

## Fiziopatologia dereglărilor hemostazei în sindromul

**Valeriu Cobeț**

---

## 1.4. FIZIOPATOLOGIA DEREGLĂRILOR HEMOSTAZEI ÎN SINDROMUL ANTI-FOSFOLIPIDIC

---

Tangența strânsă a sindromului antifosfolipidic (SAFL) cu sistemul hemostazei a fost trecută în evidență chiar în primele relatări (anii 80 ai sec XX) de descriere a entității SAFL drept un patern de trombofilie autoimună dobândită cu semne clinice de tromboză recurentă și afectare severă a gestației, până la preeclampsie, eclampsie și avort spontan. Experiența clinică acumulată demonstrează, că atât în SAFL primar, cât și în cel secundar, asociat cu alte maladii autoimune (e.g. lupusul sistemic eritematos, artrita reumatoidă), riscul trombozei arteriale și venoase și a repercusiunilor iminente crește semnificativ.

În plan fiziopatologic evoluția clinică a SAFL, în primul rând la capitolul tulburărilor hemostatice, este determinată de prezența unui grup eterogen de anticorpi antifosfolipidici (AAF), care recunosc drept antigen non-self proteine plasmatică capabile să fixeze fosfolipide anionice exprimate sau legate de celulele endoteliului vascular, plachete, monocite, trofoblastele fătului sau reprezintă faza solidă de contact în testul diagnostic de laborator imuno-enzimatic. Antigenele principale sunt  $\beta$ 2-glycoproteina I ( $\beta$ 2GPI), cunoscută ca și apolipoproteina H, și protrombina care leagă fosfatidilserina, iar anticorpul anti- $\beta$ 2GPI (anti- $\beta$ 2GPI reprezentat de IgG sau IgM) și cei către protrombină reprezintă 90% din activitatea autoimună și clinică a sindromului antifosfolipidic.

$\beta$ 2GPI este o proteină de un singur lanț, opulent glicolizată, formată din 5 segmente complementare numite domenii (I, II, III, IV și V) cu masa moleculară <50 kDa și conținut sanguin abundent (<0,2 mg/ml), care dispune de o aviditate înaltă privind fixarea fosfolipidelor încărcate negativ exprimate pe suprafața diferitor celulele, cum ar fi cardiolipina, fosfatidilserina și fosfatidilinozitolul.  $\beta$ 2GPI, spre deosebire de anti- $\beta$ 2GPI, este recunoscută per se drept un anticoagulant slab activ, iar prin fixarea sa de fosfolipide facilitează activarea proteinei C, componentă cheie a sistemului anticoagulant. Deși există un spectru larg de AAF (circa 30), numai 3 sunt angrenați în apanajul diagnostic al SAFL: anti- $\beta$ 2GPI, anticorpul anticardiolipinici (aCL) și lupusul anticoagulant (LA).

Denumirea sindromului antifosfolipidic a avut până în anul 1985 sintagma de sindrom anticardiolipinic, iar sintagma de LA își trage originea din anii 50 ai secolului XX, când a fost implementat testul de laborator de estimate in vitro a timpului parțial activat al tromboplastinei – timpul de formare a cheagului de fibrină la acțiunea fosfolipidelor fără factorul tisular (TF, Tissue Factor). Acest test, care consemnează utilizarea drept prototip al tromboplastinei (combinația din TF, fosfolipidele circulante și cationii de calciu) extractul fosfolipidic din creierul bovin (cefalina), a constatat prezența activității anticoagulante a sângelui majorată (>45 sec) la o parte din pacienți cu lupus sistemic eritematos, fapt ce a justificat denumirea acestui fenomen „lupus anticoagulant”, iar anticorpii care au neutralizat cefalina - LA. Antigenul LA este protrombina, iar testul timpului parțial activat al tromboplastinei este un test de estimare a coagulării intrinseci, deoarece estimează nu numai conținutul protrombinei din plasmă, dar și fezabilitatea factorilor de coagulare V, VII și X. Deși testul arată întârzierea formării trombusului fibrinic analogic stărilor de risc al hemoragiilor, fenomenul „lupus anticoagulant” se manifestă in vivo prin entități clinice opuse: tromboză, embolism și alterările trombotice ale gestației.

Prin acțiunea sa complexă asupra plachetelor, endoteliocitelor, monocitelor și componentelor sistemelor de coagulare, anticoagulare și fibrinoliză, anticorpi aFL periclitează nativitatea funcțională a hemostazei, înclinând balanța spre coagulare și tromboză, chiar dacă trombocitopenia și exonerarea parțială a trombinei din faza enzimatică a coagulării sunt prezente.

Remarcabil, că anticorpii antifosfolipidici (aFL) extrași și purificați din sângele pacienților cu SAFL pot interacționa cu mai multe proteine ale sistemului de hemostază expresate pe endoteliocite, monocite, plachete, fapt ce sugerează abilitatea unei clase de anticorpi să inducă tulburări de coagulare versatile, iar tromboza în patul arterial, venos sau microcirculator devine un mecanism patogenetic important de leziune a organelor vitale (placenta, rinichii, creierul, pulmonii etc.). De menționat, că în populația generală prezența aAFL se estimează la o rată de 20% la persoanele cu vârsta sub 50 de ani cu accident vascular cerebral. Rata aAFL poate crește până la 30% la femeile cu

preeclampsie. Conform studiului „Euro-Phospholipid” prezența lupusului eritematos a fost decelată la 37% din pacienții cu aAFL.

Consensul serologic diagnostic al SAFL din Sydney (2006) a consemnat și includerea testului pozitiv anti- $\beta$ 2GPI (IgG și IgM) la prezența AL și aCL, iar timpul dintre 2 determinări pozitive să fie extins până la 2 săptămâni. La ora actuală AL este recunoscut drept predictorul principal al trombozei, iar anti- $\beta$ 2GPI – markerul manifestărilor clinice inerente SAFL. Pacienții cu testul pozitiv la toate cele 3 clase de anticorpi (i.e. anti- $\beta$ 2GPI, AL și aCL) se impun prin cel mai înalt risc la tromboză și afectarea sarcinii. În acest context este de subliniat și însemnătatea prezenței comorbidităților cu valențe de facilitare a trombozei, cum ar fi hipertensiunea arterială, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, terapia de suplینire cu contraceptive orale. Studiul multicentric populațional RATIO (Risk of Arterial Thrombosis In relation to Oral contraceptives) a demonstrat rolul cheie al AL în tromboza arterială la femeile cu vârsta sub 50 de ani, iar aCL și anticorpii către protrombină nu au influențat riscul accidentelor vasculare (infarctul miocardic și stroke).

Tromboza din SAFL poate evolua în oricare segment vascular, comparativ cu localizarea specifică venoasă a trombusului caracteristică trombofiliei congenitale datorată deficienței de proteină C, fapt ce aduce la apel, că evenimentele trombotice difuze au la bază o interfață patogenetică multifactorială declanșată de acțiunea aFL (antifosfolipide), iar recurențele trombotice apar în pofida tratamentului anticoagulant în zonele vasculare cu injuriile primare. Tromboza arterială, ca o trăsătură clinică importantă a SAFL, se întâlnește mai rar comparativ cu tromboza venoasă și se impune prioritar prin afectarea circulației cerebrale și printr-un impact redus asupra arterelor coronariene și renale. Fiziopatologia evenimentelor trombotice și tromboembolice venoase în SAFL este complicată și intricată, și cuprinde un diapazon mare, de la trombocitopenie moderată până la infarcte ischemice și leziuni organice multiple (e.g. sindromul antifosfolipidic catastrofic), tromboza venelor profunde în cadrul acestuia fiind cea mai frecventă manifestare clinică. Totodată, titre înalte ale aFL se întâlnesc și la pacienții cu SAFL asimptomatici.

Fiziopatologia anticorpilor antifosfolipidici. Producția de anticorpi aFL în sindromul antifosfolipidic este rezultatul răspunsului eronat al sistemului imun, în primul rând celular central și periferic. Cercetările fundamentale au demonstrat, că imunizarea șoricilor cu cardiolipină și  $\beta$ 2GPI purificată nu a condus la formarea aAFL, iar administrarea  $\beta$ 2GPI structural mutilată a declanșat sinteza de anti- $\beta$ 2GPI. Dimpotrivă, administrarea cardiolipinei la șoricii transgenici cu incompetența sistemului imun a rezultat în sinteza anti-CL monoclonali (preponderent IgG) și activarea statusului protrombotic. Anti-CL monoclonali au reacționat activ cu fosfolipidele încărcate negativ (cardiolipina, fosfatidilserina și fosfotidilinozitolul), structurile plachetare și ADN, iar puterea de fixare a fost dependentă de titrul  $\beta$ 2GPI. Pe de altă parte, sinteza anti-CL s-a atestat la șoricii normali, dacă administrarea cardiolipinei s-a realizat pe fondalul premedicației cu estrogen, dar  $\beta$ 2GPI nu a influențat capacitatea anticorpilor de a reacționa cu cardiolipina.

Sub aceste aspecte s-a abordat rolul substratului genetic în contiguitate cu disfuncția sistemului major de histocompatibilitate II (MHC II) inerent celulelor profesionale prezentatoare de antigen, precum și a factorilor endogeni și exogeni, care pot transforma antigenul self în non-self și declanșa formarea anticorpilor AFL patologici.

Rolul genelor HLA-DR4 și HLA-DQw7 responsabile de expresia componentelor MCH II este relatat în contextul titrului înalt al AL la pacienții cu lupus, iar HLA-DR4 și HLA-DRw53 sunt genele cu expresia crescută la pacienții cu SAFL primar și titrul elevat de anti- $\beta$ 2GPI. Expresia redusă a genelor ce guvernează expresia componentelor C4a și C4b ale sistemului complementului este asociată de creșterea titrului anti-CL.

Polimorfismul genelor ce controlează expresia  $\beta$ 2GPI (mai frecvent substituția valinei la poziția 247 a lanțului de aminoacizi prin leucină) este de asemenea un mecanism de creștere a producției anti- $\beta$ 2GPI la pacienții cu SAFL, evidentă acompaniată de creșterea notabilă a riscului trombozei arteriale și venoase. Titrele înalte ale anti- $\beta$ 2GPI asociate la prezența LA cresc riscul dezvoltării trombozei venelor profunde de 5 ori.

---

Mutațiile genei ce controlează expresia protrombinei de asemenea reprezintă o cauză de formare a anticorpilor către protrombină, iar limitarea activării proteinei C de către trombină, ca rezultat final, va susține statusul protrombotic activat.

Polimorfismul genelor ce controlează expresia trombomodulinei, anexinei V, PAI-1 (inhibitorul activatorului de plasmină), glicoproteinelor plachetare GPIa/GPIIa și GPIIb/GPIIIa este coroborat drept o precondiție a riscului trombotic crescut la pacienții cu SAF.

Din grupul factorilor endogeni care pot influența formarea aAF apoptoza se remarcă prin cel mai consistent apanaj de dovezi. Apoptoza este un fenomen natural, genetic programat, de control al calității și cantității populațiilor celulare, care prin formarea corpurilor apoptotici digerați ulterior de către macrofage, exclude expunerea structurilor membranare, plasmatică și nucleare mutilate sistemului imun. În condiții, când desfășurarea în timp a apoptozei este compromisă (în primul rând clearance-ul corpurilor apoptotici de către macrofage), apare riscul formării autoanticorpilor. Fosfatidilserina, o fosfolipidă cu sarcină negativă, este expresată pe partea interioară a membranei, iar în timpul apoptozei se expresează la exterior pentru a fi recunoscută de către macrofage. Când procesul de recunoaștere este periclitat și întârziat, atunci fosfatidilserina formează prin intermediul receptorului Ro60 un complex cu  $\beta$ 2GPI, contra căruia se formează anti- $\beta$ 2GPI. În studii experimentale s-a demonstrat că imunizarea șoricicilor cu corpi apoptotici asociați de  $\beta$ 2GPI conduce la formarea anticorpilor aFL.

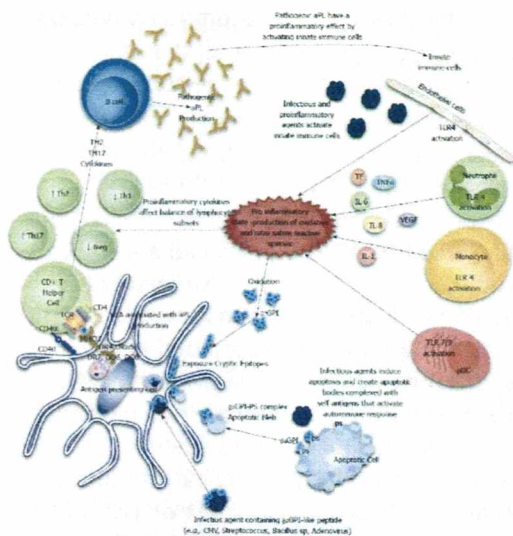
Privind influențele exogene, agenții infecțioși, în primul rând virali, se anunță drept factorii principali capabili să faciliteze formarea lor. Titre înalte, în special de anti-CL, sunt apreciate la pacienții infectați cu HIV, virusul hepatitei B și C, herpes (Cyto Megalo Virus and Varicella Zoster Virus), parvovirus B19. Mecanismul ostial prin care infecția virală conduce la producția autoanticorpilor impune oxidarea  $\beta$ 2GPI de către radicalii liberi de oxigen, eliberarea cărora în exces este declanșată de citokinele proinflamatoare eliberate sub acțiunea agentului infecțios, proces mediat de receptorii Toll-like 4, 7 și 9. În circulația sanguină  $\beta$ 2GPI se întâlnește în opulență și în forma redusă grație conținutului mare de reziduuri de cisteină și grupuri tiolice, care asigură protecția antioxidantă, iar tiolii liberi participă în interacțiunea  $\beta$ 2GPI cu

plachetele și endoteliocitele vasculare. În stresul oxidativ accentuat oxidarea  $\beta$ 2GPI conferă un patern imunologic non-self care este procesat de celulele dendritice pentru prezentarea de către MHCII a antigenului  $\beta$ 2GPI limfocitelor T naive, fapt ce rezultă în formarea populațiilor de Th2 și Th17 (prin costimulare cu sistemul CD40/CD40L), care vor susține formarea anti- $\beta$ 2GPI de către limfocitele B. Acest fenomen este augmentat în dereglările imune manifestate prin reducerea expresiei limfocitelor T reglatoare (CD3). Astfel, la pacienții cu SAFL titrul anticorpilor aFL se corelează cu reducerea raportului Th1/Th2 și a populației CD3, precum și cu elevarea Th17 și a nivelului circulant al  $\beta$ 2GPI oxidate.

Acești markeri imuni împreună cu titrul anticorpi aFL au valoare predictivă notabilă privind riscul trombocitopeniei și trombozei la pacienții cu SAFL primar sau secundar. Trombocitopenia ( $<100-150 \times 10^9/L$ ) estimată în SAFL primar la o rată medie de 20% și SAFL secundar în peste 40% cazuri, este repercusiunea acțiunii directe a aAF asupra plachetelor, fapt ce rezultă în agregarea plachetară și tromboză. Mecanismul autoimun al citopeniei este mai degrabă caracteristic pentru anemia hemolitică (prezența anticorpilor aFL fiind constatată la o cotă de până la 72%) și se impune prin fixarea directă a aCL de suprafața hematiilor (patern de opsonizare), deși receptorul eritocitar nu este identificat.

Formarea anti- $\beta$ 2GPI în SAFL secundar poate avea la bază și fenomenul de mimicrie celulară, întrucât mai mulți agenți infecțioși (adenovirusul, streptococul, Cyto Megalo Virusul) eliberează o proteină similară structurii  $\beta$ 2GPI ( $\beta$ 2GPI like peptide), dar cu proprietăți antigenice non-self, declanșând, astfel, sinteza anti- $\beta$ 2GPI. Autoanticorpii reacționează slab cu  $\beta$ 2GPI circulantă din cauza mascării epitopului antigenic I, dar fixează activ  $\beta$ 2GPI legată de fosfolipidele expresate pe endoteliocite, plachete, monocite, etc., periclitând funcționalitatea normală a sistemelor hemostazei grație activării și promovării statusului protrombotic.

Așadar, într-o schemă sinoptică se pot sumariza mecanismele principale de formare a aAF în sindromul antifosfolipidic (fig.1):



**Figura 1.** Aspecte fiziopatologice privind formarea anticorpilor aFL în sindromul fosfolipidic (Willis R, Gonzalez EB. Pathogenetic mechanisms of antiphospholipid antibody production in antiphospholipid syndrome. World J Rheumatol. 2015; 5(2): 59-68. doi:10.5499/wjr.v5.i2.59)

Mutațiile genelor care controlează expresia MHC II (DR4, DR7, DR8, DQ6 etc.).

Polimorfismul genelor responsabile de expresia diferitor factori ai sistemelor complementului și hemostazei.

Apoptoza periclitată.

Impactul infecțios (imprimis virotic) care mărește oxidarea β2GPI circulante, facilitând astfel procesarea eronată de către celulele dendritice, precum și mimicria celulară.

Patogenia trombozei declanșată de anticorpii antifosfolipidici în sindromul antifosfolipidic

Declanșarea trombozei sub acțiunea anticorpilor aFL are la bază o interfață patogenetică care cuprinde mai multe fenomene inerente sistemelor hemostazei, care într-un careu de legături reciproce converg spre instalarea unui status procoagulant sustenabil:



1. Activarea plachetelor, endoteliocitelor și monocitelor.
2. Inhibiția sistemului anticoagulant.
3. Activarea cascadei coagulante.
4. Inhibiția sistemului fibrinolitic.
5. Activarea sistemului complementului.
6. Activarea răspunsului inflamator.

*Mecanismul trombotic mediat de plachete.* Plachetele au un rol central în declanșarea trombozei, în special a trombozei arteriale, și la pacienții cu semnele clinice inerente și cu testul pozitiv la aFL se constată 2 particularități cardinale: activarea plachetară asociată de creșterea expresiei receptorilor glicoproteici și trombocitopenia. Plachetele, responsabile de hemostaza primară sau microcirculatorie, sunt vizate și drept o fuzetă de angrenare a hemostazei secundare, responsabile de formarea cheagului fibrinic

Impactul anticorpilor aFL asupra hemostazei primare este determinat în fond de acțiunea anti- $\beta$ 2GPI. Molecula de  $\beta$ 2GPI vehiculată cu jetul sanguin are o formă circulară, în care domeniul I (situs-ul de legare cu anti- $\beta$ 2GPI) este ascuns de către domeniul V și, astfel, capacitatea anti- $\beta$ 2GPI de fixare a  $\beta$ 2GPI circulante este foarte joasă. Când  $\beta$ 2GPI se fixează cu domeniul V de plachete prin intermediul diferitor receptori ApoER2 (Apolipoprotein E Receptor 2), GPIba (Glycoprotein I ba), LRP2 (low density Lipoprotein Receptor related Protein 8) domeniul I se deschide pentru fixarea cu anti- $\beta$ 2GPI, care rezultă în dimerizarea moleculei de  $\beta$ 2GPI. Acest proces este mediat de factorul plachetar 4 (PF4), un tetramer care facilitează fixarea a 2 molecule de  $\beta$ 2GPI, iar anti- $\beta$ 2GPI interacționează cu complexul format. Important de menționat, că fixarea monomerului  $\beta$ 2GPI de receptorii plachetelor nu conduce la activarea acestora, proces care are loc doar în cazul prezenței dimerului de  $\beta$ 2GPI în cadrul acțiunii anti- $\beta$ 2GPI. Mai mult decât atât, există dovezi potrivit cărora anti- $\beta$ 2GPI (predilect IgM), pot fixa direct PF4 prin intermediul fragmentul Fab. Anti- $\beta$ 2GPI pot interacționa și cu complexul  $\beta$ 2GPI-fosfatidilserina, fosfolipid care se expresează pe suprafața trombocitelor în diferite condiții de ultraj, cum ar fi în cazul acțiunii citokinelor proinflamatoare, radicalilor liberi de oxigen și azot, lipopolizaharidelor bacteriene, endo- și exotoxinelor, etc., având drept deznodământ firesc activarea plachetelor.

Activarea plachetelor de complexul  $\beta 2$ GPI-anti- $\beta 2$ GPI rezultă în o serie de evenimente cu conotație protrombotică, grupate în 2 eșaloane: degranularea plachetară și expresia receptorilor de adeziune și agregare trombocitară. În plachetele activate se constată fosforilarea kinasei p38MAP (Mitogen Activated Protein) și eliberarea din granulele dense și granulele alpha ale conținutului plasmatic anuclear a moleculelor de ATP și ADP și, respectiv, a tromboxanului A2 (TxA2), serotoninei, ADP, calciului, PF4, factorului von Willebrand, micro-ARN, etc.

TxA2, un eicosanoid derivat de acidul arahidonic, are T/2 de metabolizare <30 sec și este convertit în TxB2, care în asociere cu capacitatea sa de stimulare a agregării plachetare are și un efect bronhoconstrictor durabil. Efectul TxA2 de stimulare a agregării plachetare este potențat prin efectul vasoconstrictor, ambele fiind contracarate de către prostaciclina (PGI2). Prin acțiunea sa paracrină TxA2 activează receptorii specifici (cuplați cu proteina G) de pe suprafața plachetelor adiacente conducând la extinderea procesului trombotic, datorită modificării formei trombocitelor, activării fosfolipazei A2 și mediată preponderent prin receptorii IIb/IIIa. Activarea fosfolipazei C (izoforma beta) de către TxA2 conduce la hidroliza inozitolfosfatului fosfat cu formarea diacilglicerolului și inozitolului trifosfat, precum și la activarea proteinkinazei C și creșterea calciului citozolic, care asigură fenomenul de degranulare a plachetelor. Totodată, calciul citozolic participă în procesul de schimbare a formei plachetelor, considerat unul din primele evenimente ale activării plăcuțelor sanguine de către TxA2. Schimbarea formei are la bază reorganizarea citoscheletonului prin fosforilarea lanțului subțire de miozină, controlată de kinaza dependentă de complexul calciu-calmodulină, în cadrul căreia se formează noi filamente de actină și o rețea submembranară densă de proteine contractile, propice extinderii filopodiilor și centralizării granulelor plachetare alpha, care descarcă factori de creștere, factori de coagulare și factorul von Willebrand. Trecerea plachetelor din disc în sferă facilitează agregarea și, totodată, adeziunea lor la suprafața endoteliului alterat, care expune adlumsal fibrele de collagen și alte componente ale matricei extracelulare. Activarea plachetară prin intermediul TxA2 are un rol deosebit în tromboza arterială declanșată de acticorpii aFL în primul rând în circulația cerebrală, efect potențat de acțiunea vasoconstrictoare a

TxA<sub>2</sub>. Vasoconstricția arterială (în primul rând la nivelul arteriolelor dotate cu o medie musculară bine dezvoltată), mediată de TxA<sub>2</sub> temperează fluxul sanguin creând, astfel, o condiție necesară adeziunii plachetelor la endoteliul alterat.

Un aport considerabil în patogenia trombozei îl aduce factorul von Willebrand, nivelul plasmatic al căruia elevează notabil la pacienții cu SAFL și se corelează autentic cu severitatea statusului protrombotic și procoagulant. Acest factor este activ sintetizat de celulele endoteliale vasculare (mai puțin de megacariocite) și cantonat în granulele alpha plachetare. Remarcabil, că  $\beta$ 2GPI circulantă neutralizează factorul von Willebrand și prin această acțiune își revendică efectul anticoagulant nativ (prezența anti- $\beta$ 2GPI nu anihilează acest efect și nu influențează abilitatea adezivă a glicoproteină față de factorul de coagulare VIII în vederea inhibării metabolizării lui). De asemenea, este importantă capacitatea factorului von Willebrand de a se lega de colagenul matricei extracelulare (e.g. colagenul de tip V), promovând adeziunea plachetară, precum și de receptorii GPIb și GPIIb/GPIIIa, facilitând procesul de agregare plachetară.

Expunerea adluminală a colagenului subendotelial la factorii circulanți este precedată de leziunile endoteliocitelor, care promovează eliberarea din granulele Weibel-Palade a factorului von Willebrand. Ca și TxA<sub>2</sub>, factorul von Willebrand are o semnificație mai concludentă în geneza trombozei arteriale vs tromboza venoasă, dat fiind comportamentul structural lui diferit în jetul sanguin cu stres hemodinamic mare și mic. În circuitul venos cu o valoare joasă a stresului hemodinamic și un curent sanguin lin factorul von Willebrand își păstrează preponderent configurația unei spirale încâlcite în cadrul căreia multe site-suri active menite să fixeze colagenul subendotelial sunt ascunse.

În circuitul arterial cu o valoare superioară a stresului hemodinamic și un curent sanguin mai turbulent, factorul von Willebrand, dimpotrivă, se împune structural printr-o spirală descolăcită și întinsă, fapt ce rezultă în creșterea numărului de site-suri active abile să fixeze colagenul subendotelial. Astfel, mai multe plachete vor adera la factorul von Willebrand din zonele endoteliale lezate prin intermediul receptorilor de adeziune (GPIb și GPIIb/IIIa), expesați pe suprafața trombocitelor (redistribuiți în plutele lipidice și concentrate la capetele

lipicioase ale filopodiei). Prin fixarea factorului von Willebrand de receptorii GPIb se poate declanșa activarea intrinsecă a plachetelor, care vor expresa pe suprafața lor factorul procoagulant Xa și trombina. Acest fenomen este o manetă a interfeței de conexiune a hemostazei trombocitare și a cascadei coagulante. Evident, că în precondiționările patologice, manifestate apriori prin injurii endoteliale (ateroscleroza, dislipidemia, hiperhomocisteinemia, hiperglicemia, hipertensiunea arterială, etc.), adeziunea și agregarea plachetară declanșate de anticorpul aFL vor fi potențate.

La pacienții cu SAFL care au testul pozitiv la anticorpul aFL nivelul circulant al trombocitelor activate este elevat, iar fixarea factorului von Willebrand de receptorii acestora, GPIIb/IIIa, va asigura o adeziune ireversibilă a plachetelor la structurile colagenului subendotelial. Mai mult decât atât, factorul von Willebrand susține cascada procoagulantă și prin mecanismul dependent de factorul VIII, care se reduce la faptul că în interacțiunea lor non-covalentă acesta din urmă este protejat de proteoliza intravasculară, iar T/2 lui de metabolizare crește de circa 5 ori.

Cercetările experimentale au arătat, că administrarea anticorpilor monoclonali către factorul von Willebrand sau receptorilor GPIIb/IIIa a redus semnificativ tromboza la șoricelii expuși acțiunii anticorpului aFL, precum și expresia CD63 (o proteină membranară importantă în procesul interacțiunii dinamice a celulelor), determinând, astfel, diminuarea complexelor plachete-leucocite. Pe acest fondal s-a urmărit și reducerea expresiei receptorului plachetar GPIba, o subunitate a receptorului GPIb, capabilă să fixeze mai mulți liganzi circulanți, inclusiv  $\beta$ 2GPI și, deci, complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI. Activarea receptorului plachetar GPIba, care influențează expresia CD63 și, respectiv, activitatea adeziv-agregantă a trombocitelor nu are loc la acțiunea monomerului  $\beta$ 2GPI și e posibilă numai în cazul dimerizării glicoproteinei, deci la acțiunea complexului  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI.

Important de menționat, că stabilizarea dimerilor  $\beta$ 2GPI este susținută de trombospondina-1 (TSP-1) și factorul plachetar 4 (tetramer polipeptid format din 70 de aminoacizi) încărcat pozitiv, stocat în granulele alpha și care poate lega cantități mari de heparină, micșorând, astfel, capacitatea sistemului anticoagulant. Dacă împotriva complexului PF4/heparină se vor forma autoanticorpi, atunci se va

instala trombocitopenia. Complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI/PF4 fixat de plachete va activa fosforilarea pMAPK-38, promovând mecanismul cheie al trombofiliei dependente de anticorpii aFL: degranularea plachetelor și eliberarea mediatorilor protrombotici și procoagulanți, în primul rând TxA2 și factorul von Willebrand.

Plachetele activate sub acțiunea complexului  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI/PF4 vor expresa TSP-1 și vor elibera în fluxul sanguin forma solubilă de trombospondină, glicoproteină de matrice implicată nu numai în susținerea statusului protrombotic grație inhibiției plasminei, dar și în potențarea răspunsului inflamator mediat de receptorii CD36 exprasați de macrofage și endoteliocite. Activarea receptorilor endoteliali CD36 de către TCP-1 conduce la eliberarea factorului von Willebrand și la expresia moleculelor de adeziune intercelulară. Mecanismul trombotic mediat de endoteliocite. Endoteliul vascular are un rol deosebit în reglarea hemostazei și un aport dihotomic în dependență de integritatea lui structural-funcțională. În condiții fiziologice celulele endoteliale dispun de o activitate antitrombotică, întrucât expresează și eliberează factori anticoagulanți, cum ar fi trombomodulina (cu excepția microcirculației cerebrale), inhibitorul factorului tisular (TFI), cofactorul antitrombinei III (heparin-like glycosaminoglycans), receptori către antitrombina III și către proteina C, oxidul nitric, prostaciclina, etc., iar în injurii, dimpotrivă, se evidențiază activitatea protrombotică și procoagulantă.

Cercetările in vitro au demonstrat, că anti- $\beta$ 2GPI fixează celulele endoteliale în prezența  $\beta$ 2GPI care are domeniul I descoperit, iar drept urmare se instalează un fenotip procoagulant și proinflamator al endoteliocitelor, manifestările de bază fiind creșterea expresiei TF, inhibitorului activatorului de plasminogen, ICAM-1 (intercellular adhesive molecule 1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), selectinelor E, P și IL-6. Administrarea aAF la șoriciei transgenici cu expresia redusă a moleculelor de adeziune și citokinelor proinflamatoare se impune printr-un status protrombotic mult mai atenuat, comparativ cu animalele sălbatice. La pacienții cu SAF Nivelele circulante ale ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, selectinelor E, P și IL-6 sunt elevate, fapt asociat de creșterea conținutului sanguin al microparticulelor de endoteliocite, ca markeri ai leziunii endoteliale, susținute în parte de răspunsul

inflamator accentuat și infiltrarea peretelui vascular cu monocite și macrofage.

Interacțiunea  $\beta$ 2GPI cu celulele endoteliale se realizează prin fixarea domeniului V a glicoproteinei de diferiți receptori expresați constitutiv sau inductibil pe endoteliocit, cum ar fi anexina 2, structurile anionice ale heparan sulfatului, Toll-like-R4 și ApoER2. Remarcabil, că concentrații mari de  $\beta$ 2GPI se decelează în zonele subendoteliale ale plăcilor ateromatoase la pacienții cu lupus și SAF secundar, fapt ce se asociază cu creșterea expresiei Toll-like-R4 și a activității protrombotice și procoagulante a endoteliului vascular.

Anexinele reprezintă o familie largă (peste 100) de proteine membranare calciu-dependente, care fixează fosfolipide și servesc drept receptori pentru diferiți liganzi. Anexina 2 de pe suprafața endoteliocitului și monocitului servește drept receptor pentru plasminogen și activatorul plasminogenului. Anexina 2 fixează monomerul de  $\beta$ 2GPI fără activarea celulei endoteliale, aceasta din urmă având loc la fixarea complexului  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI, fapt ce rezultă în instalarea fenotipului procoagulant. La șoriceii cu gena anexinei 2 knockout nu se documentează semne de tromboză la administrarea aAF, iar expresia factorului tisular și a moleculelor de adeziune este subiacentă paternului animalelor de referință. Activarea genei ce controlează expresia anexinei 2, dimpotrivă, s-a manifestat prin dezvoltarea unui status procoagulant concludent, iar Nivelele circulante ale TF, ICAM-1, VCAM-1, IL-6, selectinelor E și P sunt superioare valorilor de referință. Cercetări recente au adus la apel evidente, care indică rolul receptorilor Toll-like în promovarea acțiunii procoagulante a anti- $\beta$ 2GPI asupra endoteliocitului mediată de anexina 2. Blocarea receptorilor Toll-like 2 și Toll-like 4 expesați pe endoteliocit a modificat pozitiv Nivelele circulante ale plasminogenului, activatorului de plasmină, a factorului tisular, precum și a moleculelor de adeziune la acțiunea anti- $\beta$ 2GPI, fapt ce a consolidat opinia, că receptorii Toll-like pot funcționa ca co-receptori pentru anexina 2. Inflamația cronică sau sistemică asociată de accentuarea aterogenității și creșterea expresiei receptorilor Toll-like pe suprafața mai multor celule, incluzând endoteliocitele și monocitele, potențează efectul procoagulant și protrombotic al aAFL mediat prin anexina 2.

Tratamentul cu statine, care ameliorează funcționalitatea endoteliului vascular s-a impus la pacienții cu SAF prin reducerea mediatorilor procoagulanți și protrombotici și drept consecință a severității procesului de tromboză arterială și venoasă. De menționat în acest context, că beneficiile menționate s-au asociat cu micșorarea expresiei factorului nuclear kappaB (NF-kB), p38MAPK și a factorului tisular. Remarcabil, că in vitro expresia FT indusă de anti-β2GPI în cultură de endoteliocite sau monocite s-a atestat a fi dependentă de prezența vitaminei D3, care a contribuit și micșorarea numărului de endoteliocite activate și la atenuarea apoptozei celulare. Deprecierea expresiei fosfatidilserinei a atenuat efectele anti-β2GPI asupra endoteliocitului, aceasta fiind inteligibil urmată de restabilirea adecvată a raportului TF/TFI. Astfel, activarea statusului procoagulant inerentă acțiunii anti-β2GPI este strâns legată de factorul tisular, expresia căruia pe endoteliocite crește odată cu stimularea anexinei 2.

De consemnat faptul că la pacienții cu SAFL sunt detectați și anticorpi specifici către anexina 2, iar interacțiune lor se impune analogic acțiunii complexului β2GPI/anti-β2GPI prin creșterea expresiei factorului tisular, moleculelor de adeziune, citokinelor proinflamatoare și a riscului evenimentelor trombotice. Expresia endotelială a TF se anunță și la activarea receptorului Toll-like 4 de către lipopolizaharidele bacteriene în asociere cu expresia NF-kB, fosforilarea p38MAPK și creșterea Nivelelor circulante ale citokinelor proinflamatoare. În acest context este coroborată ipoteza, că rolul factorului infecțios în promovarea simptomelor clinice ale SAFL și în particular a trombozei susținute prin TF are la bază activarea receptorului Toll-like, estimat drept cofactor al anexinei 2, receptorul complexului β2GPI/anti-β2GPI. Drept confirmare poate fi adusă dovada augmentării in vivo a trombozei și a creșterii expresiei TF la acțiunea complexului β2GPI/anti-β2GPI în prezența lipolizaharidelor bacteriene. Interesant, că un efect similar, dar mai puțin accentuat, poate fi urmărit la blocarea anexinei 2, fapt ce indică asupra fezabilității paternului endotelial „multi-receptor” privind acțiunea protrombotică a AAF, asociată de creșterea TF și micșorarea trombomodulinei, iar activarea NF-kB și fosforilarea p38MAPK sunt vizate drept semnalizări intracelulare comune.

Factorul tisular sau factorul III al sistemului de coagulare inițiază coagularea extrinsecă prin activarea factorilor VII și X. Totodată, TF este acceptat prin acțiunea sa autocrină și paracrină drept un mecanism de activare a expresiei citokinelor proinflamatoare, care la rândul lor vor precondiționa și susține procesul de tromboză. Astfel, în paradigma TF-inflamație-tromboză complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI are rol de declanșare și potențare a statusului protrombotic. În plus, aAF stimulează sistemul complementului pe calea clasică, iar componenta C5a crește expresia factorului tisular. Componentele C3a și C5a ale complementului sunt implicate în alterările placentei iminente SAFL prin periclitarea echilibrului dintre PGF (factorul de creștere a placentei) și VEGF (factorul endotelial de creștere) și imbalanța receptorilor specifici. Factorul tisular crește producția de trombină, care de asemenea este un activator al sistemului complementului pe cale alternativă. Blocarea TF prin anticorpii monoclonali specifici previne complicațiile gestației la femeile cu testul pozitiv la aAFL, iar statinele prin efectul pleiotrop antiinflamator și de ameliorare a endoteliului vascular au efect benefic privind restricțiile creșterii fetale.

Acțiunea aAFL asupra endoteliului vascular se impune prin diminuarea expresiei constitutive a trombomodulinei (TM), care în sistemul hemostazei are un efect anticoagulant deosebit, întrucât complexul TM-trombină activează proteina C (PC), o proteină dependentă de vitamina K care circulă în formă de zimogen (masa moleculară 62 kD), capabilă să inactiveze factorii sistemului de coagulare FVa, FVIIa și FVIIIa și, respectiv, trombokinaza. Activitatea anticoagulantă a PC este potențată de proteina S (PS) în forma circulantă liberă, dar nu cea legată de componenta C4b a sistemului complementului și care se consideră drept un cofactor al proteinei C. Formarea complexului PC-PS este dependentă de funcționalitatea receptorului PC expresat pe endoteliocit sau necesită o interfață fosfolipidă de catalizare. Rezultatele acumulate denotă, că activitatea anticoagulantă a proteinei C crește până la 20 de ori când aceasta se fixează de receptorul specific endotelial. Astfel, oricare injurie endotelială asociată de „expresia în jos” a receptorului PC periclitează acest mecanism de atenuare a activității cascadei coagulante.

Complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI inhibă expresia receptorului proteinei C de pe endoteliu, precum și anihilează fixarea PC de fosfolipidul



anion, mediată de anexina 5, rezultând în creșterea activității coagulante. Anexina 5 este un receptor expresat pe fosfolipidele anione ale diferitor celule, cu afinitate față de  $\beta$ 2GPI. Activarea anexinei 5 de  $\beta$ 2GPI facilitează formarea complexului PC-PS (un mecanism de promovare a efectului anticoagulant al  $\beta$ 2GPI), pe când activarea ei de complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI se impune prin efect opus și rezultă prin urmare în diminuarea capacității sistemului anticoagulant și ultraj către dezvoltarea normală a sarcinii.

Efectele naturale ale proteinei C depășesc perimetrul sistemului de hemostază. Este notabilă în acest context acțiunea PC activate de a atenua inflamația sistemică, plauzibil prin inhibiția expresiei moleculelor de adeziune, chemokinelor și a citokinelor proinflamatoare. Administrarea proteinei C activate la pacienții cu sepsis sever a redus rata mortalității. În cultură de celule PC a demonstrat efect de control al proliferării celulare și supraviețuire în diferite condiții stresogene.

Nivelul plasmatic al trombomodulinei are o tendință de elevare la pacienții cu SAF, în deosebi forma secundară (e.g. lupusul sistemic eritematos) și este un predictor al injuriei endoteliale, urmată de eliberarea glicoproteinei în sânge (trombomodulina solubilă). Creșterea trombomodulinei solubile se constată în diferite stări patologice asociate de leziunile endotelului vascular, nivelul căreia se corelează direct cu severitatea acestora. În SAFL trombomodulina este scoasă din exercițiul anticoagulant, repercusiunea principală fiind nu atât inactivarea unor cantități de trombină, cât deprecierea funcționalității proteinei C. Fixarea trombinei de trombomodulină are, în afară de activarea proteinei C, consecințe ambigue. Pe o parte ea pierde capacitatea de a activa plachetele și a transforma fibrinogenul în fibrină. Pe de altă parte, trombina legată de trombomodulină activează carboxipeptidaza B, un inhibitor al fibrinolizei, TAFI (thrombin inductible fibrinolysis inhibitor). Carboxipeptidaza B clivează reziduurile carboxiterminale de lizină din lanțul de fibrină, prin ce se anihilează procesul de fibrinoliză, deoarece devine imposibilă fixarea plasminei și a activatorului plasminei de fibrină. Conceptual TAFI este apreciat drept un stabilizator natural al cheagului fibrinic.

În apanajul fiziopatologiei dereglărilor hemostazei la pacienții cu SAFL trombina are valențe patogenetice distincte. Datorită formării

anticorpilor către protrombină, valorile cantitative ale trombinei sunt reduse, iar testul *in vitro* stabilește o creștere a timpului de formare a trombusului fibrinic. Totuși, reducerea trombinei este asociată de activarea statusului procoagulant și protrombotic, în deosebi, când anticorpii către trombină asociază molecule de fosfatidilserină, titrul cărora se corelează cu severitatea trombozei venelor profunde și cu riscul de infarct miocardic acut la persoanele tinere. Explicația acestui fenomen, chiar la noima proprietății trombinei de activare a plachetelor, se bazează pe faptul că declinul cantitativ al trombinei compromise concludent capacitatea complexului trombomodulină-trombină de a activa proteina C, elementul cheie al sistemului anticoagulant. Prin urmare se poate de admis, că disfuncția sistemului anticoagulant are în cadrul trombozei inerente SAF un rol patogenetic lider.

Trombina este dovedită a fi cel mai puternic agonist solubil al plachetelor, activarea acestora fiind mediată prin receptori cuplați de proteina G care fac parte din familia de receptori activați de protează. Stimularea lor de trombină (proprietățile ei biochimice sunt proprii proteazelor) conduce la creșterea concentrației calciului citozolic și eliberarea de ADP (adenozindifosfat), care va activa receptorii P2Y1 și, în deosebi, P2Y12 (receptori transmembranari din 342 de aminoacizi cuplat cu proteina G), implicați în menținerea statusului de „plachetă activată”, ce se impune prin eliberarea TxA2 și a factorului von Willebrand.

Astfel, se formează o interfață paracrină reverberantă, care rezultă în creșterea câmpului de plachete activate, chiar la concentrații mici de trombină, iar adenozinfosfatul prin inhibiția adenilatciclazei și micșorarea AMPc (adenozinmonofosfat ciclic) va susține potențialul agregant al trombocitelor. Anume agregarea masivă a plachetelor se consideră a fi cauza principală a trombocitopeniei în SAF, care condiționează *in vitro* majorarea timpului de sângerare (indicele hemostazei primare sau microcirculatorii). Mai mult, receptorul P2Y12 mediază activarea PI3K (fosfatinozitol kinaza 3), prin ce se produce activarea receptorului de fibrinogen care facilitează secreția plachetară de alți factori activi ai hemostazei și sustenabilitatea agregatelor trombocitare.

Trombina și factorul von Willebrand eliberat la activarea receptorului P2Y12, care va activa receptorii colagenului expus adluminat, sunt

factorii responsabili de formarea familiei de „plachete acoperite”, capabile să cantoneze proteine procoagulante și să expreseze fosfatidilserina, fosfolipidul ce interacționează cu  $\beta$ 2GPI. Totodată, factorul tisular expresat de endoteliul alterat sau la acțiunea complexului  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI stimulează expresia selectinei P pe suprafața plachetelor, care va interacționa atât cu selectina E de pe endoteliocit, cât și cu selectina L de pe suprafața leucocitelor circulante, rezultând în formarea agregatelor trombo-leucocitare. Legătura de gen receptor-ligand între selectina P și selectina L conduce la activarea NADH-oxidazei de pe suprafața plachetelor și, respectiv, la formarea superoxidului anion ( $O_2^-$ ), un radical liber de oxigen cu acțiune protrombotică și proinflamatoare notabilă. În condițiile stresului oxidativ activat este înlesnită activarea plachetară de către filamina A, o proteină citoscheletică ce leagă filamentele de actină importante în degranularea și schimbarea formei plachetei, precum și cu receptorul GPIIb/IIIa, care facilitează activarea integrinei  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (receptor de adeziune), implicat în fixarea fibrinogenului și activarea neutrofilelor prin intermediul receptorilor de adeziune leucocitară Mac-1.

Receptorii P2Y<sub>12</sub> și  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 sunt implicați în declanșarea și promovarea trombozei intra-stent după angioplastia arterelor periferice și cerebrale. La pacienții cu SAF incidența restenozei intra-stent este de 3 ori mai mare, fapt determinat și de reducerea expresiei TFI și a receptorului endotelial al proteinei C. Administrarea antagoniștilor P2Y<sub>12</sub> are nu numai efect antitrombotic, dar și antiinflamator, antiproliferativ, antiaterogen, întrucât acest receptor este expresat și pe celulele imune, miocitele netede vasculare și chiar pe celulele microgliei. Activarea plachetelor are per se un efect proinflamator manifest, datorită expresiei receptorului CD40 și elevării nivelului circulant al ligandului solubil CD40 (sCD40L), acesta fiind estimat drept unul din mecanismele accentuării inflamației sistemice la pacienții cu sindromul antifosfolipidic.

*Mecanismul trombotic mediat de monocite.* Rolul monocitelor în evoluția manifestărilor trombotice ale sindromului antifosfolipidic este vizat prin prisma a 2 evenimente cruciale: (1) expresia factorului tisular și (2) eliberarea exagerată a citokinelor proinflamatoare. Cercetările in vitro au arătat că ambele sunt în fond declanșate de activarea mononuclearelor de către complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI prin

intermediul receptorilor cu afinitate față de  $\beta$ 2GPI, reprezentați de TLR2, TLR4, ApoER2 și anexina 2, deci familia de receptori expresați și pe endoteliocite. Expresia TLR2 și TLR4 pe monocite are conotații distincte: receptorii TLR2 se impun prin expresie inductibilă, iar TLR4 – prin expresie constitutivă. În cultură de celule s-a stabilit, că monocitele pacienților cu SAF sensibilizate prin lipopolizaharide bacteriene demonstrează o activitate majorată a receptorilor TLR2, dependentă în mod direct de cantitatea de ATP, comparativ cu persoanele sănătoase. Mai mult, la pacienții cu lupus și SAF este concludent crescută și expresia receptorilor  $\beta$ 2GPI, fapt ce s-a asociat de expresia majorată a factorului tisular. Sunt dovezi care trec în evidență faptul, că în SAF capacitatea monocitelor de sinteză a  $\beta$ 2GPI este augmentată, determinând elevarea nivelului circulant al acestei glicoproteine, sintetizate prioritar, dar nu în mod exclusiv de hepatocite.

Creșterea mai pronunțată a expresiei TF (CD142) pe monocite se constată la activarea TLR2 și anexinei 2 de către complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI și anti-CL. Deci, factorul infecțios, care induce expresia inductibilă Toll-like2, are în patogenia SAF nu numai rol de declanșare a formării AAF, dar și de sinteza mononucleară a  $\beta$ 2GPI. Remarcabil, că la pacienții cu SAF este crescut și raportul monocitelor circulante cu fenotip proinflamator activat (CD14+16+), care dispun de capacitate de adeziune endotelială majorată la acțiunea CMP-1 sau CCL2, chemokina principală a mononuclearelor. Expresia TF de monocite este dependentă de limfocitele CD4, fapt ce indică asupra rolului acestora în menținerea durabilă a statusului protrombotic activat la pacienții cu sindromul antifosfolipidic.

Predictorii expresiei factorului tisular monocitar în SAFL sunt micro-ARN-155 și micro-ARN-146a extracelulari, creșterea cărora se asociază cu micșorarea Nivelelor plasmaticice ale micro-ARN-19b și micro-ARN-20a în corelare cu severitatea trombozei, intensitatea stresului oxidativ, expresiei citokinelor proinflamatoare și selectinelor P și L, precum și titrul anticorpilor antifosfolipidici. Materialul probatoriu acumulat permite de a concluda, că micro-ARN-19b și micro-ARN-20a circulante sunt nu numai markeri ai expresiei TF monocitar, dar și niște factori de potențare a răspunsului inflamator al celulelor endoteliale și, deci, de diseminarea inflamației. Remarcabil, că prepararea culturii de endoteliocite umane cu AAF preluați de la

pacienții cu SAF a condus la creșterea TF și la exocitoza exosomilor ce conțin micro-ARN-19b și micro-ARN-20a. Prin urmare se poate de admis, că mecanismul dependent de micro-ARN al expresiei factorului tisular monocitar este comun cu cel iminent endoteliocitelor.

Nivelul circulant al unor micro-ARN (e.g. mico-ARN-146a-3p și mico-ARN-146a-5p) se anunță drept un predictor al complicațiilor gestaționale la femeile cu SAF. Tratamentul in vitro al trofoblastelor cu a AAF condiționat creșterea expresiei intracelulare a acestor micro-ARN.

Este importantă legătura dintre expresia micro-ARN și răspunsul inflamator celular, întrucât expunerea la AAF atât a celulelor endoteliale, cât și a trofoblastelor, s-a manifestat prin sinteza IL-8, o interleukină cu proprietăți proinflamatoare marcante. Sub acțiunea AAF monocitele exprimează un set variat de citokine proinflamatoare (e.g. IL-2, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- $\alpha$ , galectina-3, etc.) și molecule de adeziune intercelulară care se corelează autentic cu nivelul circulant ale sCD40L, predictor veritabil al statusului protrombotic și infecțios.

Un alt patern fiziopatologic al trombozei legate de monocite este determinat de periclitarea aparatului mitocondrial al mononuclearelor, fapt ce rezultă în eliberarea excesivă a radicalilor liberi de oxigen. Pretratarea monocitelor cu coenzima Q10 (un antioxidant cu proprietăți antiinflamatoare și antitrombotice dovedite) a redus expresia factorului tisular la acțiunea aAF din clasa IgG. Rezultatele trialului clinic randomizat, placebo controlat, NCT02218476 au adus la apel beneficii importante ale tratamentului pacienților cu SAF prin forma redusă a CoQ10 (Qred; 200 mg/d) timp de 1 lună, cum ar fi micșorarea față de placebo a Nivelelor circulante ale markerilor protrombotici (e.g. TF), proinflamatori (e.g. IL-6 și IL-8), prooxidanți (e.g. dialdehida malonică) și elevarea conținutului plasmatic al micro-ARN-19b și micro-ARN-20a.

Atenuarea inflamației s-a manifestat și prin semnalmamente clare de ameliorare a funcționalității endoteliului vascular atestată prin micșorarea expresiei VECAM-1, creșterea ratei vasodilatării mediate de flux și a concentrației sanguine de NO. Importantă în acest context este și diminuarea în monocite a fosforilării a 7 kinaze intracelulare implicate în promovarea statusului protrombotic, stresului oxidativ și răspunsului inflamator. Printre acestea se găsește și p38MAPK, o

kinază activată de plachete, implicată în dezorganizarea neutrofilelor și formarea rețelei de cromatină și granule extracelulare, NETs (Neutrophil Extracellular Traps). La rândul său NETs este o sursă de factori de activare a plachetelor și a celulelor endoteliale, precum și de antigene nucleare care declanșează formarea autoanticorpilor nucleari, fenomen propriu lupusului sistemic eritematos. În plus, NETs-ul poate servi drept o „rețea-proptea” de adeziune a plachetelor la endoteliul alterat de către proteazele înmagazinate în granulele de neutrofile extracelulare. Conglomerate de NETs-uri in vivo sunt depistate în spațiile vilozităților epiteliale placentare la femeile cu SAF, complicat prin preeclampsie și eclampsie.

Acest trial a consolidat ipoteza suportului multifactorial al trombozei în SAFL, interfața patogenetică fiind orchestrată de factori proinflamatori, factori prooxidanți și perturbări ale expresiei diferitor familii de micro-ARN.

Un alt mecanism de menținere durabilă a expresiei factorului tisular monocitar în SAF este determinat de efectul aAF de micșorare a expresiei proteinei de catalizare a oxidării, reducerii și a izomerizării punților disulfide, PDI (Protein catalyzing Disulfide Isomeration) la nivelul Cys186–Cys209 al TF. Drept urmare, statusul activ al TF se menține, perpetuând, astfel, cascada extrinsecă a coagulării. Mai mult decât atât, reducerea expresiei PDI sub acțiunea aAF se impune prin activarea NF-kappaB, care pune în exercițiu genele responsabile de răspunsul inflamator și eliberarea excesivă a citokinelor proinflamatoare. Blocarea receptorului monocitar Toll-like 8 a atenuat „expresia în jos” a PDI sub acțiunea aAF, fapt ce indică asupra rolului acestui receptor în reglarea expresiei factorului tisular monocitar.

Sub acțiunea aAF asupra monocitelor expresia kinazei Rho crește, fapt ce rezultă în potențarea sintezei factorului tisular. Efectul antitrombotic al statinelor este în parte legat de capacitatea lor de a inhiba kinaza Rho monocitară. Trombina, ca și endotelina 1, dimpotrivă, activează kinaza Rho monocitară și endotelială și, astfel, promovează statusul protrombotic indus prin acțiunea anticorpilor antifosfolidici. Se consideră că efectul stimulator al sintezei TF monocitar este propriu IgG (anti-CL) și nu se referă la IgM și CA.

Efectul anticardiolipinului (aCL) asupra monocitelor se soldează cu creșterea expresiei receptorilor PAR (Protease Activated Receptor),

PAR1, PAR3 și PAR4, receptori specifici pentru trombină (receptorul PAR2 este, totodată, implicat în transformarea monocitelor în macrofage sub acțiunea citokinelor proinflamatoare, în primul rând a stimulatorului coloniei monocitare). La pacienții cu SAF expresia receptorilor PAR1 și PAR2 este crescută, iar blocarea lor, în deosebi, PAR2 limitează expresia TF monocitar la acțiunea AAF, subliniind rolul acestuia în declanșarea cascadei coagulante. Astfel, receptorul PAR2 poate fi o țintă a terapiei trombozei la pacienții cu SAF, mai ales că expresia lui se decelează și pe suprafața neutrofilelor, care sub acțiunea tripsinei declanșează un răspuns inflamator asociat de formarea NETs. Reducerea NETs sub acțiunea statinelor s-a documentat drept un efect benefic în vederea prevenirii sau atenuării evoluției sindromului coronarian acut, precum și ameliorării evoluției post-infarct în faza acută (24-72 ore, când infiltrarea neutrofilelor în zona necrotică a miocardului și expresia macrofagelor proinflamatoare, M1, se estimează la cote maxime).

*Mecanismul trombotic mediat de dezechilibrul coagulare/anticoagulare/fibrinoliză.*

Cascada coagulantă iminentă hemostazei macrocirculatorii este în mod natural declanșată de factorul Hageman de contact XII (coagularea intrinsecă) și factorul tisular, expresat de endotelicitele lezate, precum și de monocite, neutrofile (coagularea extrinsecă). Sistemul anticoagulant este reprezentat de trombomodulină, proteinele C și S, antitrombina III și heparină. Important de menționat, că la pacienții cu SAF nivelul circulant al factorului XII este redus datorită prezenței anticorpilor specifici și se corelează negativ cu creșterea timpului testului tromboplastinic in vitro, precum și cu nivelul AAF reprezentat de LA. Totuși, carența factorului XII se estimează ca o entitate protrombotică în SAFL, dată fiind implicarea concludentă a acestuia în activarea fibrinolizei.

Anti- $\beta$ 2GPI inhibă activitatea factorului XII, dar în concentrații mari se constată un efect opus. Prezența autoanticorpilor către factorul Hageman este un fenomen inteligibil în SAF, apreciat drept un patern autoimun, și influențează, spre deosebire de aAF, deznodământul hemostazei doar prin inhibarea fibrinolizei. Rolul aAF în activarea cascadei de coagulare extrinsecă este evident și se impune prin creșterea

expresiei TF monocitar și endotelial. Autoanticorpii către protrombină se estimează la 40-45% din pacienții cu SAFL, dar implicarea lor în tromboză este acceptată doar prin prisma reducerii activării proteinei C în deficitul fiziologic de trombină. Totodată, în prezența aAF conversia protrombinei în trombină este accelerată, fapt ce poate contracara în parte efectul deficitului de protrombină. Reducerea expresiei și activității proteinei C este unul din predictorii principali ai disfuncției sistemului anticoagulant și activării statusului procoagulant la pacienții cu SAFL. La această noimă este importantă de asemenea: (i) carenta cofactorului anticoagulant, proteinei S, mediată de AAF; (ii) atenuarea activității proteinei C datorită micșorării activității receptorului endotelial specific către PC și inhibiției de către AAF a oxidării; (iii) inhibiția activării PC de către complexul trombomodulină-trombină.

Incompetența antitrombinei III, o protează serină cu acțiune anticoagulantă prin inhibiția enzimelor antrenate în formarea trombinei, este vizată în SAF drept o consecință a reacției încrucișate a aAF cu heparina, prezența căreia este necesară pentru promovarea normală a efectului anticoagulant ale proteazei. În plus, în prezența aAF capacitatea antitrombinei de inactivare a trombinei și a factorului Xa este diminuată. Rolul anticorpilor contra factorului Xa (componentă a trombokinazei) în patogenia trombozei iminente sindromului antifosfolipidic nu este elucidat. Datele acumulate sunt contradictorii și intricate, întrucât afinitatea factorului Xa către anticorpii specifici la pacienții cu SAFL este mai mare comparativ cu indicele pacienților cu lupus, dar fără aAF. Sub acest aspect este vehiculată ipoteza, potrivit căreia anticorpi Xa reduc capacitatea antitrombinei III de inactivare a factorului Stuart-Prower.

Antagoniștii factorului Xa sunt o clasă de remedii anticoagulante de perspectivă în profilaxia și tratamentul trombozei la pacienții cu SAFL. Activitatea sistemului anticoagulant este indispensabilă și de anexina 5 expresată abundant în manieră constitutivă pe endoteliocele vasculare și trofoblastele placentare. Când  $\beta$ 2GPI se fixează cu domeniul V de anexina 5, aceasta din urmă preia o structură 2D de sită, care selectiv acoperă mai multe fosfolipide și proteine, în primul rând, tromboplastina endotelială (TF III sau CD142), anihilând accesul ei la factorii circulanți ai sistemului coagulant (factorul X) și declanșarea



coagulării intrinseci, fără a periclita conexiunea cu moleculele de heparană sulfat. În cadrul SAFL, anti- $\beta$ 2GPI reacționează cu domeniul I al  $\beta$ 2GPI fixată pe anexina 5, rezultând în pierderea capacității ei de a realiza misiunea de scut al tromboplastinei și, totodată, a performanțelor anticoagulante ale  $\beta$ 2GPI.

Conceptual este important, că cultura de trofoblaste placentare și endoteliocite expresează mai puține molecule de anexină 5 în prezența aAFL (IgG) preluate de la pacienții cu SAFL, iar plasma incubată cu aceste celule demonstrează o activitate coagulantă sporită. Această evidență impune o semnificație fiziopatologică deosebită a mecanismului anticoagulant al AAF în patogenia dereglărilor hemostazei la pacienții cu SAFL. Creșterea potențialului coagulant și deprecierea fezabilității anticoagulante sunt asociate la pacienții cu SAFL de inhibiția fibrinolizei. Cu toate acestea prezența D-dimerilor, produsul degradării fibrinei de către plasmină, este decelată în sângele pacienților cu SAFL, iar majorarea lor peste 2,0 microg/ml se estimează drept un predictor relevant al trombozei.

Plauzibil de admis în acest context, că procesul de creștere a activității coagulante în SAFL este mai accentuat comparativ cu severitatea afectării fibrinolizei. Aceasta din urmă are la bază, potrivit datelor obținute în studiile clinice și fundamentale mai multe mecanisme, printre care oportun se impune creșterea activității și expresiei inhibitorului activatorului plasminei, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) și reducerea activatorului tisular al plasminei, tPA (tissue plasminogen activator). Alt mecanism constă în formarea la pacienții cu SAFL a anticorpilor contra plasminei și/sau tPA, care scot din exercițiu capacitatea de liză a fibrinei propriie sistemului de fibrinoliză. În plus, este coroborată ipoteza rolului lipoproteinei (a), un marker al moleculelor de LDL cu aterogenitate înaltă, care, fiind în exces la pacienții cu SAF, concurează cu fibrina în vederea expunerii la acțiunea proteolitică a plasminei.

Reducerea activității plasminei rezultă în metabolizarea proteolitică depreciată a trombospondinei-1 solubile eliberată prioritar de plachete și endoteliocite. Acest fenomen determină activarea statusului protrombotic și procoagulant, iar pe de altă parte inhibiția sistemului de fibrinoliză, întrucât TSP-1 stimulează expresia PAI-1, care în mod

normal trebuie să fie contracarată prin acțiunea  $\beta$ 2GPI. Anti- $\beta$ 2GPI anihilează acțiunea inhibitorie a  $\beta$ 2GPI asupra PAI-1 în manieră dependentă de concentrație. Mai mult, complexul  $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI reduce activitatea fibrinolică endogenă, chiar în prezența factorului Hageman, care stimulează formarea plasminei. Este importantă de asemenea și acțiunea anti- $\beta$ 2GPI de compromitere a efectului  $\beta$ 2GPI privind stimularea formării plasminei, mediată de tPA și realizată prin intermediul receptorilor expesați pe molecula de plasminogen (anexina 2). Activarea anexinei 2 de către  $\beta$ 2GPI facilitează procesul de interacțiune a tPA cu plasminogenul propice formării plasminei și fibrinolizei, iar sub acțiunea anti- $\beta$ 2GPI acest proces este periclitat.

*Mecanismul trombotic susținut de sistemul complementului și inflamație.* Fiind un patern deosebit al procesului autoimun, SAFL se impune prin activitatea crescută a sistemului complementului și, drept una din consecințele acesteia, prin accentuarea inflamației sistemice, care în mod cumulativ și reciproc potențează evoluția trombozei. Nivelele circulante elevate ale diferitor componente activate ale complementului se corelează direct cu severitatea trombozei arteriale și/sau venoase la pacienții cu SAFL, precum și cu titrul anticorpi aFL. Mai multe cercetări experimentale au arătat, că șoriceii transgenici care nu expresează componentele C3 și c5 ale complementului sunt rezistenți la inducerea trombozei prin acțiunea anticorpi aFL. Drept urmare procesul de formare și eliberare a TF endotelial este compromis de carența C5a.

Inhibiția activității sistemului complementului prin eculizumab (anticorp monoclonal uman care neutralizează C5) are beneficii asupra evoluției clinice a SAFL, inclusiv la femeile însărcinate cu risc de preeclampsie și avort spontan. La pacienții cu SAFL Nivelele circulante ale complexelor imune sunt elevate, fapt ce sugerează rolul acestora în activarea clasică a complementului, în special dacă aCL și anti- $\beta$ 2GPI sunt reprezentate de IgG1, care dispune de o capacitate de activare a Cq1 mai mare comparativ cu IgG2. Componentele activate ale sistemului complementului sunt capabile să potențeze procesul de expresie endotelială a moleculelor de adeziune intercelulară declanșată de aAF, repercusiunile de bază fiind exacerbarea leziunilor endoteliale, inclusiv aterosclerotice, și creșterea, astfel, a activității procoagulante.

Injuriile endoteliale pot fi mediate de MAC C5b-C9 (membrane attack complex complex), care prin acțiune proteolitică iminentă dezgolește fibrele colagene subendoteliale propice activării hemostazei primare sau trombocitare. În studii experimentale s-a demonstrat că administrarea aAF a condus la acumularea C9 în endoteliu, expresia crescută a TF și formarea trombusurilor declanșată de coagularea extrinsecă, iar la șoricicii cu deficiență de C6 aceste fenomene au fost notabil atenuate. Gradul de infiltrare a componentelor MAC în endoteliu în SAFL se corelează cu hipocomplementemia, fapt ce indică asupra activării de proporții a sistemului complementului și consumului exagerat al componentelor acestuia. Hipocomplementemia la pacienții cu lupus și SAFL este mai profundă, comparativ cu lupus fără aAF, iar la femeile însărcinate riscul asupra gestației este mai mare odată cu declinul cantitativ al componentelor complementului, în primul rând fracțiile complementului C3 și C4.

Implicația nemijlocită a complementului în patogenia trombozei se anunță prin capacitatea unor componente (în primul rând C5a) de a potența efectul trombinei privind activarea inhibitorului fibrinolizei, TAFI (Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor), precum și creșterea expresiei moleculelor de adeziune intercelulară pe suprafața endotelioцитelor. Există evidențe și asupra activării de către C5a a factorului tisular plachetar 4, care facilitează procesul de dimerizare a  $\beta$ 2GPI la fixarea ei de anexina 2 endotelială, fenomen în deosebi important în prezența unui titru redus al anti- $\beta$ 2GPI. Mai mult, dimerizarea naturală a  $\beta$ 2GPI la acțiunea factorului tisular plachetar 4 poate avea loc și în absența anti- $\beta$ 2GPI, iar efectele protrombotice declanșate sun similare SAFL.

În prezența factorului tisular plachetar 4  $\beta$ 2GPI exercită un efect de inhibiție a degradării C5b propice formării complexului MAC, care potrivit studiilor recente, stimulează eliberarea factorului von Willebrand și expresia TF, selectinelor, integrinelor și citokinelor proinflamatoare. Remarcabil, că la pacienții cu SAF catastrofic, manifestat prin prezența trombozei vaselor mici în cel puțin 3 organe vitale timp de 1 săptămână, sunt decelate Nivele circulante înalte ale factorului von Willebrand, IL-1, IL-6, IL-8 și TNF- $\alpha$  și a selectinei solubile P, care asigură adeziunea și pasajul transendotelial al

neutrofilelor, iar nivelul componentelor C3 și C5 este diminuat, fapt ce indică asupra consumului lor exagerat.

Acțiunea MAC asupra membranei celulare conduce pe o parte la activarea genelor proinflamatoare, iar pe de altă parte facilitează translocarea fosfatidilserinei de pe partea interioară a plasmolemei pe partea exterioară, care va fi ulterior fixată de aAF. Realizarea acestui fenomen pe endoteliocite, plachete, neutrofile și monocite va declanșa și/sau exacerba statusul protrombotic prin mecanismele menționate ud supra. Astfel, acțiunea cooperantă și interdependentă a sistemului complementului și inflamației este crucială în promovarea trombozei declanșată de aAF în sindromul antifosfolipidic, iar leziunile celulare inflamatoare pot facilita și activarea complementului pe cale lectin-dependentă.

Semnificativă în plan conceptual la această conotație este constatarea creșterii expresiei receptorului plachetar CD36 (GPIIIa) sub acțiunea citokinelor proinflamatoare, iar complementul crește afinitatea acestuia față de anticorpii antifosfolipidici, fapt ce rezulta în activarea plachetelor, declanșarea hemostazei primare și sustenabilitatea hemostazei secundare. Activarea receptorului CD36 plachetar va conduce la eliberarea de TPS-1 din granulele-alpha, care va interacționa cu fibrinogenul pe suprafața trombocitelor, potențând adeziunea acestora, iar activarea receptorului endoteliocitar CD36 de către AAF va diminua sinteza prostaciclinoi (PGI<sub>2</sub>) în detrimentul controlului adecvat al statusului protrombotic.

### ***Postulate conceptuale***

1. Sindromul antifosfolipidic (SAFL) este un patern al patologiei autoimune, care compromite nativitatea funcțională a hemostazei, manifestările principale fiind tromboza arterelor, venelor și microcirculației, responsabilă în mod direct de rata înaltă a trombembolismului pulmonar, accidentelor vasculare și a gestației periclitată până la avort spontan.

2. Anticorpii antifosfolipidici (anticorpii aFL) sunt formați către proteinele plasmatică (protrombina și  $\beta$ 2GPI) care fixează fosfolipidele anionice (e.g. cardiolipina, fosfatidilinozitolul și fosfatidilserina) expresate constitutiv sau inductibil pe suprafața celulelor implicate nemijlocit în controlul hemostazei (plachete, endoteliocite, monocite),

declanșând un status protrombotic sustenabil. Anticorpii principali, anti- $\beta$ 2GPI, activează aceste celule și prin intermediul receptorilor specifici, cum ar fi anexina 2, Toll-like 4, ApoER2 (apolipoprotein E receptor 2), etc.

3. Mecanismele patogenetice cheie ale dereglării hemostazei în SAF sunt: (i) activarea plachetelor asociată de expresia receptorilor glicoproteici de adeziune și agregare, precum și eliberarea TxA2 și factorului von Willenbrand, (ii) activarea sistemului de coagulare extrinsecă în urma activării factorului tisular, leziunii endotelocitelor și angrenării sistemului complementului, (iii) atenuarea sistemului anticoagulant grație activării subpragale a proteinei C și (iiii) inhibiția fibrinolizei. În geneza trombozei arterelor organelor vitale TxA2 și factorul von Willenbrand au un rol semnificativ, întrucât TxA2 induce vasoconstricție, iar ultimul în stres hemodinamic majorat expresează un număr mare de site-usuri de fixare a colagenului subendotelial.

4. Marcherii de laborator ai SAFL în testele de estimare a hemostazei in vitro sunt: creșterea timpului de sângerare (hemostaza primară), a timpului parțial activat al tromboplastinei (coagularea intrinsecă și calea comună) și a timpului protrombinic (coagularea extrinsecă și calea comună). Din markerii circulanți cu valoare predictivă notabilă sunt trombocitopenia (de consum și autoimună) responsabilă de creșterea timpului de sângerare, hipocomplementemia (consumul exagerat al componentelor principale, C3, C4 și C5), elevarea imunoglobulinelor G și M, deprecierea protrombinei, creșterea D-dimerilor, etc.

5. Strategia terapeutică aplicată la pacienții cu SAF în vederea prevenirii și corectării tulburărilor hemostazei și sechelelor ei, proiectată pe mecanismele de declanșare și susținere a trombozei, include statinele și inhibitorii complementului. Statinele atenuază răspunsul inflamator și stresul oxidativ, reduc expresia moleculelor de adeziune intercelulară, influențează benefic integritatea endotelului, diminuează expresia TF și calea extrinsecă de coagulare. Anticorpii monoclonali către diferite componente ale complementului (e.g. eculizumab) scoate din exercițiu impactul MAC, asociat de expresia fosfatidilserinei, beneficiul antitrombotic fiind în deosebi bine documentat la femeile cu ultraj față de sarcină.

## Indice bibliografic

1. Willis R, Gonzalez EB. Pathogenetic mechanisms of antiphospholipid antibody production in antiphospholipid syndrome. *World J Rheumatol.* 2015; 5(2): 59-68. doi:[10.5499/wjr.v5.i2.59](https://doi.org/10.5499/wjr.v5.i2.59).
2. Marina P, Sikara, Eleftheria P, Grika and Panayiotis G. Vlachoyiannopoulos (November 9th 2011). Pathogenic Mechanisms of Thrombosis in Antiphospholipid Syndrome (SAFL), Thrombophilia, Andrea Luigi Tranquilli, IntechOpen, DOI: 10.5772/25522.
3. Chighizola CB, Raschi E, Borghi MO et al. Update on the pathogenesis and treatment of the antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2015; 27:476-482.
4. Boles J. Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus.* 2010; 19(4): 370-378. <https://doi.org/10.1177/0961203309360810>.
5. Favaloro E. Mixing studies for lupus anticoagulant: mostly yes, sometimes no. *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58:487-491.
6. O'Sullivan JM, Ward S, Lavin M, O'Donnell JS. von Willebrand factor clearance—biological mechanisms and clinical significance. *Br. J. Haematol.* 2018; 183:185–195.
7. Zhang W, Gao F, Lu D, Sun N et al. Anti- $\beta_2$  glycoprotein I antibodies in complex with  $\beta_2$  glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: Apolipoprotein E receptor 2' and glycoprotein I b $\alpha$ . *Front. Med.* 2016; 10: 76–84.
8. Hell L, Lurger K, Mauracher LM, Grilz E et al. Altered platelet proteome in lupus anticoagulant (LA)-positive patients—protein disulfide isomerase and NETosis as new players in LA-related thrombosis. *Exp. Mol. Med.* 2020; 52:66–78.
9. Baroni G, Banzato A, Bison E, Denas G et al. The role of platelets in antiphospholipid syndrome. *Platelets.* 2017; 28:762–766.
2. Der H, Kerekes G, Veres K, Szodoray P et al. Impaired endothelial function and increased carotid intima-media thickness in association with elevated von Willebrand antigen level in primary antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2007; 16:497–503.

3. Zuo Y, Shi H, li C, Knight JS. Antiphospholipid syndrome: a clinical perspective. *Chin Med J*. 2020; 133(8):929-940. doi: 10.1097/CM9.0000000000000705.
4. Chaturvedi S, Alluri R, McCrae KR. Extracellular vesicles in the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2018; 44:493–504. doi: 10.1055/s-0037-1599081.
5. Bertolaccini ML, Sciascia S, Murru V, Garcia-Fernandez C et al. Prevalence of antibodies to prothrombin in solid phase (aPT) and to phosphatidylserine-prothrombin complex (SAFL/PT) in patients with and without lupus anticoagulant. *Thromb Haemost*. 2013; 109:207–13. doi: 10.1160/TH12-07-0527.
6. Zuily S, Regnault V, Guillemin F. Superficial vein thrombosis, thrombin generation and activated protein C resistance as predictors of thromboembolic events in lupus and antiphospholipid patients. A prospective cohort study. *Thromb Res*. 2013; 132(1):e1-e7.
7. Kremers RMW, Zuily S, Kelchtermans H, Peters TC et al. Prothrombin conversion is accelerated in the antiphospholipid syndrome and insensitive to thrombomodulin. *Blood Adv*. 2018; 2(11):1315-1324.  
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018018036>.
8. Frank M, Sodin-Serml S, Irman S, Bozic B, Rosman B. Beta2-glycoprotein I and annexin A5 phospholipid interactions: artificial and cell membranes. *Autoimmun Rev*. 2009; 9(1):5-10. doi: 10.1016/j.autrev.2009.02.025.
9. Harper BE, Wills R, Pierangeli SS. Pathophysiological mechanisms in antiphospholipid syndrome. *Int J Clin Rheumatol*. 2011; 6(2):157-171. doi: [10.2217/ijr.11.9](https://doi.org/10.2217/ijr.11.9).
10. Ramirez GA, Efthymio M, Isenberg DA. Under crossfire: thromboembolic risk in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2019; 58:940-952.
11. Cohen H, Efthymiou M, Isenberg DA. Use of direct oral anticoagulants in antiphospholipid syndrome: reply. *J. Thromb. Haemost*. 2020; 18:259-261.
12. Garcia-Carrasco M, Jimenez-Herrera E, Galvez-Romero J. The anti-thrombotic effects of vitamin D and their possible relationship with antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2018; 27:2181-2189.

- 
13. Palomo IG, Segovia FM, Alarcon ML, Fuentes BY et al. An insight into the pathophysiology of thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2007; 12(8):3093-3103.
  14. Lally L, Sammaritano LR. Vasculitis in antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2015; 41(1):109–23. doi:10.1016/j.rdc.2014.09.009.
  15. Laplante P, Fuentes R, Salem D, Subang R, Gillis MA, Hachem A. Antiphospholipid antibody-mediated effects in an arterial model of thrombosis are dependent on toll-like receptor 4. *Lupus*. 2016; 25(2):162–76. doi:10.1177/0961203315603146.
  16. De Groot PG, Laa B. Mechanisms of thrombosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Best Practice & Research Rheumatology*. 2017; 31(3):334-341. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2017.09.008>.
  17. Isslam A, Alam F, Sasongko TH, Gan SH. Antiphospholipid Antibody-Mediated Thrombotic Mechanisms in Antiphospholipid Syndrome: Towards Pathophysiology-Based Treatment. *Current Pharmaceutical Design*. 2016; 22(28). doi: [10.2174/1381612822666160527160029](https://doi.org/10.2174/1381612822666160527160029).