteles.

Obe aPT monoklonski protitelesi sta se vezali na površino celic samo ob prisotnosti protrombina (Slika 15). Protitelesa 231D so se vezala na 75,9%, protitelesa 51A6 na 45,4%, medtem ko so se kontrolni mišji IgG vezali na manj kot 0,5% celic v vzorcu. Protitelesa 231D, ki imajo lastnosti aPS/PT, so se vezala intenzivneje kot 51A6, ki imajo lastnosti aPT-A.

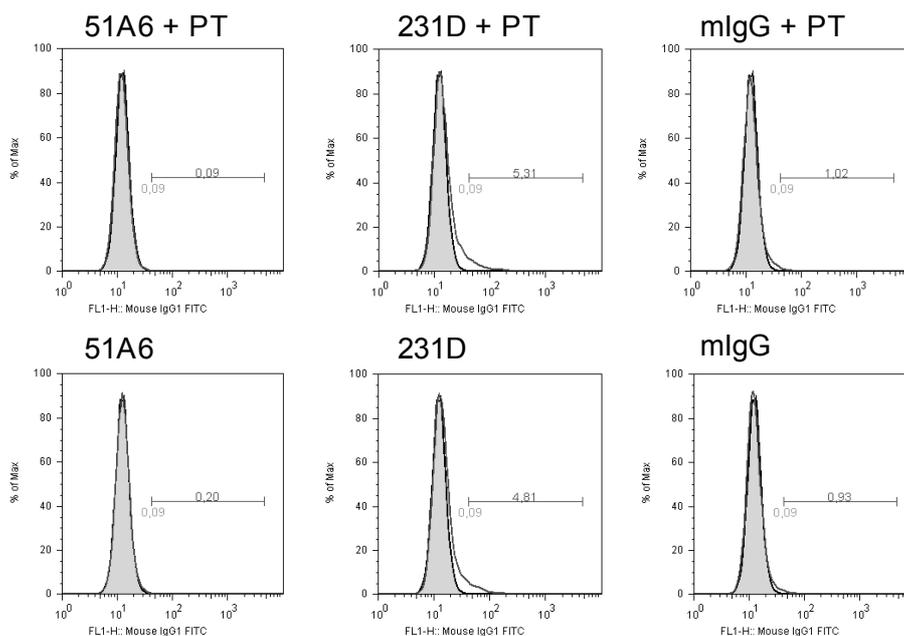


Slika 15: Vezava monoklonskih protiteles 51A6 in 231D ter kontrolne mišje IgG frakcije na površino monocitov RAW264.7 ob prisotnosti/odsotnosti protrombina (PT). Abscisa predstavlja intenziteto fluorescenco, ordinata pa delež prešteti celic. Ob horizontalni črti vsakega grafa so prikazani deleži celic v posameznem vzorcu, ki so vezala protitelesa. Kontrolno fluorescenco (polni graf) smo izmerili v vzorcu brez prisotnih protiteles.

### 5.2.1 Vpliv lipopolisaharida

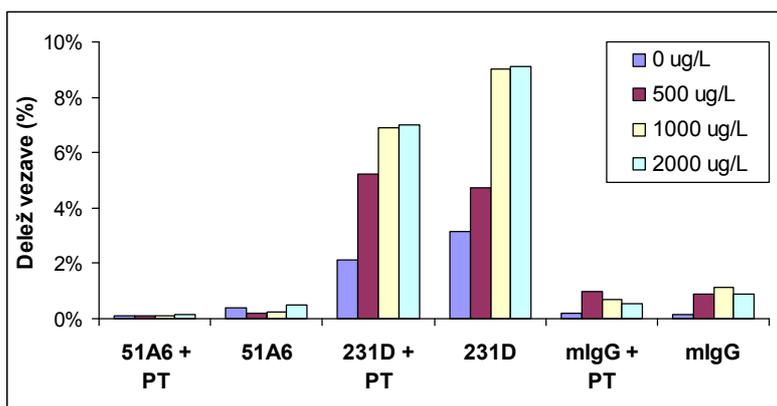
V enem izmed poskusov smo celice preko noči stimulirali z lipopolisaharidom (LPS) in jih naslednji inkubirali 4 ure s protitelesi in protrombinom ob prisotnosti fiziološke koncentracije  $Ca^{2+}$ , ter merili vezavo protiteles na površino celic. Poskus smo naredili na monocitih RAW264.7 z monoklonskimi protitelesi 51A6 in 231D ter s kontrolnimi mišjimi IgG.

Ugotovili smo, da LPS ni ustrezno aktiviral celic, saj so se vsa tri protitelesa vezala minimalno, na manj kot 5,3% celic (slika 16). Koncentracija LPS je bila konstantna 500  $\mu\text{g/L}$ .



Slika 16: Vezava monoklonskih aPT 51A6 in 231D ter kontrolne miške IgG frakcije (mIgG) na površino monocitov RAW264.7 ob prisotnosti/odsotnosti protrombina (PT). Abscisa predstavlja intenziteto fluorescence, ordinata pa delež prešteti celic. Celice so bile preko noči stimulirane s 500  $\mu\text{g/L}$  LPS. Ob horizontalni črti vsakega grafa so prikazani deleži celic v posameznem vzorcu, ki so vezala protitelesa. Kontrolno fluorescence (polni graf) smo izmerili v vzorcu brez prisotnih protiteles.

Preverili smo tudi vpliv višjih koncentracij LPS na stimulacijo monocitov RAW264.7 in posledično vezavo protiteles na njihovo površino. Višje koncentracije LPS so močnejše stimulirale monocite, vendar je bila vezava protiteles šibka, največ 9,1% celic je vezalo protitelesa. Poleg tega pa je bila vezava celo intenzivnejša v odsotnosti protrombina.

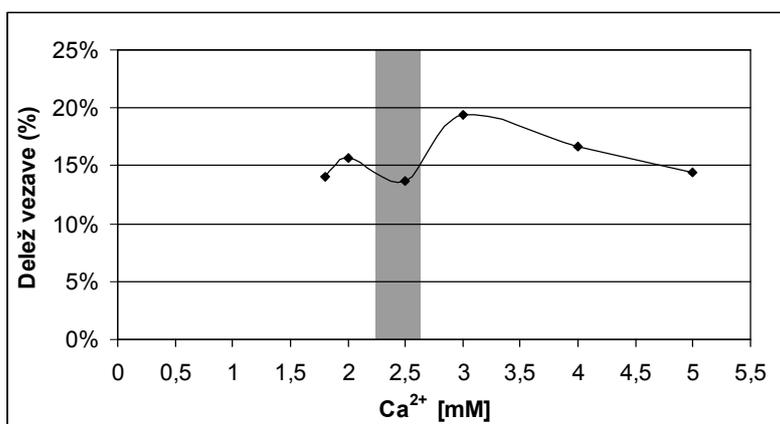


Slika 17: Vezava monoklonskih aPT 51A6 in 231D ter kontrolne miške IgG frakcije na površino monocitov RAW264.7 ob prisotnosti/odsotnosti protrombina (PT). Celice so bile preko noči stimulirane z različnimi koncentracijami lipopolisaharida (0, 500, 1000, 2000  $\mu\text{g/L}$ ).

### 5.2.2 Vpliv kalcijevih ionov

Monocite RAW264.7 smo 2 uri inkubirali s protrombinom in monoklonskimi protitelesi 51A6 ob prisotnosti različnih koncentracij  $\text{Ca}^{2+}$ . Na ta način smo preverjali vpliv koncentracije kalcijevih ionov na aktivacijo celic in posledično vezavo protiteles na površino celic.

Na sliki 18 je prikazan delež vezave protiteles 51A6 ob prisotnosti protrombina pri različnih koncentracijah  $\text{Ca}^{2+}$ . Vezava protiteles je bila najnižja v fizioloških koncentracijah  $\text{Ca}^{2+}$  2,2-2,6 mM. Pri višji ali nižji koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  smo izmerili višji delež celic, ki so vezala protitelesa 51A6. Največ, to je 19,4% celic, je vezalo protitelesa 51A6 pri koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  3 mM, katero smo uporabili tudi v vseh nadaljnjih poskusih.

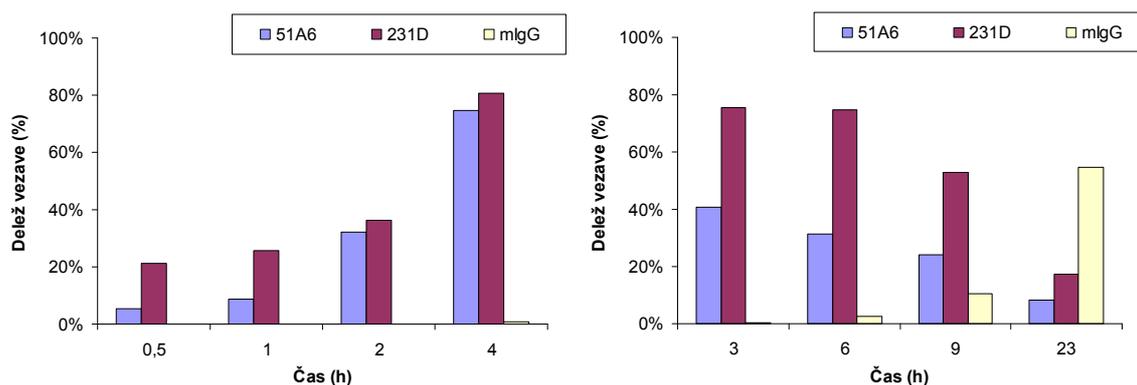


Slika 18: Vezava monoklonskih aPT 51A6 na površino mišjih monocitov RAW264.7 ob prisotnosti protrombina pri različnih koncentracijah kalcijevih ionov. Zasenčeno območje na grafu prikazuje fiziološko koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  (2,2-2,6 mM) (105).

### 5.2.3 Vpliv časa inkubacije celic s protrombinom in protitelesi

Celice RAW264.7 smo ob prisotnosti kalcijevih ionov različno dolgo inkubirali s protrombinom in monoklonskimi aPT oziroma mišjimi IgG. Na slika 19 sta prikazana dva ločeno izvedena poskusa z različnimi časi inkubacije.

Obe monoklonski aPT sta se vezali na površino celic najbolj po 3-4 urah inkubacije. S podaljševanjem časa inkubacije, se je vezava monoklonskih protiteles nižala, medtem ko se je vezava kontrolnih mišjih IgG večala. V vseh nadaljnjih poskusih smo celice inkubirali 4 ure.

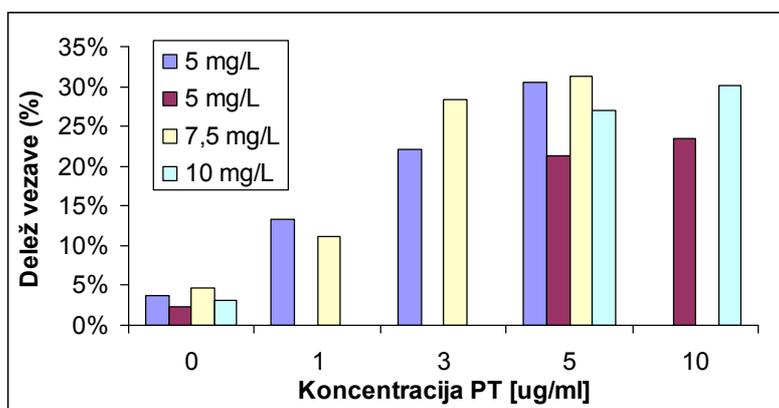


Slika 19: Vezava monoklonskih aPT 51A6 in 231D ter kontrolne IgG frakcije zdrave miši na površino mišjih monocitov RAW264.7 ob prisotnosti protrombina in  $Ca^{2+}$  pri različnih časih inkubacije. Grafa predstavljata dva ločeno izvedena poskusa.

### 5.2.4 Vpliv koncentracije protrombina in protiteles

V več različnih poskusih smo preverili, pri kateri koncentraciji protrombina in monoklonskih aPT 231D, ki so v predhodnih poskusih pokazalo največjo kapaciteto vezave, izmerimo najvišjo vezavo na površino celic.

Pri koncentraciji protrombina 5 mg/L smo dosegli maksimalno vezavo 231D v koncentraciji 7,5 mg/L in te koncentracije smo uporabili v vseh nadaljnjih poskusih. Na sliki 20 posamezni stolpci prikazujejo vezavo različnih koncentracij 231D monoklonskih aPT pri določeni koncentraciji protrombina. Podatki so zbrani iz več zaporedno ponovljenih poskusov in nekatere koncentracije so bile večkrat ponovljene.



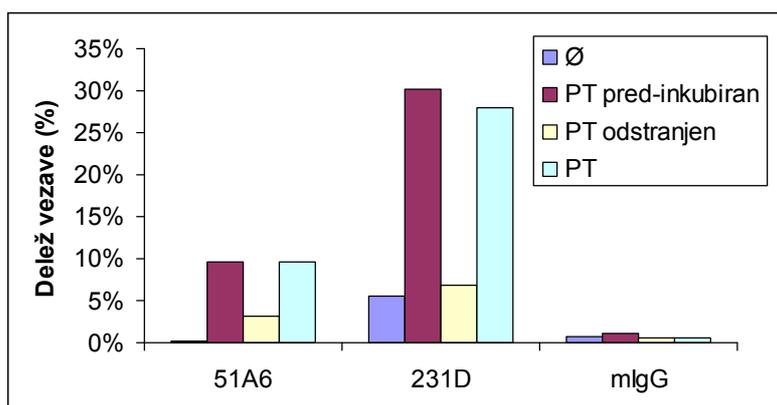
Slika 20: Vezava različnih koncentracij monoklonskih aPT 231D (5; 7,5 in 10 mg/L) pri različnih koncentracijah protrombina (0; 1; 3; 5; 10 mg/L).

### 5.2.5 Pomen hkratne prisotnosti protrombina in protiteles

Preverili smo vezavo obeh monoklonskih aPT 231D in 51A6 ter kontrolne mišje IgG frakcije na površino mišjih monocitov RAW 264.7 pri 3mM Ca<sup>2+</sup> v štirih različnih pogojih:

1. ∅: Celice smo inkubirali samo s protitelesi štiri ure.
2. pred-inkubiran PT: Celice smo najprej inkubirali s protrombinom dve uri, nato smo dodali protitelesa in inkubirali še dve uri.
3. odstranjen PT: Celice smo inkubirali s protrombinom dve uri in jih nato sprali z vmesnim centrifugiranjem. Na ta način smo odstranili nevezan protrombin iz gojišča. Nato smo dodali protitelesa in inkubirali še dve uri.
4. PT: Celice smo inkubirali s protrombinom in protitelesi štiri ure.

Obe monoklonski aPT sta se vezali na površino celic samo pod pogojem, da je bil v celični suspenziji istočasno prisoten tudi protrombin (slika 21). V primeru, ko je bil protrombin odstranjen iz celične suspenzije, protitelesa pa so bila dodana kasneje, smo izmerili minimalno vezavo protiteles na površino celic oziroma enako kot v primeru, kjer protrombin sploh ni bil prisoten. Kontrolna mišja IgG frakcija se je v vseh pogojih vezala na manj kot 1% celic.

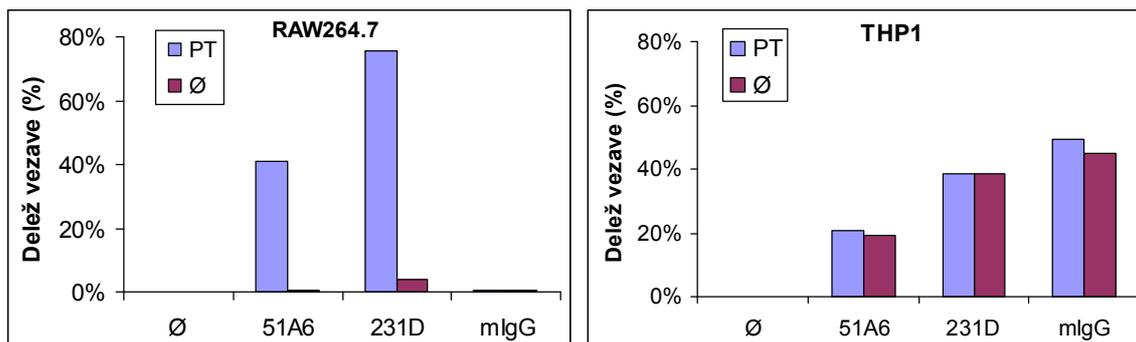


Slika 21: Vezava monoklonskih aPT 231D in 51A6 ter kontrolne mišje IgG frakcije na površino mišjih monocitov RAW264.7 pri različnih pogojih: odsotnost protrombina, predinkubacija protrombina, odstranitev protrombina pred dodatkom protiteles, prisotnost protrombina.

### 5.2.6 Vezava protiteles na površine različnih celičnih linij

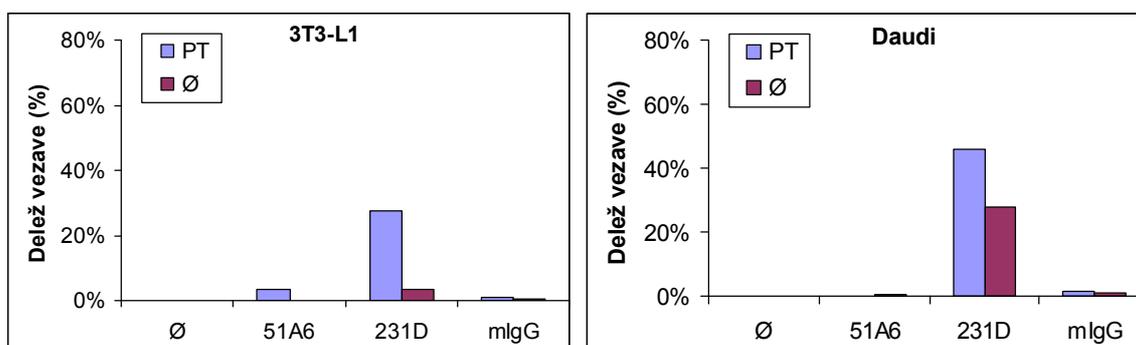
Tri različne celične linije smo, pod enakimi pogoji, ki smo jih prej vzpostavili na mišjih monocitih RAW264.7, inkubirali s protrombinom, kalcijem in protitelesi. Uporabili smo monoklonska aPT 231D in 51A6 ter kontrolno mišjo IgG frakcijo.

Celice THPI so humani monociti, izolirani iz periferne krvi bolnika z akutno levkemijo monocitov. Monocite RAW264.7 in THP1 smo izbrali, ker imajo pomembno vlogo pri strjevanju krvi. Uporabili pa smo tudi dve celični liniji, ki nista prokoagulantni, (ne sodelujeta neposredno pri kaskadni reakciji strjevanja krvi); celice Daudi, ki izvirajo iz humanega B limfoblasta in celice 3T3-L1, ki so embrionalni mišji fibroblasti.



Slika 22: Vezava monoklonskih aPT 231D in 51A6 ter kontrolne mišje IgG frakcije na površino mišjih monocitov RAW264.7 in humanih monocitov THP1.

V nasprotju z mišjimi monociti RAW264.7 smo pri humanih monocitih THP1 izmerili zelo visoko nespecifično vezavo protiteles na površino celic. Monoklonska aPT so se vezala na velik delež celic tudi v odsotnosti protrombina. Največji delež vezave pa smo izmerili v vzorcu, kjer je bila kontrolna mišja IgG frakcija (slika 22).



Slika 23: Vezava aPT monoklonskih protiteles 231D in 51A6 ter kontrolne mišje IgG frakcije na površino ne-prokoagulantnih celičnih linij mišji fibroblasti 3T3-L1 in humani limfoblasti Daudi.

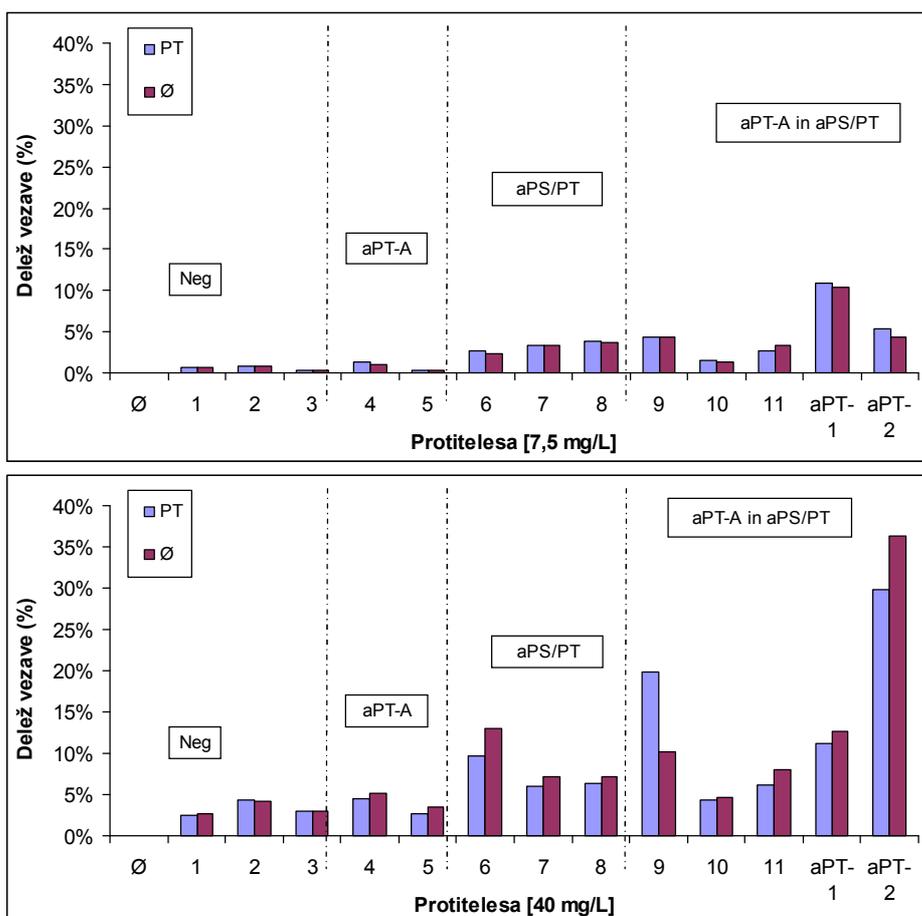
Monoklonska aPT 231D so se je vezala, tako na površino mišjih fibroblastov 3T3-L1, kot tudi na humane limfoblaste Daudi v prisotnosti protrombina, vendar je bil delež celic, ki so vezala 231D protitelesa nižji, kot pri mišjih monocitih RAW264.7 (slika 23). Monoklonska aPT 51A6 so se enako kot kontrolna mišja IgG protitelesa vezala na manj kot 2% celic.

### 5.2.7 Vezava poliklonskih protiteles

Izolirane IgG frakcije in izolirana aPT smo inkubirali z mišjimi monociti RAW264.7 v prisotnosti/odsotnosti protrombina. IgG frakcije so bile izolirane iz serumov bolnikov z APS in negativnimi aCL med katerimi so bili

- 3 negativni,
- 2 pozitivna na aPT-A,
- 3 pozitivni na aPS/PT in
- 3 pozitivni na aPT-A in aPS/PT.

Protitelesa proti protrombinu smo izolirali iz IgG frakcij dveh izbranih bolnikov z APS, ki sta imela visoko pozitivna aPS/PT in tudi aPT-A.



Slika 24: Vezava 11-ih iz seruma izoliranih IgG frakcij in 2 iz IgG frakcij izoliranih protiteles proti protrombinu (aPT-1 in aPT-2). Črtkane črte razmejijo vzorce glede na njihove vrednosti protiteles proti protrombinu. Koncentracija protiteles je bila 7,5 mg/L - zgornji graf in 40 mg/L - spodnji graf.

Pri vseh izoliranih IgG frakcijah in tudi pri obeh izoliranih aPT, (na sliki 24 sta označena z aPT-1 in aPT-2), smo izmerili visoko nespecifično vezavo na površino celic v odsotnosti protrombina (Slika 24). Vendar pa so se na površino celic vezala najintenzivneje protitelesa izolirana iz bolnikov, ki so imeli hkrati prisotna tako aPS/PT kot tudi aPT-A, najnižjo vezavo pa smo izmerili pri bolnikih, ki niso imeli protiteles proti protrombinu. Testirali smo dve različni koncentraciji protiteles, 7,5 mg/L in 40 mg/L. Pri večji koncentraciji smo izmerili večje deleže celic, ki so vezala protitelesa vendar ni bilo razlik v vezavi glede na prisotnost protrombina.

## 6 RAZPRAVA

### 6.1 DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU *IN VITRO*

#### 6.1.1 Različne izvedbe aPS/PT ELISA

Prevalenca aPT pri bolnikih z antifosfolipidnimi protitelesi niha od 50 do 90%, odvisno od laboratorijske metode, s katero jih določamo (38). Različne izvedbe metode ELISA so najpogosteje uporabljene za njihovo odkrivanje, vendar še ni veljavne standardizirane izvedbe. Opisanih je več načinov določanja aPT, vendar pa je po dosedanjih podatkih povezava aPT s kliničnimi znaki APS najboljša pri metodi, pri kateri uporabimo najbolj fiziološkemu stanju podoben testni sistem s fosfatidilserinom in kalcijem (28, 42). Prevalenca pozitivnih primerov aPT naraste med bolniki z antifosfolipidnimi protitelesi vse do 90% (38). Številni raziskovalci (pregled v (106) so testirali svoje skupine bolnikov s različnimi aPT ELISA metodami, vendar je le nekaj raziskovalnih skupin med seboj primerjalo aPS/PT ELISA z aPT-A ELISA (42, 54, 55, 57, 58).

Zaradi omenjenih dejstev smo se odločili za izvedbo metode aPS/PT ELISA z vezanim fosfatidilserinom in s prisotnimi  $\text{Ca}^{2+}$  ioni in za primerjavo te metode s klasično aPT-A ELISA. V eni izmed predhodnih študij {Ambrožič, 2002 93 /id; ŽIGON, 2002 48 /id} smo ugotovili relativno nizko analitsko občutljivost osnovne metode aPS/PT ELISA, ki jo je prvi opisal Atsumi s sodelavci (42). Osnovno metodo aPS/PT ELISA testa smo zato modificirali in primerjali rezultate modificirane izvedbe z rezultati osnovne izvedbe. Modificirano izvedbo smo primerjali tudi z aPT-A ELISA.

Predvidevali smo, da se aPS/PT v metodi ELISA obnašajo podobno kot anti- $\beta_2$ GPI (11, 12). V *in vitro* testih se namreč  $\beta_2$ GPI konformacijsko spremeni in posledično veže anti- $\beta_2$ GPI šele po svoji vezavi na ustrezno anionsko površino (23). Anionske površine povečajo tako gostoto protrombina (42) kot tudi sprožijo njegovo konformacijsko spremembo (45). Predvideva se da aPT reagirajo z neoepitopi, ki se na protrombinu odkrijejo šele po njegovi vezavi na fosfatidilserin (38) hkrati pa tudi povečajo njegovo afiniteto za negativno nabite fosfolipide (49).

Upoštevač zgoraj omenjene ugotovitve smo sklepali, da se aPT v tekoči fazi minimalno vežejo na topni protrombin in da hkratna prisotnost protiteles in protrombina potisne razmerje med vezanim in nevezanim protrombinom v prid vezanega. V nasprotju z osnovno metodo aPS/PT ELISA, smo pri modificirani metodi v vdolbinice mikrotitrne plošče nanесли protrombin in serum zaporedoma brez vmesnega spiranja - inkubacija je bila torej skupna. Z modifikacijo smo dosegli večjo gostoto na fosfatidilserin vezanega protrombina (slika 7) in posledično večjo analitsko občutljivost {ŽIGON, 2002 48 /id} v primerjavi z osnovno metodo, kjer se nekaj že adsorbiranega antigena izgubi s spiranjem. Na osnovi teh podatkov predvidevamo, da hkratna prisotnost protiteles poveča koncentracijo protrombina na anionski površini. Tudi druge raziskovalne skupine (63) so pokazale, da LA povečajo vezavo protrombina na fosfolipidne vezikle, čeprav mehanizem ni poznan. Verjetno pa je, da imata pri tem pomembno vlogo tako bivalentna vezava protiteles na dve molekuli protrombina, kot tudi povečana lokalna koncentracija protrombina na površini fosfolipidov. Povečana vezava protrombina je verjetno tudi posledica zmanjšane disociacije protrombina s površine fosfolipidnih veziklov. Ker se pri modificirani metodi veže večja količina antigena, ostaja na molekulah fosfatidilserina manj prostora za vezavo drugih protiteles v vzorcu. Torej je prednost te metode tudi v tem, da

izmerimo pri modificirani metodi manjše ozadje, ki ga dajo protitelesa, vezana neposredno na fosfatidilserin (aPS), kot pa pri osnovni metodi. Samo antifosfolipidna protitelesa, ki za vezavo na anionske fosfolipide potrebujejo še kofaktor, naj bi imela patogenezo vlogo pri APS (16). Glede na to, da aPS niso povezana z znaki APS, je zmanjšanje njihovega vpliva na končni rezultat določitve aPS/PT zelo zaželeno.

Modificirano in osnovno izvedbo aPS/PT ELISA smo med seboj primerjali tudi kvantitativno na skupini 15 vzorcev. Pri pozitivnih vzorcih smo izmerili višje vrednosti mOD z modificirano aPS/PT ELISA, medtem ko smo pri negativnih vzorcih s to metodo izmerili nižje vrednosti mOD kot z osnovno aPS/PT (slika 6). Pri slednjih, med katerimi so bili tudi trije krvodajalci, smo izmerili najvišjo absorpcijo v slepem vzorcu, kjer ni bilo dodanega protrombina in je bila vezava nespecifičnih oziroma t.i. infekcijskih aPS neposredno na fosfatidilserin neovirana. aPS kompetitivno tekmujejo za vezavno mesto s protrombinom na fosfatidilserin. Več je vezanega protrombina, manjša je vezava aPS. Pri osnovni metodi je bila vezava nekoliko nižja, ker je bil fosfatidilserin deloma prekrit s protrombinom. Najnižja vezava aPS pa je bila v vdolbinicah z modificirane izvedbe, kjer se je vezalo največ protrombina in je bilo najmanj prostora za vezavo aPS. Ker so vsi pozitivni vzorci imeli najvišje vrednosti, izmerjene z modificirano metodo, lahko potrdimo da, ni prišlo do vezave aPT na topen protrombin v raztopini. V kolikor pa so se v raztopini formirali kompleksi aPT s protrombinom, so se le-ti naknadno vseeno vezali na fosfatidilserin. S tem poskusom smo tudi pokazali, da se z modifikacijo metode analitska specifičnost testa ni zmanjšala.

Pri vseh preiskovancih smo z našo modificirano aPS/PT ELISA izmerili absorpcije tako v vdolbinicah s protrombinom, kot tudi v slepih vzorcih, kjer je bil prisoten samo fosfatidilserin. Na ta način smo želeli čimbolj upoštevati vpliv v serumu morebitno prisotnih aPS na končni rezultat. V kolikor je bila izmerjena absorpcija v slepih vzorcih (aPS) višja od tiste, izmerjene v vzorcih s protrombinom, potem smo te vzorce označili za negativne. Pri osnovni izvedbi aPS/PT ELISA so avtorji (42) vrednosti slepih vzorcev odštevali od vrednosti izmerjene v vzorcih s protrombinom. Takšno dejanje pa lahko poveča eksperimentalno napako, saj v tem primeru morebitni nizko pozitivni vzorci z dovolj visokim aPS postanejo lažno negativni.

### 6.1.2 Pražne vrednosti aPS/PT ELISA in aPT-A ELISA

Pražne vrednosti razmejujejo ravni signalov v metodi, ki so zaznavni pri zdravi populaciji, od značilno povišanih ravni pri bolnikih. Določitev pražne vrednosti, katera predstavlja razmejitev med pozitivnimi in negativnimi vrednostmi, je torej ključnega pomena pri predstavitvi rezultatov testiranja vzorcev na antifosfolipidna protitelesa. Za določitev ustrezne pražne vrednosti je potrebno zagotoviti ustrezno število vzorcev zdravih ljudi, med katere lahko prištevamo tudi krvodajalce, pri katerih je v času darovanja izključena akutna okužba ter kronične bolezni, zaradi katerih človek ne bi bil primeren za darovanje krvi. Če je kontrolna skupina premajhna, so postavljene pražne vrednosti vprašljive in s tem postane vprašljiva tudi interpretacija kasnejših rezultatov.

Pražne vrednosti za IgG in IgM aPS/PT smo določili na osnovi izmerjenih absorpcij pri skupini 150 krvodajalcev. Frekvenčna porazdelitev vseh izmerjenih absorpcij je desno asimetrična, zato smo za prag izbrali 98 percentil frekvenčne porazdelitve (slika 8), ki

sovpada z vrednostjo 3 standardnih odklonov nad srednjo vrednostjo. Pražni vrednosti aPS/PT sta bili 63 mOD in 65 mOD za IgG in IgM.

Podajanje rezultatov v obliki izmerjenih vrednosti absorpcij ni primerno, saj ne omogoča kvantitativne primerljivosti med laboratoriji, same vrednosti absorpcij pa tudi ne odražajo titrov protiteles. Dodatno smo pri vsaki analizi uporabili IS, ki smo ga serijsko redčili in nato z umeritveno krivuljo vsakemu vzorcu predpisali tudi arbitrarne enote. Vendar, dokler aPS/PT metode niso standardizirane in ni dostopnih mednarodnih kalibratorjev oziroma referenčnih kontrol, podajanje rezultatov v obliki arbitrarnih enot nima večjega pomena. Vse rezultate v raziskavi zato podajamo v obliki absorpcij, kot je storila tudi večina ostalih raziskovalnih centrov v svojih objavah.

Standardni vzorec je za mednarodno primerljivost nepogrešljiv dejavnik. Takšen standard bi moral biti na razpolago v velikih količinah in bi moral biti stabilen v daljšem časovnem obdobju. Za standardizacijo metode se lahko uporabi serum bolnika, ki je visoko pozitiven za dano avtoprotitelo ali pa mešanica serumov, ki so visoko pozitivni za specifično protitelo. V naši aPS/PT ELISA smo uporabili dva IS: za IgG je bila to frakcija IgG, izolirana iz seruma bolnika z visoko pozitivnimi aPT, medtem ko smo za IgM uporabili serum bolnika, ki ima visoko pozitivna aPT. Za medlaboratorijsko primerjavo skozi daljše časovno obdobje nastopijo težave, ko zmanjka bolnikovega seruma, saj je praktično nemogoče dobiti nov standard povsem enake kvalitete. Iz tega stališča so človeška monoklonska protitelesa idealen standard, saj bi bil vzorec enake kakovosti na razpolago v skoraj neomejenih količinah.

Poleg samih absolutnih vrednosti absorpcij, izmerjenih v vzorcu s protrombinom, smo upoštevali tudi izmerjene absorpcije v slepih vzorcih, kjer ni bilo protrombina. Vzorci z rezultatom, višjim od prazne vrednosti, so bili pozitivni le ob pogoju, da so vrednosti vzorčne vdolbinice s prisotnim protrombinom (aPS/PT) presegle vrednosti, izmerjene v slepi vdolbinici brez prisotnosti protrombina (aPS). Vsi krvodajalci so imeli višje izmerjene vrednosti aPS in nižje aPS/PT in so zato bili negativni.

Pražno vrednost za IgG in IgM aPT-A smo določili na osnovi izmerjenih absorpcije 62 krvodajalcev. Absorpcije enako kot pri aPS/PT niso bile normalno porazdeljene (slika 9). Za pražno vrednost smo prav tako določili 98 percentil, ki je bil pri IgG 493 mOD in 721 mOD pri IgM.

### 6.1.3 Primerjava aPS/PT ELISA z aPT-A ELISA

Vse raziskovalne skupine, ki so do danes primerjale aPS/PT z aPT-A ELISA (54, 55, 57) so povzele protokol aPS/PT ELISA po njegovi prvi objavi (42). Mi smo osnovno metodo za določanje aPS/PT modificirali in nato primerjali dobljene rezultate s tistimi, izmerjenimi z aPT-A ELISA.

Podobno kot raziskovalne skupine pred nami, je tudi naša raziskava potrdila korelacijo med rezultati obeh ELISA s Spearmanovim koeficientom korelacije rangov  $R_o=0,773$  z verjetnostjo  $p<0,001$  za IgG ter  $R_o=0,51$  in  $p<0,001$  za IgM. Ob enem pa smo prav tako odkrili večje število bolnikov, ki so imeli neskladne rezultate (pozitivne rezultate v samo enem testu); pri IgG (32%) in IgM (56%). V nasprotju z vsemi prejšnjimi objavami, je v naši študiji imel med vsemi bolniki z neskladnimi rezultati samo eden pozitivne aPT-A in

negativne aPS/PT (samo IgG izotipa). Vsi ostali z neskladnimi rezultati pa so imeli obratno kombinacijo (pozitivne samo aPS/PT) (slika 10). Vse druge raziskovalne skupine poročajo o enakovrednem deležu bolnikov pri obeh kombinacijah in zato povzemajo, da obstojata dve prekrivajoči, vendar pa ne identični, populaciji aPT. Z našo modificirano aPS/PT ELISA smo izmerili pozitiven rezultat praktično pri vseh pozitivnih bolnikih določenih z aPT-A ELISA (razen pri enem bolniku razreda IgG) zato sklepamo, da ta metoda omogoča detekcijo obeh, tako aPT-A kot tudi aPS/PT, populacij protiteles. Možno je tudi, da dejansko ne obstojata dve ločeni populaciji aPT, vendar zaradi razlik v njihovi avidnosti, ne pa tudi epitopski specifičnosti, z različnimi testi prednostno določimo samo eno subpopulacijo druge pa ne. Nasprotno pa z modificirano izvedbo aPS/PT ELISA zajamemo različne subpopulacije aPT. Čeprav so te ugotovitve neskladne z našimi začetnimi pričakovanji in v okviru te naloge hipoteza, da obstaja več populacij aPT, ni potrjena, pa se kljub temu poveča klinična uporabnost dobljenih rezultatov. Za samo klinično uporabnost je bolje hkrati meriti več subpopulacij protiteles, kot pa posamezne, kakor so najverjetneje izmerili drugi avtorji ob uporabi različnih izvedb ELISA. Zakaj modifikacija aPS/PT metode omogoča določitev več subpopulacij, je možno razložiti na več načinov. 1. Orientacija oziroma lega protrombina v modificirani metodi omogočajo različnim populacijam aPT vezavo na molekule protrombina. 2. Povečana koncentracija protrombina na površini fosfatidilserina, ki jo dosežemo z modifikacijo, omogoča zaznavno vezavo tudi nizko avidnih aPT. 3. Hkratna prisotnost aPT in protrombina v reakcijski mešanici potisne razmerje topnega protrombina v smer vezanega in prepreči njegovo disociacijo iz fosfolipidne površine. Tukaj povzemamo, da v nasprotju z našo hipotezo, na osnovi omenjenih *in vitro* rezultatov ne moremo potrditi obstoja dveh različnih populacij aPT.

Pred kratkim objavljena multicentrična študija (58), kjer so primerjali tako hišne kot komercialno dostopne aPT-A in aPS/PT ELISA je pokazala, da ni nobena izmed primerjanih metod, dala dovolj zanesljive rezultate. Z našo modifikacijo aPS/PT ELISA pa smo dosegli višjo analitično občutljivost in hkrati omogočili detekcijo obeh populacij aPT z eno samo metodo. V prihodnje bo potrebno našo metodo primerjati še z drugimi komercialno dostopnimi analiznimi kompleti. Nujna pa bi bila tudi multicentrična študija, kjer bi modificirano aPS/PT ELISA ovrednotili tudi drugi raziskovalni centri na bolnikih iz njihovih populacijskih študij.

#### 6.1.4 Primerjava modificirane aPS/PT ELISA z aCL in anti- $\beta_2$ GPI ELISA

Mero povezanosti med višino aPS/PT in aCL ter med višino aPS/PT in anti- $\beta_2$ GPI pri istem bolniku smo določili s Spearmanovim testom korelacije.

Test je pokazal nizko mero korelacije med aPS/PT in aCL ( $R_o=0,469$ ;  $p<0,001$  za IgG in  $R_o=0,520$ ;  $p<0,001$  za IgM) ter med aPS/PT in anti- $\beta_2$ GPI ( $R_o=0,367$ ;  $p<0,001$  za IgG in  $R_o=0,428$ ;  $p<0,001$  za IgM). Velik delež bolnikov je imel pozitivne vrednosti, izmerjene samo v eni metodi pri obeh izotipih protiteles (slika 11), 14% pa je imelo samo aPS/PT, medtem ko so bila aCL in anti- $\beta_2$ GPI negativna. Iz tega lahko sklepamo da korelacija med aPS/PT in kliničnimi znaki APS, ki smo jo pokazali, ni posledica navzkrižne reaktivnosti teh protiteles z aCL ali anti- $\beta_2$ GPI.

Nekaj pomislekov smo imeli, da bi se lahko pri aPS/PT ELISA endogeni  $\beta_2$ GPI, ki je normalno prisoten v serumu v koncentraciji 50 do preko 200 mg/L, vezal na fosfatidilserin. Posledično bi bila omogočena vezava anti- $\beta_2$ GPI, kar pa bi motilo določitev protiteles, ki

prepoznajo kompleks protrombin-fosfatidilserin. Vzorce serumov smo redčili 1:100, torej je bila koncentracija endogenega  $\beta_2$ GPI v reakcijski mešanici  $\sim 2$  mg/L, protrombina pa 10 mg/L.  $\beta_2$ GPI in protrombin tako tekmujeta za vezavno mesto na fosfatidilserinu. Vendar je zaradi prisotnosti 5 mM koncentracije kalcija v pufru za redčitev vzorcev in v spiralnem pufru, vezava tako nizke koncentracije  $\beta_2$ GPI zanemarljiva, medtem ko je vezava protrombina ob prisotnosti kalcija favorizirana.

S primerjanjem korelacije višine aPS/PT in anti- $\beta_2$ GPI pa smo dodatno potrdili, da v testu aPS/PT-ELISA nismo napačno določali anti- $\beta_2$ GPI, saj smo odkrili zelo nizko mero korelacije med rezultati obeh metod. Pri določanju IgG izotipa protiteles smo pri 14 vzorcih izmerili pozitiven rezultat samo pri anti- $\beta_2$ GPI, medtem ko je bil aPS/PT negativen. Pri IgM izotipu protiteles pa je bilo tako pri 4 bolnikih.

### 6.1.5 Klinični pomen aPS/PT

Kljub vedno večjemu poznavanju imunoloških in funkcionalnih lastnosti aPT pa je njihova klinična vloga še daleč od znanega. Številne študije so preverjale klinični pomen aPT (pregled v literaturi (38, 108)). Rezultati si nasprotujejo predvsem zaradi uporabe različnih metod za njihovo določanje v katerih se merijo protitelesa usmerjena proti različnim epitopom. Pred kratkim izvedena meta analiza objavljenih študij (106) ni uspela najti prepričljive povezave med aPT in trombozami, saj je polovica raziskovalnih skupin potrdila korelacijo med prisotnostjo aPT-A in trombozami in/ali APS, medtem ko ostali te korelacije niso našli. Avtorji so zato zaključili, da za sedaj ni nobene klinične koristi, ki bi jih doprineslo merjenja aPT. Skupaj z velikimi razlikami v uporabljenih laboratorijskih metodah in v proučevanih vzorcih bolnikov pa je pomembna omejitev do danes objavljenih študij njihova retrospektivna ali presečna izvedba kar onemogoča potrditi njihov klinični pomen. Objavljena je bila samo ena longitudinalna študija o napovedni vrednosti aPT pri bolnikih s SLE. Ta pa je pokazala, da imajo aPT višjo diagnostično specifičnost za tromboze kot aCL in anti- $\beta_2$ GPI in so bili poleg LA najboljši napovedni kazalci trombotičnih dogodkov pri bolnikih s SLE (56). Ugotovili pa so tudi, da je pomemben pokazatelj tveganja za razvoj tromboze tudi število pozitivnih antifosfolipidnih protiteles izmerjenih pri posameznem bolniku.

Večina študij v literaturi je proučevala klinični pomen aPT-A, določenih na mikrotitrskih ploščah z visoko afiniteto vezave z imobiliziranim protrombinom. Zelo malo pa je podatkov o aPS/PT ELISA in njihovi primerjavi s aPT-A ELISA. Prvi je Atsumi s sodelavci (42) pokazal, da so aPS/PT povezana s kliničnimi znaki APS, medtem, ko za aPT-A, tega niso odkrili. V zadnjih letih so še štiri raziskovalne skupine primerjale klinični pomen protiteles določenih po obeh metodah (54, 55, 57, 58). Med njimi so vsi potrdili korelacijo med aPS/PT in trombozami, ki je bila v primerjavi s korelacijo med aPT-A in trombozami močnejša. V eni izmed študij so s trombozami bila povezana samo aPS/PT, medtem ko aPT-A niso bila (54).

V naši študiji je bila prevalenca aPS/PT pri 98 preiskovancih 45%. Pri 18,4% bolnikih sta bila oba izotipa povišana, Samo IgG izotip protiteles je imelo 4,1% bolnikov, samo IgM pa 22,4% bolnikov. Bolniki s SLE in/ali APS so statistično pogosteje imeli pozitivna aPS/PT v primerjavi s kontrolno skupino, kar je veljalo tudi ločeno za posamezen izotip protiteles. Med 98 bolniki je imelo 61 bolnikov SLE, 31 bolnikov sekundarni SLE+APS in samo 6 bolnikov APS. Bolniki s SLE in bolniki s SLE+APS so imeli statistično značilno višje

izmerjene absorpcije v primerjavi s krvodajalci, medtem ko se absorpcije izmerjene pri bolnikih z APS niso razlikovale od skupine krvodajalcev (slika 12). Vendar pa je bila skupina bolnikov z APS sorazmerno majhna, zato je ta primerjava vprašljiva, hkrati pa je pomembno, da je med 6 bolniki z APS eden imel pozitivna IgG aPS/PT, 4 pa pozitivna IgM aPS/PT medtem ko pri kontrolah ni bil nihče pozitiven.

Neodvisno od postavljene diagnoze smo v testirani skupini bolnikov preverili povezavo nivojev aPS/PT s kliničnimi motnjami karakterističnimi za APS. Znotraj skupine bolnikov s SLE in/ali APS jih je 43 doživelo arterijsko ali vensko trombozo. Pri slednjih so bili nivoji aPS/PT statistično značilno povišani v primerjavi s skupino, ki tromboz ni doživela .

V skupini 98 bolnikov s SLE in/ali APS je kar 14 (14,3%) bolnikov imelo pozitivna samo aPS/PT, medtem ko so imeli tako aCL kot anti- $\beta_2$ GPI negativna. Med slednjimi jih je 7 imelo postavljeno diagnozo APS, torej so zadostili tako kliničnemu, kot laboratorijskemu kriteriju (9). Eden je imel SLE z zabeleženo vensko trombozo v preteklosti, ni pa zadostil laboratorijskemu kriteriju za postavitev diagnoze APS. Iz tega lahko sklepamo, da bi lahko bilo testiranje aPS/PT v korist pri bolnikih, ki ustrezajo kliničnim kriterijem, vendar so negativni v rutinsko uporabljenih testih za antifosfolipidna protitelesa. Tudi Ghirardello in sodobniki (56) so v svoji študiji pokazali, da več pozitivnih testov na antifosfolipidna protitelesa poveča posameznikovo tveganje za razvoj tromboze.

Nadalje smo znotraj naše skupine bolnikov s SAB z multivariantno logistično analizo preverili nivoje aPS/PT, aCL in anti- $\beta_2$ GPI in pojavnost le-teh pri vseh bolnikih z APS in ločeno pri posameznih kliničnih motnjah značilnih za APS (preglednica 3). Odkrili smo, da so aPS/PT, izmerjena z našim modificiranim testom, med vsemi testiranimi antifosfolipidnimi protitelesi statistično značilno najbolj prevalentna pri arterijskih trombozah. Pri bolnikih s prisotnimi PS/PT smo izmerili največje razmerje obetov za razvoj arterijske tromboze (OR=8,17) v primerjavi s bolniki, ki imajo anti- $\beta_2$ GPI (OR=3,57) ali aCL (OR=4,94), kar je dokaz za potrebo po študijah o morebitnih vzročnih povezanosti, ki bi potrdila ali so aPS/PT pomemben in neodvisen faktor tveganja za arterijsko trombozo. Nobeno od testiranih antifosfolipidnih protiteles ni bilo statistično značilno povezano s venskimi trombozami, čeprav so aPS/PT znova imela najvišje razmerje obetov. Med trinajstimi do danes objavljenimi študijami (povzeto v (56)) sta samo dve študiji enako kot mi potrdili povezavo med aPS/PT in arterijskimi trombozami. Druge tri študije so potrdile povezavo z venskimi trombozami, medtem ko štiri raziskovalne skupine te povezave niso našle. V ostalih študijah vrsta tromboze ni bila navedena. Z našo študijo smo na testiranem vzorcu 98 bolnikov s SAB tudi določili, da imajo bolniki z prisotnimi aPS/PT za 9,12-krat večje obete za razvoj APS v primerjavi z bolniki brez teh protiteles, medtem ko je tveganje pri bolnikih z aCL 8,69 in anti- $\beta_2$ GPI 5,56.

aPS/PT so bila diagnostično bolj občutljiva za APS od aCL in anti- $\beta_2$ GPI (79% proti 61% in 53%) in le nekoliko manj specifična (77% proti 85% in 83%). To je lahko pokazatelj nižje postavljene prazne vrednosti pri aPS/PT ELISA; višja prazna vrednost bi znižala diagnostično občutljivost in povišala specifičnost. V primerjavi s pregledom diagnostične občutljivosti drugih objavljenih hišnih ELISA testov za APS ali tromboze (preglednica 2) je samo ena metoda (54) tako diagnostično občutljiva za arterijske tromboze (84,4%) kot naša modificirana aPS/PT ELISA (80,0%), obe metodi imata hkrati primerljivo diagnostično specifičnost (65,7% in 67,1%). Drugi dve metodi imata zelo nizko

občutljivost, vendar pa sta nekoliko bolj specifični. Visoka diagnostična občutljivost naše modificirane metode je tudi rezultat njene večje analitske občutljivosti v primerjavi z osnovno metodo, njena diagnostična specifičnost pa je kljub temu zelo primerljiva z ostalimi objavljenimi študijami.

Na osnovi naših rezultatov zaključimo, da bi rutinsko določanje aPS/PT lahko pripomoglo v diagnostiki APS. Na zadnjem mednarodnem konsenzusu (9), so se raziskovalci strinjali, da so aPS/PT povezana z APS, vendar je njihova specifičnost še vprašljiva in zato ta protitelesa še niso vključena v diagnostiko APS kot samostojen laboratorijski kriterij. Nove študije, ki vrednotijo diagnostično pomembnost aPS/PT, med njimi je tudi naša, so zato zaželene.

V prihodnje bi bilo smiselno zasnovati raziskavo na večjem številu klinično in laboratorijsko dobro opredeljenih bolnikov, kjer bi preverili nivoje aPS/PT, aCL anti- $\beta_2$ GPI in LA ter tako ovrednotili naše ugotovitve. Velika pridobitev pa bi bila tudi multicentrična študija, kjer bi več laboratorijev testiralo svoje vzorce z našo modificirano izvedbo in nato dobljene rezultate primerjali s svojimi metodami. Na ta način bi lahko pridobili podatke o med laboratorijski ponovljivosti metode in njeni uporabnosti v primerjavi z drugimi metodami.

#### 6.1.6 Avidnost protiteles proti protrombinu

Najbolj proučevana antifosfolipidna protitelesa so anti- $\beta_2$ GPI, ki so eden od kriterij za diagnozo APS. Veliko je znanega o karakteristikah anti- $\beta_2$ GPI in v literaturi se jih pogosto primerja z aPT. Naša raziskovalna skupina je že objavila pomembna dognanja o obstoju visoko avidnih anti- $\beta_2$ GPI, kar je bilo v dotedanji literaturi negirano ali zgolj omenjeno kot posamična verjetnost (109). Znano je, da se tako  $\beta_2$ GPI (110, 111) kot tudi protrombin (45) konformacijsko spremenita po vezavi na ustrezno negativno nabito površino. Pri tem pride do izpostavitve neoepitopov, kar omogoča vezavo specifičnih protiteles. Prav tako je verjetno, da se anti- $\beta_2$ GPI bivalentno povežeta z dvema molekulam antigena (112) in še pred kratkim je veljalo, da so ta protitelesa nizko avidna (113, 114). Enako se tudi aPT bivalentno vežejo na kovalentno povezane dimere in multimerne protrombina na površini ELISA plošče (46). V eni izmed študij so pokazali, da je interakcija med monovalentnimi fragmenti Fab, pripravljenimi iz IgG frakcije bolnika z LA, in protrombinom zanemarljiva; iz kinetičnih merjenj asociacije in disociacije pa je razvidno, da pride do bivalentne vezave med protrombinom in aPT na lipidni membrani (47). Navzkrižno povezani dimeri in multimeri olajšajo vezavo nizko afinitetnih protiteles. Ta odkritja pa nakazujejo, da so aPT nizko afinitetna protitelesa, prej kot pa antineoepitopna protitelesa, čeprav o sami avidnosti aPT ni objavljenih študij.

V tem raziskovalnem delu smo preverili avidnost aPT s posebno izvedbo ELISA t.i. kaotropno ELISA, kjer vzorce, ki jih analiziramo redčimo v naraščajočih koncentracijah NaCl in na ta način postopno slabimo šibke medmolekulske interakcije. Avidnost posameznega vzorca smo nato določili arbitrarno. Vezavo izmerjeno pri 0,5 mM NaCl smo primerjali z vezavo pri fizioloških pogojih in vzorce uvrstili v visoko, heterogeno ali nizko avidne skupine (Slika 11).

V testirani skupini 10 bolnikov s SLE in/ali APS je eden imel visoko avidna aPT, 5 jih je imelo heterogeno avidna in 4 so imeli nizko avidna aPT (preglednica 4). V skupini z

visoko in heterogeno avidnimi protitelesi so prevladovali bolniki z APS, medtem ko so nizko avidna protitelesa, bila pogosteje prisotna pri bolnikih s SLE. V skupini z nizko avidnimi protitelesi nihče ni imel APS, zato je mogoče, da je razvoj APS povezan s prisotnostjo visoko avidnih aPT, kot je naša raziskovalna skupina že pokazala za anti- $\beta_2$ GPI (109). Proučevana skupina vzorcev je premajhna za morebitno statistično obdelavo.

Pri izbranem vzorcu smo s kaotropno ELISA hkrati izmerili avidnost tako v serumu kot tudi v izolirani frakciji IgG istega seruma. Avidnost tega vzorca se tudi v izolirani IgG frakciji, kjer ni bilo prisotnih IgM protiteles, ni spremenila, vzorec je še vedno vseboval heterogeno avidna protitelesa. Prav tako koncentracija protiteles (serum, IgG frakcija) ni vplivala na rezultat kaotropnega testa. Za potrditev te teze, bi bilo v prihodnje potrebno enako ponoviti še s serumom, IgG frakcijo in izoliranimi aPT protitelesi bolnika, ki ima visoko avidna protitelesa.

Na osnovi večkrat ugotovljene podobnosti v karakteristikah aPT in anti- $\beta_2$ GPI, ter na osnovi teh preliminarnih rezultatov o avidnosti aPT, lahko predhodne ugotovitve naše raziskovalne skupine (109), ki je jasno pokazala, da visoko avidna anti- $\beta_2$ GPI pri bolnikih z APS niso redkost, povzamemo tudi za aPT. Študij avidnosti aPT na večjem vzorcu bolnikov bo natančneje opredelil naše domneve, da lahko avidnost aPT in zorenje afinitete aPT s potekom bolezni pomembno vpliva na samo klinično sliko APS, predvsem na razvoj tromboz.

### **6.1.7 Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom**

Iz obstoječih bank Kliničnega oddelka za revmatologijo SPS Interne klinike KC Ljubljana smo izbrali dva bolnika z APS in z visoko pozitivnimi tako aPS/PT kot tudi aPT-A. Oba seruma smo uporabili, najprej za izolacijo IgG protiteles, potem pa še za izolacijo aPT. Eden izmed obeh serumov je vseboval visoko avidna aPT, drugi pa heterogeno avidna aPT. Podatek o avidnosti aPT nam je pomagal tudi pri sami izolaciji aPT iz IgG frakcij z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom. Na osnovi avidnosti smo namreč lahko določili ustrezne pogoje afinitetne kromatografije. Prilagodili smo čas vezave protiteles na protrombin, ki smo ga predhodno vezali na kolono, in kasneje še čas izpiranja že vezanih aPT in izbira ustreznega izpiralnega pufra.

Mnogi avtorji trdijo, da z različnimi ELISA testi dokazujemo dve različni populaciji aPT; aPS/PT in aPT-A. Zanimalo nas je, ali bomo z izolacijo ločili domnevno različni populaciji aPT. Na kolono smo vezali samo protrombin in fosfolipidi niso bili prisotni. Zato bi pričakovali, da se bodo na kolono vezalo samo aPT-A, medtem ko se bodo aPS/PT, izločila skupaj z ostalimi protitelesi. Izpirek z izoliranimi aPT obeh serumov smo testirali z aPS/PT ELISA kot tudi z aPT-A ELISA. Izpirek je bil, enako kot IgG frakcija in serum, pozitiven v obeh ELISA metodah. Prav tako smo testirali tudi ostanek izolacije protrombinske kolone, ki je imel v manjši meri še vedno prisotna aPT, ker zmogljivost kolone ni zadoščala za izolacijo celotne količine. Tudi ostanek je bil enako pozitiven v obeh ELISA testih, čeprav bi pričakovali, da se bodo aPS/PT izločila iz kolone, aPT-A pa vezala. Zato sklepamo, da oba vzorca nista vsebovala dveh različnih populacij aPT in da njuna aPT verjetno prepoznajo epitop na protrombinu, neodvisno od njegove vezave na fosfolipidno površino.

V prihodnje bi morali izolacijo aPT izvesti tudi na tistih serumih, ki so bili pozitivni samo v aPS/PT ELISA in na enem serumu, ki je imel pozitiven rezultat samo v aPT-A ELISA. Morda se v prvi skupini serumov protitelesa ne bi vezala na kolono, medtem ko bi pri drugem serumu vezavo pričakovali. Na ta način bi lahko potrdili/ovrgli obstoj različnih populacij aPT, vezanih na konformacijske spremembe protrombina. Za zdaj pa tudi na osnovi teh rezultatov ne moremo potrditi obstaja različnih populacij aPT, ki bi se razlikovala v epitopski specifičnosti, kvečjemu gre za več subpopulacij aPT z različni avidnostmi.

## 6.2 VEZAVA PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA MEMBRANE CELIC *IN VIVO*

Glavna klinična motnja bolnikov z antifosfolipidnimi protitelesi so tromboze. Opisani so bili številni mehanizmi, ki bi pojasnili nagnjenost k trombozam, vendar je patogeneza tromboz najverjetneje splet mnogih (115). Zelo verjetno je, da antifosfolipidna protitelesa inhibirajo naravne antikoagulantne sisteme, oslabijo fibrinolitično aktivnost in tudi, da delujejo direktno na celične funkcije.

Proučevanje patogeneze APS je v veliki meri osredotočeno na faktorje strjevanja krvi, vendar imajo pomembno vlogo tudi endotelijske celice. Za znane patogene učinke antifosfolipidnih protiteles v organizmu je nujna njihova vezava na membrane celice. Nekateri znanstveniki razlagajo, da vezava antifosfolipidnih protiteles na endotelijske celice sproži celično aktivacijo in vzpostavitev protrombotičnega stanja, kar posledično prispeva k hiperkoagulabilnosti, značilni za APS. Študije so pokazale, da so endotelijske celice izražale značilno večje količine adhezijskih molekul (ICAM-1, VCAM.1 in E-selektin), če so jih inkubirali z antifosfolipidnimi protitelesi (70, 116-118). Prav tako so pokazali, da inkubacija antifosfolipidnih protiteles skupaj z monociti poveča ekspresijo in aktivnost tkivnega faktorja (119-122). Zelo malo pa je študij o samem vezanju antifosfolipidnih protiteles ter njihovih kofaktorjev,  $\beta_2$ GPI in protrombina, na membrano celic. Prav tako ni znano kako, oziroma preko katerih transmembranskih receptorjev poteka prenos signala v notranjost celice.

$\beta_2$ GPI se s svojo V. domeno veže na membrane endotelijskih celic (123), medtem ko se protrombin, ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , veže na negativno nabite fosfolipide s predelom Gla (25). Zhao in sodelavci (124) so pokazali, da je njihovo monoklonsko aPT, izolirano iz bolnika z APS, povečalo vezavo protrombina na poškodovane endotelijske celice, kasneje pa je Vega-Ostertag s sodelavci (125) še pokazal, da isto monoklonsko aPT poveča ekspresijo tkivnega faktorja in E-selektina, kar bi lahko vodilo v razvoj tromboz. Vezavo  $\beta_2$ GPI in posledično tudi anti- $\beta_2$ GPI so dokazali le na apoptotičnih celicah, medtem ko te vezave na viabilnih celicah niso zaznali (82). Sama interakcija  $\beta_2$ GPI z apoptotičnimi celicami izpostavi epitop, ki je tako antigen (83), za antifosfolipidna protitelesa, kot tudi imunogen (84) v zdravih miškah. Pred kratkim so isti raziskovalci dokazali, da se tudi aPT selektivno vežejo le na apoptotične, na pa tudi na viabilne celice (85). Drugi raziskovalci pa se sprašujejo, kako je možna sama vezava antifosfolipidnih protiteles na mirujoče endotelijske celice, saj le-te ne izražajo negativnih fosfolipidov na svoji površini (86). Antifosfolipidna protitelesa se v njihovi študiji niso vezala na mirujoče endotelijske celice in jih prav tako niso aktivirala. Vendar pa so vezavo monoklonskih antifosfolipidnih protiteles dokazali na aktiviranih in apoptotičnih celicah.

V naši magistrski nalogi smo želeli pokazati, da se aPT ob prisotnosti kalcijevih ionov in protrombina vežejo na površino tudi viabilnih celic in ne samo apoptotičnih celic. Znano je, da se membranska asimetrija poruši pri nekaterih kritičnih celičnih dogodkih, kot so aktivacija celice, poškodba in apoptoza (79). Fenomen lipidnega mešanja so odkrili tudi pri aktivaciji trombocitov in eritrocitov ob povišani koncentraciji citoplazemskega  $\text{Ca}^{2+}$  (80, 81). Predpostavili smo, da bo aktivacija celic sprožila takšne membranske spremembe, ki bi omogočile vezavo antifosfolipidnih protiteles. V ta namen smo različne transformirane celične linije inkubirali s protrombinom in aPT, pri takšnih pogojih, za katere smo predvideli, da bi lahko izzvali aktivacijo in posledično izpostavitve fosfatidilserina. Vezavo na površino smo nato določili s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s fluoresceinom, in merili na pretočnem citometru.

Prve poskuse smo izvedli na mišji monocitni celični linij RAW264.7 z dvema mišjima monoklonskima aPT; 51A6 in 231D in kontrolnimi IgG protitelesi, izoliranimi iz zdrave miši. Ozadje vsakega poskusa je predstavljal vzorec brez protiteles. Naredili smo več zaporednih poskusov pri katerih smo ločeno spremenili največ en parameter, da smo našli optimalne pogoje za vezavo aPT na membrano viabilnih celic. Vsak posamezen poskus je bil zaradi variabilnosti bioloških sistemov ponovljen vsaj trikrat. Dokazali smo, da se obe monoklonski aPT vežeta na površino celic samo ob hkratni prisotnosti protrombina. Protitelesa 231D, ki imajo lastnosti aPS/PT, so se vezala intenzivneje kot 51A6, ki imajo lastnosti aPT-A. Kontrolna mišja IgG protitelesa, pa so se vezala na manj kot 0,5% celic, ne glede na prisotnost/odsotnost protrombina.

### **6.2.1 Iskanje optimalnih pogojev vezave protiteles proti protrombinu na viabilne monocite**

V preliminarnih poskusih smo sledili nekaterim pogojem inkubacije, kot so jih objavili D'Agnillo in sodelavci (85), ki so edini do sedaj potrdili vezavo aPT na membrano celic. V svoji študiji so pokazali, da se protrombin in aPT vežejo le na apoptotične celice Jurkat, medtem ko se na viabilne niso vezala. Toda znano je, da pride do sprememb v fiziološkem stanju membrane tako apoptotičnih celic kot tudi pri aktiviranih in poškodovanih celic (124). Pri naših poskusih smo celice obdelali s  $\text{Ca}^{2+}$ , protrombinom in protitelesi ter jih inkubirali 4 ure pri 37°C, 5% atmosferi  $\text{CO}_2$  in 100% relativni vlažnosti. Na ta način smo zagotovili celicam normalne fiziološke pogoje v času obdelave/obrnave s protrombinom in protitelesi. Nasprotno so D'Agnillo in sodelavci najprej izzvali apoptozo in šele nato tretirali celice s protrombinom in protitelesi, na ledu pri +4°C.

Predpostavili smo, da bodo aktivirane celice na svoji membrani izpostavile večji delež negativno nabitih fosfolipidov, kar bi vodilo v vezavo antifosfolipidnih protiteles. Z namenom aktiviranja celic, smo najprej mišje monocite RAW 264.7 stimulirali z LPS. To je glavna strukturna komponenta zunanje membrane po gramu negativnih bakterij in sproži intenzivni imunski odziv pri vretenčarjih. Je močan aktivator mnogih celičnih linij, predvsem makrofagov, ki posledično sprostijo številne citokine, le-ti pa usmerjajo imunski odziv (126). Celice smo preko noči stimulirali s 500  $\mu\text{g/L}$  LPS. Naslednji dan smo celicam dodali protrombin in aPT ter jih ob prisotnosti fiziološke koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  inkubirali 4 ure pri 37°C, 5% atmosferi  $\text{CO}_2$  in 100% relativni vlažnosti. Nato smo merili vezavo protiteles na površino celic. Ugotovili smo, da LPS ni povzročil takšnega porušenja membranske integritete, ki bi omogočilo vezavo antifosfolipidnih protiteles, saj je bila

vezava obeh monoklonskih aPT in tudi kontrolne mIgG, ob prisotnosti protrombina, zanemarljiva (slika 16). Preverili smo še vpliv višjih koncentracij LPS na stimulacijo monocitov RAW264.7 in posledično vezavo protiteles na njihovo površino. Potrdili smo koncentracijski vpliv, vendar kljub temu, da so se aPT pri višjih koncentracijah LPS vezala nekoliko močnejše na monocite, je bila ta vezava še vedno šibka in celo intenzivnejša v odsotnosti protrombina (slika 17).

Asimetrija lipidov v membrani je vsaj deloma vzdrževana z encimom aminofosfolipidna translokaza, ki transportira fosfatidilserin in fosfatidiletanolamin iz zunanje v notranjo plast membrane. Ker je spontano gibanje med obema plastema membrane počasno, je integriteta membrane lahko stabilna več ur ali celo dni po inhibiciji aminofosfolipidne translokaze. Nasprotno pa se lipidna asimetrija hitro poruši tudi ob povečani koncentraciji znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  (127) in pri tem ima pomembno vlogo nespecifična lipidna skramblaza, ki katalizira dvosmerno transmembransko mešanje lipidov (74). Glavna posledica tega je površinska izpostavitve fosfatidilserina, kar podpira in omogoča strjevanje krvi. Iz tega vidika nas je v nadaljevanju zanimalo, kako kalcijevi ioni vplivajo na aktivacijo celic, oziroma na izpostavitve fosfatidilserina na membrani celic. Mišje monocite smo stimulirali z različnimi koncentracijami  $\text{Ca}^{2+}$  ob prisotnosti protrombina in monoklonskih aPT 51A6. V osnovnem gojišču za gojenje celic (DMEM-1640) je 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , kar je bila naša izhodiščna koncentracija. Vezava protiteles je bila najnižja v fizioloških koncentracijah  $\text{Ca}^{2+}$ , ki je 2,2-2,6 mM (105). Pri višji ali nižji koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$ , smo izmerili večji delež celic, ki so vezala protitelesa 51A6. Ugotovili smo, da  $\text{Ca}^{2+}$  pomembno vplivajo na vezavo protrombina in aPT na membrano monocitov, najverjetneje, ker vplivajo na delovanje nespecifične lipidne skramblaze, ki transportira fosfatidilserin na zunanjo membrano. Največ, to je 19,4% celic, je vezalo protitelesa 51A6 pri koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  3 mM, katero smo uporabili tudi v vseh nadaljnjih poskusih.

V poskusih časovne odvisnosti na vezavo aPT smo pokazali, da se obe vrsti monoklonskih aPT vežejo na površino celic najboljše po 3-4 urah inkubacije. V tem času se je v zunanjo plast celične membrane transportiralo največ fosfatidilserina. Na izpostavitve fosfatidilserina je najprej vplivala povišana koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$ . Ob vezavi prvih molekul aPT preko protrombina, pa so se celice najverjetneje še dodatno aktivirale in posledično izpostavile še več fosfatidilserina, kar je omogočilo večjo vezavo z daljšim časom inkubacije. Vendar pa se je vezava monoklonskih aPT po več kot šestih urah inkubacije postopno spet nižala. Predvidevamo, da je to posledica celičnih mehanizmov, ki postopoma celici povrnejo membransko asimetrijo. Celica namreč po določenem času aktivacije ponovno vzpostavi normalno fiziološko stanje; v nasprotnem primeru preide v programirano smrt ali apoptozo. Ker smo v naših poskusih zagotovili fiziološke pogoje za rast celic, so le-te po določenem času aktivacije najverjetneje znova vzpostavile integriteto membrane. S tem je bila onemogočena vezava protrombina in aPT na površino celic. Že vezani kompleksi protrombin-aPT so tako ali disociirali stran od membrane ali pa jih je celica internalizirala. Zanimivo je tudi, da so se po daljšem času inkubacije (>12ur) na površino celic vezala kontrolna mišja IgG. V tem primeru ne gre za specifično vezavo na membrano celic, ampak so se mišja poliklonska IgG protitelesa, izolirana iz zdrave miši, zelo verjetno vezala nespecifično preko Fc receptorjev, ki so na monocitih prisotni v velikem številu (128). Na osnovi teh ugotovitev smo v vseh nadaljnjih poskusih monocite tretirali s protrombinom in protitelesi ob prisotnosti 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  4 ure.

Preveriti smo morali tudi optimalno koncentracijo protrombina in protiteles za vezavo na membrane celic. V več različnih poskusih smo pri različnih koncentracijah protrombina in monoklonskih aPT 231D merili vezavo na površino celic. Monoklonska aPT 231D smo izbrali, ker so v predhodnih poskusih pokazala največjo kapaciteto vezave. Podatki, ki so jih objavili D'Agnillo in sodelavci (85) kažejo, da je pri koncentraciji protrombina 5 mg/L intenziteta vezave aPT enaka kot pri 20 mg/L. Na osnovi tega smo v naših poskusih preverili razpon koncentracij protrombina med 0-10 mg/L (slika 20). Pri koncentraciji protrombina 5 mg/L smo, prav tako kot D'Agnillo in sodelavci (85), dosegli maksimalno vezavo 231D. Hkrati s protrombinom pa smo spreminjali tudi koncentracijo 231D in ugotovili, da višanje koncentracije protiteles in protrombina ne pomeni nujno večje vezave na površino celic. Sama intenziteta je verjetno bolj odvisna od razpoložljive fosfatidilserinske površine in povečevanje koncentracije protrombina ter protiteles nima učinka. Največjo vezavo smo izmerili pri koncentraciji aPT 231D 7,5 mg/L in koncentraciji protrombina 5 mg/L, ki sta bili nato zagotovljeni tudi v vseh nadaljnjih poskusih.

V prvem delu magistrske naloge smo v naših *in vitro* poskusih potrdili, da hkratna prisotnost aPT in protrombina potisne razmerje med vezanim in nevezanim protrombinom v prid vezanega. Prav tako smo pokazali, da hkratna prisotnost aPT poveča koncentracijo protrombina na anionski površini, kar posledično favorizira vezavo aPT. Te ugotovitve smo želeli podkrepiti tudi z *in vivo* dokazi. Tako smo zasnovali poskus, pri katerem smo preverili vezavo obeh monoklonskih aPT 231D in 51A6 ter kontrolne mišje IgG frakcije na površino mišjih monocitov RAW 264.7 pri 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  v štirih različnih pogojih. Protrombin smo, ali odstranili pred dodatkom protiteles, ali pa smo ga inkubirali hkrati s protitelesi različno dolgo. Obe monoklonski aPT sta se vezali na površino celic samo v dveh primerih, ko je bil v celični suspenziji, hkrati z njimi, prisoten tudi protrombin (slika 21). Zelo pomembno je, da smo v primeru, ko je bil protrombin inkubiran ločeno in nato pred dodatkom protiteles odstranjen iz celične suspenzije, izmerili minimalno vezavo protiteles na površino celic. Intenziteta vezave v slednjem primeru je bila celo enaka kot v primeru, kjer protrombina sploh ni bilo v celični suspenziji. Kontrolna mišja IgG frakcija se je v vseh pogojih vezala na manj kot 1% celic. Torej so se aPT vezala na membrano celic le, če je bil v gojišču istočasno prisoten tudi protrombin, kot so v svoji študiji ugotovili tudi D'Agnillo in sodelavci (85). Pri vezavi aPT na komplekse protrombina in fosfatidilserina delujeta vsaj dva procesa. Najprej se na protrombinu po njegovi vezavi na fosfatidilserin izpostavi neo-epitop, kar poveča afiniteto aPT za novo nastali epitop na protrombinu. Drugič pa fosfatidilserin nudi površino, na kateri se protrombin lahko nakopiči dovolj na gosto, tako da obe vezavni mesti na aPT, ki bi drugače slabo vezali protrombin v raztopini, sedaj vežeta protrombin z večjo avidnostjo. V slednjem primeru se protitelesa vežejo na antigen bivalentno. Na osnovi omenjenih trditev in naših rezultatov lahko zaključimo da, aPT 1. povečajo nalaganje protrombina na anionske fosfolipide, 2. preprečujejo njegovo disociiranje iz celične membrane in 3. povečajo dostopnost protrombina na površini celice.

V prvem delu magistrske naloge smo tudi razpravljali o *in vitro* določanju dveh populacij aPT. Zaključili smo, da naša modificirana metoda aPS/PT ELISA omogoča detekcijo obeh domnevnih populacij aPT, tako aPT-A, kot tudi aPS/PT. Hkrati pa smo se tudi spraševali o njunem dejanskem obstoju *in vivo* in zaključili, da verjetno obstojajo razlike le v avidnosti ne pa tudi epitopski specifičnosti in zato omenili morebiten obstoj subpopulacij. Raziskovalna skupina prof. Takao Koike iz Sappora na Japonskem je razvila dve različni

monoklonski aPT, ki prepoznavata različne epitope na protrombinu. Eno aPT (51A6) je visoko afinitetno za čisti protrombin (PT-A), drugo (231D) pa je minimalno reaktiven za čisti protrombina in je visoko afiniteten za protrombin, kadar je le-ta v kompleksu s fosfatidilserinom. Obe monoklonski protitelesi ločeno določamo v aPT-A oziroma aPS/PT ELISA. Vezavo obeh monoklonskih aPT smo testirali na mišjih monocitih RAW264.7, da bi ugotovili ali obstojajo razlike med njima tudi *in vivo*. V skladu z našimi prvotnimi pričakovanji so se protitelesa 231D, ki imajo lastnosti aPS/PT v vseh poskusih vezala intenzivneje, kot 51A6, ki imajo lastnosti aPT-A. Enako so ugotovili tudi D'Agnillo in sodelavci (85), kajti tudi njihovo monoklonsko protitelo z značilnostmi aPS/PT, se je vezalo močnejše v primerjavi z aPT-A monoklonskim protitelesom. V svoji raziskavi pa so monoklonska protitelesa tudi cepili najprej s pepsinom do F(ab')<sub>2</sub> in jih nato še reducirali do monovalentnih fragmentov Fab. Slednji so se na protrombin, vezan na membrane celic ali na druge fosfolipidne površine vezali enako močno kot cele imunoglobulinske molekule. Na ta način so pokazali, da je njihovo monoklonsko aPS/PT protitelo visoko avidno za epitop, ki se izpostavi na protrombinu šele po njegovi vezavi na negativno nabite fosfolipide. S tem so ovrgli domnevo, da gre za nizko avidno protitelo, ki bi se vezalo intenzivneje le zaradi večje gostote protrombina na fosfolipidni površini. Naši rezultati te ugotovitve v določeni meri potrjujejo, vendar bi bilo potrebno 231D in 51A6 monoklonska protitelesa cepiti s pepsinom za bolj definitivne zaključke, kar pa zaradi omejene količine monoklonskih protiteles v naši raziskavi ni bilo možno izvesti.

### 6.2.2 Primerjava vezave monoklonskih protiteles proti protrombinu na različnih celičnih linijah

Tri različne celične linije smo pod enakimi pogoji, kot smo jih prej vzpostavili na mišjih monocitih RAW264.7, inkubirali s protrombinom, protitelesi in kalcijevimi ioni. Izbrali smo celice THP1, ki so enako kot RAW 264.7 monociti vendar so humanega in ne mišjega izvora. Drugi dve celični liniji, to so celice Daudi in celice 3T3-L1, pa sta bili izbrani neprokoagulantni, z predvidevanjem, da bo vezava na njihovo površino šibkejša, ker niso neposredno vključene v kaskadno reakcijo strjevanja krvi.

Pričakovali smo, da bomo tudi pri drugih celičnih linijah izmerili vezavo aPT na membrano celic in da bo ta vezava na prokoagulantnih celičnih linijah intenzivnejša. V nasprotju z mišjimi monociti RAW264.7 pa smo pri humanih monocitih THP1 izmerili zelo visoko vezavo protiteles na površino celic v odsotnosti protrombina. Največji delež vezave smo celo izmerili v vzorcu z kontrolnimi mišjimi IgG (slika 22). Možna razlaga teh nepričakovanih rezultatov je, da so se protitelesa vezala na membrano monocitov THP1 nespecifično z Fc delom imunoglobulinske molekule. Znano je, da monociti na svoji površini izražajo veliko število Fc receptorjev (1, 128). Omenjena vezava je bila intenzivnejša od specifične, z Fab predelom posredovane, vezave na protrombin in je nad slednjo najverjetneje prevladala. Ena izmed možnih rešitev tega problema bi bilo blokiranje Fc receptorjev na monocitih, druga pa cepitev protiteles s pepsinom, da se znebimo Fc predela imunoglobulinskih molekul. Pri slednji nas ovirajo omejene količine monoklonskih protiteles.

V skladu z našimi pričakovanji, da bodo celične linije, ki v telesu neposredno sodelujejo v kaskadni reakciji strjevanja krvi, vezala aPT intenzivneje kot druge celične linije, pa smo to tudi potrdili. Monoklonska aPT 231D so se vezala tako na površino mišjih fibroblastov 3T3-L1 kot tudi na humane limfoblaste Daudi v prisotnosti protrombina. Delež celic, ki so

vezala 231D protitelesa pa je bil znatno nižji, kot pri mišjih monocitih RAW264.7 (slika 23). Monoklonska aPT 51A6 so se enako kot kontrolna mišja IgG protitelesa vezala na manj kot 2% celic. Tudi pri teh celičnih linijah smo potrdili razliko med aPS/PT monoklonskimi protitelesi 231D in pa aPT-A monoklonskimi protitelesi 51A6, saj so se slednja na membrano vezala minimalno. Na osnovi ugotovljenega povzemamo, da so v *in vivo* pogojih aPS/PT protitelesa bolj potentna za vezavo na membrane v primerjavi z aPT-A in jim lahko pripisujemo večji pomen v patogenezi APS.

### 6.2.3 Vezava poliklonskih protiteles

Za zaključek smo z nekaj preliminarnimi poskusi želeli vezavo aPT na membrane celic, ki smo jo pokazali z monoklonskimi aPT, potrditi tudi z aPT, ki smo jih predhodno izolirali iz serumov bolnikov z APS. Zato smo iz izbranih serumov, ki smo jih dobili iz obstoječih bank raziskovalne skupine prof. Takao Koike iz Sappora na Japonskem, izolirali IgG frakcije. Ti serumi niso imeli aCL, razlikovali pa so se na osnovi prisotnosti različnih aPT. Iz obstoječih bank našega laboratorija smo izbrali dva seruma bolnikov z APS in z visoko pozitivnimi tako aPS/PT in kot tudi aPT-A, iz katerih smo najprej izolirali IgG, nato pa še aPT. Vzorce smo razdelili v štiri skupine (slika 24): skupina z negativnimi vzorci, skupina z vzorci pozitivnimi samo na aPT-A, skupina z vzorci pozitivnimi samo na aPS/PT in skupina, v kateri so bili vzorci pozitivni na aPT-A in hkrati tudi na aPS/PT.

Pri vseh vzorcih, tako frakcijah IgG kot tudi pri obeh izoliranih aPT, smo izmerili visoko nespecifično vezavo na površino celic v odsotnosti protrombina (Slika 24). V izoliranih IgG frakcijah so, poleg aPT protiteles, prisotna tudi protitelesa usmerjena proti številnim drugim antigenom med njimi tudi anti- $\beta_2$ GPI. Bolj prečiščena sta bila le dva vzorca, katerima smo iz IgG frakcij, na koloni z vezanim protrombinom, izolirali samo aPT. Kljub temu pa so tudi v teh dveh vzorcih še vedno t.i. poliklonska protitelesa, ki prepoznavajo več različnih epitopov na molekuli protrombina, za razliko od monoklonskih protiteles, ki so vsa usmerjena le proti enemu specifičnemu epitopu (1, 128). Zaradi tega poliklonska protitelesa lahko prepoznavajo tudi druge strukture na membrani celic in ne le epitopov protrombinske molekule. Verjetno je, da so se v celični suspenziji, kjer ni bilo prisotnega protrombina, na membrano vezala tista protitelesa, ki niso usmerjena proti protrombinu. V celični suspenziji, kjer je bil protrombin prisoten, pa so se poleg slednjih vezala tudi aPT, vendar je vezava prvih prevladovala. Poleg tega pa smo celice ves čas inkubacije s protrombinom in protitelesi vzdrževali v gojišču, ki je vseboval proteine govejega seruma, kjer je prisoten tudi  $\beta_2$ GPI. Zato je zelo verjetno, da smo v vzorcih z IgG frakcijami določili tudi vezavo anti  $\beta_2$ GPI na  $\beta_2$ GPI. Temu problemu bi se morda lahko izognili tako, da bi celice v času inkubacije s protitelesi inkubirali v gojišču, ki ne vsebuje proteinov govejega seruma. Vendar bi to posledično vplivalo tudi na samo fiziološko stanje celic, saj le-te po določenem času v gojišču brez dodatnih proteinov umrejo, temu pa smo se želeli izogniti.

Poleg koncentracije protiteles 7,5 mg/L, smo testirali še višjo koncentracijo 40 mg/L. V vzorcu s poliklonskimi protitelesi je namreč koncentracija specifičnih aPT znatno nižja. Zato smo pričakovali, da bomo pri višji koncentraciji protiteles izmerili tudi višjo specifično vezavo v prisotnosti protrombin, ki bi morda nadvladala nespecifično vezavo na proteine govejega seruma. Kljub temu, da smo pri višji koncentraciji dejansko izmerili večje deleže celic, ki so vezala protitelesa, pa se razlika med specifično in nespecifično vezavo ni povečala.

Kljub neugodni vezavi v odsotnosti protrombina pa je zanimivo, da so se na površino celic vezali najintenzivneje tisti vzorci, ki so imeli hkrati prisotna tako aPS/PT kot tudi aPT-A, medtem ko smo najnižjo vezavo izmerili prav pri bolnikih, ki so bili negativni.

Čeprav s poliklonskimi aPT izoliranimi iz bolnikov z APS nismo uspeli potrditi rezultatov monoklonskih aPT, pa bomo v prihodnje te raziskave nadaljevali. Kot je že bilo v prvem delu razprave omenjeno bi bilo smiselno izvesti izolacijo aPT tudi na tistih serumih, ki so pozitivni samo na aPS/PT ali samo na aPT-A. Na ta način bi morda dobili bolj prečiščena aPT, pri katerih bi bila vezava na membrano celic v odsotnosti protrombina zanemarljiva.

Tako z *in vitro* kot tudi *in vivo* testi smo pokazali, da aPT učinkoviteje prepoznajo protrombin, ko je le-ta v kompleksu s fosfolipidi, medtem ko je vezava v raztopini minimalna. Obenem pa protitelesa tudi povečajo količino na fosfolipide vezanega protrombina in preprečujejo njegovo disociacijo. Protrombin je pomemben faktor v kaskadni reakciji strjevanja krvi, zato so upravičena domnevanja, da aPT, enako kot druga antifosfolipidna protitelesa značilno prisotna pri bolnikih z APS, prispevajo k nastanku tromboz pri teh bolnikih. Na našem vzorcu bolnikov s SAB smo jasno potrdili korelacijo med arterijskimi trombozami in prisotnostjo aPS/PT, v kolikor so slednja določena z našo modificirano metodo. Pomembno je, da modificirana izvedba aPS/PT ELISA omogoča določitev tudi velikega deleža aPT-A protiteles in trdimo, da metoda omogoča določanje različnih subpopulacij aPT, s tem pa se močno poveča njena klinična uporabnost. Z poskusi na celičnih linijah, smo uspeli prvi pokazati vezavo aPT ob prisotnosti kalcija in protrombina na površino viabilnih celic, saj so drugi raziskovalci pokazali in trdili, da se le-ta vežejo samo na apoptotične celice. S tem smo pritrdili domnevam o patofiziološki vlogi v plazmi krožečih aPT, saj je za njihovo vlogo v hiperkoagulabilnem stanju značilnem za APS, nujna vezava na površino celic. Čeprav smo pokazali vezavo monoklonskih aPT na površino celic pa so potrebna še nadaljnja raziskovanja s poliklonskimi protitelesi in njihovimi Fab fragmenti. Odprta ostajajo še številna vprašanja, med njimi tudi kako aPT in tudi druga antifosfolipidna protitelesa po vezavi na površino celice sprožijo odgovor v celicah kar vodi v sintezo prokoagulantnih faktorjev. Zelo verjetno pa je, da pri tem sodeluje nek kofaktor, ki prenese signal v celico, vendar dokaza o njegovem obstoju še ni.

## 7 SKLEPI

1. Na osnovi naših *in vitro* rezultatov razlagamo obstoj več različnih subpopulacij aPT, ki se razlikujejo v avidnosti ne pa tudi epitopski specifičnosti, kar je v nasprotju za našimi začetnimi pričakovanji. Z našo modificirano aPS/PT ELISA določamo različne subpopulacije aPT, kar poveča njeno klinično uporabnost. Ta metoda bi morebiti lahko nadomestila ločeno testiranje aPT-A in aPS/PT s standardnimi metodami.
2. Hkratna prisotnost aPT in protrombina v raztopini potisne razmerje topnega protrombina v smer vezanega in poveča njegovo gostoto na anionski površini.
3. Dokazali smo visoko stopnjo povezanosti aPS/PT določenih z našo modificirano metodo s kliničnimi znaki APS. Pri bolnikih z aPS/PT smo izmerili največje razmerje obetov za razvoj arterijske tromboze v primerjavi z anti- $\beta_2$ GPI in aCL, kar je dokaz za potrebo po študijah o morebitnih vzročnih povezavah, ki bi potrdila ali so aPS/PT pomemben in neodvisen faktor tveganja za arterijsko trombozo. V prihodnje bo smiselno opozarjati tudi o možni vključitvi aPS/PT, poleg že uveljavljenih aCL in anti- $\beta_2$ GPI, v laboratorijske kriterije za postavitev diagnoze APS.
4. Določili smo visoko avidna aPT in potrdili podobnosti v karakteristikah med aPT in anti- $\beta_2$ GPI. Predhodne ugotovitve naše raziskovalne skupine, da visoko avidna anti- $\beta_2$ GPI pri bolnikih z APS niso redkost, lahko povzamemo tudi za aPT.
5. Določili smo optimalne pogoje za vezavo aPT na viabilne prokoagulantne celične linije. Vezava monoklonskih aPT je bila najintenzivnejša po štirih urah inkubacije pri koncentraciji protrombina 5 mg/L, koncentraciji protiteles 7,5 mg/L in koncentraciji kalcijevih ionov 3 mM. Celice so bile pod temi pogoji aktivirane in so na svoji površini izpostavile fosfatidilserin. Omogočena je bila vezava protrombina ter aPT in tako smo pokazali, da se aPT vežejo tudi na viabilne celice in ne le na apoptotične celice, kot je bilo do sedaj opisano v literaturi.
6. Nekatere značilnosti aPT *in vivo* smo potrdili tudi *in vitro*. aPT potrebujejo hkratno prisotnost protrombina za vezavo na celične membrane in najverjetneje preprečijo njegovo disociacijo s površin celic, kot tudi iz drugih fosfolipidnih površin.
7. Monoklonska aPS/PT (231D) se vežejo na membrane celic z večjo intenziteto kot aPT-A monoklonska protitelesa (51A6).
8. Vezava aPT je bila najintenzivnejša na membrane prokoagulantne celične linije mišjih monocitov RAW264.7, medtem ko je na bila na ne-prokoagulantnih celičnih linijah mišjih fibroblastov 3T3-L1 in humanih limfoblastov Daudi, znatno nižja.

## 8 LITERATURA

- (1) Vozelj M: Temelji imunologije. 1. izdaja, Ljubljana, DZS, 2000. str.48-51; 91-98; 101-113.
- (2) Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B: Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. *Autoimmun Rev* 2005; 4(5): 303-308.
- (3) Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B: poglavje Affinity and Avidity of Autoantibodies; v knjigi: Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL, : Autoantibodies. Elsevier, 2007, str.21-28.
- (4) Lotze MT, Thompson AW: Measuring immunity. Basic science and clinical practice. Amsterdam, Elsevier, 2005.
- (5) Božič B: Laboratorijska diagnostika in spremljanje revmatskih bolezni. *Farm Vestn* 2004; 55: 113-118.
- (6) Hughes GR: Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983; 287(6399): 1088-1089.
- (7) Harris EN, Pierangeli SS, Gharavi AE: Diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a proposal for use of laboratory tests. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S144-S148.
- (8) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.
- (9) Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA: International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7): 1309-1311.
- (10) Roubey RA: Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* 1994; 84(9): 2854-2867.
- (11) Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335(8705): 1544-1547.
- (12) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T: Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336(8708): 177-178.
- (13) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(11): 4120-4124.
- (14) Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF: Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66(6): 629-632.
- (15) Roubey RA: Antigenic specificities of antiphospholipid autoantibodies: implications for clinical laboratory testing and diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1996; 5(5): 425-430.

- (16) Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA: A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992; 1(2): 75-81.
- (17) Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV: Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72(2): 512-519.
- (18) Roubey RA, Pratt CW, Buyon JP, Winfield JB: Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon beta 2-glycoprotein I. *J Clin Invest* 1992; 90(3): 1100-1104.
- (19) Galli M: Antiphospholipid syndrome: association between laboratory tests and clinical practice. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(5-6): 249-255.
- (20) Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL: Autoantibodies.2. izdaja, ELSEVIER, 2007.
- (21) Roubey RA: Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39(9): 1444-1454.
- (22) Kandiah DA, Krilis SA: Beta 2-glycoprotein I. *Lupus* 1994; 3(4): 207-212.
- (23) Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO: Anti beta 2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995; 89(2): 397-402.
- (24) Willems GM, Janssen MP, Pelsers MM, Comfurius P, Galli M, Zwaal RF, Bevers EM: Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-beta 2-glycoprotein I complexes to lipid membranes. *Biochemistry* 1996; 35(43): 13833-13842.
- (25) Huang M, Rigby AC, Morelli X, Grant MA, Huang G, Furie B, Seaton B, Furie BC: Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat Struct Biol* 2003; 10(9): 751-756.
- (26) Degen SJ, Davie EW: Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; 26(19): 6165-6177.
- (27) DE Groot PG, Horbach DA, Simmelink MJ, van OE, Derksen RH: Anti-prothrombin antibodies and their relation with thrombosis and lupus anticoagulant. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S32-S36.
- (28) Amengual O, Atsumi T, Koike T: Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48(4): 886-895.
- (29) Edson JR, Vogt JM, Hasegawa DK: Abnormal prothrombin crossed-immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood* 1984; 64(4): 807-816.
- (30) Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, Hackeng TM, Bouma BN, DE Groot PG: Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81(10): 2618-2625.
- (31) Galli M: poglavje Anti-Prothrombin Antibodies; v knjigi: Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y, : *The Antiphospholipid Syndrome II* . Elsevier, 2002, str.59-70.
- (32) Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T: Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 77(3): 486-491.
- (33) Horbach DA, van OE, Donders RC, Derksen RH, DE Groot PG: Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1996; 76(6): 916-924.

- (34) Horbach DA, van OE, Derksen RH, DE Groot PG: The contribution of anti-prothrombin-antibodies to lupus anticoagulant activity--discrimination between functional and non-functional anti-prothrombin-antibodies. *Thromb Haemost* 1998; 79(4): 790-795.
- (35) Bajaj SP, Rapaport SI, Barclay S, Herbst KD: Acquired hypoprothrombinemia due to non-neutralizing antibodies to prothrombin: mechanism and management. *Blood* 1985; 65(6): 1538-1543.
- (36) Galli M, Bevers EM, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF: Effect of antiphospholipid antibodies on procoagulant activity of activated platelets and platelet-derived microvesicles. *Br J Haematol* 1993; 83(3): 466-472.
- (37) Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG: Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74(4): 1120-1125.
- (38) Galli M, Barbui T: Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 1999; 93(7): 2149-2157.
- (39) Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T: Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179(2): 457-462.
- (40) Pengo V, Biasiolo A, Fior MG: Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when beta 2-glycoprotein I is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost* 1995; 73(1): 29-34.
- (41) Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, Kawasugi K, Gohchi K, Tsukamoto M: Phosphatidyl serine-dependent antiprothrombin antibody is exclusive to patients with lupus anticoagulant. *Br J Rheumatol* 1996; 35(6): 589-591.
- (42) Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike T: Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9): 1982-1993.
- (43) Pierangeli SS, Goldsmith GH, Branch DW, Harris EN: Antiphospholipid antibody: functional specificity for inhibition of prothrombin activation by the prothrombinase complex. *Br J Haematol* 1997; 97(4): 768-774.
- (44) Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, Bevers EM, Willems GM, DE Groot PG: Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol* 2001; 113(3): 621-629.
- (45) Wu JR, Lentz BR: Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb Haemost* 1994; 71(5): 596-604.
- (46) Cakir, B., Rivadeneira, A. C., Hayes, P. M., Ortel, T. L., Petri, M., Roubey, R. A.: Anti-prothrombin autoantibodies: detection and characterization. *Lupus* 1998; 7(2): S219.
- (47) Willems GM, Janssen MP, Comfurius P, Galli M, Zwaal RF, Bevers EM: Kinetics of prothrombin-mediated binding of lupus anticoagulant antibodies to phosphatidylserine-containing phospholipid membranes: an ellipsometric study. *Biochemistry* 2002; 41(48): 14357-14363.
- (48) Rao LV, Hoang AD, Rapaport SI: Differences in the interactions of lupus anticoagulant IgG with human prothrombin and bovine prothrombin. *Thromb Haemost* 1995; 73(4): 668-674.

- (49) Rao LV, Hoang AD, Rapaport SI: Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood* 1996; 88(11): 4173-4182.
- (50) Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T: Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1999; 8(9): 761-766.
- (51) Galli M: Should we include anti-prothrombin antibodies in the screening for the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun* 2000; 15(2): 101-105.
- (52) Čučnik, S., Kveder, T., Božič, B.: Heterogeneity of anti-prothrombin antibodies, detected by different ELISAs. *Lupus* 2002; 11(9): 578.
- (53) Čučnik, S., Kveder, T., Božič, B.: Paratope diversity of anti-thrombin antibodies = Paratopska raznolikost protiteles proti trombinu. *Zbornik razširjenih povzetkov, Farmaceutski vestnik* 2004; 55 (posebna št.): 350-351.
- (54) Nojima J, Iwatani Y, Suehisa E, Kuratsune H, Kanakura Y: The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Haematologica* 2006; 91(5): 699-702.
- (55) Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T: Significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other antiphospholipid antibody assays. *Mod Rheumatol* 2006; 16(3): 158-164.
- (56) Ghirardello A, Bizzaro N, Zampieri S, Iaccarino L, Bassi N, Tozzoli R, Ruffatti A, Villalta D, Tonutti E, Doria A: Biological and clinical relevance of anti-prothrombin antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109: 503-510.
- (57) Bertolaccini ML, Atsumi T, Koike T, Hughes GR, Khamashta MA: Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems. Prevalence and clinical significance in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 2005; 93(2): 289-297.
- (58) Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, Alessandri C, Allegri F, Bistoni O, Bizzaro N, Caccavo D, Galeazzi M, Gerli R, Giovannelli L, Longobardo G, Lotzniker M, Malacarne F, Migliorini P, Parodi A, Pregnolato F, Radice A, Ricciari V, Ruffelli M, Sinico RA, Tozzoli R, Villalta D, Marcolongo R, Meroni P: Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(2): 268-274.
- (59) Arnout J: The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996; 75(4): 536-541.
- (60) Field SL, Hogg PJ, Daly EB, Dai YP, Murray B, Owens D, Chesterman CN: Lupus anticoagulants form immune complexes with prothrombin and phospholipid that can augment thrombin production in flow. *Blood* 1999; 94(10): 3421-3431.
- (61) Ferro D, Quintarelli C, Valesini G, Violi F: Lupus anticoagulant and increased thrombin generation in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 1994; 83(1): 304.
- (62) Musial J, Swadzba J, Jankowski M, Grzywacz M, Bazan-Socha S, Szczeklik A: Thrombin generation measured *ex vivo* following microvascular injury is increased in SLE patients with antiphospholipid-protein antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 78(4): 1173-1177.

- (63) Field SL, Chesterman CN, Dai YP, Hogg PJ: Lupus antibody bivalency is required to enhance prothrombin binding to phospholipid. *J Immunol* 2001; 166(10): 6118-6125.
- (64) Galli M, Daldossi M, Barbui T: Anti-glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1994; 71(5): 571-575.
- (65) Wurm H: beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem* 1984; 16(5): 511-515.
- (66) Op den Kamp JA: Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* 1979; 48: 47-71.
- (67) Rauch J, Janoff AS: The nature of antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1992; 19(11): 1782-1785.
- (68) Levine JS, Koh JS, Subang R, Rauch J: Apoptotic cells as immunogen and antigen in the antiphospholipid syndrome. *Exp Mol Pathol* 1999; 66(1): 82-98.
- (69) Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF: Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta* 1983; 736(1): 57-66.
- (70) Chen PP, Lin YC, Wu KC, Yen JH, Ou TT, Wu CC, Liu HW, Tsai WC: Activation of endothelial cells by antiphospholipid antibodies--a possible mechanism triggering thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Kaohsiung J Med Sci* 2006; 22(10): 484-490.
- (71) Franck PF, Bevers EM, Lubin BH, Comfurius P, Chiu DT, Op den Kamp JA, Zwaal RF, van Deenen LL, Roelofsen B: Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. *J Clin Invest* 1985; 75(1): 183-190.
- (72) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148(7): 2207-2216.
- (73) Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14(3): 131-136.
- (74) Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P: Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 182(5): 1597-1601.
- (75) Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF: Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1439(3): 317-330.
- (76) Comfurius P, Bevers EM, Galli M, Zwaal RF: Regulation of phospholipid asymmetry and induction of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 1995; 4 Suppl 1: S19-S22.
- (77) Devaux PF: Phospholipid flippases. *FEBS Lett* 1988; 234(1): 8-12.
- (78) Bitbol M, Devaux PF: Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(18): 6783-6787.
- (79) Sahu SK, Gummadi SN, Manoj N, Aradhyam GK: Phospholipid scramblases: an overview. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462(1): 103-114.
- (80) Williamson P, Kulick A, Zachowski A, Schlegel RA, Devaux PF: Ca<sup>2+</sup> induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 1992; 31(27): 6355-6360.
- (81) Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ: Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating

- transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 1997; 272(29): 18240-18244.
- (82) Price BE, Rauch J, Shia MA, Walsh MT, Lieberthal W, Gilligan HM, O'Laughlin T, Koh JS, Levine JS: Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a beta 2-glycoprotein I-dependent manner. *J Immunol* 1996; 157(5): 2201-2208.
- (83) Rauch J, Subang R, D'Agnillo P, Koh JS, Levine JS: Apoptosis and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15(2): 231-235.
- (84) Levine JS, Subang R, Koh JS, Rauch J: Induction of anti-phospholipid autoantibodies by beta2-glycoprotein I bound to apoptotic thymocytes. *J Autoimmun* 1998; 11(5): 413-424.
- (85) D'Agnillo P, Levine JS, Subang R, Rauch J: Prothrombin binds to the surface of apoptotic, but not viable, cells and serves as a target of lupus anticoagulant autoantibodies. *J Immunol* 2003; 170(6): 3408-3422.
- (86) Chen Q, Stone PR, Woon ST, Ching LM, Hung S, McCowan LM, Chamley LW: Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease? *Thromb Res* 2004; 114(2): 101-111.
- (87) Harlow Ed LD: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- (88) *Affinity Chromatography: Principles and Methods*: PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1976.
- (89) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11): 1271-1277.
- (90) Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR: Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(1): 215-222.
- (91) Horita T, Ichikawa K, Kataoka H, Yasuda S, Atsumi T, Koike T: Human monoclonal antibodies against the complex of phosphatidylserine and prothrombin from patients with the antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2007; 16(7): 509-516.
- (92) Tsutsumi A, Ichikawa K, Matsuura E, Koike T: Anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S98-102.
- (93) Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GR: beta 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37(10): 1453-1461.
- (94) Žigon P. Določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu z encimsko imunskim testom na trdnem nosilcu. 2002. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije.
- (95) Bertolaccini ML, Atsumi T, Khamashta MA, Amengual O, Hughes GR: Autoantibodies to human prothrombin and clinical manifestations in 207 patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998; 25(6): 1104-1108.
- (96) Božič B. Antifosfolipidna protitelesa pri sistemskem lupusu eritematozusu in pri globoki venski trombozi. 1990. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani.
- (97) Loizou S, McCrea JD, Rudge JC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN: Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Standardization and quantitation of results. *Clin Exp Rheumatol* 1982;(2): 738-745.
- (98) Čučnik S, Ambrožič A, Božič B, Skitek M, Kveder T: Anti-beta2-glycoprotein I ELISA: methodology, determination of cut-off values in 434 healthy Caucasians

- and evaluation of monoclonal antibodies as possible international standards. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(8): 777-783.
- (99) Reber G, Schousboe I, Tincani A, Sanmarco M, Kveder T, De MP, Boffa MC, Arvieux J: Inter-laboratory variability of anti-beta2-glycoprotein I measurement. A collaborative study in the frame of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies Standardization Group. *Thromb Haemost* 2002; 88(1): 66-73.
- (100) Cyanogen Bromide activated Agarose. [C9210]. 1996. Taufkirchen, Germany, Sigma-Aldrich Chemie GmbH.
- (101) Instruction immunopure (G) IgG purification kit. [4441-0492W]. 2005. Rockford, USA, Pierce.
- (102) RAW 264.7. [TIB-71]. 2008. Wesel, Germany, ATCC The Global Bioresource Center and LGC Standards GmbH .
- (103) THP-1. [TIB-202]. 2008. Wesel, Germany, ATCC The Global Bioresource Center and LGC Standards GmbH .
- (104) Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS: Distinguishing plasma lupus anticoagulants from anti-factor antibodies using hexagonal (II) phase phospholipids. *Thromb Haemost* 1989; 62(3): 892-896.
- (105) Berne RM, Levy MN: *Physiology*. 4th izdaja, St. Louis , Mosby, 1998.
- (106) Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T: Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprotrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102(8): 2717-2723.
- (107) Ambrožič, A., Kveder, T., ŽIGON, P., Božič, B.: A modified ELISA for the detection of phosphatidylserine dependent anti-protrombin antibodies with increased sensitivity and specificity. *Ann.Rheum.Dis.* 2002; 61(1): 218-219.
- (108) Puurunen M, Vaarala O, Julkunen H, Aho K, Palosuo T: Antibodies to phospholipid-binding plasma proteins and occurrence of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80(1): 16-22.
- (109) Čučnik S, Kveder T, Križaj I, Rozman B, Božič B: High avidity anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(11): 1478-1482.
- (110) Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T: Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179(2): 457-462.
- (111) Koike T, Matsuura E: Anti-beta 2-glycoprotein I antibody: specificity and clinical significance. *Lupus* 1996; 5(5): 378-380.
- (112) Reddel SW, Wang YX, Krilis SA: Anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies require an antigen density threshold, consistent with divalent binding. *Lupus* 2003; 12(1): 37-45.
- (113) Tincani A, Spatola L, Prati E, Allegri F, Ferremi P, Cattaneo R, Meroni P, Balestrieri G: The anti-beta2-glycoprotein I activity in human anti-phospholipid syndrome sera is due to monoreactive low-affinity autoantibodies directed to epitopes located on native beta2-glycoprotein I and preserved during species' evolution. *J Immunol* 1996; 157(12): 5732-5738.
- (114) Sheng Y, Kandiah DA, Krilis SA: Anti-beta 2-glycoprotein I autoantibodies from patients with the "antiphospholipid" syndrome bind to beta 2-glycoprotein I with low affinity: dimerization of beta 2-glycoprotein I induces a significant increase in anti-beta 2-glycoprotein I antibody affinity. *J Immunol* 1998; 161(4): 2038-2043.

- (115) Koike T, Bohgaki M, Amengual O, Atsumi T: Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench. *J Autoimmun* 2007; 28(2-3): 129-133.
- (116) Del PN, Guidali L, Sala A, Buccellati C, Khamashta MA, Ichikawa K, Koike T, Balestrieri G, Tincani A, Hughes GR, Meroni PL: Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Human polyclonal and monoclonal anti-beta 2-glycoprotein I antibodies react *in vitro* with endothelial cells through adherent beta 2-glycoprotein I and induce endothelial activation. *Arthritis Rheum* 1997; 40(3): 551-561.
- (117) Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Hall J, Harris EN, Pierangeli SS: E-Selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2003; 1(4): 843-848.
- (118) Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN: Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *Circ Res* 2001; 88(2): 245-250.
- (119) Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR: The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998; 79(2): 276-281.
- (120) Reverter JC, Tassies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, Ordinas A: Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein s. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(11): 1319-1326.
- (121) Reverter JC, Tassies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, Escolar G, Hughes GR, Ingelmo M, Ordinas A: Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum* 1998; 41(8): 1420-1427.
- (122) Zhou H, Wolberg AS, Roubey RA: Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by diltiazem. *Blood* 2004; 104(8): 2353-2358.
- (123) Del PN, Sheng YH, Raschi E, Kandiah DA, Tincani A, Khamashta MA, Atsumi T, Hughes GR, Ichikawa K, Koike T, Balestrieri G, Krilis SA, Meroni PL: Human beta 2-glycoprotein I binds to endothelial cells through a cluster of lysine residues that are critical for anionic phospholipid binding and offers epitopes for anti-beta 2-glycoprotein I antibodies. *J Immunol* 1998; 160(11): 5572-5578.
- (124) Zhao Y, Rumold R, Zhu M, Zhou D, Ahmed AE, Le DT, Hahn BH, Woods VL, Jr., Chen PP: An IgG antiprothrombin antibody enhances prothrombin binding to damaged endothelial cells and shortens plasma coagulation times. *Arthritis Rheum* 1999; 42(10): 2132-2138.
- (125) Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, Chen P, Pierangeli S: A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic *in vivo* and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *Br J Haematol* 2006; 135(2): 214-219.
- (126) Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H: Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 2003; 100(2): 171-194.
- (127) Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Zhao J, Smeets EF, Schlegel RA, Schroit AJ, Weiss HJ, Williamson P, Zwaal RF, Sims PJ: The complex of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and calcium ions is not responsible for Ca<sup>2+</sup>-induced loss of phospholipid asymmetry in the human erythrocyte: a study in

Scott syndrome, a disorder of calcium-induced phospholipid scrambling. *Blood* 1995; 86(5): 1983-1991.

(128) Roitt IM, Brostoff J, Male DK: *Immunology*. 5. izdaja, Mosby, 1998.