

## Protitelesa proti protrombinu

Antiprothrombin antibodies

Polona Žigon,<sup>1</sup> Aleš Ambrožič,<sup>1</sup> Borut Božič,<sup>1,2</sup> Saša Čučnik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetni klinični center, Klinični oddelek za revmatologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Ljubljana, Slovenija

### Korespondenca/ Correspondence:

Polona Žigon  
m: polona.zigon@guest.arnes.si

### Ključne besede:

antifosfolipidna protitelesa; antifosfolipidni sindrom; encimsko imunska metoda; klinična uporabnost; od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu; protitelesa proti protrombinu; tromboza

### Key words:

antiphospholipid antibodies; antiphospholipid syndrome; anti-phosphatidylserine prothrombin antibodies; antiprothrombin antibodies; clinical utility; enzyme immunoassays; thrombosis

### Izvleček

Pri bolnikih z antifosfolipidnim sindromom (APS) povzročajo patogena avtoprotitelesa, imenovana antifosfolipidna protitelesa, tromboze in zaplete v nosečnosti. Najpogostejši antigenski tarči antifosfolipidnih protiteles sta  $\beta$ 2-glikoprotein I ( $\beta$ 2GPI) in protrombin, vezana na fosfolipidno površino. V mednarodno sprejetih smernicah se za postavitev diagnoze APS narekuje prisotnost tromboze in/ali značilnih zapletov v nosečnosti ter hkratno trajno povišane vrednosti lupusnih antikoagulantov (LA), antikardiolipinskih protiteles (aCL) ali protiteles proti  $\beta$ 2GPI (anti- $\beta$ 2GPI). Novejše težnje pri diagnosticiranju APS predlagajo meritev več različnih skupin antifosfolipidnih protiteles, med njimi tudi protiteles proti protrombinu, katerih skupen izračun poda oceno tveganja za trombozo pri posamezniku z APS. Protitelesa proti protrombinu so pri bolnikih z APS pogosto prisotna in včasih tudi edina povišana. Metode za njihovo določitev se razlikujejo in so nestandardizirane. Veliko novejših študij je potrdilo, da ima metoda za določanje protiteles proti protrombinu s kompleksom protrombin/fosfatidilserin na trdnem nosilcu (aPS/PT ELISA) večjo diagnostično uporabnost v primerjavi z metodo, ki ima na trdnem nosilcu vezan samo protrombin. Naša raziskovalna skupina je razvila izvedbo aPS/PT ELISA z izboljšano analitsko občutljivostjo, ki omogoča določitev klinično pomembnih protiteles. Večji delež protiteles aPS/PT je imel aktivnost LA v primerjavi s protitelesi aCL in anti- $\beta$ 2GPI. Izkazalo se je, da so aPS/PT pomembno povezana z

venskimi trombozami in predstavljajo med vsemi antifosfolipidnimi protitelesi najvišje tveganje za zaplete v nosečnosti.

### Abstract

In patients with antiphospholipid syndrome (APS), the presence of a group of pathogenic autoantibodies called antiphospholipid antibodies causes thrombosis and pregnancy complications. The most frequent antigenic target of antiphospholipid antibodies are phospholipid bound  $\beta$ 2-glycoprotein I ( $\beta$ 2GPI) and prothrombin. The international classification criteria for APS connect the occurrence of thrombosis and/or obstetric complications together with the persistence of lupus anticoagulant (LA), anti-cardiolipin antibodies (aCL) and antibodies against  $\beta$ 2GPI (anti- $\beta$ 2GPI) with APS. Current trends for the diagnostic evaluation of APS patients propose the determination of multiple antiphospholipid antibodies, among them also anti-prothrombin antibodies, to obtain a common score for estimating the risk of thrombosis in APS patients. Antiprothrombin antibodies are common in APS patients and are sometimes the only antiphospholipid antibodies elevated. Methods for their determination differ and have not yet been standardized. Many novel studies confirmed that the method using phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT ELISA) as an antigen on solid phase had higher diagnostic accuracy compared to the method using prothrombin alone (aPT ELISA). Our research group developed an *in-house* aPS/PT ELISA with increased analytical sensitivity,

**Citirajte kot/Cite as:**  
Zdrav Vestn 2015;  
84: 209–21

Prispelo: 6. mar. 2014,  
Sprejeto: 2. dec. 2014

which enables the determination of all clinically relevant antiprothrombin antibodies. aPS/PT exhibited the highest percentage of LA activity compared to aCL and anti- $\beta$ 2GPI. aPS/PT antibodies measured by the *in-house* method were

associated with venous thrombosis and presented the strongest independent risk factor for the presence of obstetric complications among all tested antiphospholipid antibodies.

## Uvod

Protitelesa proti protrombinu so avto-protitelesa, katerih prisotnost je značilna za nekatere imunske bolezni. Spadajo v heterogeno družino antifosfolipidnih protiteles, katerih poimenovanje združuje protitelesa proti fosfolipidom, kompleksom fosfolipidov s plazemskimi proteini in nekaterim plazemskim proteinom.<sup>1</sup> Kljub svojemu imenu večinoma niso usmerjena proti anionskim fosfolipidom, kot so sprva domnevali, ampak proti številnim proteinom, ki se vežejo na negativno nabite fosfolipide.<sup>2</sup> Najpogostejši in najbolj proučevani antigeni tarči antifosfolipidnih protiteles sta  $\beta$ 2-glikoprotein I ( $\beta$ 2GPI)<sup>3,4</sup> in protrombin,<sup>5</sup> ki sta oba vključena v proces hemostaze. Trajno povišana antifosfolipidna protitelesa najdemo v plazmi bolnikov z antifosfolipidnim sindromom (APS), pri katerem rušijo hemostatsko ravnotežje, lahko pa se pojavljajo tudi prehodno pri različnih infekcijskih boleznih (gobavost, leptospiroza, sifilis, tuberkuloza, hepatitis A in druge).

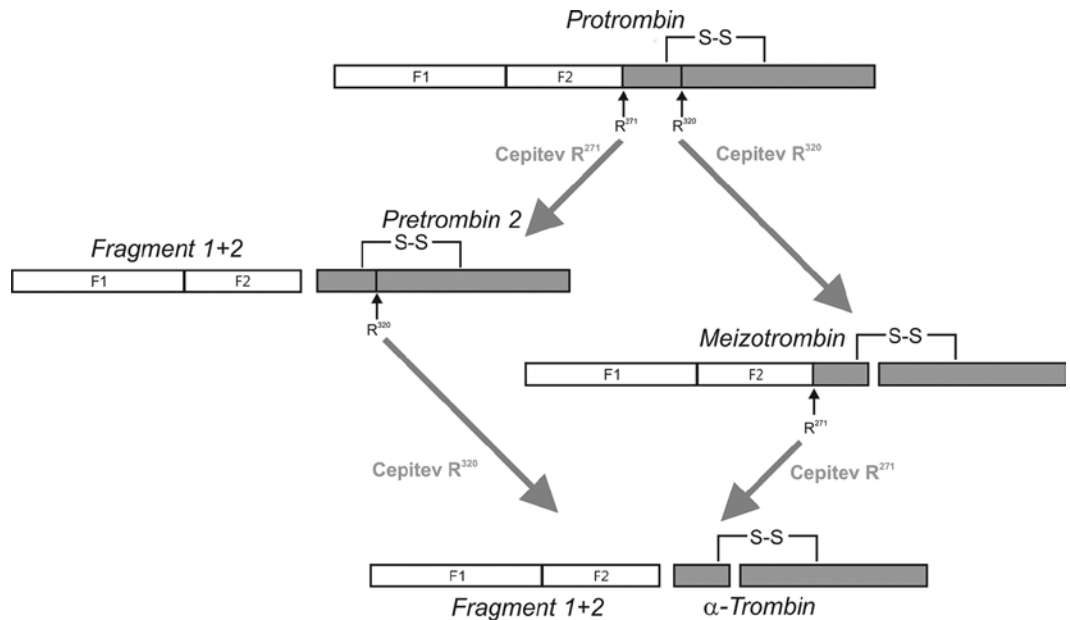
## Antifosfolipidni sindrom

APS je z antifosfolipidnimi protitelesi posredovana trombofilija. Za to sistemsko avtoimunsko bolezen, prvič opisano leta 1983,<sup>6</sup> so značilne tromboze različnih segmentov obtočil in/ali zapleti med nosečnostjo ter prisotnost antifosfolipidnih protiteles. APS je lahko pridružen drugi sistemsko vezivnotkivni bolezni, pri približno polovici bolnikov pa se pojavlja kot samostojna bolezen. Mednarodno sprejeta klasifikacijska merila natančno določajo pogoje za določitev diagnoze APS (Tabela 1) in zapovedujejo prisotnost vsaj enega kliničnega in vsaj enega laboratorijskega merila.<sup>7,8</sup> Poleg klasičnih se pri APS lahko pojavi vrsta kliničnih in laboratorijskih znakov, ki sicer niso vključeni v klasifikacijska diagnostična merila, so pa z APS, čeprav v manjši meri, povezani. Med slednjimi so trombocitopenija, livedo reticularis, prizadetost srčnih zaklopk in centralnega živčevja ter prisotnost

**Tabela 1:** Klasifikacij za diagnozo APS.<sup>7,8</sup>

Klinična merila	
Tromboze:	Ena ali več dokumentiranih tromboz arterij, ven ali malih žil (angiografija, Doppler UZ, CT, MRI, biopsija itd.).
Zapleti v nosečnosti	Ena/več nepojasnjenih smrti morfološko normalnega ploda med 10. in 34. tednom nosečnosti.
	Ena/več eklampsij/preklampsij pred 34. tednom nosečnosti.
	Trije nepojasnjeni spontani splavi pred 10. tednom nosečnosti.
Laboratorijska merila	
Lupusni antikoagulant	Prisotni v plazmi dvakrat/večkrat v presledku vsaj 12 tednov.
Antikardiolipinska protitelesa	IgG in/ali IgM prisotni v plazmi/serumu v srednjem ali visokem titru (> 99. percentil), dvakrat/večkrat v presledku vsaj 12 tednov.
Protitelesa proti beta 2 glikoproteinu I	IgG in/ali IgM prisotni v plazmi/serumu (> 99. percentil), dvakrat/večkrat v presledku vsaj 12 tednov.
Diagnozo gotovega APS lahko postavimo, če izpolnjuje bolnik vsaj enega od kliničnih ter vsaj enega od laboratorijskih meril.	

**Slika 1:** Pretvorba protrombina v trombin.



antifosfolipidnih protiteles, katerih tarča so protrombin, protein C, protein S, aneksin V, fosfatidilserin in fosfatidiletanolamin.<sup>7</sup>

Metode, ki se trenutno uporabljajo za določanje antifosfolipidnih protiteles, lahko delimo v dve skupini: encimsko imunske, s katerimi določamo protitelesa proti kardiolipinu (aCL), anti-β<sub>2</sub>GPI in protitelesa proti protrombinu, ter testi koagulacije, s katerimi določamo lupusne antikoagulate (LA). Po mednarodno sprejetih merilih za klasifikacijo APS sodijo med laboratorijska merila LA, aCL in anti-β<sub>2</sub>GPI, ki so določena v intervalu najmanj 12 tednov.<sup>7,8</sup>

Nedavno sta dve raziskovalni skupini<sup>9,10</sup> predstavili svojevrsten matematični izračun za oceno tveganja tromboze pri bolnikih z APS (*angl.* antiphospholipid score oziroma global antiphospholipid syndrome score, GAPSS). To je nov pristop v diagnosticiranju APS, pri katerem bi za oceno tveganja tromboze upoštevali rezultate različnih antifosfolipidnih protiteles (LA, aCL, anti-β<sub>2</sub>GPI in protitelesa proti protrombinu-izotipov IgG in IgM). Skupen izračun bi zdravnikom lahko pomagal pri odločitvi za uvedbo, ukinitev ali spremembo ustreznega zdravljenja.

## Protrombin

Protrombin je od vitamina K odvisna beljakovina z enojno verigo. Gen protrombina je lociran na kromosomu 11, blizu centromere, in je dolg 21 000 baznih parov.<sup>11</sup> Njegova

sinteza poteka v jetrih, znotraj hepatocitov, kjer pride tudi do sekundarne modifikacije proteina. V krvni obtok se sprosti kot glikoprotein s 579 amino kislinami in molekularno maso 72 kDa.<sup>12,13</sup> Normalna plazemska koncentracija je 100 mg/L z razpolovnim časom 2–4 dni.<sup>14</sup> Sestavljen je iz treh predelov: domena "kringel", domena Gla (bogata s karboksi-glutaminsko kislino) in katalitična domena serinske proteaze. Posttranslacijska modifikacija protrombina poteka na predelu Gla in je od vitamina K odvisna karboksilacija ostankov glutaminske kisline v γ-karboksi glutamatamske ostanke. Ob prisotnosti kalcijevih ionov se protrombin veže na negativno nabite fosfolipide s predelom Gla. Ta vezava je potrebna za pretvorbo protrombina v biološko aktiven α-trombin, medtem ko je domena kringel odgovorna za vezavo trombina na fibrin.

Protrombin, ali tudi faktor II, igra osrednjo vlogo v verižni reakciji strjevanja krvi. V krvi kroži kot proencim, ki ga v kaskadni reakciji koagulacije protrombinazni kompleks proteolitično aktivira v aktivno serinsko proteazo α-trombin (Slika 1). Pri tem se sprosti velik peptid, fragment 1 + 2. Trombin ali faktor IIa je serinska proteaza, ki odcepi fibrinopeptida A in B od fibrinogena, pri tem nastane netopni fibrin, ki je končni proizvod strjevanja krvi.<sup>15</sup> Trombin ima v hemostazi številne funkcije: pretvori fibrinogen v fibrin, zaščiti fibrinske strdke pred fibrinolizo, aktivira trombocite, aktivira faktorje V, VIII

in XI (pozitivna povratna zanka), se veže na trombomodulin in preko poti proteina C inaktivira kofaktorje V in VIII (negativna povratna zanka).

## Protitelesa proti protrombinu

### Zgodovina

Leta 1983 je Bajaj s sodelavci prvič predstavil dokaze o obstoju protiteles proti protrombinu pri dveh bolnikih z LA in hipoprotrombinemijo.<sup>16</sup> Ta protitelesa so vezala protrombin, ne da bi preprečila njegovo aktiviranje v trombin. Avtorji so predpostavljali, da je hipoprotrombinemija posledica vezave protiteles na protrombin in hitrega odstranjevanja imunskih kompleksov iz obtoka. Leto dni kasneje so s protitočno imunoelektroforezo potrdili obstoj kompleksov protrombin-antiprotrombin v plazmi bolnikov z LA, vendar brez hude hipoprotrombinemije.<sup>17</sup> Fleck s sodelavci je te ugotovitve potrdil, ko je pokazal, da imajo protitelesa, ki vežejo protrombin, aktivnost LA in so prisotna pri 72 % bolnikov z aktivnostjo LA.<sup>18</sup> V študiji, v kateri so proučevali bolnike z aCL in LA, so izpostavili vlogo protiteles proti protrombinu za aktivnost LA.<sup>5</sup> Izmed 16 vzorcev bolnikov z LA je bilo pri 11 vzorcih mogoče zaznati vezavo na fosfolipidno površino le ob prisotnosti protrombina in kalcija. Kasneje so Oosting in sodelavci pokazali, da protitelesa z aktivnostjo LA zavirajo delovanje protrombinaznega kompleksa na površini endotelijskih celic in da frakcija IgG z aktivnostjo LA veže kompleks fosfolipid-protrombin.<sup>19</sup> Antigenski tarči za večino protiteles, ki izražajo aktivnost LA, sta protrombin in/ali  $\beta$ 2GPI na fosfolipidih. Izmed 10 bolnikov z LA so izolirane frakcije IgG vsebovale protitelesa proti protrombinu v vsaj 9 primerih.<sup>20</sup>

### Metode določanja protiteles proti protrombinu

Protitelesa proti protrombinu so prvič izmerili v začetku 90. let z dvojno imunodifuzijo in s protitočno imunoelektroforezo.<sup>16-18,21</sup> Pri obeh metodah protitelesa proti protrombinu tvorijo imunске komplekse s protrombinom v gelu, kar se kaže kot pre-

cipitacijska linija. Vendar pa metodi ne podata kvantitativne ocene protiteles. V večini primerov je titer in/ali afiniteta protiteles proti protrombinu celo prenizka, da bi nastale jasne precipitacijske linije. Kljub temu so ta *in vitro* odkritja pokazala, da takšni kompleksi verjetno obstajajo tudi v plazmi *in vivo*. Protitelesa so v preteklosti določali tudi z drugimi tehnikami, ki pa temeljijo na oslavitvi encimske aktivnosti protrombina po vezavi s protitelesi.<sup>19,22</sup> Pri teh tehnikah je potrebno prej izolirati protitelesa proti protrombinu in očistiti faktorje strjevanja krvi, kar naredi te metode neprimerne za rutinsko delo.

V zadnjih nekaj letih je več raziskovalnih skupin razvilo različne encimsko-immunske metode na trdnem nosilcu (ELISA), ki so do danes daleč najbolj uporabljane tehnike določanja protiteles proti protrombinu. Omogočajo hitro določitev koncentracije in izotipa protiteles. Arvieux s sodelavci je prvi določil protitelesa proti protrombinu z ELISA, pri kateri je protrombin kot antigen nanesen na mikrotitrne plošče z visoko afiniteto vezave.<sup>23</sup> Na ta način so določali protitelesa, usmerjena proti samemu protrombinu, ki jih danes poimenujemo s kratico aPT. Pri tem je zanimivo, da način predstavitve protrombina na trdnem nosilcu močno vpliva na njegovo prepoznavo s strani protiteles proti protrombinu.<sup>24</sup> Protitelesa proti protrombinu se vežejo na protrombin, ki je ali imobiliziran na ustrezni anionski površini, kot so  $\gamma$ -obsepane ali visoko vezavne polovinilkloridne (PVC) mikrotitrne plošče, ali pa je izpostavljen imobiliziranim anionskim fosfolipidom. Nasprotno pa se protrombin na navadne polistirenske mikrotitrne plošče z nizko afiniteto vezave ne veže.<sup>23</sup> V tem pogledu je reaktivnost protiteles proti protrombinu v ELISA močno podobna reaktivnosti nizko avidnih anti- $\beta$ 2GPI. Slednja prepoznajo  $\beta$ 2GPI le, kadar je le-ta vezan na anionsko površino, medtem ko je vezava na  $\beta$ 2GPI v tekoči fazi minimalna.<sup>25-27</sup>

Kasneje so Matsuuda in sodobniki pokazali, da se lahko protitelesa proti protrombinu ob prisotnosti ionov  $Ca^{2+}$  določijo tudi z ELISA, pri kateri je protrombin vezan na fosfatidilserin.<sup>28</sup> Slednja so danes poimenošana od fosfatidilserina odvisna protitelesa

proti protrombinu (aPS/PT). ELISA z vezanim kompleksom protrombin-fosfatidilserin (aPS/PT ELISA) je omogočila učinkovitejšo določitev protiteles proti protrombinu v primerjavi z ELISA, s čimer so določali aPT (aPT ELISA).<sup>29</sup> 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 visoko vezavne mikrotitrskne plošče. To omogoča kopičenje in pravilno usmeritev protrombina, s tem pa nastanejo boljše pogoji za vezavo protiteles.
2. Na fosfatidilserin se lahko s pomočjo  $\text{Ca}^{2+}$  ujamejo tudi krožeči deli membran s pritrjenimi kompleksi protrombina in protiteles, ki so lahko prisotni v nekaterih primerih.
3. Protitelesa morebiti reagirajo z neoepitopi, ki se pojavijo na protrombinu šele, ko se ta veže na fosfatidilserin.

Nezanemarljivo pa je tudi dejstvo, da aPS/PT ELISA bolje posnema samo *in vivo* vezavo protrombina in protiteles. Prav tako pomembno je odkritje Atsumija s sodelavci, ki so pokazali, da so aPS/PT močnejše kot aPT povezana z aktivnostjo LA.<sup>30</sup> Ta skupina v svoji študiji ni našla korelacije med ravnimi aPS/PT in aPT pri bolnikih z APS. Zato meni, da se z aPS/PT ELISA določajo vsaj deloma epitopsko različna protitelesa v primerjavi z aPT ELISA. Kasneje smo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKC Ljubljana) modificirali prvo opisano metodo aPS/PT ELISA in s tem povečali njeno analitsko občutljivost.<sup>31</sup> Nova izvedba hišne metode aPS/PT ELISA je omogočila zaznavo obeh domnevno različnih populacij protiteles in s tem določitev vseh klinično pomembnih protiteles proti protrombinu z eno metodo.

### Hematološke lastnosti

Po eni izmed teorij naj bi protitelesa proti protrombinu povzročila podaljšano strjevanje krvi *in vitro* z zaviranjem aktivacije protrombina v trombin.<sup>32</sup> 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 pokazal, da je dodatek afinitetno očiščenih protiteles proti protrombinu plazmi zdravega človeka sprožil aktivnost LA, ki jo je bilo mogoče nevtralizirati z dodatkom prebitka fosfolipida.<sup>33</sup> Pokazali so tudi, da so kompleksi protrombin s protitelesi proti protrombinu zavirali tako protrombinazni kot tenazni kompleks. Torej protitelesa proti protrombinu morebiti povečajo afiniteto protrombina za negativno nabite fosfolipide in tako tekmujejo s faktorji strjevanja krvi za dostopno katalitično fosfolipidno površino.<sup>34</sup> Ta mehanizem pojasni tudi, zakaj dodatek fosfolipidov izniči aktivnost LA, ki jo povzročijo protitelesa proti protrombinu. Nekateri raziskovalci so poročali o obstoju dveh tipov krožečih protiteles proti protrombinu, ki jih lahko ločimo na osnovi njihovih učinkov v koagulacijskih sistemih. Prva so funkcionalna, ki povzročajo aktivnost LA, druga pa so nefunkcionalna, ki ne prispevajo k aktivnosti LA.<sup>29,35</sup> Razlike v učinkih so verjetno posledica epitopske specifičnosti različnih protiteles proti protrombinu. Protitelesa proti protrombinu lahko nastanejo tudi pri imunizaciji s plazminogenom in slednja najverjetneje pripadajo nefunkcionalni skupini.<sup>36</sup> Po vezavi protrombina na fosfolipide se razkrijejo neoepitopi. Protitelesa proti tem epitopom naj bi bila funkcionalna v nasprotju s protitelesi, ki prepoznajo protrombin neodvisno od njegove vezave na fosfolipide.

### Imunološke lastnosti in epitopsko mapiranje

Z različnimi metodami določamo domnevno različne populacije protiteles proti protrombinu, kar je verjetno posledica prepoznave različnih epitopov na protrombinu. Kateri so specifični epitopi na protrombinu, ki jih protitelesa prepoznajo, še ni znano, vendar pa se ve, da protitelesa ne vežejo protrombina, če je la-ta v raztopini. Po eni izmed razlag protitelesa reagirajo z neoepitopi, ki se pojavijo šele, ko se protrombin pritrudi na anionske fosfolipide. Wu in Lentz sta pokazala, da se protrombin konformacijsko spremeni po vezavi na fosfatidilserin.<sup>37</sup>

Kasneje je Galli s sodelavci ugotovila, da je protrombin v ELISA prepoznan učinkoviteje, če je vezan na fosfatidilserin. Predlagala je, da je v teh pogojih antigen bolj nakopičen in pravilno usmerjen, kar omogoči optimalne pogoje za vezavo protiteles.<sup>29</sup> Poročali so tudi o bivalentni vezavi protiteles proti protrombinu na kovalentno povezane dimere in multimerne protrombina na površini mikrotitrne plošče.<sup>38,39</sup> Navzkrižno povezani dimeri in multimeri olajšajo vezavo nizko afinitetnih protiteles. Ta odkritja nakazujejo, da so protitelesa proti protrombinu najverjetneje nizko afinitetne narave in ne protitelesa proti neoepitopom.<sup>24</sup> Temu nasprotuje odkritje Bajaja in sodelavcev, ki so v serumih bolnikov z LA izmerili visoko afinitetna protitelesa proti protrombinu z afiniteto vezave  $K_d 10^{-10}$ – $10^{-9}$ .<sup>21</sup> Tudi kasnejša merjenja avidnosti protiteles proti protrombinu s kaotropno ELISA so potrdila obstoj tako visoko kot nizko avidnih protiteles.<sup>40</sup> V eni izmed študij so pokazali, da je interakcija med monovalentnimi fragmenti Fab, pripravljenimi iz IgG frakcije bolnika z LA, in protrombinom zanemarljiva.<sup>41</sup> Iz kinetičnih merjenj asociacije in disociacije je bilo razvidno, da pride do bivalentne vezave med protrombinom in protitelesi na lipidni membrani. Na osnovi omenjenih odkritij lahko povzamemo, da se protrombin na fosfolipidni površini ob prisotnosti  $Ca^{2+}$  kovalentno poveže (dimerizira), ob tem se pojavijo neoepitopi, šele nato pa je omogočena vezava protiteles proti protrombinu.

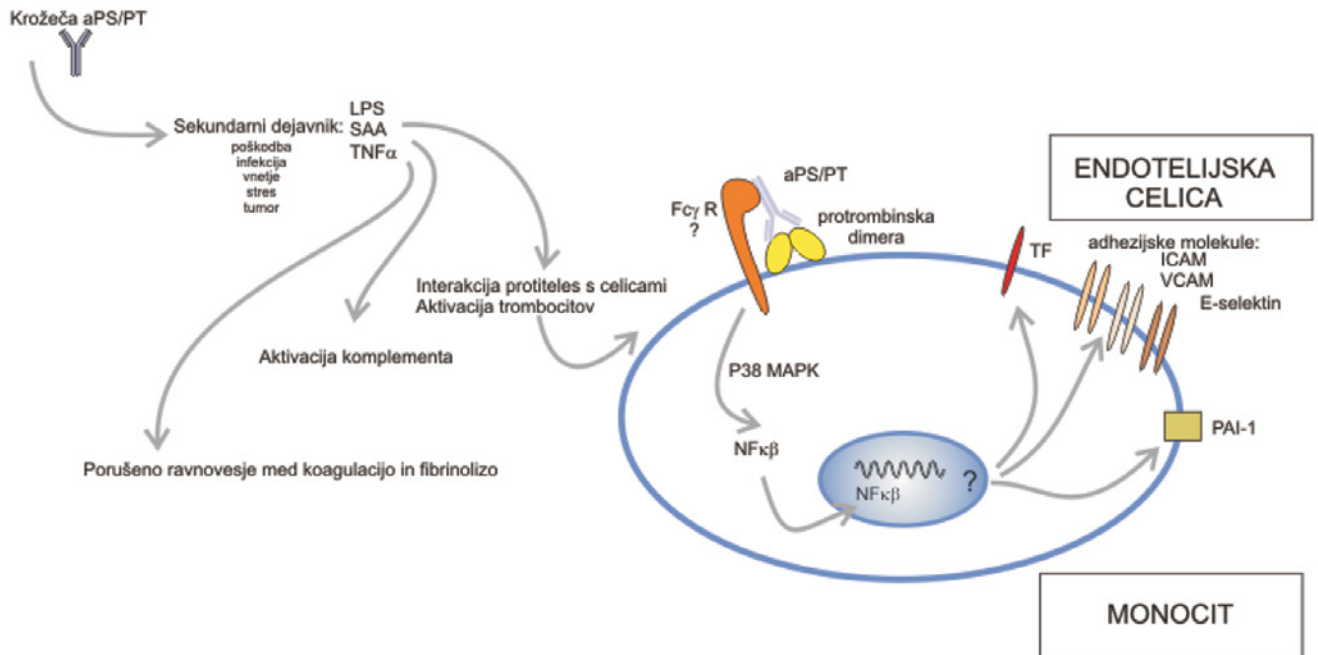
Študije protrombinskih fragmentov so pokazale, da se epitop za vezavo protiteles najverjetneje nahaja na konservativnih regijah, ki so homologne z drugimi od vitamina K odvisnimi proteini, protitelesa pa so najverjetneje poliklonske narave.<sup>42</sup> Frakcije IgG, izolirane iz bolnikov z LA, so se vezale tako na cel protrombin kot tudi na protrombin in na fragment 1 (Slika 1).<sup>43</sup> Nobeno od izoliranih protiteles ni reagiralo z imobiliziranim trombinom. Dominantni epitopi so precej verjetno umeščeni blizu vezavnega mesta za fosfolipide, čeprav so lahko zelo heterogeno razporejeni. Drugi so proučevali epitope na protrombinu z uporabo rekombinantnih protrombinskih fragmentov. Pokazali so, da je 61,5 % protiteles prepoznalo

fragment 1 in 38,4 % protrombin (fragment 2 +  $\alpha$ -trombin).<sup>44</sup> Domene Kringel so homologne z drugimi od vitamina K odvisnimi proteini. Možno je, da protitelesa proti protrombinu prepoznajo epitop na teh domenah, kar potrjuje navzkrižna reaktivnosti protiteles proti protrombinu s plazminogenom.<sup>45</sup>

Velik delež protiteles proti protrombinu je specifičen za humani protrombin<sup>5</sup> in samo majhen delež le-teh reagira tudi z govejim protrombinom.<sup>46</sup> Večinoma najdemo pri bolnikih z APS le protitelesa proti humanemu protrombinu. Pri nekaterih bolnikih so našli v plazmi samo protitelesa proti govejemu protrombinu, vendar je bila klinična slika teh bolnikov nejasna.<sup>47</sup>

## Klinični pomen

Več retrospektivnih in presečnih študij, ki jih je prvič povzela Galli s sodelavci,<sup>42</sup> pred kratkim pa še Sciasca s sodelavci,<sup>48</sup> je proučevalo klinični pomen protiteles proti protrombinu, določenih z ELISA. Različni laboratoriji po svetu izvajajo svoje različice hišnih metod ELISA ali uporabljajo komercialno dostopne analize komplete za določanje protiteles proti protrombinu. Vendar so mednarodne študije, s katerimi so poskušali standardizirati in poenotiti te metode, zelo redke in do danes niso dale pričakovanih rezultatov.<sup>49</sup> Razlike v postopkih in uporabljenih reagentih ter dejstvo, da ni na voljo mednarodnih standardov, so glavni razlogi za velike razlike med objavljenimi študijami. Primerjalne študije dveh načinov določanja protiteles proti protrombinu, aPT ELISA ali aPS/PT ELISA, so pokazale, da se rezultati obeh izvedb le delno prekrivajo, kar pomeni, da so nekateri bolniki pozitivni v samo eni od obeh izvedb.<sup>49-52</sup> Rezultati tako aPT ELISA kot tudi aPS/PT ELISA domnevno ne pripadajo isti populaciji protiteles, čeprav so oboji klinično povezani z APS. Mnogi so zato ocenili, da je z vidika kliničnega pomena nujno upoštevati rezultate obeh izvedb. V zadnjem sistematskem pregledu študij, ki so proučevale aPT (38 študij) ali aPS/PT (10 študij), so povzeti rezultati več kot 7000 bolnikov in kontrol.<sup>48</sup> Oba tipa protiteles proti protrombinu predstavljata povečano tvega-



**Slika 2:** Patogeni mehanizmi delovanja protiteles proti protrombinu. aPS/PT, od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu; FcγR, receptor za Fc predel protiteles IgG; ICAM, znotrajcelična adhezijska molekula; LPS, lipopolisaharid; MAPK, z mitogenom aktivirana proteinska kinaza; NFκβ, transkripcijski jedrni faktor; PAI-1, inhibitor plazminogen aktivatorja; SAA, serumski amiloid A; TF, tkivni faktor; TNFα, tumor nekrotizirajoči faktor alpha; VCAM: adhezijska molekula vaskularne celice;

nje za tromboze. Vendar pregledni članek pokaže, da aPS/PT predstavljajo večjo nevarnost za arterijske in/ali venske tromboze v primerjavi z aPT (OR 5,1; 95 % CI 4,2–6,3 in OR 1,8, 95 % CI 1,4–2,8). Avtorji zaključujejo, da bi rutinsko merjenje aPS/PT, ne pa tudi aPT, omogočilo boljšo določitev trombotičnega tveganja pri bolnikih s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi, prav tako pa potrjujejo nesporno potrebo po nadaljnem raziskovanju v smeri vključitve teh protiteles v laboratorijska merila APS.

Rezultati v Laboratoriju za Imunologijo revmatizma UKC Ljubljana razvite hišne metode aPS/PT ELISA so pokazali, da aPS/PT predstavljajo povečano tveganje za venske tromboze (OR 3,5 95 % CI 1,7–7,0) in manj za arterijske tromboze (OR 1,9, 95 % CI 0,9–4,1).<sup>53</sup> Zelo pomembno je bilo odkritje, da so protitelesa proti protrombinu v primerjavi z drugimi raziskovanimi protitelesi predstavljala največje tveganje za zaplete v nosečnosti (OR 9,3 95 % CI 3,5–24,6). aPS/PT so bila tudi edina antifosfolipidna protitelesa, katerih vrednosti so bile značilno povišane pri bolnicah z zapleti v zgodnji nosečnosti pred 12. tednom nosečnost.<sup>54</sup> Samo povezavo med protitelesi proti protrombinu in zapleti v nosečnosti je proučevalo precej manj študij v primerjavi s študijami o pri-

sotnosti teh protiteles pri trombozah. Približno polovica študij povezave protiteles proti protrombinu z nosečnostnimi zapleti ni uspela potrditi.<sup>51,55–59</sup> Nasprotno pa sta Akimoto in Bertolaccini s sodelavci pokazala močno in specifično povezavo med različnimi tipi protiteles proti protrombinu in spontanimi splavi.<sup>60,61</sup> Klinično povezavo med protitelesi in zapleti v nosečnosti sta kasneje potrdili še dve študiji,<sup>62,63</sup> vendar pa, nobena od omenjenih študij ni našla povezave med zapleti v zgodnji nosečnosti pred 12. tednom nosečnosti in prisotnostjo protiteles proti protrombinu. Najnovejša odkritja Laboratorija za Imunologijo revmatizma UKC Ljubljana so pokazala, da so aPS/PT povezana s ponavljajočimi se zgodnjimi ali poznimi splavi neodvisno od drugih antifosfolipidnih protiteles, zato avtorji povzemamo, da njihovo določanje izboljša diagnostično obravnavo bolnic z zapleti v nosečnosti, značilnimi za APS.<sup>54,55</sup>

Zaradi vedno več dokazov o klinični uporabnosti protiteles proti protrombinu in težnje po njihovi vključitvi med laboratorijska merila za klasifikacijo APS smo se raziskovalci združili tudi v multicentrično študijo, katere namen je določiti uporabnost aPS/PT v diagnostiki APS. Prvi izsledki so pokazali, da določanje aPS/PT lahko poma-

ga pri diagnosticiranju APS.<sup>64</sup> V Laboratoriju za imunologijo revmatizma smo se tako odločili, da med rutinske preiskave uvedemo preiskavo za aPS/PT s hišno izvedbo aPS/PT ELISA.

## Patogena vloga

Vedno več je dokazov, da igrajo protitelesa proti protrombinu pomembno vlogo v trombotičnem stanju, značilnem za APS. Prisotnost protiteles proti protrombinu vodi v trombotično stanje preko prepletanja različnih mehanizmov delovanja in različnih patoloških učinkov na endotelijske celice, monocite, trombocite, aktivacije komplemента ter neposrednega vpliva na hemostazo (Slika 2).<sup>34,42,65-69</sup> Upošteva analogije med imunološkim vidikom in kliničnim učinkom aCL ali anti- $\beta$ 2GPI ter protitelesi proti protrombinu je zelo verjetno, da se antifosfolipidna protitelesa podobno vpletajo v patofiziologijo APS. Nastanek antifosfolipidnih protiteles se povezuje z različnimi dejavniki, kot so gensko ozadje, napake imunskega sistema, hormonski ter okoljski vplivi (infekcije, cepiva, stres, zdravila, tumor). V zadnjem času se je izoblikovala t. i. "hipoteza dveh sprožilcev", ki poskusi razložiti, zakaj do tromboz pride le občasno kljub trajno povišanemu ravnu antifosfolipidnih protiteles.<sup>68-70</sup> Na osnovi te teorije obstoječa antifosfolipidna protitelesa predstavljajo prvi sprožilec, ki vzpostavi primarno trombofilno stanje. Do strdkov pa pride šele ob sekundarnem dražljaju, ki ga predstavlja prisotnost drugih molekul, npr. lipopolisaharidov (LPS) ali proteinov akutne faze, kot sta SAA in TNF $\alpha$ , ki se pojavljajo ob okužbah.

Protrombin je vključen v kaskadno reakcijo strjevanja krvi in tako, prisoten v plazmi ter na celični površini endotelijskih celic, dostopen krožečim protitelesom. Možnih je več učinkov, ki jih povzročijo v plazmi krožeča protitelesa proti protrombinu.

### 1. Interakcija z endotelnimi celicami, monociti in trombociti

Protitelesa proti protrombinu, ki prepoznajo kompleks protrombina in anionskih fosfolipidov na membrani endotelnih celic ali monocitov, aktivirajo celice, ki nato spro-

stijo prokoagulantne snovi. Ko so endotelne celice izpostavljene protitelesom, aktivirajo signalno pot p38 z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (p38 MAPK) in izločajo trombofilne molekule, predvsem tkivni faktor in adhezijske molekule.<sup>71-74</sup> Po eni od teorij se protitelesa proti protrombinu lahko vežejo tudi na trombocite in povzročijo trombocitopenijo, čeprav so pri bolnikih z antifosfolipidnimi protitelesi odkrili tudi specifična protitelesa proti glikoproteinom trombocitov.<sup>75</sup>

### 2. Neposreden vpliv na hemostazo

Protitelesa proti protrombinu zavirajo s trombinom posredovano sproščanje prostaciklina iz endotelnih celic in s tem vplivajo na aktiviranje proteina C.<sup>1</sup> Protitelesa proti protrombinu tudi dokazano povečajo afiniteto protrombina za negativno nabite fosfolipide.<sup>44</sup> Raziskave so pokazale, da tako mišja monoklonska protitelesa proti protrombinu kot tudi izolirane frakcije IgG z aktivnostjo LA povečajo vezavo protrombina na fosfolipidne vezikle.<sup>76</sup> Tako kompleksi protrombina in protiteles proti protrombinu tekmujejo z drugimi faktorji strjevanja krvi za razpoložljivo fosfolipidno površino. Posledica tega je podaljšan čas strjevanja, ki ga lahko izničimo z dodatkom fosfolipidov. Ta pojav *in vitro* bi prenesen v okolje *in vivo* pomenil, da membrane z vezanimi kompleksi protrombina in protiteles zmanjšajo koncentracijo dostopnega protrombina in/ali fosfolipidnih površin za optimalno sestavljanje protrombinaznega kompleksa.<sup>77</sup> Tej teoriji nasprotuje dejstvo, da je tvorba trombina pri bolnikih z LA ali z antifosfolipidnimi protitelesi povečana.<sup>78,79</sup> Monoklonska protitelesa proti protrombinu in frakcije IgG so vplivala na prečiščene komponente protrombinaznega kompleksa in povečala tvorba trombina.<sup>76</sup>

### 3. Aktiviranje komplemента

Sistem komplemента so v zadnjih raziskavah povezali z nastankom tromboz pri bolnikih z APS. Študije na miših so pokazale, da so živali brez komponent komplemента C3 in C5 po dajanju antifosfolipidnih protiteles razvile izrazito manjše strdke v primerjavi z zdravimi.<sup>80</sup> Aktiviranje komplemента je sprožilo ekspresijo tkivnega faktorja na nevtrofilcih in zato spremenila čas strjeva-



nja krvi.<sup>81</sup> Nedavno pa so tudi objavili, da so ravni komponent komplemента pri bolnikih s primarnim APS nižji v primerjavi z zdravimi.<sup>82</sup>

#### 4. Vpletanje v mehanizme fibrinolize

Protitelesa proti protrombinu navzkrižno reagirajo s plazminogenom, vendar imata obe skupini protiteles različne funkcionalne lastnosti.<sup>36</sup> Še vedno je vprašljivo, ali so protitelesa proti plazminogenu sploh povezana s trombozami. V eni od študij so bila protitelesa proti protrombinu in plazminogenu pogosta pri bolnikih s SLE, vendar pa ni bilo dokazane nobene korelacije med njimi.<sup>83</sup> Protitelesa proti protrombinu so bila značilno povezana s trombozami, protitelesa proti plazminogenu pa ne. Večina kliničnih študij je enotnih, da protitelesa proti protrombinu in proti plazminogenu niso povezana.<sup>83,84</sup>

#### 5. Drugi dejavniki

K razvoju tromboz pa verjetno prispevajo tudi drugi prirojeni ali pridobljeni dejavniki, kot so mutacija protrombinskega gena, prisotnost faktorja V Leiden, hiperhomocisteinemia, povečana raven protrombina, faktorja VIII in von Willenbrandtovega faktorja v plazmi ter zmanjšana aktivnost proteina C in proteina S.<sup>24</sup>

Enako kot trombotični zapleti so tudi zapleti v nosečnosti pri APS posledica prepletanja po eni strani prej navedenih mehanizmov, po drugi pa neposrednega vpliva protiteles na posteljico. Histološka odkritja so pokazala, da protitelesa proti protrombinu povzročijo tromboze malega žilja na posteljici.<sup>85</sup> Trofoblast posteljice je glavni organ, pri katerem je fosfatidilserin v veliki meri izpostavljen na zunanji plasti celične membrane. Med embrionalno in placentalno diferenciacijo pride do porušanja membranske lipidne asimetrije in izpostavitve fosfatidilserina na zunanji membrani.<sup>86</sup> Protitelesa proti protrombinu bi lahko navzkrižno povezala protrombin na celični površini in tako sprožila aktiviranje komplemента in motila znotrajcelično signalizacijo.<sup>69</sup> Prav tako so opazili povečano število apoptoz celič velikank na ekto placentalni coni z izpostavljenim fosfatidilserinom, kar lahko vodi v nepravilen razvoj placente in/ali zarodka.<sup>87</sup> Po drugi strani pa so pri miših opazili, da igra

protrombin pomembno vlogo v razvoju zarodka in da odsotnost protrombina vodi v embrionalno smrt.<sup>88</sup> Zelo verjetno je tudi, da protitelesa proti protrombinu, kot druga aPL, porušijo zaščitni antikoagulantni aneksinski plašč na površini trofoblastov in endoteljskih celic.<sup>89</sup>

## Zdravljenje

V prvi vrsti je zdravljenje usmerjeno v preprečevanje tromboz z uporabo acetilsalicilne kisline, varfarina ter heparina nizke molekularne mase kot najpogostejša učinkovita zamenjava varfarina. Za zdravljenje pri nosečnicah se uporabljajo nizki odmerki acetilsalicilne kisline (50–100 mg) v kombinaciji z nefrakcioniranim heparinom ali heparinom nizke molekulske mase. Če zdravljenje ni dovolj učinkovito, se uporabljajo tudi hidrosiklorokin, nizki odmerki prednizolona, zdravljenje z intravenskimi imunoglobulini, plazmafereza in imunoadsorpcija.<sup>90–92</sup> Nosečnice, ki so ustrezno zdravljene, imajo zelo dobre obete za uspešno nosečnost.<sup>93</sup>

## Zaključki

Protitelesa proti protrombinu so pogosto prisotna pri bolnikih z APS. Številne študije so pokazale, da je določanje protiteles proti protrombinu, predvsem aPS/PT, klinično uporabno. Nekateri bolniki s kliničnimi znaki APS imajo med vsemi merjenimi antifosfolipidnimi protitelesi povišane samo vrednosti aPS/PT. Prav tako se številni strinjajo, da merjenje več različnih antifosfolipidnih protiteles natančneje ovrednoti tveganje za tromboze pri bolnikih z APS. Z novimi spoznanji bodo v prihodnje vedno bolj težili k vključitvi aPS/PT med laboratorijske kriterije APS, saj aPS/PT pomembno prispevajo predvsem k diferencialni diagnostiki oziroma k bolj natančni opredelitvi bolnic z zapleti v nosečnosti, zlasti v prvem trimesečju.

## Literatura

- Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood*. 1994; 84(9): 2854–67.
- Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 1990; 335(8705): 1544–7.
- Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*. 1990; 336(8708): 177–8.
- 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 USA*. 1990; 87(11): 4120–4.
- 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): 629–32.
- Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983; 287(6399): 1088–9.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006; 4(2): 295–306.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(7): 1309–11.
- Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis and rheumatism*. 2012; 64(2): 504–12.
- Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology (Oxford)*. 2013; 52(8): 1397–403.
- Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*. 1987; 26(19): 6165–77.
- Kisiel W, Hanahan DJ. Purification and characterization of human Factor II. *Biochimica et biophysica acta*. 1973; 304(1): 103–13.
- Magnusson S, Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, Petersen TE. Proceedings: Complete primary structure of prothrombin. Partial primary structures of plasminogen and hirudin. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*. 1975; 34(2): 562–3.
- Shapiro SS, Martinez J. Human prothrombin metabolism in normal man and in hypocoagulable subjects. *The Journal of clinical investigation*. 1969; 48(7): 1292–8.
- Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*. 1990; 76(1): 1–16.
- Bajaj SP, Rapaport SI, Barclay S, Herbst KD. Acquired hypoprothrombinemia due to non-neutralizing antibodies to prothrombin: mechanism and management. *Blood*. 1985; 65(6): 1538–43.
- Edson JR, Vogt JM, Hasegawa DK. Abnormal prothrombin crossed-immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood*. 1984; 64(4): 807–16.
- Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood*. 1988; 72(2): 512–9.
- 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): 2618–25.
- Permpikul P, Rao LV, Rapaport SI. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and beta 2-glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood*. 1994; 83(10): 2878–92.
- Bajaj SP, Rapaport SI, Fierer DS, Herbst KD, Schwartz DB. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood*. 1983; 61(4): 684–92.
- 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): 466–72.
- 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): 1120–5.
- Galli M, Barbui T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 1999; 93(7): 2149–57.
- 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): 457–62.
- 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.
- Cucnik S, Kveder T, Rozman B, Bozic B. Binding of high-avidity anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2004; 43(11): 1353–6.
- 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): 589–91.
- Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in pa-

- tients with antiphospholipid antibodies. *Thromb-Haemost.* 1997; 77(3): 486–91.
30. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. 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): 1982–93.
  31. Žigon P, Ambrozic A, Cucnik S, Kveder T, Rozman B, Bozic B. Modified phosphatidylserine-dependent antiprothrombin ELISA enables identification of patients negative for other antiphospholipid antibodies and also detects low avidity antibodies. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49(9): 1573.
  32. Pierangeli SS, Goldsmith GH, Branch DW, Harris EN. Antiphospholipid antibody: functional specificity for inhibition of prothrombin activation by the prothrombinase complex. *BrJHaematol.* 1997; 97(4): 768–74.
  33. Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, Bevers EM, Willems GM, et al. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *BrJHaematol.* 2001; 113(3): 621–9.
  34. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(4): 886–95.
  35. 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. *ThrombHaemost.* 1998; 79(4): 790–5.
  36. Puurunen M, Palosuo T, Lassila R, Anttila M, Varala O. Immunologic and hematologic properties of antibodies to prothrombin and plasminogen in a mouse model. *Lupus.* 2001; 10(2): 108–15.
  37. Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *ThrombHaemost.* 1994; 71(5): 596–604.
  38. Cakir B, Rivadeneira AC, Hayes PM, Ortel TL, Petri M, Roubey RA. Anti-prothrombin autoantibodies: detection and characterization. *Lupus.* 1998; 7(2):S219-S.
  39. Field SL, Chesterman CN, Dai YP, Hogg PJ. Lupus antibody bivalency is required to enhance prothrombin binding to phospholipid. *J Immunol.* 2001; 166(10): 6118–25.
  40. Žigon P, Cucnik S, Ambrozic A, Sodin Semrl S, Kveder T, Bozic B. Antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex as an additional diagnostic marker of APS? *Lupus.* 2012; 21(7): 790–2.
  41. 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): 14357–63.
  42. Galli M. Anti-Prothrombin Antibodies. In: Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y, editors. *The Antiphospholipid Syndrome II*: Elsevier; 2002. p. 59–70.
  43. 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): 4173–82.
  44. 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): 761–6.
  45. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thrombosis and haemostasis.* 1996; 75(5): 721–4.
  46. Rao LV, Hoang AD, Rapaport SI. Differences in the interactions of lupus anticoagulant IgG with human prothrombin and bovine prothrombin. *ThrombHaemost.* 1995; 73(4): 668–74.
  47. 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-S6.
  48. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thrombosis and haemostasis.* 2013; 111(2).
  49. Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, Alessandri C, Allegri F, Bistoni O, et al. Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *ClinExpRheumatol.* 2007; 25(2): 268–74.
  50. Bardin N, Alessi MC, Dignat-George F, Vague IJ, Sampol J, Harle JR, et al. Does the anti-prothrombin antibodies measurement provide additional information in patients with thrombosis? *Immunobiology.* 2007; 212(7): 557–65.
  51. 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.
  52. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, et al. Significance of anti-prothrombin 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. *ModRheumatol.* 2006; 16(3): 158–64.
  53. Žigon P, Cucnik S, Ambrozic A, Kveder T, Semrl SS, Rozman B, et al. Detection of Antiphosphatidylserine/Prothrombin Antibodies and Their Potential Diagnostic Value. *Clinical and Developmental Immunology.* 2013; 2013: 8.
  54. Žigon P. Vezava antiprothrombinskih protiteles v in vitro in ex vivo modelih ter njihova klinična uporabnost pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi. = Antiprothrombin antibody binding using in vitro and ex vivo models indicates their clinical relevance for autoimmune patients. [doctoral dissertations]: Univerza v Ljubljani; 2014.

55. Zigon P, Perdan Pirkmajer K, Tomsic M, Kveder T, Bozic B, Sodin Semrl S, et al. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies Are Associated with Adverse Pregnancy Outcomes. *Journal of Immunology Research*. Article ID 975704, in press.
56. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, Kordich LC, Carreras LO. Relationship of anti beta2-glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. *ThrombHaemost*. 1997; 78(3): 1008–14.
57. Sater MS, Finan RR, Abu-Hijleh FM, Abu-Hijleh TM, Almawi WY. Anti-phosphatidylserine, anti-cardiolipin, anti-beta2 glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in recurrent miscarriage at 8–12 gestational weeks. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2012; 163(2): 170–4.
58. Sugiura-Ogasawara M, Atsumi T, Ozaki Y, Koike T, Suzumori K. Phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies are not useful markers for high-risk women with recurrent miscarriages. *FertilSteril*. 2004; 82(5): 1440–2.
59. Tsutsumi A, Atsumi T, Yamada H, Hirayama KE, Ichikawa K, Fujimoto S, et al. Anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies are not frequently found in patients with unexplained recurrent miscarriages. *AmJ ReprodImmunol*. 2001; 46(3): 242–4.
60. Akimoto T, Akama T, Saitoh M, Kono I, Sumida T. Antiprothrombin autoantibodies in severe pre-eclampsia and abortion. *The American journal of medicine*. 2001; 110(3): 188–91.
61. 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. *ThrombHaemost*. 2005; 93(2): 289–97.
62. Marozio L, Curti A, Botta G, Canuto EM, Salton L, Tavella AM, et al. Anti-prothrombin antibodies are associated with adverse pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66(5): 404–9.
63. Vlasea A, Gil A, Cuesta MV, Arribas F, Diez J, Lavilla P, et al. Antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies (aPS/PT) as potential markers of antiphospholipid syndrome. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2013; 19(3): 289–96.
64. Amengual O, Forastiero R, Sugiura-Ogasawara M, Oku K, Otomo K, Alves J, et al. International multi-centre study to evaluate the clinical significance of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *EULAR: Ann Rheum Dis* 2014.
65. Abou-Nassar K, Carrier M, Ramsay T, Rodger MA. The association between antiphospholipid antibodies and placenta mediated complications: a systematic review and meta-analysis. *Thrombosis research*. 2011; 128(1): 77–85.
66. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *The New England journal of medicine*. 2013; 368(11): 1033–44.
67. Mehdi AA, Uthman I, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future. *European journal of clinical investigation*. 2010; 40(5): 451–64.
68. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nature reviews Rheumatology*. 2011; 7(6): 330–9.
69. Oku K, Amengual O, Atsumi T. Pathophysiology of thrombosis and pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome. *European journal of clinical investigation*. 2012; 42(10): 1126–35.
70. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood*. 2005; 106(7): 2340–6.
71. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *ThrombHaemost*. 1996; 75(4): 536–41.
72. Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, Yasuda S, Sakai Y, Furusaki A, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies. *IntImmunol*. 2004; 16(11): 1633–41.
73. Lopez-Pedraza C, Buendia P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis and rheumatism*. 2006; 54(1): 301–11.
74. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis and rheumatism*. 2005; 52(5): 1545–54.
75. Galli M, Daldossi M, Barbui T. Anti-glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *ThrombHaemost*. 1994; 71(5): 571–5.
76. Field SL, Hogg PJ, Daly EB, Dai YP, Murray B, Owens D, et al. Lupus anticoagulants form immune complexes with prothrombin and phospholipid that can augment thrombin production in flow. *Blood*. 1999; 94(10): 3421–31.
77. Roubey RA. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum*. 1996; 39(9): 1444–54.
78. 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.
79. 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. *ThrombHaemost*. 1997; 78(4): 1173–7.
80. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis and rheumatism*. 2005; 52(7): 2120–4.

81. Romay-Penabad Z, Liu XX, Montiel-Manzano G, Papalardo De Martinez E, Pierangeli SS. C5a receptor-deficient mice are protected from thrombophilia and endothelial cell activation induced by some antiphospholipid antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1108: 554–66.
82. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(6): 1030–5.
83. Simmelink MJ, De Groot PG, Derksen RH. A study on associations between antiprothrombin antibodies, antiplasminogen antibodies and thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003; 1(4): 735–9.
84. Bu C, Li Z, Zhang C, Gao L, Cai G. IgG antibodies to plasminogen and their relationship to IgG anti-beta(2)-glycoprotein 1 antibodies and thrombosis. *Clinical rheumatology*. 2008; 27(2): 171–8.
85. Kujovich JL. Thrombophilia and thrombotic problems in renal transplant patients. *Transplantation*. 2004; 77(7): 959–64.
86. Blank M, Shoenfeld Y. Antiphospholipid antibody-mediated reproductive failure in antiphospholipid syndrome. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2010; 38(2–3): 141–7.
87. Matalon ST, Shoenfeld Y, Blank M, Yacobi S, von Landenberg P, Ornoy A. Antiphosphatidylserine antibodies affect rat yolk sacs in culture: a mechanism for fetal loss in antiphospholipid syndrome. *Am J Reprod Immunol*. 2004; 51(2): 144–51.
88. Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmback K, et al. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(13): 7597–602.
89. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis. *Lupus*. 2010; 19(4): 460–9.
90. Cervera R, Asherson RA. Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases. In: Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME, editors. *Antiphospholipid syndrome*. Totowa: Humana Press; 2008. p. 9–14.
91. Alijotas-Reig J. Treatment of refractory obstetric antiphospholipid syndrome: the state of the art and new trends in the therapeutic management. *Lupus*. 2013; 22(1): 6–17.
92. Yang P, Kruh JN, Foster CS. Antiphospholipid antibody syndrome. *Current opinion in ophthalmology*. 2012; 23(6): 528–32.
93. Bramham K, Hunt BJ, Germain S, Calatayud I, Khamashta M, Bewley S, et al. Pregnancy outcome in different clinical phenotypes of antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010; 19(1): 58–64.