

Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο Νεότερα δεδομένα για την παθογένεια και τη θεραπεία

Παρασκευή Κώτση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS), χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων ενάντια στα φωσφολιπίδια με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης, καθ' ἑξίν αποβολές ή άλλες μαιευτικές επιπλοκές. Μπορεί να είναι πρωτοπαθές ή δευτεροπαθές σε συνδυασμό συνηθέστερα με συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ). Τα αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν είτε με ELISA ή με δοκιμασίες πήξεως. Τελευταία δεδομένα στην παθογένεια του APS ενοχοποιούν το οξειδωτικό stress σαν το έναυσμα της ανοσολογικής διαταραχής και την απάντηση των Β-κυττάρων ως καθοριστικούς παράγοντες στην εξέλιξη της νόσου, οδηγώντας σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, περιλαμβανομένων βιολογικών και εστιασμένων θεραπειών. Η καταστολή ή η ελάττωση των Β-λεμφοκυττάρων, μπορεί να είναι βοηθητική για κάποιους ασθενείς. Μελέτες καταδεικνύουν ένα ρόλο και για την πρωτογενή αιμόσταση στην παθογένεια του νοσήματος αναδεικνύοντας νέους θεραπευτικούς στόχους. Σήμερα εφόσον ο ασθενής αναπτύξει θρόμβωση τίθεται σε διά βίου αντιπηκτική αγωγή, λόγω του υψηλού κινδύνου υποτροπών. Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στις περιπτώσεις θρομβωτικού κυρίως APS ότι η ανοσοκαταστολή έχει κάποιο ευεργετικό αποτέλεσμα. Πιθανή εξαίρεση αποτελεί το καταστροφικό APS (περίπου 1% των περιστατικών). Μερικά πρόσφατα δημοσιεύματα καταδεικνύουν τη χρήση του rituximab με θετικά αποτελέσματα σε ανθεκτικές περιπτώσεις. Οι στατίνες και άλλα φάρμακα έχουν πιθανά αντιθρομβωτική και ανοσορρυθμιστική δράση και θα μπορούσαν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν σαν επιπρόσθετη αγωγή εφόσον υπάρξουν μελέτες που θα καταδείξουν το όφελος σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (aPL).

Haema 2014; 5(1): 24-34 Copyright EAE

Εισαγωγή

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS), γνωστό και ως σύνδρομο Hughes, είναι μια προθρομβωτική διαταραχή με εκδηλώσεις τόσο από τη φλεβική όσο και από την αρτηριακή κυκλοφορία.¹ Η εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση των κάτω άκρων και τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά είναι οι πιο συχνές εκδηλώσεις του.² Εκδηλώσεις όμως μπορεί να υπάρχουν από οποιοδήποτε όργανο ή ιστό με προσβολή του αγγειακού του δικτύου. Σε ένα μικρό αριθμό ασθενών αναπτύσσεται το καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (CAPS), που χαρακτηρίζεται από θρομβώσεις σε πολλαπλά μικρά αγγεία και οδηγεί σε πολυοργανική ανεπάρκεια με υψηλή θνητότητα. Άλλες σημαντικές εκδηλώσεις του APS είναι οι

μαιευτικές εκδηλώσεις που περιλαμβάνουν ανεξήγητο θάνατο ενός ή περισσότερων μορφολογικά φυσιολογικών εμβρύων στη 10^η ή μεγαλύτερη εβδομάδα της κύησης, ο πρόωρος τοκετός ενός ή περισσότερων μορφολογικά φυσιολογικών νεογνών πριν την 34^η της κύησης λόγω εκλαμψίας ή σοβαρής προεκλαμψίας, και 3 ή περισσότερες αλληλοδιάδοχες ανεξήγητες αποβολές πριν τη 10^η εβδομάδα της κύησης.¹

Τα κριτήρια για τη διάγνωση APS (2006) καθιστούν απαραίτητη την παρουσία των ειδικών αυτοαντισωμάτων που επιμένουν για >12 εβδομάδες IgG ή IgM ιστύπου και ανιχνεύονται με ELISA για τη β2-γλυκοπρωτεΐνη I (β2-GPI) ή αντικαρδιολιπινικά αντισώματα ή με δοκιμασίες για ανίχνευση του αντιπηκτικού του λύκου (Lupus-anticoagulant Assays).¹ Οι δοκιμασίες για το αντιπηκτικό του λύκου ανιχνεύουν αυτοαντισώματα που in vitro παρατείνουν τους χρόνους πήξης. Ο όρος “αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα” (aPL) χρησιμοποιείται για όλα τα είδη

Παρασκευή Κώτση, Αιματολόγος, Επιμελήτρια, Κέντρο Αίματος και Κέντρο Αιμορραγικών Διαθέσεων, Λαϊκό Νοσοκομείο, Αγίου Θωμά 17, Αθήνα Τ.Κ. 11427, e-mail: vkotsis@msn.com

αντισωμάτων. Η διάγνωση του APS τίθεται όταν υπάρχει τουλάχιστον ένα από τα προαναφερθέντα κλινικά κριτήρια με ένα εργαστηριακό κριτήριο.¹

Ο ρόλος των “αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων” (APA, aPL)

Παθογενετικοί μηχανισμοί

Μετά την ανακάλυψη το 1990 ότι η πρωτεΐνη β2-GPI που συνδέεται με τα φωσφολιπίδια είναι κριτικής σημασίας για τη διάγνωση του συνδρόμου, πάνω από 20 πιθανές πρωτεΐνες στόχος έχουν περιγραφεί (προθρομβίνη, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S, t-PA και ανεξίνη A5).

Ωστόσο το θετικό αντιπηκτικό του λύκου είναι ο ισχυρότερος παράγων κινδύνου για θρόμβωση και δυσμενή έκβαση της κυήσεως σε σχέση με τα αντισώματα έναντι β2-GPI ή αντικαρδιολιπινικά αντισώματα.³

Σε μελέτη σε γυναίκες ηλικίας κάτω από 50 ετών, για παράγοντες κινδύνου για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο βρέθηκε το 17% να έχουν θετικό αντιπηκτικό του λύκου σε σύγκριση με 0,7% του γενικού πληθυσμού (OR, 43,1).⁴ Ο κίνδυνος αυξάνεται παραπέρα με τη χρήση των αντισυλληπτικών δισκίων (OR, 201) ή κάπνισμα (OR, 87). Το 1% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας παρουσιάζουν καθ' έξι αποβολές, και περίπου 10-15% από αυτές εκτιμάται ότι πάσχουν από μαιευτικό APS. Θετικό αντιπηκτικό του λύκου είναι ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγων για θρόμβωση σε αμιγώς μαιευτικό APS με ετήσια επίπτωση εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης 1,46%, και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου 0,32%.

Ο κίνδυνος του πρώτου θρομβωτικού επεισοδίου σε ασυμπτωματικά άτομα που είναι θετικά και στα 3 είδη αντισωμάτων (αντιπηκτικό του λύκου, αντικαρδιολιπινικά αντισώματα, αντισώματα έναντι της β2-GPI) είναι 5,3% ανά έτος.⁶

Μεταξύ των αντισωμάτων έναντι της β2-GPI βρέθηκε ότι εκείνα που συσχετίζονται καλλίτερα με τα θρομβοεμβολικά επεισόδια είναι αυτά που στρέφονται ενάντια στο τμήμα I (domain I, DI) (OR 18,9, CI 6,8–53,2), της β2-GPI (Σχήμα 1). Αντισώματα ενάντια στα τμήματα II-V (domain II-V, DII-V) δεν συσχετίζονται με θρόμβωση (OR 1,1, CI 0,4–2,8). Παραπέρα μελέτη έδειξε ότι τα παθολογικά αντισώματα αναγνωρίζουν μια θετικά φορτισμένη περιοχή γύρω από τα αμινοξέα aa 40–43 και αυτά είναι τα αντισώματα που ανιχνεύονται με τις πιξιολογικές μεθόδους (β2-GPI-dependent LAC).⁷ Ενώ το DI περιέχει τον επίτοπο για τη δέσμευση των αντι-β2-GPI αντισωμάτων, το DV είναι εκείνο που συνδέει το ανοσοσύμπλεγμα με τα ανιονικά φωσφολιπίδια. Μόνο μετά την αλληλεπίδραση με τα αντισώματα και τον διμερισμό της β2-GPI μπορεί να συνδεθεί στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μονοκυττάρων. Αυτοα-



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση της free thiol μορφής της β2-GPI.

ντισώματα από ασθενείς με APS όταν ενίονται σε πειραματόζωα επάγουν τη θρόμβωση, οι θρομβογονικές όμως ιδιότητες τους μειώνονται σημαντικά όταν απομακρύνονται τα αντισώματα έναντι της β2-GPI.^{8,9} Αντίθετα η χρησιμότητα των αντισωμάτων έναντι καρδιολιπίνης για την διάγνωση του θρομβωτικού αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου αμφισβητείται.¹⁰

Έως σήμερα δεν έχει καταδειχθεί ένας και μόνος μηχανισμός στην παθογένεια του APS.

Οι πρώτες μελέτες εστίασαν στον αιμοστατικό μηχανισμό και κατέδειξαν επιτάχυνση του σχηματισμού θρομβίνης με συγκέντρωση προθρομβίνης μέσω αντισωμάτων στην επιφάνεια των ανιονικών φωσφολιπιδίων ή με την απομάκρυνση της ανεξίνης V από τα φωσφολιπίδια¹¹ και την κυτταρική έκφραση του ιστικού παράγοντα (TF), καθώς και διαταραχή της ινωδόλυσης. Αργότερα μελέτες κατέδειξαν ενεργοποίηση του κλασσικού μονοπατιού του συμπληρώματος.¹² Παρά τις ασάφειες στο μηχανισμό, η κύρια εκδήλωση είναι η παρουσία μιας προθρομβωτικής κατάστασης που σχετίζεται με την κλινική εικόνα αλλά και τη θεραπευτική αντιμετώπιση του APS.

Νεότερα δεδομένα καταδεικνύουν ότι το APS χαρακτηρίζεται από αυξημένο οξειδωτικό stress. Το οξειδωτικό stress παίζει άμεσο ρόλο στη δομή και λειτουργία της β2-GPI. Στοιχεία παρουσίας οξειδωτικού stress είναι η χαμηλή δραστηριότητα της παραοξονάσης (Paraoxonase), που αντιστοιχεί στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (high density lipoprotein - HDL) που προλαμβάνουν την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (low density lipoprotein - LDL) σε ασθενείς με APS,^{13,14} ενώ τα επίπεδα της 8 επι-προσταγλανδίνης F2α που είναι βιολογικός δείκτης υπεροξείδωσης των λιπιδίων είναι αυξημένα.¹⁵ Τα συμπλέγματα β2-GPI-οξειδωμένων LDL είναι αυξημένα στους πάσχοντες σε σχέση με υγιή άτομα.

Σε κάθε ένα από τα τμήματα DI έως DIV της β2-GPI περιέχονται 2 δισουλφιδικοί δεσμοί και στο πέμπτο τμήμα (DV) περιλαμβάνεται ένας ακόμα δισουλφιδικός δεσμός που συνδέει την κυστεΐνη (Cys) 288 με την Cys 326.¹⁶ Στα υγιή άτομα, στο πλάσμα ανευρίσκεται κυρίως η ονομαζόμενη μορφή free thiol που χαρακτηρίζεται από διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ της Cys32 και Cys60 (κοντά στον επίτοπο που αναγνωρίζουν τα Β-λεμφοκύτταρα) στο DI και μεταξύ της Cys288 και της Cys326 στο DV (κοντά στον επίτοπο που αναγνωρίζεται από τα Τ-λεμφοκύτταρα).^{17,18} Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στις θέσεις αυτές διασπώνται από τις οξειδοαναγωγάσες (oxidoreductases) thioredoxin-1 και την πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση (protein disulfide isomerase, PDI).¹⁹ Σε συνθήκες οξειδωτικού stress, δημιουργούνται δισουλφιδικοί δεσμοί στις θέσεις αυτές.¹⁷ Το ποσοστό της οξειδωμένης β2-GPI σε ασθενείς με APS σε σχέση με την μη οξειδωμένη μορφή είναι σημαντικά αυξημένο σε σύγκριση με άλλους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα (με παρουσία ή όχι αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων χωρίς το κλινικό σύνδρομο) και υγιείς (P<0.001).¹⁷ Ασθενείς με το σύνδρομο θετικοί στο αντιπηκτικό του λύκου και στα αντί-β2-GPI αντισώματα έχουν υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένης β2-GPI από ασθενείς που είναι αρνητικοί στο αντιπηκτικό του λύκου και θετικοί στα αντισώματα.¹⁷ Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την θεωρία ότι η οξείδωση της β2-GPI αποκαλύπτει τον κριτικό επίτοπο που αναγνωρίζεται από τα Β-λεμφοκύτταρα. Αντι-β2-GPI αντισώματα που προήλθαν από πειραματόζωα με ανοσολογική διέγερση με ανθρώπινη β2-GPI έδειξαν ελαττωμένη ικανότητα δέσμωσης της β2-GPI που είχε επεξεργασθεί με οξειδοαναγωγή¹⁹ και το ίδιο ισχύει και για αντισώματα που είχαν ληφθεί από ασθενείς με APS.

Ρόλο φαίνεται να παίζει και η διαμόρφωση της β2-GPI που μπορεί να υπάρχει σε κυκλική μορφή με αλληλεπίδραση του DI με το DV. Στη διαμόρφωση αυτή ο κριτικής σημασίας επίτοπος που αναγνωρίζεται από το Β-λεμφοκύτταρα παραμένει κρυφός από το ανοσοποιητικό σύστημα.²⁰ Σε δέσμωση της σε επιφάνεια ανιονικών φωσfolιπιδίων μέσω του DV, η κυκλική μορφή αλλά-

ζει διαμόρφωση, «ανοίγει» σε σχηματισμό αγκιστριού και αποκαλύπτει τον επίτοπο του DI επιτρέποντας την δέσμωση των ειδικών αυτοαντισωμάτων. Η παρουσία της κυκλικής διαμόρφωσης δεν έχει άμεσα αποδειχθεί στον άνθρωπο αλλά υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την παρουσία της in vivo. Η πρωτεΐνη Η (προϊόν του *Streptococcus pyogenes*) αλλάζει τη διαμόρφωση της β2-GPI από την κυκλική στην ανοικτή ανοσογόνο μορφή της όταν ενίεται σε ποντίκια και οδηγεί στον σχηματισμό αυτοαντισωμάτων.²¹

Τα αυτοαντισώματα από ασθενείς με APS ενιέμενα σε ποντίκια δεν προάγουν τη δημιουργία θρόμβου απουσία βλάβης του αγγειακού τοιχώματος γεγονός που συνηγορεί υπέρ του μοντέλου των δυο χτύπημάτων "two hit" για την πρόκληση θρόμβωσης. Το αρχικό πρώτο χτύπημα διασπά-ενεργοποιεί το ενδοθήλιο, και ένα δεύτερο οδηγεί στο σχηματισμό του θρόμβου.²² Η β2-GPI δεν συνδέεται στο μη διεγερμένο ενδοθήλιο in vivo.²³ Απαραίτητο βήμα για τη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων με τη β2-GPI στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι η διέγερση τους. Στο CAPS, λοίμωξη και χειρουργική επέμβαση αναγνωρίζονται σαν παράγοντες που προδιδεθούν σε ενδοθηλιακή βλάβη. Όμως το αρχικό ερέθισμα δεν αναγνωρίζεται σε πολλές περιπτώσεις APS. Η διαταραχή της οξειδωτικής ισορροπίας στο αγγειακό μικροπεριβάλλον των ασθενών με APS μπορεί να αποτελεί το πρώτο χτύπημα που διεγείρει το ενδοθήλιο, επιτρέποντας στα ανοσοσυμπλέγματα της β2-GPI να σχηματισθούν στην επιφάνεια του κυττάρου και να εκδηλώσουν την παθογενετική τους δράση.

Οξειδωτικό stress από εξωγενείς παράγοντες π.χ. κάπνισμα μπορεί να ωθεί το ενδοθηλιακό περιβάλλον προς προθρομβωτικό φαινότυπο. Παραδείγματος χάριν μπορεί να ευοδώνει την έκφραση της ανεξίνης A2 που αποτελεί ενδοθηλιακό επιφανειακό υποδοχέα για τη β2-GPI και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του APS.²⁴ Κλινικό παράδειγμα αποτελεί ο σχετικός κίνδυνος αγγειακού ισχαιμικού επεισοδίου σε νέες γυναίκες με APS και θετικό αντιπηκτικό του λύκου (OR, 43.1), που αυξάνεται σε 87 με ταυτόχρονο κάπνισμα.⁴ Σε ένα μοντέλο θρόμβωσης σε ποντίκια, προϊόντα μεταβολισμού O₂ (reactive oxygen species-ROS) προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων, διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων και έκφραση του παράγοντα von Willebrand. Η N-acetylcysteine (NAC), που εξουδετερώνει τα ROS, αναστέλλει το σχηματισμό του θρόμβου σε αυτό το μοντέλο.²⁵ Η θεραπευτική αξία της NAC στο APS δεν έχει διερευνηθεί.

Ο ρόλος της eNOS (ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου-NO)

Ασθενείς με APS έχουν χαμηλότερα επίπεδα νιτροδών στο πλάσμα, και παθολογικές αγγειακές απαντήσεις

που εξαρτώνται από το ενδοθήλιο σε σύγκριση με υγιείς,¹⁴ γεγονός που καταδεικνύει διαταραχή στη λειτουργία της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO. Το ενδοθηλιακό NO συμβάλλει σημαντικά στη φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία.²⁶ Παράγεται από την ενζυματική μετατροπή της L-αργινίνης από την eNOS και έχει εξαιρετικά μικρό χρόνο ημιζωής. Η εκτίμηση της δραστηριότητας της eNOS βασίζεται στη μέτρηση των μεταβολιτών του NO στο πλάσμα. Τα νιτρώδη χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό. Σε πειραματόζωα η έγχυση αυτοαντισωμάτων έναντι του DI της β2-GPI ανταγωνίζεται τη δραστηριότητα της eNOS, με αποτέλεσμα προσκόλληση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Η δράση αυτή ήταν ανεξάρτητη από το συμπλήρωμα. Η NO εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή των αρτηριολίων στα πειραματόζωα, αναστέλλεται από τα DI αυτοαντισώματα της β2-GPI, κατάσταση αντίστοιχη με αυτή των ασθενών με aPL.¹⁴ Η αναστολή της eNOS επάγεται μέσω των DI αυτοαντισωμάτων της β2-GPI που οδηγούν σε διμερισμό των μορίων β2-GPI σε επαφή με τον υποδοχέα 2 της απολιποπρωτεΐνης E ApoER2α (LDL receptor-related protein 8), διασυνδέοντας και ενεργοποιώντας τον υποδοχέα 2 της ApoE, στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (EC).²⁷ Η αναστολή της eNOS οδηγεί σε προσκόλληση των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια των EC και προάγει το σχηματισμό του θρόμβου. Η δραστηριότητα αυτή των αντι-β2-GPI αντισωμάτων αναστρέφεται σε ποντίκια με έλλειψη eNOS ή ApoE υποδοχέα 2, καταδεικνύοντας τον κριτικό τους ρόλο. Δεν είναι γνωστό αν τα aPL ασκούν παρόμοια δράση στην παραγωγή της eNOS από τα αιμοπετάλια που επίσης φέρουν τον ApoER2α.

Οι στατίνες, αναστολείς της 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) αναγωγάσης, αναστέλλουν τις θρομβογονικές ιδιότητες των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων *in vitro* και *in vivo*,²⁸ και η δράση τους οφείλεται εν μέρει στη δυνατότητά τους να αυξάνουν την παραγωγή της eNOS.²⁹

Επίδραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα

Τα αντιφωσφολιπιδικά αυτοαντισώματα είναι γνωστό ότι αυξάνουν την έκφραση στην επιφάνεια των κυττάρων προπηκτικών και προσκολλητικών μορίων. Προφανώς ένας υποδοχέας είναι απαραίτητος για τη μετάδοση σήματος από το περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου (πυρήνα). Τουλάχιστον 2 υποδοχείς έχουν δείχθει να υπάρχουν στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, η ανεξίνη A2 (ANXA2), που έχει υψηλή συγγένεια με τη β2-GPI και αποτελεί μάλλον τον κύριο υποδοχέα της. Η ANXA2, όμως δεν έχει διαμεμβρανικό τμήμα για ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος. Ο δεύτερος υποδοχέας είναι ο toll-like receptor 4 (TLR4). Ο συνδέτης του TLR4 προκαλεί

ομοδιμερισμό του υποδοχέα και ενδοκυττάρια ενεργοποίηση μέσω του μυελικού παράγοντα διαφοροποίησης 88 (MyD88), που οδηγεί στην ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB). Ο TLR4 ανήκει στους υποδοχείς που αναγνωρίζουν παθογόνα (pathogen recognition receptors, PRRs). Λαμβάνουν σήματα από ποικίλες μοριακές δομές παθογόνων (PAMPS) που διεγείρουν πρωτογενείς ανοσολογικές απαντήσεις. Τελευταία φάνηκε ότι στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων δημιουργούνται πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα που περιλαμβάνουν αντι-β2-GPI αντισώματα, β2-GPI, την ανεξίνη A2, τον toll-like υποδοχέα 4 (TLR4), την καλρετικουλίνη και τη νουκλεολίνη.³⁰ Το σύμπλεγμα αυτό φαίνεται ότι είναι υπεύθυνο για τη μετάδοση του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Η απουσία της ανεξίνης A2 έχει αναφερθεί ότι προστατεύει από θρόμβωση πειραματόζωα στα οποία έχουν χορηγηθεί αυτοαντισώματα από ασθενείς με APS.³¹ Στα μονοκύτταρα έχει βρεθεί η β2-GPI σε λιπιδικά τμήματα από μεμβράνες μονοκυττάρων να συνεντοπίζεται με την ανεξίνη A2 και τον υποδοχέα TLR4. Αυτοαντισώματα από ασθενείς με APS διακόπτουν την μιτοχονδριακή λειτουργία μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ποικίλων ROS και την έκφραση του TF. Τα αντισώματα των ασθενών δεν συνεντοπίζονται με τα μιτοχόνδρια καταδεικνύοντας έναν έμμεσο μηχανισμό δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων. Η παραγωγή των ενδοκυττάρων ROS στα μονοκύτταρα αναστέλλεται με τη χρήση NAC, βιταμίνης C, ή με τη χρήση του μιτοχονδριακού συμπαραγόντα του συνενζύμου Q10 και ακολουθεί ελάττωση της έκφρασης του TF.³² Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται με διαφορετικό τρόπο από πολυκλωνικά αυτοαντισώματα από ασθενείς με θρομβωτικό APS (επάγουν την έκφραση του TF), σε σχέση με πολυκλωνικά αυτοαντισώματα από ασθενείς με αμιγές μαιευτικό APS.³³

Ο TF είναι το κλειδί στην έναρξη του πηκτικού μηχανισμού. Σε βλάβη του αγγειακού τοιχώματος και έκθεση της φωσφατιδυλσερίνης, ο TF αποκαλύπτεται και δεσμεύει τον VIIa, (ενεργοποιημένο VII) που οδηγεί σε ενεργοποίηση του παράγοντα IX και του X. Η σημασία του TF στην παθογένεια του APS υποστηρίζεται από αποτελέσματα σε μοντέλα ποντικών *in vitro* και *in vivo*. Αντιδράσεις ανταλλαγής θειολών παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κατάστασης του TF. Οι PDI, (Protein disulfide isomerase inhibitors) είναι εξωκυττάριοι ρυθμιστές της ανταλλαγής θειολών, συσχετίζονται με τον TF, εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και προαπαιτείται η ύπαρξή τους για να εκδηλωθεί θρόμβωση που ξεκινά από τον TF.³⁴ Αναστολείς της PDI μπορεί να έχουν επίδραση στην αντιμετώπιση του APS στοχεύοντας τον TF.³⁵

Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα XI προδιαθέτουν για ανάπτυξη φλεβοθρόμβωσης και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο στον γενικό πληθυσμό, καθρεφτίζοντας τις δυο συχνότερες εκδηλώσεις ασθενών με APS. Στο APS

υπάρχει διαταραχή στην ενεργοποίηση του XI.³⁶ Ο παράγων XI είναι προένζυμο που μετατρέπεται στην ενεργό μορφή του (XIa) από τον XIIa ή τη θρομβίνη. Ο XIa είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση του IX οδηγώντας σε έκρηξη στην παραγωγή θρομβίνης. Μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα των οξειδοαναγωγασών (thioredoxin 1 και PDI),³⁶ που στοχεύουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς του XI (στη θέση Cys118–Cys147 και Cys362–Cys482) δημιουργώντας ελεύθερεςθειόλες σε αυτές τις θέσεις. Και οι δύο μορφές του παράγοντα XI ανευρίσκονται στο πλάσμα.³⁶ Σε μελέτη βρέθηκε ότι οι ασθενείς με APS έχουν υψηλότερα επίπεδα παράγοντα XI με ελεύθερεςθειόλες σε σχέση με υγιή άτομα.³⁶ Ο παράγων XI που έχει δεχθεί την επίδραση των οξειδοαναγωγασών μετατρέπεται ταχύτερα σε XIa. Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ του παράγοντα XI και των οξειδοαναγωγασών φαίνεται να είναι σημαντική, διότι αναστολές των οξειδοαναγωγασών (PDI) και του XIa είναι αποτελεσματικοί στη θεραπεία της θρόμβωσης σε ζωικά μοντέλα.³⁷ Η αναστολή του XI παρέχει προστασία ενάντια στη θρόμβωση χωρίς αύξηση του κινδύνου αιμορραγίας, κάνοντας τον XI ελκυστικό θεραπευτικό στόχο.

Όσον αφορά τα αιμοπετάλια η β2-GPI αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του παράγοντα von Willebrand στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων (glycoprotein Iba) και τον υποδοχέα 2 της ApoE (ApoER2a).³⁸ Τα αυτοαντισώματα συνδέονται στους υποδοχείς αυτούς και ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, απελευθερώνοντας θρομβοξάνη A2. Τέλος ο αιμοπεταλιακός παράγων 4 (PF-4), μια θετικά φορτισμένη κατιονική πρωτεΐνη απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και διευκολύνει το διμερισμό της β2-GPI, αυξάνοντας τον σχηματισμό παθογενετικών ανοσοσυμπλεγμάτων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων.³⁹

Διαταραχή της πρωτοπαθούς (Innate) ανοσίας

Υπάρχουν κλινικά ευρήματα που καταδεικνύουν αλληλεπικάλυψη στην παθογένεση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου (ΣΕΛ) και στο APS. Η συχνότητα θετικού αντιπηκτικού του λύκου σε ασθενείς με ΣΕΛ είναι 30%, και η παρουσία θετικού αντιπηκτικού του λύκου στους ασθενείς αυτούς αυξάνει το κίνδυνο θρόμβωσης (OR, 5,6). Η συσχέτιση μεταξύ των υποστηρίζεται και από την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι του D1 της β2-GPI και την ανάπτυξη ενός συνδρόμου ανάλογου με το APS σε ένα ζωικό μοντέλο λύκου⁴⁰ (NZW X BXSB F1 αρσενικά ποντίκια). Στο μοντέλο αυτό κύριος παθογενετικός μηχανισμός είναι ο διπλασιασμός του TLR7 (Toll-like receptor 7) λόγω μετάθεσης του TLR7 από το X στο Y χρωμόσωμα στα BXSB άρρενα ποντίκια. Αντισώματα από ασθενείς με APS αυξάνουν την έκφραση των υποδοχέων TLR7 και TLR8 σε πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα και μονοκύτταρα αντίστοιχα, καθώς και τη

μετακίνησή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το ενδόσωμα κάνοντας τα κύτταρα ευαίσθητα στους συνδέτες των TLR7 και TLR8. Οι δράσεις αυτές εξαρτώνται από την πρόσληψη των αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων στο ενδόσωμα, την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης, και τη δημιουργία υπεροξειδίου.⁴¹ Η αναστολή των υποδοχέων TLR7 και TLR8 μπορεί να αποτελεί στόχο στη θεραπεία του ΣΕΛ και των APL. Η υδροχλωροκίνη έχει δείξει ότι αναστέλλει τον TLR7 και κλινικά σε ασθενείς με ΣΕΛ έχει συσχετιστεί με ελάττωση της πιθανότητας διατήρησης θετικών APL.⁴²

Ο BAFF (B-cell activating factor) είναι κυτταροκίνη κριτικής σημασίας για την επιβίωση των B-λεμφοκυττάρων.⁴³ Το belimumab είναι αντίσωμα που αναστέλλει τον BAFF και χρησιμοποιείται στη θεραπεία του ΣΕΛ.⁴⁴ Η αναστολή του BAFF προλαμβάνει την ανάπτυξη θρόμβωσης στα NZW X BXSB F1 αρσενικά ποντίκια υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο της αναστολής των B-λεμφοκυττάρων στην πρόληψη της θρόμβωσης σε ασθενείς με APL και ΣΕΛ.⁴⁵

Νεώτερα δεδομένα στη θεραπεία του APS

Η θεραπεία σήμερα του θρομβωτικού APS είναι ηπαρίνη και μακράς διάρκειας αντιπηκτική αγωγή με ανταγωνιστές της βιταμίνης K. Στο άμεσο μέλλον τα νέας γενιάς από του στόματος αντιπηκτικά (NOACs) φαίνεται να μεταβάλλουν το τοπίο στη θεραπευτική αντιμετώπιση της θρομβοεμβολικής νόσου. Περιλαμβάνουν τους άμεσους αναστολές της πήξης είτε ενάντια στη θρομβίνη [(DTI direct thrombin inhibitors) dabigatran etexilate (Pradaxa)] ή τους άμεσους αναστολές του παράγοντα Xa [rivaroxaban (Xarelto), apixaban (Eliquis) and edoxaban]. Σε αντίθεση με τις αντιβιταμίνες K έχουν σταθερή δόση δεν αλληλεπιδρούν με τροφές και αλκοόλ, έχουν λιγότερες φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις και δεν απαιτείται παρακολούθηση, με κύριο μειονέκτημα τη δυσχερή αναστροφή σε περίπτωση αιμορραγίας (απουσία αντιδότη). Η δραστηριότητα τους στη θρομβοεμβολική νόσο (VTE) έχει καταδειχθεί σε μεγάλες κλινικές μελέτες (Phase III) και έχουν λάβει άδεια για διάφορες ενδείξεις από το European Medicines Agency (EMA) και τον Food and Drug Administration (FDA) στις ΗΠΑ. Στις μελέτες του rivaroxaban EINSTEIN είχε περιληφθεί ένας μικρός αριθμός ασθενών με αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα χωρίς όμως να γίνει ανάλυση των “APS” αυτών ασθενών. Δεν υπάρχουν μελέτες ούτε σε πειραματικά μοντέλα APS. Υπάρχει σε εξέλιξη κλινική μελέτη [Rivaroxaban in AntiPhospholipid Syndrome (RAPS)]. Ο κύριος στόχος της μελέτης RAPS είναι να καταδείξει ότι η αγωγή με το rivaroxaban δεν είναι κατώτερη όσον αφορά την αποτελεσματικότητα από την βαρφαρίνη. Οι ασθενείς τυχαιοποιούνται μετά 3μηνη τουλάχιστον αγωγή με βαρφαρίνη σε βαρφαρίνη (target INR 2.5) ή σε rivaroxaban 20 mg 1 φορά την ημέρα

(ή 15 mg σε νεφρική ανεπάρκεια). Σε ασθενείς που παρουσιάζουν αντίσταση ή δυσανεξία στους VKA έχουν χρησιμοποιηθεί οι χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνες (LMWH).⁴⁶ Το fondaparinux δεν έχει αλληλεπίδραση με το συμπλήρωμα⁴⁷ και πιθανά δεν πλεονεκτεί έναντι των LMWH αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις θρομβοπενίας από ηπαρίνη.⁴⁸ Σήμερα λόγω έλλειψης δεδομένων μόνο σε περίπτωση δυσανεξίας ή κακού αντιπηκτικού ελέγχου των VKA θα πρέπει να εξετάζει κανείς τη χορήγηση των νεότερων αντιπηκτικών. Απουσιάζουν επίσης δεδομένα για τις αρτηριακές θρομβώσεις και τις περιπτώσεις των ασθενών με υποτροπιάζουσες θρομβώσεις ενώ βρίσκονται σε θεραπευτικά επίπεδα αντιπηκτικής αγωγής με VKA.

Η Υδροξυλωροκίνη (HCQ) αποτελεί σημαντική θεραπεία για ρευματικά νοσήματα λόγω των αντιφλεγμονωδών, ανοσορρυθμιστικών και μεταβολικών δράσεων της. Υπάρχουν δεδομένα in vitro και in vivo σε πειραματικά μοντέλα που υποστηρίζουν ότι μπορεί να αναστρέψει τις θρομβογονικές ιδιότητες των APL σε αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε μελέτες σε ασθενείς με ΣΕΛ και αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα έχει φανεί η αντιθρομβωτική της δράση και η βελτίωση στην επιβίωση αν και είναι ασαφής ο μηχανισμός. Σε ασθενείς με APS υπάρχει μόνο μια μικρή μελέτη για δευτεροπαθή πρόληψη που καταδεικνύει την αποτελεσματικότητά της.⁴⁹ Η υδροξυλωροκίνη αναστέλλει την ικανότητα της β2-GPI να σχηματίζει ανοσοσυμπλέγματα που διασπούν το στρώμα της ανεξίνης A5. Σε ζωικά μοντέλα έχει επιδείξει αντιθρομβωτική δράση. Μια διεθνής πολυκεντρική προοπτική μελέτη (“HCQ Trial”) για πρωτογενή πρόληψη θρόμβωσης σε ασθενείς με θετικά APL χωρίς θρόμβωση και χωρίς άλλο αυτοάνοσο νόσημα είναι σε εξέλιξη (www.apsaction.org) (clinicaltrials.gov/#:NCT01784523), συγκρίνοντας HCQ με placebo. Περισσότερα δεδομένα χρειάζονται για τη δράση της HCQ στα aPL των ασθενών. Σήμερα ενδείκνυται σε ασθενείς με ΣΕΛ με θετικά aPL και στο πρωτοπαθές APS σε ανθεκτικά περιστατικά (σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα θρόμβωση υπό αντιπηκτική αγωγή) σαν επιπρόσθετη θεραπεία.

Οι στατίνες έχουν ποικίλες ανοσορρυθμιστικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες.⁵⁰ Οι ιδιότητες αυτές, πιθανά τις καθιστούν χρήσιμες στη θεραπεία του APS. Μελέτες σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφάλιο φλέβα (HUVECs) έδειξαν ότι οι στατίνες μπορούν να ελαττώσουν την έκφραση του TF και μορίων προσκόλλησης που επάγονται από τα aPL, καθώς και την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα.⁵¹ Σε δύο μελέτες σε APS ασθενείς, η θεραπεία με φλουβαστατίνη καταστέλλει την έκφραση του TF και άλλων προθρομβωτικών δεικτών. 41 δείγματα aPL-θετικών ασθενών συγκρίθηκαν με 30 υγιή άτομα, στα 9/12 (75%) οι πιο κάτω δείκτες ήταν σημαντικά αυξημένοι στους ασθενείς [IL-6, IL1β, VEGF, TNF-α, IFN-α, επαγόμενη

πρωτεΐνη-10 (IP10), sCD40L, sTF, και ICAM-1] και η φλουβαστατίνη ανέστρεψε τα επίπεδα για τους 6/12 (50%) δείκτες (IL1β, VEGF, TNFα, IP10, sCD40L, και sTF).⁵²

Επιπρόσθετα οι πιο συχνοί καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου στο APS είναι η υπερτριγλυκεριδαμία και η χαμηλή HDL. Στο APS, οι στατίνες έχουν επιδράσεις στα κύτταρα, που βοηθούν στην πρόληψη της θρόμβωσης, ρυθμίζοντας την προφλεγμονώδη απάντηση και την προθρομβωτική κατάσταση, χαμηλώνοντας τα επίπεδα των λιπιδίων, προλαμβάνοντας την αρτηριοσκλήρυνση. Σε υγιή άτομα η χορήγηση στατίνης σε καθημερινή βάση ελάττωσε σημαντικά τον κίνδυνο καρδιαγγειακού επεισοδίου και συμπτωματικής φλεβοθρόμβωσης.⁵³ Μελλοντικές έρευνες πρέπει να εστιάσουν στο ρόλο των στατινών στην πρωτογενή πρόληψη της θρόμβωσης σε aPL-θετικούς ασθενείς ή στη δευτερογενή πρόληψη σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα επεισόδια θρόμβωσης. Σήμερα δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη χορήγηση των στατινών εκτός από τις περιπτώσεις υπερλιπιδαιμίας. Μια υποομάδα των ασθενών με υποτροπιάζουσες θρομβώσεις ή υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο μπορεί να ωφεληθεί από τη χορήγησή τους.

Η Αναστολή των Β-λεμφοκυττάρων. Τα Β λεμφοκύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων καθώς και στο APS. Το Rituximab είναι ένα αντι-CD20 χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται στη θεραπεία των μη-Hodgkin λεμφωμάτων (B-NHL) και της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL). Έχει εγκριθεί από το FDA για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (RA), και αγγειίτιδων (Wegener’s Granulomatosis). Έχει χρησιμοποιηθεί εκτός ενδείξεων (off label) σε APS με σοβαρή θρομβοπενία, αιμολυτική αναιμία, δερματικά έλκη και νέκρωση καθώς και σε CAPS με ποικίλες απαντήσεις. Η μελέτη RITAPS (Rituximab in Antiphospholipid Syndrome- μελέτη φάσης II) είχε στόχο να εκτιμήσει την ασφάλεια του rituximab σε ενήλικες ασθενείς με πρωτοπαθές APS και την επίπτωση του rituximab στα aPL (για 12 μήνες) και σε εκδηλώσεις του APS που δεν συμπεριλαμβάνονται στα διαγνωστικά κριτήρια (για 6 μήνες). Οι ασθενείς έλαβαν 2 δόσεις IV rituximab (1000 mg) την 1^η μέρα και τη 15^η μέρα. Η RITAPS έδειξε ότι είναι ασφαλές, δεν έφερε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα και τον τύπο των aPL και ελέγχει κάποιες εκδηλώσεις του APS που δεν συμπεριλαμβάνονται στα διαγνωστικά κριτήρια.

Σε ασθενείς με CAPS (θνητότητα 30-50%), υπάρχουν 20 ασθενείς που έλαβαν rituximab, 5 πέθαναν και οι 15 είχαν καλή έκβαση.⁵⁴

Το Belimumab (Benlysta) είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη BLYS, (ή BAFF ή TNFSF13B) τον διαλυτό διεγέρτη των ανθρώπινων Β-λεμφοκυττάρων και παράγοντα επιβίωσης τους. Το Benlysta δεν δεσμεύει άμεσα τα Β-λεμφοκύτταρα, αλλά δεσμεύοντας τον BLYS, αναστέλλει την επιβίω-

ση τους, συμπεριλαμβανομένων των αυτοαντιδραστικών Β-λεμφοκυττάρων και μειώνει τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα που παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Δεν έχει μελετηθεί για την πρόληψη θρόμβωσης και άλλων εκδηλώσεων που σχετίζονται με τα aPL σε ασθενείς με SLE αλλά είναι συνεχώς αυξανόμενη η εμπειρία σε αυτή την ομάδα ασθενών. Σήμερα τα δεδομένα δεν είναι αρκετά αλλά ειδικά το rituximab φαίνεται να έχει ένα ρόλο σε «δύσκολους» ασθενείς κυρίως με αιματολογικές και θρομβωτικές μικροαγγειακές εκδηλώσεις. Η δόση που έχει εγκρίνει το FDA για την RA δεν έχει συγκριθεί σε μελέτες με την κλασική δόση 375 mg/m² 1 φορά την εβδομάδα για 4 εβδομάδες που έχει εγκριθεί για αγγειίτιδες.

Αναστολή συμπληρώματος

Το eculizumab (μονοκλωνικό αντίσωμα) αναστολέας του C5 προλαμβάνει τη θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια που επιπλέκει τη νεφρική μεταμόσχευση σε ασθενείς με CAPS, και είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία αυτών των ασθενών.^{55,56} Μελέτες σε πειραματόζωα εμπλέκουν την ενεργοποίηση του κλασσικού μονοπατιού του συμπληρώματος στη θρόμβωση στο APS και αποτέλεσαν την βάση για τη χρήση του eculizumab. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα αντιφωσφολιπιδικά αυτοαντισώματα δημιουργεί το C5a, που δεσμεύεται και ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα επάγοντας την έκφραση του TF.⁵⁷ Με βάση τα πειραματικά δεδομένα το C3 και το C5 αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για τη θεραπεία του μειωτικού APS.⁵⁸ In vitro και σε πειραματικά μοντέλα η ενεργοποίηση του συμπληρώματος ειδικά του C5, είναι απαραίτητα ενδιάμεσο στάδιο στη θρόμβωση από aPL και οδηγεί στη δημιουργία του C5a, ισχυρού φλεγμονώδη μεσολαβητή, που συμβάλλει στην αγγειακή φλεγμονή. Το C5a αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του, C5aR, για να προάγει την προσέλκυση και ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων (PMN) και μονοκυττάρων και την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης αυξάνει την έκφραση του TF των ουδετεροφίλων, που θεωρείται ένας από τους μηχανισμούς που τα aPL προκαλούν θρόμβωση. Θεραπεία με το αντι-C5 αντίσωμα ή πεπτίδια που δεσμεύονται στον C5aR παρεμποδίζουν την ανάπτυξη θρόμβωσης σε ποντίκια που πάσχουν από APS. Η aPL-επαγόμενη πλακουντιακή ανεπάρκεια, φλεγμονή και θρόμβωση χρειάζεται την αλληλεπίδραση του C5a και του υποδοχέα του. Στη βλάβη της τροφοβλάστης παίζουν ρόλο η προσέλκυση και ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων που επάγεται από το C5a και αναστέλλεται με το αντι-C5, πεπτίδια που μπλοκάρουν τον C5aR, και έλλειψη συμπληρώματος.⁵⁹ Έλλειψη ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος σε μοντέλα ποντικών οδηγεί σε μικροαγγειοπάθεια και αποβολή εμβρύου. Μεταλλάξεις

loss-of-function σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος οδηγούν στο άτυπο ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο (aHUS) προεκλαμψία και παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία (PNH). Τα νοσήματα αυτά χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κύτταρων των μικρών αγγείων, κυτταρική βλάβη και θρόμβωση και αντιμετωπίζονται με το eculizumab.⁶⁰ Υπάρχουν λίγα περιστατικά APS που έχει χορηγηθεί eculizumab.⁵⁵ Με βάση τις αναφορές αυτές υπάρχει μια κλινική μελέτη (clinicaltrials.gov #:NCT01029587 phase II) που ερευνά αν η αδρανοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος σε ασθενείς με ιστορικό CAPS που υποβάλλονται σε νεφρική μεταμόσχευση οδηγεί σε βελτίωση της έκβασης.

Θεραπεία με πεπτίδια

Τα αντι-DI αντισώματα είναι τα κυρίως σχετιζόμενα με την παθογένεια, αλλά η σύνδεση του DV στον υποδοχέα του είναι επίσης απαραίτητη. Οι προτεινόμενες θεραπείες με πεπτίδια κυρίως στοχεύουν την αλληλεπίδραση του DI-aPL και του DV-φωσφολιπιδία. Μέχρι στιγμής όλες οι μελέτες είναι in vitro ή σε πειραματόζωα. Ποικίλες στρατηγικές ακολουθούνται στην προσπάθεια να διακοπεί ο σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων της β2-GPI.

Το DV της β2-GPI συνδέεται στον A1 συνδέτη του υποδοχέα 2 της ApoE.⁶¹ Ένα διμερές μόριο A1-A1 εμποδίζει τον σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων β2-GPI στην επιφάνεια των ανιονικών φωσφολιπιδίων.⁶² Σε πειραματικά μοντέλα η έγχυση διαλυτών μονομερών A1 τμημάτων προστατεύει από την θρομβογονική δράση των αυτοαντισωμάτων έναντι της β2-GPI αποδεικνύοντας την θεραπευτική αξία των διμερών A1-A1.⁶³ Μελετήθηκαν διάφορα πεπτίδια και βρέθηκε ότι το οκταπεπτίδιο CKNKEKKC είχε τα καλύτερα αποτελέσματα στην αναστολή δέσμευσης των aPL. Ένα πεπτίδιο (GDKV) με 15 αμινοξέα που περιέχει το CKNKEKKC έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε πειράματα και παρουσιάζει ισχυρή ομολογία με το πεπτίδιο TIFI (προέρχεται από τον μεγαλοκυτταροί). Τα δυο αυτά πεπτίδια ενίεμενα σε πειραματόζωα οδηγούν στον σχηματισμό aPL.⁶⁴ Το TIFI χρησιμοποιήθηκε σαν αναστολέας της θρόμβωσης σε πειραματικά μοντέλα ποντικού (Pierangeli mouse femoral vein thrombosis model) με καλά αποτελέσματα⁶⁵ και ελάττωσε τη σύνδεση των αντι-β2-GPI σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας (human umbilical vein endothelial cells - HUVEC), καθώς και σε κύτταρα ανθρώπινης τροφοβλάστης, όπως και την απώλεια του εμβρύου που ακολουθεί την έγχυση aPL σε ποντίκια.⁶⁶

Δυο ομάδες μελέτησαν την επίδραση μεταλλάξεων στο DI της β2-GPI στη σύνδεση IgG αντισωμάτων από ασθενείς με APS (APS-IgG).^{67,68} Αναγνωρίστηκε ένας σημαντικός επίτοπος για APS-IgG μεταξύ των υπολειμμάτων αμινοξέων 39 και 43 του DI. Μετάλλαξη της αργι-

νίνης R39 σε σερίνη [variant DI (R39S)] είχε αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας σύνδεσης.⁶⁸ Μετάλλαξη του ασπαρτικού στις θέσεις 8 και 9 σε σερίνη και γλυκίνη οδήγησε στο variant DI (D8S, D9G), που είχε μεγαλύτερη συγγένεια με τα APS-IgG σε σχέση με το φυσιολογικό DI.⁶ Στο μοντέλο του Pierangeli, φάνηκε ότι τόσο το φυσιολογικό DI όσο και το DI (D8S, D9G) ανέστελλαν τη θρόμβωση από APS-IgG με δόσοεξαρτώμενο τρόπο ενώ το DI (R39S) δεν είχε επίδραση.⁶⁹ Γραμμικά πεπτίδια που φέρουν τον επίτοπο δεν συνδέονται το ίδιο καλά όσο ολόκληρο DI το με APS-IgG πιθανά λόγω διαφορών στη διαμόρφωση.⁶⁹ Επίσης έχουν γίνει μελέτες σε πειραματόζωα με άλλα πεπτίδια που στοχεύουν διαφορετικές περιοχές της β2-GPI (DI/DII περιοχή σύνδεσης).

Κανένα από αυτά τα πεπτίδια δεν έχει προχωρήσει σε κλινικές μελέτες, αλλά αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη «στοχευμένη» θεραπεία για το μέλλον.

Η NAC (N-acetylcysteine) μπορεί να διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς μέσα στον παράγοντα von Willebrand, και έχει πιθανότητα να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά σε ασθενείς με θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, και θα μπορούσε να διερευνηθεί επίσης στη θεραπεία του APS με βάση τα δεδομένα ότι το οξειδωτικό stress επηρεάζει τη δομή και λειτουργία της β2-GPI. Στα υγιή άτομα, στο πλάσμα ανευρίσκεται κυρίως η ονομαζόμενη μορφή free thiol που χαρακτηρίζεται από διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών.^{17,18} Σε συνθήκες οξειδωτικού stress, δημιουργούνται δισουλφιδικοί δεσμοί στις θέσεις αυτές.¹⁷

Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η οξειδωση της β2-GPI αποκαλύπτει τον κριτικό επίτοπο που αναγνωρίζεται από τα Β-λεμφοκύτταρα. Σε ένα μοντέλο θρόμβωσης σε ποντίκια, προϊόντα μεταβολισμού O₂ (ROS) προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων, διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων και έκφραση του παράγοντα von Willebrand. Η NAC, που εξουδετερώνει τα ROS, αναστέλλει το σχηματισμό του θρόμβου σε αυτό το μοντέλο.²⁵

Η βιταμίνη D έχει σημαντικές ανοσορρυθμιστικές δράσεις και σε in vitro μελέτες αναστέλλει την έκφραση του TF που επάγεται από τα aPL.⁷⁰ Χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης D συσχετίζονται με APS εκδηλώσεις και θρομβώσεις.^{70,71} Σε aPL-θετικούς ασθενείς θα πρέπει να διορθώνεται η ανεπάρκεια της.

Συμπεράσματα

Η παθογένεια του συνδρόμου δεν είναι πλήρως κατανοητή και η αντιμετώπιση των ασθενών με aPL με ή χωρίς APS με αντιπηκτική αγωγή δεν είναι πάντα αποτελεσματική. Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν νέους παθογενετικούς μηχανισμούς, και νέες θεραπείες που στοχεύουν τον πηκτικό μηχανισμό αλλά και ανοσορρυθμιστικούς μηχανισμούς. Είναι πιθανό στο μέλλον στην παρούσα θεραπευτική στρατηγική να προστεθούν ανοσορρυθμιστικές θεραπείες που πρέπει όμως να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλειά τους.

The antiphospholipid (Hughes) syndrome Latest advances in pathogenesis and treatment

by Paraskevi Kotsi

Blood Center and Center for Bleeding Disorders, Laiko General Hospital, Athens, Greece

ABSTRACT: The antiphospholipid (Hughes) syndrome (APS), is characterized by autoantibody production directed against phospholipids leading to an increased risk of arterial and venous thrombosis, recurrent pregnancy loss or other obstetric features. It can occur as a primary syndrome or in association with other disorders mainly with SLE (systemic lupus erythematosus). The antibodies can be detected by ELISA or coagulation tests. The latest advances in pathogenesis implicate oxidative stress and B-cell responses leading to new therapeutic approaches, including more focused utilization of existing therapies and the introduction of biological therapies. B cells have a critical role in these disorders and B-cell depletion or suppression improves disease in some patients. Studies also suggest a role for the innate immune system in disease pathogenesis, suggesting further future targets for biological therapies over the next few years. The consensus is once a patient has had a thrombosis, would be anticoagulated for life due to the high risk of further thrombosis. There is no sufficient evidence in most 'straight-forward' cases of APS that immunosuppression have any beneficial effect. The potential exception to this is in rare patients (about 1% of APS cases) with the catastrophic APS. Some recent papers have described the use of rituximab with beneficial effect in resistant cases. Statins and many other drugs also have antithrombotic and immunomodulatory effects could be used as adjunctive therapies but until now no studies are available.

Βιβλιογραφία

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4:295-306.
2. Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:1019-1027.
3. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood.* 2003; 101:1827-1832.
4. Urbanus RT, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, de Groot PG, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2009; 8:998-1005.
5. Gris JC, Bouvier S, Molinari N, et al. Comparative incidence of a first thrombotic event in purely obstetric antiphospholipid syndrome with pregnancy loss: the NOH-APS observational study. *Blood.* 2012; 119:2624-2632.
6. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood.* 2011; 118:4714-4718.
7. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood.* 2005; 105:1540-1545.
8. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005; 106:2340-2346.
9. Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B. β (2)-glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood.* 2011; 117:3453-3459.
10. Galli M, Reber G, de Moerloose P, de Groot PG. Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:399-401.
11. Rand JH, Wu XX, Andree HA, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome - a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med.* 1997; 337:154-160.
12. Girardi G, Berman J, Redecha P, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2003; 112:1644-1654.
13. Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, et al. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:2686-2694.
14. Charakida M, Besler C, Batuca JR, et al. Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome. *JAMA.* 2009; 302:1210-1217.
15. Ames PR, Nourooz-Zadeh J, Tommasino C, Alves J, Braccaccio V, Anggard EE. Oxidative stress in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 1998; 79:447-449.
16. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, et al. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J.* 1999; 18:6228-6239.
17. Ioannou Y, Zhang JY, Qi M, et al. Novel assays of thrombogenic pathogenicity for the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen β 2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum.* 2011; 63:2774-2782.
18. Ioannou Y, Zhang JY, Passam FH, et al. Naturally occurring free thiols within β 2-glycoprotein I in vivo: nitrosylation, redox modification by endothelial cells, and regulation of oxidative stress induced cell injury. *Blood.* 2010; 116:1961-1970.
19. Passam FH, Rahgozar S, Qi M, et al. Beta 2 glycoprotein I is a substrate of thiol oxidoreductases. *Blood.* 2010; 116:1995-1997.
20. Agar C, van Os GM, Morgelin M, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2010; 116:1336-1343.
21. Van Os GM, Meijers JC, Agar C, et al. Induction of anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies in mice by protein H of *Streptococcus pyogenes*. *J Thromb Haemost.* 2011; 9:2447-2456.
22. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol.* 2011; 7:330-339.
23. Agostinis C, Biffi S, Garrovo C, et al. In vivo distribution of β 2 glycoprotein I under various pathophysiologic conditions. *Blood.* 2011; 118:4231-4238.
24. Ma K, Simantov R, Zhang JC, Silverstein R, Hajjar KA, McCrae KR. High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem.* 2000; 275:15541-15548.
25. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood.* 2012; 119:e45-e56.
26. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327:524-526.
27. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2. *J Clin Invest.* 2011; 121:120-131.
28. Ferrara DE, Liu X, Espinola RG, et al. Inhibition of the thrombogenic and inflammatory properties of antiphospholipid antibodies by fluvastatin in an in vivo animal model. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:3272-3279.
29. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998; 97:1129-1135.
30. Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, Willard B, Zhang J, McCrae KR. A novel pathway for human endothelial cell

- activation by antiphospholipid/ anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Blood*. 2012; 119:884-893.
31. Romay-Penabad Z, Montiel-Manzano MG, Shilagard T, et al. Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;114:3074-3083.
 32. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, et al. Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q (10) treatment. *Blood*. 2012; 119:5859-5870.
 33. Lambrianides A, Carroll CJ, Pierangeli SS, et al. Effects of polyclonal IgG derived from patients with different clinical types of the antiphospholipid syndrome on monocyte signaling pathways. *J Immunol*. 2010; 184:6622-6628.
 34. Versteeg HH, Ruf W. Thiol pathways in the regulation of tissue factor prothrombotic activity. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18:343-348.
 35. Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest*. 2012; 122:2104-2113.
 36. Giannakopoulos B, Gao L, Qi M, et al. Factor XI is a substrate for oxidoreductases: enhanced activation of reduced FXI and its role in antiphospholipid syndrome thrombosis. *J Autoimmun*. 2012; 39:121-129.
 37. Müller F, Gailani D, Renne T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18:349-355.
 38. Urbanus RT, Pennings MT, Derksen RH, de Groot PG. Platelet activation by dimeric beta2-glycoprotein I requires signaling via both glycoprotein I α and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost*. 2008; 6:1405-1412.
 39. Sikara MP, Routsias JG, Samiotaki M, Panayotou G, Moutsopoulos HM, Vlachoyiannopoulos PG. β 2 Glycoprotein I (β 2GPI) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010; 115:713-723.
 40. Hashimoto Y, Kawamura M, Ichikawa K, et al. Anticardiolipin antibodies in NZW x BXSB F1 mice: a model of antiphospholipid syndrome. *J Immunol*. 1992; 149:1063-1068.
 41. Prinz N, Clemens N, Strand D, et al. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2011; 118:2322-2332.
 42. Broder A, Putterman C. Hydroxychloroquine use is associated with lower odds of persistently positive antiphospholipid antibodies and/or lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2013; 40:30-33.
 43. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:491-502.
 44. Fairfax K, Mackay IR, Mackay F. BAFF/BLyS inhibitors: a new prospect for treatment of systemic lupus erythematosus. *IUBMB Life*. 2012; 64:595-602.
 45. Kahn P, Ramanujam M, Bethunaickan R, et al. Prevention of murine antiphospholipid syndrome by BAFF blockade. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:2824-2834.
 46. Vargas-Hitos JA, Ateka-Barrutia O, Sangle S, Khamashta A. Efficacy and safety of long-term low molecular weight heparin in patients with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70:1652-1654.
 47. Girardi G, Redecha P, Salmon J. Heparin prevents antiphospholipid antibody induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med*. 2004; 10:1222-1226.
 48. Holtan SG, Knox SK, Tefferi A. Use of fondaparinux in a patient with antiphospholipid antibody syndrome and heparin-associated thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*. 2006; 4:1632-1634.
 49. Schmidt-Tanguy A, Voswinkel J, Henrion D, et al. Anti-thrombotic effects of hydroxychloroquine in primary antiphospholipid syndrome patients. *J Thromb Haemost*. 2013; 11:1927-1929.
 50. Danesh FR, Anel RL, Zeng L, Lomasney J, Sahai A, Kanwar YS. Immunomodulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp*. 2003; 51:139-148.
 51. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum*. 2001; 44:2870-2878.
 52. Erkan D, Willis R, Murthy VL, et al. A prospective open-label pilot study of fluvastatin on proinflammatory and prothrombotic biomarkers in antiphospholipid antibody positive patients. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73:1176-1180.
 53. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2009; 350:1851-1861.
 54. Berman H, Rodríguez-Pintó I, Cervera R, et al. Rituximab use in the catastrophic antiphospholipid syndrome: Descriptive analysis of the CAPS registry patients receiving rituximab. *Autoimmun Rev*. 2013; 12:1085-1090.
 55. Lonze BE, Singer AL, Montgomery RA. Eculizumab and renal transplantation in a patient with CAPS. *N Engl J Med*. 2010; 362:1744-1745.
 56. Shapira I, Andrade D, Allen SL, Salmon JE. Brief report: induction of sustained remission in recurrent catastrophic antiphospholipid syndrome via inhibition of terminal complement with eculizumab. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:2719-2723.
 57. Ritis K, Doumas M, Mastellos D, et al. A novel C5a receptor-tissue factor crosstalk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol*. 2006; 177:4794-4802.
 58. Holers VM, Girardi G, Mo L, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med*. 2002; 195:211-220.
 59. Redecha P, Tiley R, Tencati M, et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood*. 2007; 110:2423-2431.
 60. Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; 355:1233-1243.
 61. Lee CJ, De Biasio A, Beglova N. Mode of interaction between beta2GPI and lipoprotein receptors suggests mutually exclusive binding of beta2GPI to the receptors and anionic phospholipids. *Structure*. 2010; 18:366-376.
 62. Kolyada A, Lee CJ, De Biasio A, Beglova N. A novel dimeric inhibitor targeting beta2GPI in beta2GPI/antibody complexes implicated in antiphospholipid syndrome. *PLoS*

- One. 2010; 5:e15345.
63. Romay-Penabad Z, Aguilar-Valenzuela R, Urbanus RT, et al. Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in a murine model of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2011; 117:1408-14.
64. Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Harris EN. Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheum*. 2002; 46:545-552.
65. Ostertag MV, Liu X, Henderson V, Pierangeli SS. A peptide that mimics the Vth region of beta-2-glycoprotein I reverses antiphospholipid-mediated thrombosis in mice. *Lupus*. 2006; 15:358-365.
66. de la Torre YM, Pregnolato F, D'Amelio F, et al. Anti-phospholipid induced murine fetal loss: novel protective effect of a peptide targeting the beta2 glycoprotein I phospholipid-binding site. Implications for human fetal loss. *J Autoimmun*. 2012; 38:J209-L215.
67. Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM. Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:15542-15546.
68. Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum*. 2007; 56:280-290.
69. Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, et al. In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost*. 2009; 7:833-842.
70. Agmon-Levin N, Blank M, Zandman-Goddard G, et al. Vitamin D: an instrumental factor in the anti-phospholipid syndrome by inhibition of tissue factor expression. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70:145-150.
71. Andreoli L, Piantoni S, Dall'Ara F, Allegri F, Meroni PL, Tincani A. Vitamin D and antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012; 21:736-740.