

**Università degli Studi di Padova**  
**Dipartimento di Medicina**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E  
SPERIMENTALI  
INDIRIZZO IN SCIENZE REUMATOLOGICHE  
CICLO XXIV

**STUDIO DELL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA ED ENDOTELIALE  
IN PAZIENTI CON SINDROME DA ANTICORPI  
ANTIFOSFOLIPIDI AD ALTO RISCHIO IN TRATTAMENTO  
AFERETICO**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

**Coordinatore d'Indirizzo:** Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

**Supervisore:** Ch.ma Prof.ssa Amelia Ruffatti

**Dottoranda:** Dr.ssa Agnese Bontadi



Alle mie amiche e colleghe  
del “gruppo Ruffatti”



## INDICE

- ABBREVIAZIONI.....pag. 7
- RIASSUNTO..... pag. 9
- SUMMARY..... pag. 11
- INTRODUZIONE..... pag. 13
- SCOPI..... pag. 22
- RIMOZIONE DEGLI ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI  
IN CORSO DI GRAVIDANZA NELLA SINDROME DA  
ANTIFOSFOLIPIDI AD ALTO RISCHIO..... pag. 23
- EFFETTO *IN VITRO* DEGLI ANTICORPI ANTI- $\beta$ 2  
GLICOPROTEINA I SULL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA.  
CONFRONTO TRA ANTICORPI DELLA FASE  
QUIESCENTE E DELLA FASE CATASTROFICA..... pag. 37
- EFFETTO *EX VIVO* DEGLI ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI  
SULLE PIASTRINE E SULL'ENDOTELIO. DOSAGGIO DEI  
MARKERS DI ATTIVAZIONE PIASTRINICA ED  
ENDOTELIALE IN PAZIENTI IN FASE DI MALATTIA  
QUIESCENTE E CATASTROFICA..... pag. 50
- RINGRAZIAMENTI..... pag. 61



## *Abbreviazioni*

APS = Sindrome da anticorpi antifosfolipidi

aPL = anticorpi antifosfolipidi

CAPS = Sindrome da Antifosfolipidi Catastrofica

aCL = anticorpi anticardiolipina

anti- $\beta_2$ GPI = anti-beta2glicoproteina I

PF = plasmaferesi

IA = immunoadsorbimento

TRAP-6 = thrombin receptor activator for peptide 6

MCP-1 = proteina chemiotattica dei monociti-1

VCAM-1 = molecola di adesione cellulare vascolare-1

MMPs = metalloproteinasi di matrice

VWF = fattore di von Willebrand



## RIASSUNTO

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una patologia autoimmune caratterizzata da manifestazioni trombotiche e/o da complicanze ostetriche associate alla presenza nel sangue di anticorpi antifosfolipidi (aPL), come gli anticorpi anticardiolipina (aCL), gli anti-beta2glicoproteina I (anti- $\beta_2$ GPI) e i lupus anticoagulants. È stata inoltre individuata una variante severa dell' APS che si riscontra nell'1% dei pazienti chiamata Sindrome da Antifosfolipidi Catastrofica (CAPS). Essa è caratterizzata da fenomeni tromboembolici a carico di più distretti, con quadro clinico rapidamente ingravescente e gravato da un'elevata mortalità.

La terapia tradizionale antitrombotica dell'APS non è sempre sufficiente a contrastare le complicanze presentate dai pazienti. Vi sono infatti casi, considerati ad alto rischio, in cui risulta necessario affiancare alla terapia convenzionale, trattamenti cosiddetti di 2° livello che sono generalmente costituiti dai boli di immunoglobuline endovena e/o da tecniche di aferesi.

Nella prima parte dello studio sono state seguite tre pazienti in corso di gravidanza con APS ad alto rischio sottoposte ad un trattamento comprendente la terapia antitrombotica e l'aferesi (plasmaferesi e immunoadsorbimento su colonna) ed è stata valutata la capacità di rimozione degli anticorpi aCL e anti- $\beta_2$ GPI di classe IgG da parte di entrambi i trattamenti aferetici.

I livelli anticorpali sono stati dosati tramite metodica ELISA "home made" in campioni sierici (n. 184) raccolti prima e immediatamente dopo ogni seduta aferetica.

I risultati hanno mostrato un calo significativo dei livelli degli aCL IgG e anti- $\beta_2$ GPI IgG in tutte e tre le pazienti ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$ ,  $p=0,00$ , rispettivamente) dopo ogni seduta di aferesi. E' stato inoltre indagato l'andamento dei livelli anticorpali pre-trattamento durante il corso delle gravidanze. Si è osservato un "trend" significativamente decrescente degli aCL IgG durante la gravidanza in tutte e tre le pazienti ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$ ,  $p=0,001$ , rispettivamente). Mentre gli anti- $\beta_2$ GPI IgG hanno avuto un andamento significativamente decrescente solo nelle due pazienti che avevano i valori anticorpali basali più elevati ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$ , rispettivamente).

Nella seconda parte del lavoro, abbiamo valutato l'effetto *in vitro* sull'attivazione piastrinica degli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI IgG, rimossi dall'afèresi. Abbiamo misurato l'espressione piastrinica di P-selettina (P-sel). Gli anti- $\beta_2$ GPI sono stati estratti dal plasma della paziente n. 3 descritta nello studio precedente, con APS in fase di quiescenza e dal plasma della stessa paziente durante la fase catastrofica della malattia. I risultati hanno mostrato che gli anti- $\beta_2$ GPI non hanno alcun effetto sull'espressione piastrinica di P-sel e quindi sull'attivazione piastrinica, mentre sono in grado di potenziare significativamente l'attivazione piastrinica indotta da dosi sottosoglia di un agonista piastrinico. Inoltre gli anti- $\beta_2$ GPI presenti nella variante catastrofica della malattia hanno indotto un incremento significativamente maggiore dell'espressione piastrinica di P-sel rispetto agli anti- $\beta_2$ GPI della fase quiescente.

Infine, a seguito dei risultati ottenuti in precedenza, nella terza parte dello studio abbiamo valutato l'effetto *ex vivo* degli aPL sulle piastrine e sull'endotelio tramite il dosaggio dei principali markers di attivazione piastrinica ed endoteliale in campioni plasmatici di pazienti con APS. I risultati hanno mostrato che i pazienti con APS hanno livelli plasmatici della maggior parte dei markers indagati significativamente più elevati rispetto ai controlli. Inoltre nella variante catastrofica dell'APS si è riscontrata una concentrazione significativamente maggiore di P-sel solubile rispetto all' APS quiescente.

## SUMMARY

Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic, autoimmune disease characterized by thromboembolic manifestations and/or obstetric morbidity in association with medium to high titres of antiphospholipid antibodies (aPL), such as anticardiolipin (aCL), anti- $\beta_2$ glycoprotein I ( $a\beta_2$ GPI) antibodies and Lupus anticoagulant activity. A small percentage (1%) of APS patients develop a life-threatening variant of the disease, the Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (CAPS), which is defined as multiorgan thrombosis over a one-week time affecting at least three organs, systems and/or tissues, with histopathologic confirmation of small vessel occlusion in at least one organ or tissue. CAPS is associated with a high mortality rate (~50%) mostly due to cerebral and cardiac thrombotic involvement, infections and multiorgan failure. Conventional therapy with aspirin and/or heparin is at times incapable of preventing complications in high risk patients with APS. In those cases, in addition to conventional therapy strategies, the so-called second-line treatment protocols, including aphaeretic techniques, are employed.

The first part of the study is a report on three APS pregnant patients who were successfully treated with plasma exchange (PE) (two cases) or with immunoadsorption (IA) (one case) as a second-line treatment strategy. The efficacy of these procedures in removing IgG aCL and IgG  $a\beta_2$ GPI antibodies from blood was evaluated. Serum samples were collected before and after apheretic treatment sessions. Serum aCL and  $a\beta_2$ GPI antibodies were determined using an "in-house" enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and showed that before pregnancy all three patients had medium/high IgG aCL and IgG  $a\beta_2$ GPI titres. In all three patients, a significant decrease in IgG aCL ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ,  $p=0.00$ , respectively) and IgG  $a\beta_2$ GPI ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ,  $p=0.00$ , respectively) antibody titres were observed after PE and IA sessions. Moreover, there was a significant, steady fall in serum IgG aCL pretreatment levels during the course of all three pregnancies ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ,  $p=0.001$ , respectively). The fall in IgG  $a\beta_2$ GPI was significant in two of the patients ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ) both with high antibody titres, but not in one with medium antibody titres.

In the second part of this work, we evaluated by *in vitro* studies, the effect on platelet activation of anti- $\beta_2$ GPI antibodies removed by aphaeretic sessions. Anti- $\beta_2$ GPI antibodies were isolated from plasma of the patient n.3 (previous work), in two different stages of APS (quiescent and catastrophic, respectively). Platelet P-selectin (P-sel) expression was assessed by flow cytometry. The results showed that anti- $\beta_2$ GPI antibodies induced significant platelet P-sel expression only in presence of a platelet agonist at a subthreshold concentration. Notably, anti- $\beta_2$ GPI antibodies from the patient with catastrophic APS enhanced platelet P-sel expression more than those from the same patient in quiescent stage of disease.

Following previous results, in the third part of the study *ex vivo* platelet and endothelium activation in APS was investigated. In plasma samples from six patients with quiescent APS, four with catastrophic APS and nine healthy controls, the main markers of platelet and endothelium activation were measured. The data showed that APS patients had significantly higher levels of the most investigated markers than control subjects. Moreover, soluble P-sel significantly prevailed in catastrophic APS in comparison with quiescent APS.

# INTRODUZIONE

## LA SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una patologia autoimmune caratterizzata da manifestazioni trombotiche (arteriose, venose, o del microcircolo) e/o da complicanze ostetriche (aborti ripetuti, perdita fetale in età gestazionale  $\geq 10$  sg, o nascita pretermine) associate alla presenza nel sangue di anticorpi antifosfolipidi (aPL). I principali aPL sono gli anticorpi anticardiolipina (aCL), gli anti-beta2glicoproteina I (anti- $\beta_2$ GPI) e i lupus anticoagulants (LA) [1].

Questa sindrome è stata inizialmente descritta nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES) [2] (forma “secondaria”); successivamente si sono individuati pazienti affetti da APS non associata a connettiviti definite [3] (forma “primaria”). La patologia colpisce prevalentemente soggetti di sesso femminile [4] di età media non ancora definita anche se la malattia sembra esordire prevalentemente nei soggetti tra 15 e 50 anni [5].

La classificazione di APS si basa sulla presenza contemporanea di criteri clinici e di laboratorio. Essi vengono periodicamente revisionati nell’ambito di un Consensus internazionale, l’ultima stesura è avvenuta in occasione dell’XI Congresso Internazionale sugli Anticorpi Antifosfolipidi tenutosi nel 2004 a Sydney ed è stata pubblicata nel 2006 [6].

## CRITERI DI CLASSIFICAZIONE

La classificazione di APS richiede la presenza di almeno un criterio clinico ed un criterio di laboratorio.

### Criteri clinici

#### 1) Trombosi vascolari

Uno o più episodi di trombosi arteriosa, venosa o dei piccoli vasi in qualsiasi tessuto od organo, confermata da tecniche di diagnostica per immagini o indagini istopatologiche (in tal caso non deve esservi significativa evidenza di infiammazione della parete vascolare);

#### 2) Patologia della gravidanza

- a) una o più morti di un feto morfologicamente normale non altrimenti spiegabili e avvenute alla o dopo la 10<sup>a</sup> settimana di gestazione;
- b) uno o più parti prematuri prima della 34<sup>a</sup> settimana di gestazione per severa preeclampsia o eclampsia o grave insufficienza placentare;
- c) tre o più aborti spontanei consecutivi avvenuti prima della 10<sup>a</sup> settimana di gestazione e non altrimenti spiegabili. In particolare devono essere escluse le anomalie anatomiche materne e le alterazioni cromosomiche materne o paterne.

### **Criteri di laboratorio**

- 1) LA positivo in due o più rilevazioni ad almeno 12 settimane di intervallo. Esso deve essere determinato secondo le linee-guida della “International Society of Thrombosis and Hemostasis” [7], riviste da Pengo et al. [8];
- 2) Anticorpi aCL di classe IgG e/o IgM a titolo medio o alto (>40 GPL/MPL o >99° percentile), determinati con metodica ELISA standardizzata [9, 10] in due o più occasioni ad almeno 12 settimane di intervallo;
- 3) Anticorpi anti- $\beta_2$ GPI di classe IgG e/o IgM a titolo >99° percentile, determinati con metodica ELISA standardizzata [11] in due o più occasioni ad almeno 12 settimane di intervallo.

Vi è crescente evidenza che la presenza contemporanea di più criteri di laboratorio aumenti il rischio trombotico [12-14] ed ostetrico [15, 16]; questo viene sottolineato anche dalla raccomandazione, enunciata all'interno dell' “International consensus statement” di Sydney, di stratificare i pazienti in 2 sottocategorie sulla base della presenza di più (categoria I) o di un solo aPL (categoria II, a sua volta suddivisa in IIa, IIb o IIc se presenti da soli LA, aCL o anti- $\beta_2$ GPI, rispettivamente).

### **Meccanismi patogenetici**

E' stato dimostrato che gli aPL sono coinvolti nella patogenesi della trombosi e della perdita fetale, ma con meccanismi che risultano ancora sconosciuti [17-19].

Nell'ambito degli studi sulla patogenesi delle manifestazioni cliniche dell'APS l'endotelio ha rappresentato negli ultimi anni il campo di maggiore interesse. In

condizioni normali l'endotelio vasale ha un ruolo centrale nella regolazione dell'emostasi. In particolare esso mantiene la fluidità del sangue attraverso numerosi mediatori che agiscono controllando la coagulazione. E' stato tuttavia dimostrato che alcuni stimoli possono alterare il normale fenotipo delle cellule endoteliali, inducendole così ad agire in senso procoagulante [20]. A tal proposito esistono lavori, ormai sempre più numerosi, che evidenziano il ruolo diretto degli aPL nel promuovere il passaggio delle cellule endoteliali al fenotipo procoagulante. Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato che gli aPL attivano le cellule endoteliali attraverso il rilievo dell'aumentata espressione del fattore tissutale, di molecole di adesione come ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare-1), VCAM-1 (molecola di adesione cellulare vascolare-1) e di E-selectina da parte delle cellule endoteliali da vena ombelicale umana (HUVECs) cimentate con gli aPL [21-23] oppure attraverso l'aumentata aderenza dei monociti alle cellule endoteliali [24]. Un altro tipo di disfunzione endoteliale da aPL è l'alterazione del controllo del tono vasale. In condizioni di normalità le cellule endoteliali rilasciano una serie di fattori che regolano il tono della parete dei vasi; alcuni di essi hanno attività vasocostrittrice come l'endotelina I e il fattore attivante l'endotelio e le piastrine, mentre altri vasodilatatrice come la prostaciclina e l'ossido nitrico. A tal proposito Carreras et al. [25] hanno dimostrato che plasmi positivi per lupus anticoagulants possono bloccare il rilascio della prostaciclina dall'endotelio vasale e di conseguenza alterare l'equilibrio con il trombossano favorendo uno stato di ipercoagulabilità. Altri autori [26, 27] hanno evidenziato nella trombosi indotta dagli aPL un'alterazione dei meccanismi ossidativi ed altri ancora [28] un aumento del peptide dell'endotelina I. Le complicanze ostetriche dell'APS sono state attribuite a trombosi dei vasi utero-placentari e ad infarto placentare [29]. Infatti aPL policlonali e monoclonali si sono rivelati capaci di legarsi a fattori plasmatici come la beta2-Glicoproteina I ( $\beta$ 2-GPI) o l'annessina V a livello della superficie dell'endotelio o del trofoblasto alterando così la funzione di queste cellule e producendo una situazione di trombofilia [30, 31]. Tuttavia nella decidua e nella placenta non sempre viene ritrovata trombosi [32, 33]. E' stato infatti dimostrato [34] che gli aPL legandosi al trofoblasto possono indurre una disfunzione che ha come conseguenza un deficit della produzione ormonale e un blocco della proliferazione ed invasione da parte del trofoblasto della parete uterina. Inoltre

recenti studi hanno evidenziato [35, 36] che il danno fetale da aPL avviene attraverso l'attivazione della cascata complementare.

## **LA SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI CATASTROFICA**

È stata inoltre individuata una variante severa dell' APS che si riscontra nell'1% dei pazienti [37] chiamata Sindrome da Antifosfolipidi Catastrofica (CAPS). Essa è caratterizzata da fenomeni tromboembolici a carico di più distretti, con quadro clinico rapidamente ingravescente e gravato da un'elevata mortalità. I criteri diagnostici preliminari per la definizione di CAPS sono stati pubblicati nel 2003 [38] e comprendono:

- 1) Evidenza del coinvolgimento di 3 o più organi, sistemi e/o tessuti;
- 2) Sviluppo delle manifestazioni simultaneamente o in meno di una settimana;
- 3) Conferma istopatologica di occlusione di piccoli vasi in almeno un organo o tessuto;
- 4) Conferma laboratoristica della presenza di anticorpi antifosfolipidi (confermata a distanza di almeno 6 settimane).

La diagnosi può essere:

definita:

- se sono presenti tutti i 4 criteri;

probabile:

- se sono presenti tutti i 4 criteri, ma sono coinvolti solo 2 organi, sistemi e/o apparati;
- se sono presenti tutti i 4 criteri ma la positività antifosfolipidica non viene confermata a distanza di almeno 6 settimane a causa del decesso del paziente;
- se sono presenti i criteri 1, 2 e 4;
- se sono presenti i criteri 1, 3 e 4 e si manifesta un terzo evento a più di una settimana, ma a meno di un mese di distanza nonostante l'anticoagulazione.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da questa rara patologia sono raccolte ed analizzate in un Registro Internazionale che elenca oltre 280 casi di

CAPS, dall'analisi dei quali è stato possibile dedurre alcune importanti nozioni di utilità diagnostica e prognostica non altrimenti evidenziabili, vista l'impossibilità di sviluppare studi clinici controllati nel caso di una malattia così rara ed acuta. In particolare si sono registrate le seguenti caratteristiche [39]:

- caratteristiche dei pazienti: per la maggior parte femmine (F:M=2,4:1), età media  $37 \pm 14$  anni;
- fattori precipitanti: la CAPS è frequentemente preceduta da alcune condizioni quali infezioni (21%), neoplasie (7,6 %), interventi chirurgici (7%), sospensione o riduzione del trattamento anticoagulante (7%), farmaci (in particolare estroprogestinici) (5,6%), complicanze ostetriche (5%), riacutizzazioni di LES (3%), traumi (1%). In oltre il 40% dei casi non è però possibile identificare un evento scatenante;
- fenomeni tromboembolici: prevalgono le trombosi dei piccoli vasi, prevalentemente renali, cerebrali, polmonari, cardiaci e cutanei; inoltre frequenti sono gli ictus cerebrali e gli infarti miocardici;
- mortalità: la mortalità è del 50% circa ed è dovuta principalmente a coinvolgimento cerebrale e cardiaco, infezioni e insufficienza multiorgano.

### **Trattamento della Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi**

Il trattamento dell' APS con complicanze trombotiche prevede la prevenzione secondaria della trombosi generalmente con l'anticoagulazione orale "sine termine", talora con l'antiaggregazione piastrinica e più raramente con entrambi i trattamenti antitrombotici. In corso di gravidanza l'APS viene generalmente trattata con l'associazione di anticoagulazione a base di eparina e antiaggregazione piastrinica con acido acetilsalicilico a basso dosaggio (75-100 mg/die). Tuttavia questi protocolli non sono sempre sufficienti; in particolare nella gestione dei pazienti con CAPS il trattamento antitrombotico convenzionale deve essere integrato dall'aggiunta di cortisone, farmaci immunosoppressori e trattamento aferetico che consiste nella rimozione dal circolo degli anticorpi patogeni.

Il trattamento convenzionale inoltre non è sufficiente a permettere la conclusione favorevole nel 20-30% delle gravidanze di pazienti con APS con

impegno ostetrico. Si tratta di pazienti “ad alto rischio”, caratterizzate da una storia di trombosi e da multipla positività antifosfolipidica. In questi casi a rischio di complicanze sia materne che fetali si rendono necessarie terapie aggiuntive quali quelle di tipo aferetico ed in particolare della plasmaferesi (PF) e dell'immunoassorbimento (IA) su colonna.

## **Bibliografia:**

- [1] Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002;346:752-63.
- [2] Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985;11:591–609.
- [3] Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The “primary” antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine(Baltimore)*1989;68:366-74.
- [4] Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome. A European multicenter study of 114 patients. *Am J Med* 1994;96:3–9.
- [5] Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:145-51.
- [6] 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.
- [7] Brandt JT, Triplett DA, Alving B, et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995;74:1185–90.
- [8] Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1737-40.
- [9] Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus* 2002;11:269–75.
- [10] Wong RC, Gillis D, Adelstein S, et al. Consensus guidelines on anti-cardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004;36:63–8.
- [11] Reber G, Tincani A, Sanmarco M, et al. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004;2:1860–2.
- [12] Neville C, Rauch J, Kassis J, et al. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003; 90: 108–15.
- [13] Obermoser G, Bitterlich W, Kunz F, et al. Clinical significance of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:148–53.
- [14] Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, et al. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005;93:1147–52.
- [15] Sailer T, Zoghalmi C, Kurz C, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies are associated with pregnancy loss in women with the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 2006;95:796–801.

- [16] Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T, et al. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost* 2006;96:337-41.
- [17] Garcia CO, Kanbour-Shakir A, Tang H, et al. Induction of experimental antiphospholipid antibody syndrome in PL/5 mice following immunization with beta2GPI. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:118-24.
- [18] Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, et al. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 1999;99:1997-2002.
- [19] Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, et al. E-selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2003;1:843-8.
- [20] Mackworth-Young CG. Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin Exp Immunol* 2004;136:393-401.
- [21] Kornberg A, Renaudineau Y, Blank M, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies and anti-endothelial cell antibodies induce tissue factor in endothelial cells. *Isr Med Assoc J* 2000;2:27-31.
- [22] Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, et al. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998;79:276-81.
- [23] Dunoyer-Geindre S, de Moerloose P, Galve-de Rochemonteix B, et al. Nf-kappaB is an essential intermediate in the activation of endothelial cells by anti-beta (2)-glycoprotein 1 antibodies. *Thromb Haemost* 2002;88:851-7.
- [24] Meroni PL, Raschi E, Testoni A, et al. Statins prevents endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies. *Arthritis Rheum* 2001;44:2870-8.
- [25] Carreras LO, Vermilen JG. Lupus anticoagulant and thrombosis: possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb. Haemost* 1982;48:38-40.
- [26] Ames PR, Tommasino C, Alves J, et al. Antioxidant susceptibility of pathogenic pathways in subjects with antiphospholipid antibodies: a pilot study. *Lupus* 2000;9:688-95.
- [27] Porta C, Buggia I, Bonomi I, et al. Nitrite and nitrate plasma levels, in antiphospholipid antibodies-related conditions and in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1997;78:965-7.
- [28] Atsumi T, Khamashta MA, Haworth RS, et al. Arterial disease and thrombosis in the antiphospholipid syndrome: a pathogenic role for endothelin. *Arthritis Rheum* 1998;41:800-7.
- [29] Mackworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Antiphospholipid syndrome and disease. *Quart J Med* 1989;72:767-77.

- [30] Rand JH, Wu XX, Andree HA, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome. A possible thrombogenic mechanism. 1997 N Engl J Med 337;154-60.
- [31] Rote NS, Chang J, Katsuragawa H, et al. Expression of phosphatidylserine-dependent antigens on the surface of differentiating BeWo human chorioncarcinoma cells. Am J Reprod Immunol 1995;33:114-21.
- [32] Stone S, Khamashta MA, Poston L. Placentation, antiphospholipid syndrome and pregnancy outcome. Lupus. 2001;10:67-74.
- [33] Gharavi AE, Pierangeli SS, Levy RA, Harris EN. Mechanisms of pregnancy loss in antiphospholipid syndrome. Clin Obstet Gynecol. 2001;44:11-9.
- [34] Caruso A, De Carolis S, Di Simone N. Antiphospholipid antibodies in obstetrics: new complexities and sites of action. Hum Reprod Update. 1999;5:267-76.
- [35] Holers VM, Girardi G, Mo L, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. J Exp Med. 2002;195:211-20.
- [36] Girardi G, Berman J, Redecha P, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. J Clin Invest. 2003;112:1644-54.
- [37] 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;46:1019-27.
- [38] Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. Lupus 2003;12:530-4.
- [39] Bucciarelli S, Espinosa G, Cervera R, et al. Mortality in the catastrophic antiphospholipid syndrome: causes of death and prognostic factors in a series of 250 patients. Arthritis Rheum 2006;54:2568-76.

## SCOPI DELLA TESI

Nell'ambito del trattamento dell'APS ad alto rischio ci siamo proposti di valutare la capacità di rimozione degli aPL da parte delle due tecniche aferetiche attualmente più usate ed in particolare della plasmaferesi e dell'immunoassorbimento su colonna. Abbiamo così indagato l'andamento dei livelli plasmatici degli anticorpi aCL e anti- $\beta_2$ GPI di classe IgG in corso di gravidanza in tre pazienti con APS ad alto rischio, sottoposte a un protocollo comprendente il trattamento aferetico e la terapia antitrombotica con eparina e LDA (low dose aspirin).

Allo scopo di contribuire allo studio dei meccanismi attraverso i quali gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI sono coinvolti nelle complicanze trombotiche ed ostetriche che caratterizzano l'APS, abbiamo utilizzato gli anti- $\beta_2$ GPI di classe IgG, rimossi dall'aferesi, per valutare il loro effetto sull'attivazione piastrinica *in vitro*. In particolare gli anti- $\beta_2$ GPI sono stati estratti dal plasma della paziente n.3 dello studio precedente con APS in fase di quiescenza e dal plasma della stessa paziente durante la fase catastrofica della malattia.

Infine sulla base dei risultati ottenuti nel precedente esperimento che hanno attribuito agli anti- $\beta_2$ GPI la capacità di attivare le piastrine, è stato valutato l'effetto *ex vivo* degli aPL sulle piastrine e sull'endotelio attraverso lo studio di alcuni markers di attivazione piastrinica ed endoteliale in campioni plasmatici di pazienti con APS in fase quiescente ed in fase catastrofica di malattia.

# **RIMOZIONE DEGLI ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI IN CORSO DI GRAVIDANZA NELLA SINDROME DA ANTIFOSFOLIPIDI AD ALTO RISCHIO** (Journal of Clinical Apheresis, in press)

## **Introduzione**

Il trattamento dell'APS non è ancora standardizzato, dato l'ampio spettro delle sue manifestazioni, che vanno dalla morbidità ostetrica con poliabortività fino alla presenza di trombosi. In particolare si è evidenziata la necessità di trattamenti differenziati secondo le caratteristiche cliniche e anticorpali.

I pazienti, inoltre, possono presentare un rischio molto variabile di recidiva dell'evento ostetrico o trombotico, in base alle caratteristiche dello stesso, alla presenza di concause e alla possibile rimozione delle stesse (fattori trombofilici associati quali fumo, dislipidemie, diabete, ipertensione, assunzione di estrogeni, ecc.) [1], oltre che al profilo autoanticorpale. Appare pertanto essenziale la stratificazione dei pazienti in classi di rischio e l'impostazione di un regime terapeutico adeguato al caso. La terapia è inoltre dipendente dalla tipologia dell'evento clinico da affrontare; diverso è quindi l'approccio se si tratta della terapia di un evento acuto (trombosi in atto, CAPS), della profilassi a lungo termine di eventi trombotici o del trattamento durante la gravidanza al fine di prevenire complicanze ostetriche.

In particolare, in corso di gravidanza il trattamento va attentamente differenziato sulla base della storia personale di trombosi, del tipo di storia ostetrica e delle caratteristiche autoanticorpali, individuando nella maggior parte dei casi pazienti che potranno beneficiare di regimi terapeutici comprendenti acido acetilsalicilico a basso dosaggio (LDA) e/o eparine a diversa posologia [2].

Tuttavia questi trattamenti non sono sempre sufficienti, soprattutto nel caso di pazienti con pregressi eventi tromboembolici [3] e triplice positività degli anticorpi antifosfolipidi [4, 5]. In questi casi ad elevato rischio sono stati proposti trattamenti di secondo livello quali boli di immunoglobuline endovena (Ig ev) [6], PF [7], IA [8, 9].

La PF consiste nella rimozione di parte del plasma del paziente mediante appositi separatori e nella sua contemporanea sostituzione con fluidi di

rimpiazzo (albumina umana al 4-5% in soluzione fisiologica, plasma o plasma-expanders). Poiché il plasma contiene molteplici sostanze fondamentali, quali fattori coagulanti e anticoagulanti, citochine, ormoni, non è possibile rimuovere eccessivi volumi plasmatici, per non depauperare eccessivamente il paziente, salvo che non si utilizzi come fluido di rimpiazzo il plasma fresco congelato. Tuttavia, nei pazienti con APS il liquido di rimpiazzo ideale è rappresentato dall'albumina umana al 4%, mentre risulta controindicato l'uso di plasma umano perché ricco di fattori della coagulazione che potrebbero in pazienti così trombofilici stimolare ulteriormente la formazione di trombi [10].

Vi sono poi tecniche che permettono la rimozione specifica di sostanze disciolte nel plasma, mediante adsorbimento su colonne composte di materiali in grado di legarle selettivamente, lasciando pertanto invariate le altre componenti plasmatiche quali, ad esempio, sostanze anticoagulanti naturali che nel caso dell'APS possono svolgere un ruolo protettivo fondamentale. Questa tecnica permetterà quindi il trattamento di maggiori volumi plasmatici, rispetto alla semplice PF, proprio perché non vengono rimosse altre sostanze oltre a quella "bersaglio" che è costituita, nel nostro caso, dagli aPL di classe IgG. L'IA avviene generalmente mediante l'utilizzo di [11] proteina A stafilococcica, di IgG policlonali di pecora anti-catene leggere e pesanti delle immunoglobuline G umane o di destran solfato.

Le tecniche di aferesi sono in grado di rimuovere solamente le sostanze intravascolari, pertanto l'utilità del trattamento è massima qualora si miri alla rimozione di sostanze con una bassa distribuzione extravascolare. Inoltre le sostanze dovrebbero essere di peso molecolare sufficientemente elevato (>15 kD) e con un tempo di dimezzamento abbastanza lungo da permettere che l'effetto del trattamento si mantenga nel tempo. Le immunoglobuline presentano caratteristiche adeguate, con volumi di distribuzione extravascolare delle IgG pari a 55% e delle IgM pari a 22% e tempi di dimezzamento di circa 21 e 5 giorni rispettivamente [12]. Qualora le sostanze da rimuovere siano prodotte dall'organismo stesso, quali gli autoanticorpi, l'efficienza del trattamento varierà anche in proporzione alla velocità di sintesi. Sulla base di queste caratteristiche (volume di distribuzione, tempo di dimezzamento, velocità di produzione) sarà necessario stabilire la frequenza delle sedute aferetiche e il volume di plasma da rimuovere o trattare. Nel caso di sostanze quali le immunoglobuline si è

calcolato che la velocità di riequilibrio tra i compartimenti extra- e intravascolare sia piuttosto lenta (circa 1-3% all'ora), pertanto durante una seduta viene rimosso sostanzialmente solo quanto presente nello spazio intravascolare. La loro rimozione segue perciò una cinetica approssimativamente dell'ordine [12], come cioè se avvenisse da un singolo compartimento (intravascolare).

Il trattamento di mantenimento dell'APS, come già accennato, non si basa sull'immunosoppressione né sulla rimozione degli aPL, bensì sulla prevenzione degli eventi trombotici da essi mediati tramite anticoagulazione e/o antiaggregazione. Pertanto i trattamenti aferetici sono utilizzati solo in particolari condizioni, nelle quali la gravità del quadro clinico è tale da richiedere la rimozione rapida degli aPL per contrastarne l'azione [13-15], in particolare nel caso della CAPS, che è stata infatti inserita tra le indicazioni al trattamento con PF nelle Linee Guida della Società Americana di Aferesi [16]. Alcuni autori hanno riportato l'utilizzo delle tecniche aferetiche come trattamento di 2° livello per donne con APS in gravidanza ad alto rischio di complicanze [17-19]. Le poche segnalazioni presenti in letteratura sull'utilizzo dell'IA fanno riferimento principalmente al trattamento di pazienti con APS associata a LES, nei quali la severità della patologia rendeva necessaria una rapida rimozione anticorpale in attesa che i trattamenti immunosoppressivi avessero il tempo di agire. Di conseguenza tale trattamento viene considerato una terapia della fase acuta. Hauser [20] riporta l'effetto dell'IA mediante colonne di Proteina A stafilococcica su 11 pazienti affetti da LES resistenti al trattamento con ciclofosfamide o con controindicazione ad eseguire lo stesso. Il trattamento aferetico ha permesso la sospensione del farmaco dopo un numero variabile di sedute in tutti coloro (10/11) che lo assumevano, pur persistendo il trattamento con prednisone. Lo studio dei livelli anticorpali in questi pazienti ha evidenziato nel caso degli aCL (sia IgG che IgM) e delle IgM totali una percentuale di rimozione maggiore quanto maggiore era il livello anticorpale pre-trattamento.

Vi sono inoltre segnalazioni sull'utilità clinica dell'IA in casi di APS in cui era controindicata la terapia anticoagulante [21] e nel trattamento di gravidanze ad alto rischio di morbidità materno-fetale [8, 22-24].

## Pazienti e Metodi

### Gruppo di studio

Il criterio di inclusione nello studio era la diagnosi di APS primaria secondo i criteri clinici e di laboratorio di classificazione dell'APS [25]. Il criterio di esclusione era la presenza contemporanea di altre malattie.

Sono state seguite tre donne con APS ad alto rischio in gravidanza (n. 1, n. 2, n. 3) che giungevano alla nostra attenzione alla 6<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> settimana di gestazione (sg), rispettivamente. Esse sono state considerate ad alto rischio materno/fetale in considerazione della loro storia clinica di trombosi e della triplice positività per aPL (LA, aCL e anti- $\beta_2$ GPI a titolo medio-alto). Secondo la letteratura [5, 26] e come già accennato, questo tipo di pazienti hanno alta probabilità di fallire la gravidanza se trattate con le sole terapie convenzionali (eparina a basso peso molecolare  $\pm$  LDA). Alle pazienti è stato dunque prescritto un protocollo comprendente nadroparina (90 unità/Kg/due volte al giorno), LDA (100 mg/die) e in aggiunta il trattamento aferetico. Ogni quindici giorni veniva inoltre infuso un bolo di Ig ev (1 g/Kg) in sostituzione delle IgG sieriche sottratte dall'aferesi. La storia ostetrica, le caratteristiche cliniche e di laboratorio delle tre pazienti sono riportate nelle Tabelle 1 e 2, rispettivamente.

**Tabella 1: Storie cliniche vascolari e ostetriche delle tre pazienti affette da APS primaria ad alto rischio**

Pazienti	Trombosi vascolari	Morbilità ostetrica pregressa	Terapie
1	Microangiopatia trombotica renale, ictus ischemico, valvulopatia cardiaca	Due perdite fetali (17 <sup>a</sup> e 24 <sup>a</sup> sg)	No
		Parto cesareo pretermine (35 <sup>a</sup> sg). Neonato (2420 g)	Nadroparina due volte al giorno, LDA*, PF* e Ig ev*
2	Microangiopatia trombotica	Perdita fetale (24 <sup>a</sup> sg) e Sindrome HELLP*	Nadroparina una volta al giorno
3	Ricorrenti trombosi venose profonde	Perdita fetale (11 <sup>a</sup> sg)	Nadroparina due volte al giorno e PF*
		Parto cesareo pretermine (36 <sup>a</sup> sg). Neonato (2375 g)	Nadroparina due volte al giorno, LDA* e IA*.

\* LDA = aspirina a basso dosaggio, PF = plasmaferesi, Ig ev = immunoglobuline endovena, HELLP = haemolysis, liver enzymes, low platelets, IA = immunoadsorbimento.

**Tabella 2: Profilo antifosfolipidico, trattamento e outcome ostetrico delle tre pazienti affette da APS primaria ad alto rischio**

Pazienti	1	2	3
<b>Età (anni)</b>	37	29	35
<b>aPL (presenza e livello)</b>	IgG aCL* alto, IgG anti-β2GPI* alto, LA* positivo	IgG aCL* medio, IgG anti-β2GPI* medio, LA* positivo	IgG aCL* alto, IgG anti-β2GPI* alto, LA* positivo
<b>Terapie</b>	Nadroparina due volte al giorno, LDA*, PF*	Nadroparina due volte al giorno, LDA*, PF*	Nadroparina due volte al giorno, LDA*, IA*
<b>Outcome ostetrico</b>			
<b>Parto (sg, tipo)</b>	31 <sup>^</sup> sg, Taglio cesareo	36 <sup>^</sup> sg, Taglio cesareo	35 <sup>^</sup> sg, Taglio cesareo
<b>Motivo per parto pretermine</b>	Ritardo di crescita	Severa ipertensione	Microangiopatia trombotica
<b>Complicazioni materne</b>	Diabete gestazionale	Nessuna	CAPS* nel puerperio
<b>Peso placenta</b>	500 g	342 g	339 g
<b>Patologia Placenta</b>	Normale	Trombosi intervillose	Infarti, trombosi, vasculiti
<b>Sesso neonato</b>	M	M	F
<b>Peso nascita neonato</b>	1580 g	2400 g	2130 g
<b>Degenza in terapia intensiva</b>	30 giorni	7 giorni	5 giorni
<b>Apgar Score (1<sup>st</sup> - 5<sup>th</sup> minuto)</b>	6-8/10	9-10/10	8-8/10

\* aCL = anticorpi anticardiolipina, anti-β<sub>2</sub>GPI = anticorpi anti-β<sub>2</sub>glicoproteina I, LA = lupus anticoagulant, PF = plasmaferesi, LDA = aspirina a basso dosaggio, IA = immunoadsorbimento, CAPS = sindrome da antifosfolipidi catastrofica.

Le pazienti n. 1 e n. 2 sono state sottoposte a PF, mentre la paziente n. 3 è stata trattata con IA, data una precedente gravidanza con esito negativo nonostante il protocollo comprendesse la PF.

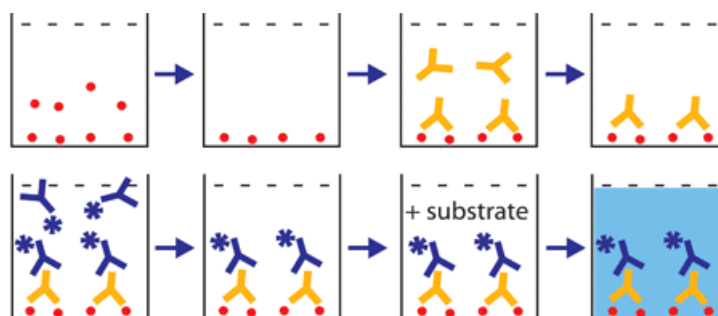
Nella prima settimana di trattamento sono state effettuate tre sedute aferetiche a giorni alterni per ciascuna paziente, successivamente le sessioni sono state programmate a cadenza settimanale fino al giorno prima della data del parto programmato. Come liquido di rimpiazzo è stata usata albumina al 4% in soluzione fisiologica.

I prelievi di sangue venoso sono stati effettuati 10 min' prima e immediatamente dopo ogni seduta aferetica in tutte e tre le pazienti per un totale di 184 campioni. Il sangue è stato raccolto in provette vacutainer senza additivi e successivamente centrifugato a temperatura ambiente per 10 min' a 3000 g. I campioni dopo essere stati sierati, sono stati congelati e conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

### **Determinazione degli aPL**

Gli anticorpi aCL sono stati dosati utilizzando un test ELISA "home made" (Figura 1) seguendo i requisiti minimi proposti dal Forum Europeo degli aPL [27, 28]. In accordo con le raccomandazioni sono stati utilizzati come controlli interni gli anticorpi monoclonali HCAL e EY2C9 [29] rispettivamente per aCL IgG e aCL IgM. Inoltre, per costruire la curva di calibrazione sono stati usati come standards LAPL GM-200 calibrators (Louisville APL Diagnostics, Inc., Doraville, GA, USA) [30]. È stato considerato come cut-off per i livelli medio/alti il 99° percentile ottenuto testando 100 soggetti sani di controllo (80 donne e 20 uomini di età media 34 anni).

Gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI sono stati testati in accordo con le proposte del gruppo di standardizzazione del Forum Europeo sugli anticorpi antifosfolipidi [28]. I risultati sono stati espressi come unità arbitrarie utilizzando una curva a otto punti di diluizione ottenuta da un pool di campioni positivi calibrati sugli anticorpi monoclonali di Koike (HCAL per gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI IgG e EY2C9 per gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI IgM) [29]. È stato considerato come cut-off per i livelli medio/alti il 99° percentile ottenuto testando i soggetti sani di controllo.



**Figura 1: Schema del metodo ELISA**

### ***Analisi statistica***

I livelli anticorpali dei campioni raccolti prima e dopo i trattamenti aferetici sono stati confrontati usando il test non parametrico di Wilcoxon. Per determinare i “trend” anticorpali durante il corso delle gravidanze è stato usato il coefficiente di correlazione di Spearman. Infine i dati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM (standard error of mean) calcolando l’intervallo di confidenza al 95%. Sono stati considerati significativi i valori di  $p < 0,05$ .

## **RISULTATI**

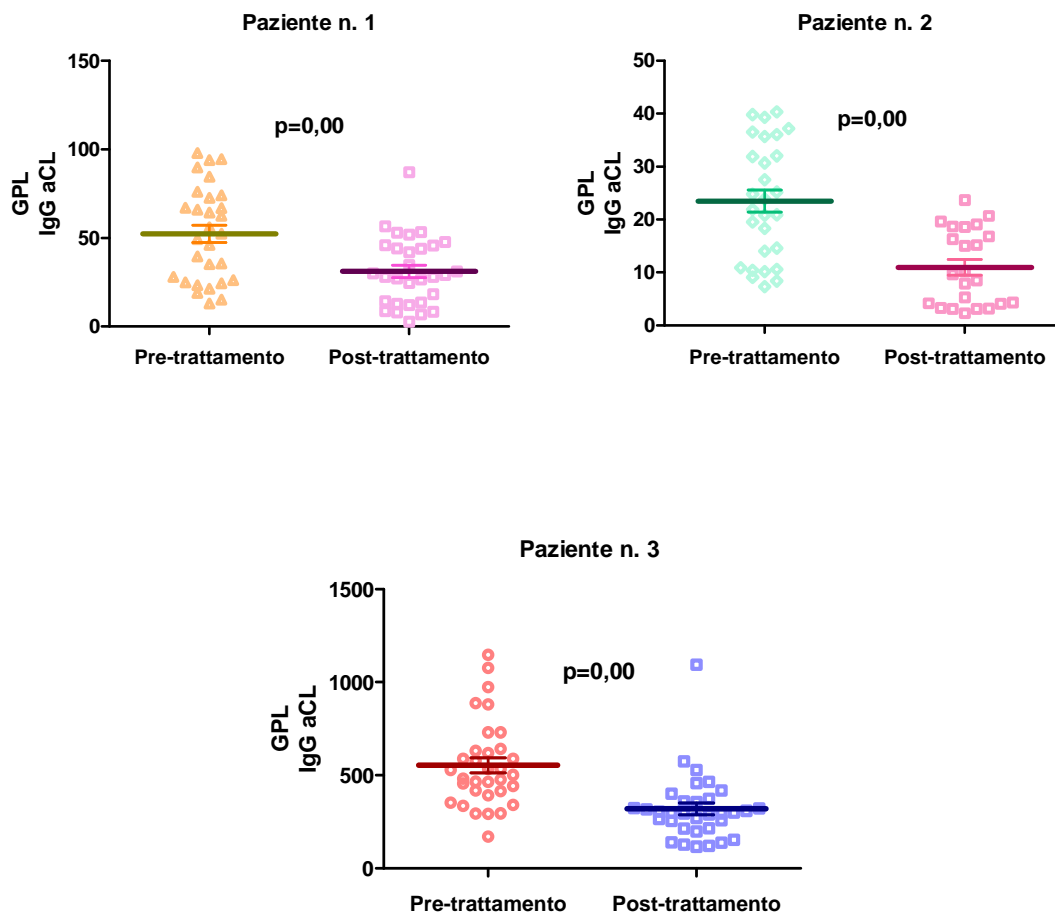
### ***Confronto tra i livelli anticorpali prima e dopo le sedute aferetiche***

Nelle pazienti n. 1 e n. 3 i livelli sierici basali degli aCL IgG e anti- $\beta_2$ GPI IgG erano a titolo alto. La paziente n. 3, invece, presentava dei livelli di partenza a titolo medio per entrambi gli anticorpi.

Confrontando le concentrazioni medie degli aCL IgG nei 30, 29, 33 campioni pre-trattamento, rispettivamente delle pazienti n. 1, n. 2 e n. 3 con quelle dello stesso numero di campioni post-trattamento abbiamo ottenuto per ciascuna paziente i seguenti risultati riportati nella Tabella 3 e illustrati nella Figura 2.

**Tabella 3: Livelli sierici medi degli anticorpi aCL IgG nei campioni raccolti prima e dopo le sedute aferetiche.**

	<b>aCL IgG PRE-trattamento (media <math>\pm</math> SEM)</b>	<b>aCL IgG POST-trattamento (media <math>\pm</math> SEM)</b>	<b>p value</b>
<b>Paziente n. 1</b>	52,13 $\pm$ 2,76 GPL	31,60 $\pm$ 2,40 GPL	0,00
<b>Paziente n. 2</b>	23,34 $\pm$ 1,37 GPL	9,90 $\pm$ 0,75 GPL	0,00
<b>Paziente n. 3</b>	553,79 $\pm$ 40,16 GPL	320,05 $\pm$ 31,3 GPL	0,00

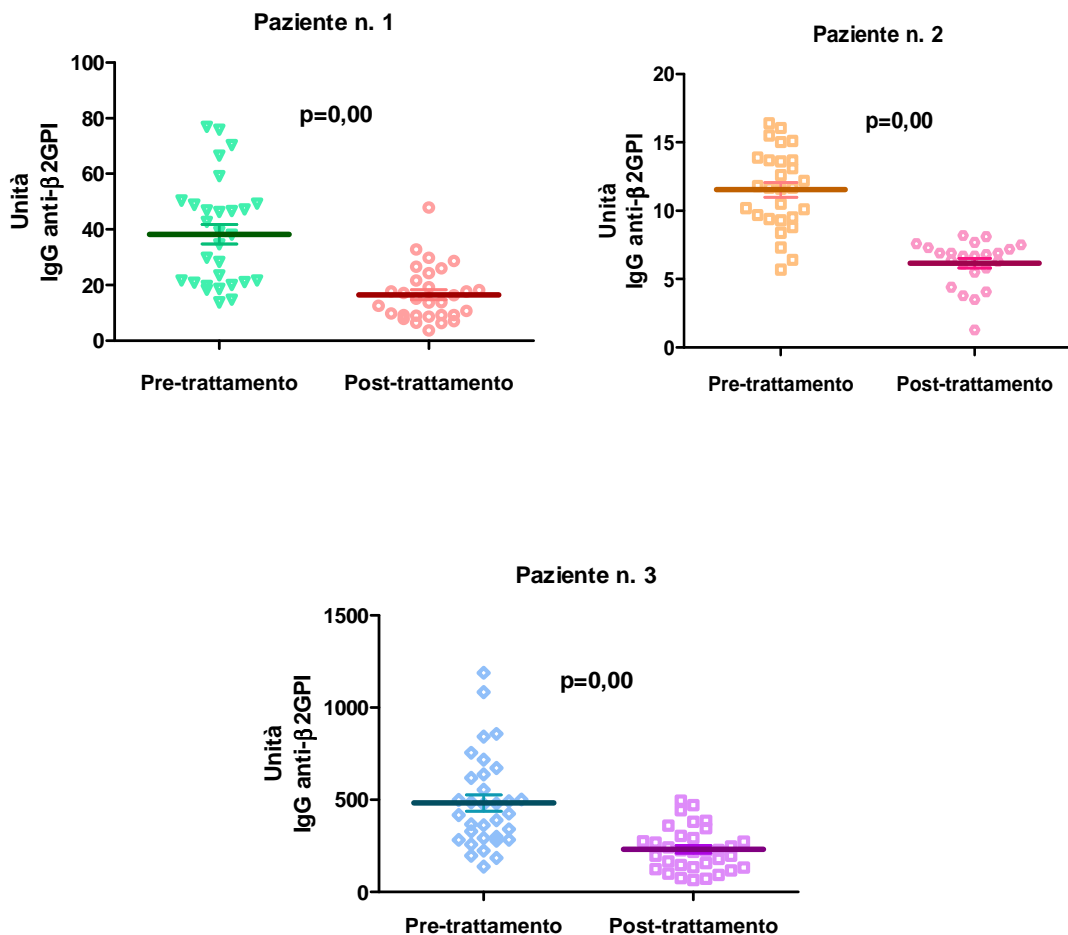


**Figura 2: Confronto dei livelli medi degli anticorpi aCL IgG pre- e post-trattamento nelle pazienti n.1, n.2 e n.3.**

Confrontando le concentrazioni medie degli anti- $\beta_2$ GPI IgG nei 30, 29, 33 campioni pre-trattamento, rispettivamente delle pazienti n. 1, n. 2 e n. 3 con quelle dello stesso numero di campioni post-trattamento abbiamo ottenuto per ciascuna paziente i seguenti risultati riportati nella Tabella 4 e illustrati nella Figura 3.

**Tabella 4: Livelli sierici medi degli anticorpi anti-β<sub>2</sub>GPI IgG nei campioni raccolti prima e dopo le sedute aferetiche.**

	anti-β <sub>2</sub> GPI IgG PRE-trattamento (media ± SEM)	anti-β <sub>2</sub> GPI IgG POST-trattamento (media ± SEM)	p value
Paziente n. 1	38,32 ± 3,51 U	16,83 ± 1,83 U	0,00
Paziente n. 2	12,29 ± 0,52 U	6,25 ± 0,36 U	0,00
Paziente n. 3	483,25 ± 43,86 U	232,10 ± 20,5 U	0,00

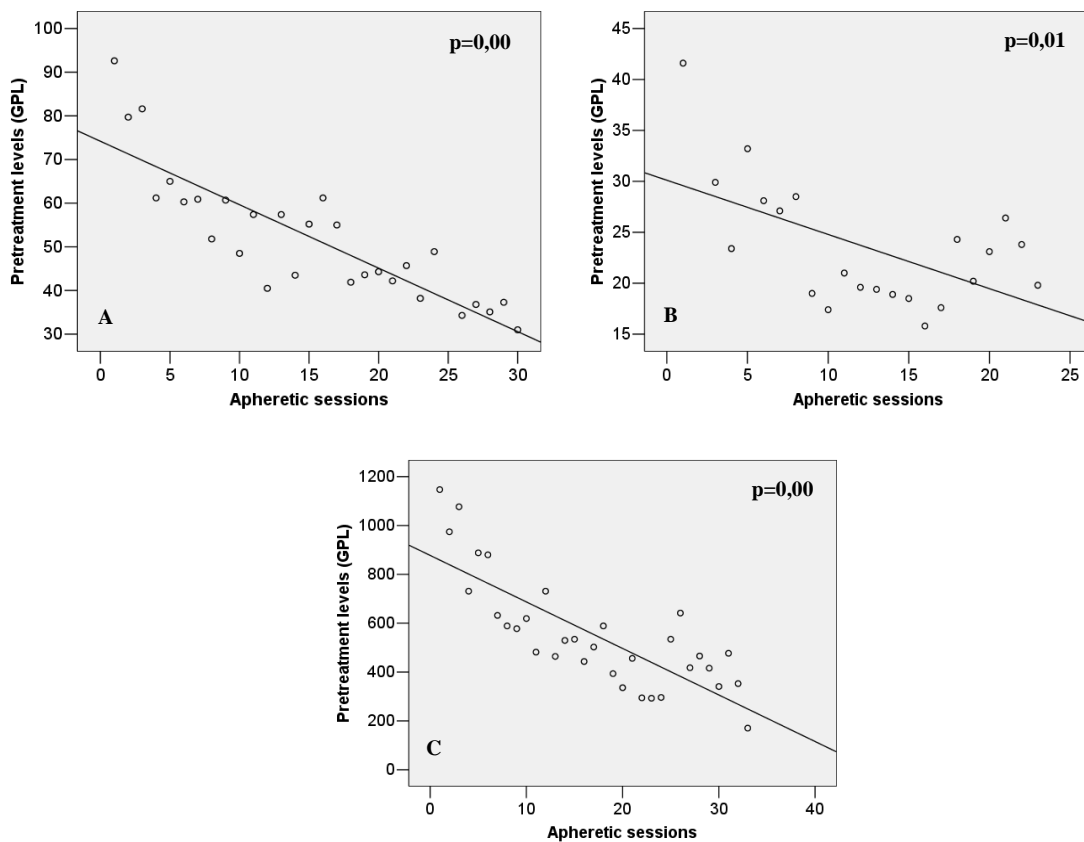


**Figura 3: Confronto dei livelli sierici medi degli anticorpi anti-β<sub>2</sub>GPI IgG pre- e post-trattamento nelle pazienti n.1, n.2 e n.3.**

### **Andamento dei livelli anticorpali nel corso delle gravidanze**

Abbiamo studiato l'andamento dei livelli pre-trattamento per ciascun anticorpo nel corso delle tre gravidanze.

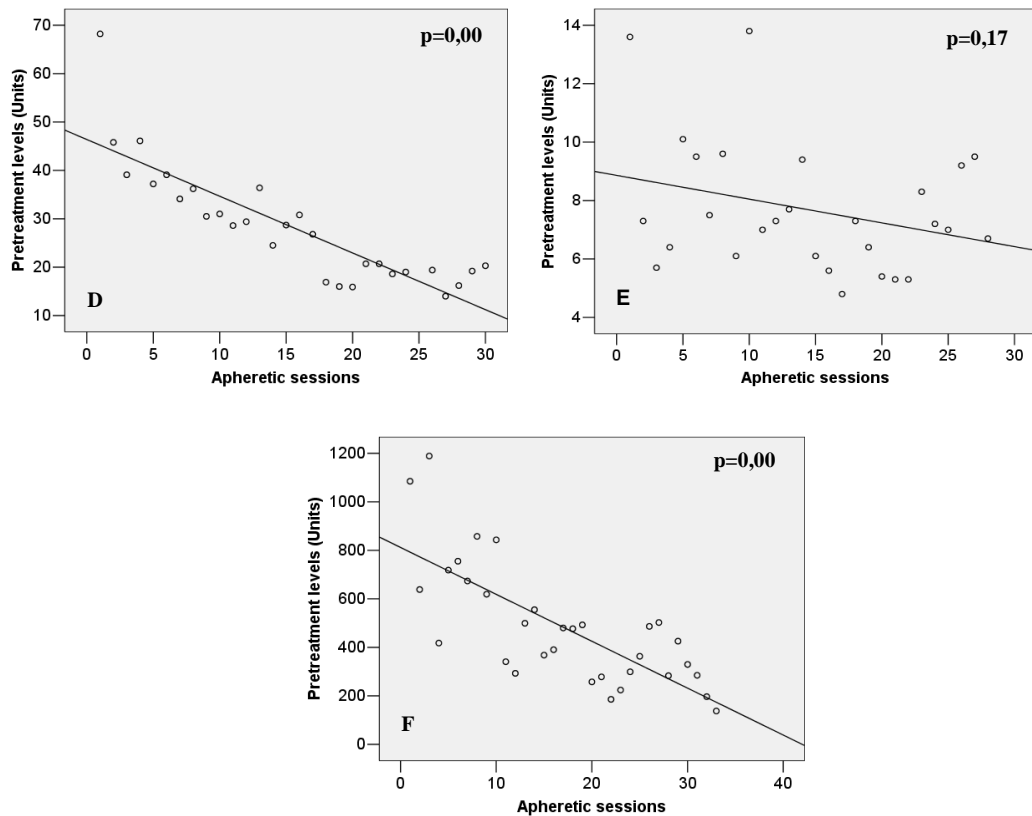
I "trend" dei livelli sierici degli aCL IgG sono risultati significativamente decrescenti in tutte e tre le pazienti ( $p=0,00$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,00$ , rispettivamente) nel corso delle gravidanze, come illustrato nella Figure 4.



**Figura 4: Andamento dei livelli pre-trattamento degli anticorpi aCL IgG nella paziente (n.1) con titolo anticorpale basale alto e trattata con PF (A), nella paziente (n.2) con titolo anticorpale basale medio e trattata con PF (B), e nella paziente (n.3) con titolo anticorpale basale alto e trattata con IA (C).**

I "trend" dei livelli sierici degli anti- $\beta_2$ GPI IgG sono risultati significativamente decrescenti nelle pazienti n. 1 e n. 3 ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$ , rispettivamente) nel corso delle gravidanze. Anche la paziente n. 2 ha mostrato un "trend" decrescente dei

livelli dell'anticorpo senza tuttavia raggiungere la significatività. I risultati vengono illustrati in Figura 5.



**Figura 5: Andamento dei livelli pre-trattamento degli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI IgG nella paziente (n.1) con titolo anticorpale basale alto e trattata con PF (D), nella paziente (n.2) con titolo anticorpale basale medio e trattata con PF (E), e nella paziente (n.3) con titolo anticorpale basale alto e trattata con IA (F).**

## DISCUSSIONE

Nonostante sia raro l'utilizzo della PF e dell'IA nelle pazienti con APS in corso di gravidanza, la letteratura [8, 9, 31] e i dati qui presentati, dimostrano che questi trattamenti non causano effetti collaterali alla madre e al feto, e possono quindi essere considerati delle opzioni terapeutiche valide nelle gravidanze ad alto rischio.

Considerando il ridotto numero di casi trattati in questo studio, è difficile confrontare l'efficacia della PF rispetto a quella dell'IA. L'outcome gravidico più favorevole si è osservato nelle pazienti n. 2 e n. 3 trattate con PF ed IA, rispettivamente. Tuttavia, il caso n.3 ha sviluppato una CAPS durante il puerperio, un periodo considerato già di per sé ad alto rischio per questo tipo di complicanza nell'APS.

I risultati ottenuti hanno dimostrato, in particolare, che le procedure di PF ed IA sono efficaci nel ridurre i livelli medi degli aCL IgG e anti- $\beta_2$ GPI IgG durante una singola seduta.

L'altro dato interessante emerso da questi studi è che nel corso delle tre gravidanze i valori anticorpali hanno avuto un andamento significativamente decrescente fino alla data del parto.

Inoltre l'inizio precoce del trattamento aferetico in gravidanza ha probabilmente permesso di contrastare l'azione patogena degli aPL, che agirebbero non solo con meccanismo trombotico ma anche interferendo con l'attecchimento del trofoblasto e con il processo di placentazione nelle fasi iniziali della gravidanza [32, 33]. Infatti, nei casi studiati, i trattamenti sono iniziati appena le pazienti avevano il test di gravidanza positivo (6<sup>^</sup>, 6<sup>^</sup> e 5<sup>^</sup> sg) e tutte e tre le donne hanno avuto un esito positivo della gravidanza.

Il timing di aferesi utilizzato ha permesso che l'inevitabile ripristino della concentrazione plasmatica degli aPL, dovuto alla sintesi di nuovi autoanticorpi e/o alla loro redistribuzione nel compartimento vascolare, non raggiungesse mai i valori iniziali.

I livelli degli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI IgG riscontrati nei campioni della paziente n. 2 si sono ridotti nel corso della gravidanza, ma il loro calo non ha raggiunto la significatività. Questo dato è in accordo con altri autori [20] che hanno dimostrato che più i livelli anticorpali pre-trattamento sono elevati, maggiore è l'efficacia delle procedure aferetiche nella rimozione degli anticorpi.

Alla conclusione di questo studio dobbiamo tuttavia riconoscere che l'utilità clinica del monitoraggio dei livelli degli aPL durante questo tipo di trattamenti in gravidanza rimane da dimostrare.

## Bibliografia

- [1] Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers. A multicentre, retrospective follow-up study. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:1025-31.
- [2] Tincani A, Branch W, Levy RA, et al. Treatment of pregnant patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003;12:524-9.
- [3] Stone S, Hunt BJ, Seed PT, et al. Longitudinal evaluation of markers of endothelial cell dysfunction and hemostasis in treated antiphospholipid syndrome and in healthy pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:454-60.
- [4] Sailer T, Zoghalmi C, Kurz C, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies are associated with pregnancy loss in women with the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 2006; 95: 796–801.
- [5] Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T, et al. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost* 2006;96:337-41.
- [6] Branch DW, Peaceman AM, Druzin M, et al. A multicenter, placebo-controlled pilot study of intravenous immune globulin treatment of antiphospholipid syndrome during pregnancy. The Pregnancy Loss Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:122-7.
- [7] Erkan D, Lockshin MD. New treatments for antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 2006;32:129-48.
- [8] Kobayashi S, Tamura N, Tsuda H, et al. Immunoabsorbent plasmapheresis for a patient with antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:399-401.
- [9] Bortolati M, Marson P, Chiarelli S, et al. Case reports of the use of immunoabsorption or plasma exchange in high-risk pregnancies of women with antiphospholipid syndrome. *Ther Apher Dial* 2009;1:157-160.
- [10] Marson P, Bagatella P, Bortolati M, et al. Plasma exchange for the management of the catastrophic antiphospholipid syndrome: importance of the type of fluid replacement. *J Intern Med*. 2008 Aug;264(2):201-3.
- [11] Yang K, Kenpe K, Yamaji K, et al. Plasma adsorption in critical care. *Ther Apher* 2002;6:184-8.
- [12] Kaplan AA: Towards a rational prescription of plasma exchange: The kinetics of immunoglobulin removal. *Semin Dial* 1992;5:227-229.
- [13] Satomi A, Koiwa F, Ogata H, et al. Plasma-exchange for thrombocytopenia in antiphospholipid syndrome: a case report. *Ther Apher* 1998; 2:157-9.
- [14] Dornan RIP. Acute postoperative biventricular failure associated with antiphospholipid antibody syndrome. *Br J Anaesth* 2004; 92:748-54.
- [15] Sachais BS, Thompson JE, Strobl FJ. Use of plasma exchange, steroids, and anticoagulation in a patient with multiple arterial thromboses and IgM anticardiolipin antibodies. *J Clin Apher*. 2002;17:138-9.
- [16] Szczepiorkowski ZM, Winters JL, Bandarenko N, et al., Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice--evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apher*. 2010;25(3):83-177.

- [17] Frampton G, Cameron JS, Thom M, et al. Successful removal of antiphospholipid antibody during pregnancy using plasma-exchange and low-dose prednisone. *Lancet* 1987; ii:1023-4.
- [18] Roberts G, Gordon MM, Porter D, et al. Acute renal failure complicating HELLP syndrome, SLE and antiphospholipid syndrome: successful outcome using plasma-exchange therapy. *Lupus* 2003; 12:251-7.
- [19] El Haieg DO, Zanati MF, El Foual FM. Plasmapheresis and pregnancy outcome in patients with antiphospholipid syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;99:236-41.
- [20] Hauser AC, Hauser L, Pabinger-Fasching I, et al. The course of anticardiolipin antibody levels under immunoadsorption therapy. *Am J Kidney Dis* 2005;46:446-54.
- [21] Yagi K, Kawano M, Haraki T, et al. Long-term efficacy of immunoadsorbent plasmapheresis in a patient with Budd-Chiari syndrome: case report with nine year follow-up. *Lupus* 2004; 13:135-8.
- [22] Maeshima E, Yamada Y, Kodama N, et al. Successful pregnancy and delivery in a case of systemic lupus erythematosus treated with immunoadsorption therapy and cyclosporin A. *Scand J Rheumatol* 1999; 28:54-7.
- [23] Nakamura Y, Yoshida K, Itoh S, et al. Immunoadsorption plasmapheresis as a treatment for pregnancy complicated by systemic lupus erythematosus with positive antiphospholipid antibodies. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:307-11.
- [24] Dittrich E, Schmaldienst S, Langer M, et al. Immunoadsorption and plasma exchange in pregnancy. *Kidney Blood Press Res* 2002; 25:232-9.
- [25] 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.
- [26] Bramham K, Hunt BJ, Germain S, et al. Pregnancy outcome in different clinical phenotypes of antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010;19(1):58-64.
- [27] Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, et al. Minimal Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004;114:553–558.
- [28] Reber G, Tincani A, Sanmarco M, et al. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1860-1862.
- [29] Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, et al. Beta 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37:1453-61.
- [30] Pierangeli SS, Harris EN. Clinical laboratory testing for the antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta* 2005;357:17-33.
- [31] Ruffatti A, Marson P, Pengo V, et al. Plasma exchange in the management of high risk pregnant patients with primary antiphospholipid syndrome. A report of 9 cases and a review of the literature. *Autoimmun Rev* 2007;6:196-202.
- [32] D'Ippolito S, Di Simone N, Di Nicuolo F, et al. Antiphospholipid antibodies: effects on trophoblast and endothelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:150-8.
- [33] Salmon JE, Girardi G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: A disorder of inflammation. *J Reprod Immunol* 2008;77:51-56.

**EFFETTO *IN VITRO* DEGLI ANTICORPI ANTI- $\beta_2$ GLICOPROTEINA I  
SULL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA.  
CONFRONTO TRA ANTICORPI DELLA FASE QUIESCENTE E  
DELLA FASE CATASTROFICA (Reumatismo, in press)**

## **Introduzione**

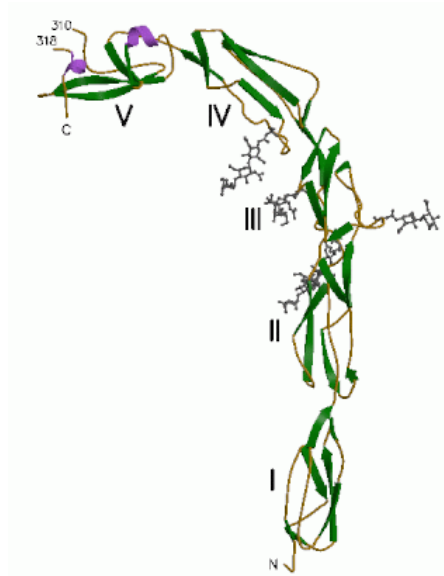
### ***$\beta_2$ GPI e anticorpi anti- $\beta_2$ GPI***

Gli aPL potrebbero avere un ruolo patogenetico nell'APS, con un meccanismo non ancora del tutto chiaro [1]. Gli antigeni-bersaglio degli aPL sono complessi costituiti da fosfolipidi e proteine plasmatiche espresse o che si legano alla superficie delle cellule endoteliali vascolari o delle piastrine [2], quali la protrombina, l'annessina V e soprattutto la  $\beta_2$ GPI [3, 4]. Quest'ultima è una glicoproteina plasmatica, di probabile origine epatica e peso molecolare di 50 KD. Essa ha una concentrazione plasmatica di 4  $\mu$ M (circa 0,2 mg/ml) e per il 40% è complessata alle lipoproteine. È costituita da 326 aminoacidi, organizzati in 5 domini (Figura 1). Quattro sono composti da circa 60 aminoacidi (con maggior prevalenza di triptofano, prolina e cisteina), mentre il quinto dominio è costituito da 82 aminoacidi; quest'ultimo sembra essere implicato nel legame della proteina con le superfici fosfolipidiche anioniche [5, 6]. La proteina riconosce anche altre molecole anioniche, quali il caolino e l'eparina.

"In vitro" si comporta come un inibitore fisiologico della coagulazione, poiché inibisce l'attivazione da contatto, l'attività protrombinasica delle piastrine e l'aggregazione piastrinica indotta da ADP. Nonostante queste proprietà, il suo ruolo fisiologico è ancora poco conosciuto, infatti la sua carenza non sembra rappresentare un fattore di rischio trombotico.

Recentemente alcuni autori hanno dimostrato che la  $\beta_2$ GPI esiste in due diverse conformazioni: una forma plasmatica circolare inattiva e una forma aperta attiva legata alle superfici. In questa forma attiva, un epitopo criptico del dominio I, viene esposto, rendendo gli anticorpi capaci di legarsi e formare un complesso  $\beta_2$ GPI-anticorpo [7, 8]. Inoltre la dimerizzazione della  $\beta_2$ GPI, causata dagli aPL, provoca un cambiamento conformazionale nella molecola e aumenta grandemente la sua affinità per i fosfolipidi anionici e per diversi recettori

cellulari, rendendola capace di interagire con le cellule. Viene ipotizzato che questo meccanismo sia alla base delle manifestazioni cliniche osservate nell'APS [9].



**Figura 1: Beta2 Glicoproteina I.**

### ***Le piastrine***

Le piastrine svolgono un ruolo fondamentale nell'emostasi primaria: in seguito a lesione della parete vascolare, vengono a contatto con il sottoendotelio e vanno incontro ad attivazione formando in pochi secondi un tappo emostatico in grado di arrestare l'emorragia. In condizioni normali le piastrine circolano come elementi isolati nel sangue in uno stato di riposo. I vasi sanguigni integri presentano infatti internamente un sottile rivestimento continuo di cellule endoteliali che impedisce il contatto delle piastrine con il sottoendotelio durante il normale flusso ematico.

L'attivazione delle piastrine può essere indotta da alterazioni endoteliali dovute non solo a traumi ma anche a disfunzioni che alterano la normale funzione o la struttura dell'endotelio e quindi la sua attività antitrombogenica.

Sembra che le piastrine abbiano un ruolo chiave nella patogenesi delle trombosi arteriose. E' stato dimostrato che sono attivate dalla  $\beta_2$ GPI dimerica, attraverso il legame con due recettori piastrinici: la glicoproteina Iba e l'apolipoproteina E recettore 2' [10-13]. Inoltre, in letteratura è riportato che

l'evento trombotico potrebbe essere scatenato dall'azione degli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI mediata dalla dimerizzazione della  $\beta_2$ GPI indotta dai tetrameri del fattore piastrinico 4 (PF4) [14]. La dimerizzazione avverrebbe principalmente in presenza degli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI i quali, legandosi ai complessi PF4/ $\beta_2$ GPI, attivano le piastrine.

Gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI, *in vitro*, sembrano essere in grado di potenziare l'attivazione piastrinica indotta dalla trombina, inducendo così l'aumento della produzione di trombossano A2 [15]. Queste scoperte suggeriscono che l'attivazione piastrinica indotta dagli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI potrebbe contribuire alla tendenza protrombotica propria dell'APS.

In seguito ad attivazione le piastrine esprimono sulla membrana plasmatica molecole che mediano sia l'adesione con i leucociti che l'attivazione endoteliale (P-selettina, CD40L) [16, 17]. Esse inoltre rilasciano mediatori che vanno ad attivare le altre piastrine circostanti (MMP-2) [18, 19] o altri tipi cellulari (sCD40L) [20] estendendo così il processo di attivazione.

Inoltre le piastrine attivate rilasciano microparticelle ad elevata attività procoagulante i cui livelli aumentano nei pazienti ad alto rischio trombotico.

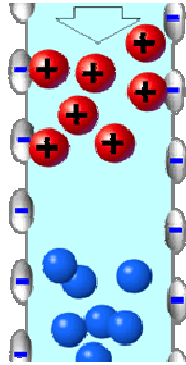
## **MATERIALI E METODI**

### ***Purificazione dell'antigene $\beta_2$ GPI***

L'antigene  $\beta_2$ GPI è stato purificato da un pool di plasmi di donatori abituali di sangue. A 300 ml di plasma sono stati aggiunti 8,2 ml di acido perclorico HClO<sub>4</sub> al 65%. L'addizione lenta e sotto agitazione magnetica ha permesso la precipitazione del 90% delle proteine contenute nel plasma umano. La successiva centrifugazione (10000 g per 15 min a temperatura ambiente) e il recupero del surnatante ha garantito il recupero della  $\beta_2$ GPI. Il surnatante raccolto è stato tamponato a pH 8.0 con una soluzione satura di carbonato di sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e dializzato in 5 litri di un tampone di cloruro di sodio (NaCl) 0,03 M con tre cambiamenti di tampone ogni 5 ore. Tutte le operazioni sopra descritte sono state effettuate a +4°C. La dialisi ha permesso di purificare il campione da eventuali sostanze interferenti con la purificazione stessa e di ottenere un pH di 8,0 con veniva eluita la prima colonna cromatografica il giorno

successivo. E' stata eseguita una prima cromatografia con una colonna di eparina che lega la  $\beta_2$ GPI con un legame ionico, ed è stata inserita in un Gradifrac System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

Il principio su cui si basa questo tipo di cromatografia è l'attrazione che si instaura tra molecole cariche di segno opposto (Figura 2).



**Figura 2: Cromatografia a scambio ionico**

Le separazioni a scambio ionico avvengono in colonne impaccate con una resina scambiatrice di ioni. Esistono due tipi di resine: gli scambiatori anionici e gli scambiatori cationici. Questi ultimi possiedono gruppi carichi negativamente e attraggono, quindi, molecole cariche positivamente. L'eluizione selettiva delle molecole legate alla resina si ottiene variando il pH o la forza ionica o entrambi, oppure mediante l'eluizione di affinità.

Il Gradifrac è un dispositivo economico e versatile utilizzato in cromatografia per la purificazione di proteine, peptidi e altre biomolecole. E' indicato soprattutto per quelle applicazioni che richiedono l'eluizione tramite gradiente. E' dotato di una pompa ed un sistema di trasporto dei tamponi che creano il gradiente. Ad esso si collega la colonna da utilizzare e permette di raccogliere le frazioni desiderate. Il Gradifrac è anche dotato di un sistema che registra il picco del materiale separato attraverso la lettura diretta con la lampada UV della concentrazione della sostanza eluita.

La colonna è stata equilibrata con circa 300 ml di una soluzione NaCl 0,03 M. Il programma è stato impostato per la cromatografia selezionando la velocità del flusso trasportatore e il tempo per costruire il gradiente. La proteina è stata eluita utilizzando una soluzione di NaCl 0,35 M ed è stata dializzata con un tampone NaCl 0,15 M (3 cambi, l'ultimo overnight, a +4°C). E' stata eseguita

una seconda cromatografia con la colonna di eparina utilizzando come soluzione di lavaggio NaCl 0,15 M e come soluzione di eluizione NaCl 0,35M. Le frazioni raccolte, dializzate con un tampone acetato 0,05 M a pH 4,8, sono state fatte passare attraverso una colonna di carbossimetilcellulosa (CM-cellulosa). Dopo un'ora di incubazione sono state raccolte le frazioni con densità ottica a 280 nm più elevate e si è dilalizzato con un tampone TRIS a pH 7,4. Il giorno successivo è stata letta la densità ottica a 280 nm. La qualità e la purezza dell'antigene sono state valutate con un elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) (Figura 3).

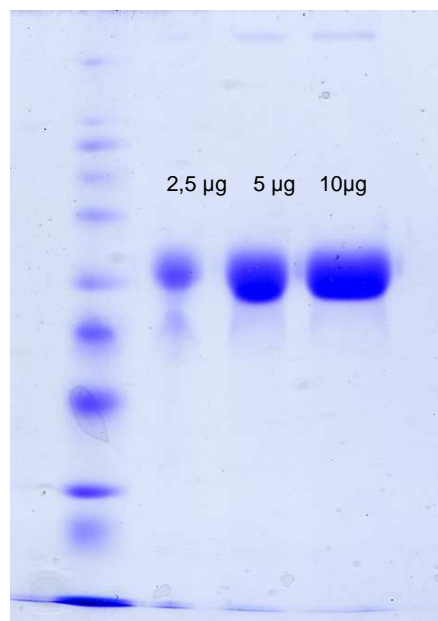


Figura 3: Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato.

### ***Estrazione degli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI***

Gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI sono stati isolati tramite cromatografia di affinità [21], dal plasma della paziente n.3 dello studio precedente, di 35 anni con APS in fase di quiescenza e da plasma della stessa paziente in fase catastrofica di malattia. L'APS era stata diagnosticata come forma primaria all'età di 21 anni sulla base di trombosi venose recidivanti agli arti inferiori associate alla presenza nel sangue di anti- $\beta_2$ GPI e aCL di classe IgG ad alto titolo (1085 U e 1147 GPL, rispettivamente) e alla positività per lupus anticoagulant. La fase catastrofica della malattia si è sviluppata subito dopo il parto ed era caratterizzata da

trombosi nel microcircolo delle estremità degli arti superiori e inferiori e da segni di insufficienza epatica e renale. Era presente iperpiressia, piastrinopenia e vi erano segni di attivazione della coagulazione come consumo di antitrombina III ed elevazione del d-dimero. All'esordio della fase catastrofica il pattern antifosfolipidico era costituito ancora dalla triplice positività ed il titolo degli anti- $\beta_2$ GPI e aCL di classe IgG era ancora alto, ma inferiore a quello della fase quiescente (139 U e 221 GPL, rispettivamente) a causa della rimozione degli aPL dal circolo da parte dell'intenso trattamento aferetico praticato nel corso della gravidanza.

Il plasma filtrato è stato caricato in una colonna di polipropilene (HiTrap NHS-activated, GE Healthcare, Sweden) coattata con  $\beta_2$ GPI umana precedentemente purificata (5 mg di proteina per ml di polipropilene). Dopo un'ora di incubazione e numerosi lavaggi con tampone fosfato salino (PBS), gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI sono stati eluiti dalla colonna con un tampone glicina 0,1 M e NaCl 0,5 M a pH 2,8 e immediatamente tamponati con una soluzione Tris 1 M, pH 8,4. La specificità antigenica degli anticorpi così purificati è stata verificata tramite test ELISA "home made". L'efficacia del binding con la  $\beta_2$ GPI degli anticorpi purificati è stata valutata usando 8 differenti concentrazioni anticorpali ed è stato osservato che il binding migliore veniva ottenuto con una concentrazione di 5 e 25  $\mu$ g/ml.

### ***Studio dell'espressione piastrinica di P-selettina mediante citometria a flusso***

Sono stati effettuati a donatori sani prelievi di sangue venoso che è stato raccolto in provette vacutainer in presenza di citrato di sodio 1:10 e poi centrifugato a 150 g per 10 min al fine di ottenere plasma ricco di piastrine (PRP). Le piastrine sono state isolate tramite gel filtrazione del PRP in colonne di Sepharose 2B (Sigma Chemical, St Louis, USA) equilibrate con un tampone Tyrode (3,1 mM HEPES, 4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5,6 mM dextrose, and 0,1% BSA, pH 7,4). Le piastrine così ottenute (100.000/ $\mu$ l) sono state incubate con l'antigene  $\beta_2$ GPI (20  $\mu$ g/ml) per 30 min' a 37 °C e con gli anti- $\beta_2$ GPI a due diverse concentrazioni (5 e 25  $\mu$ g/ml). Si è quindi proceduto marcando le piastrine con concentrazioni saturanti di due

anticorpi monoclonali: un anticorpo anti-Psel (anti-CD62P) coniugato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) e un anticorpo diretto contro un antigene piastrino-specifico (anti-CD41) coniugato con ficoeritrina (PE) (Immunotech SA, Marseille, France). Dopo 30 min' di incubazione al buio e a temperatura ambiente, i campioni sono stati diluiti con PBS e analizzati con un citofluorimetro EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Miami, USA) dotato di un argon laser operante a 488nm. Le fluorescenze emesse dai due fluorocromi (FITC e PE) sono state rilevate mediante filtri banda passante operanti a 575 e 525 nm, rispettivamente. La popolazione piastrinica è stata identificata in base alle caratteristiche morfologiche e alla positività per il CD41; mentre l'attivazione piastrinica è stata rilevata e quantificata dall'espressione di P-sel delle cellule positive.

La citometria a flusso è una tecnica che consente la misurazione delle caratteristiche fisiche e/o chimiche individuali di un elevato numero di cellule in sospensione. Le cellule sono forzate ad allinearsi mediante un flusso laminare e ad attraversare individualmente un punto di misura dove interagiscono con il fascio di luce del sistema di eccitazione. Da questa interazione vengono generati dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche delle cellule (diametro, volume, rapporto nucleo/citoplasma, granulosità interna, rugosità di superficie) e dalla presenza di marcatori fluorescenti sulla loro superficie, nel citoplasma o nel loro nucleo.

E' stato inoltre valutato se gli anti- $\beta_2$ GPI erano in grado di potenziare l'attivazione piastrinica indotta da uno stimolo debole dell'attivazione piastrinica. Sono stati pertanto condotti esperimenti preliminari volti ad individuare le concentrazioni dell'agonista thrombin receptor activator for peptide 6 (TRAP-6), un attivatore del recettore attivato dalle proteasi 1 (PAR1) della trombina. I risultati hanno mostrato che alla concentrazione di 3  $\mu$ M, il TRAP-6 induceva un'espressione di P-selettina compresa tra il 30 e il 50 % di quella massimale. Pertanto tale concentrazione è stata utilizzata per stimolare le piastrine. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte testando sempre i campioni in doppio.

### ***Analisi statistica***

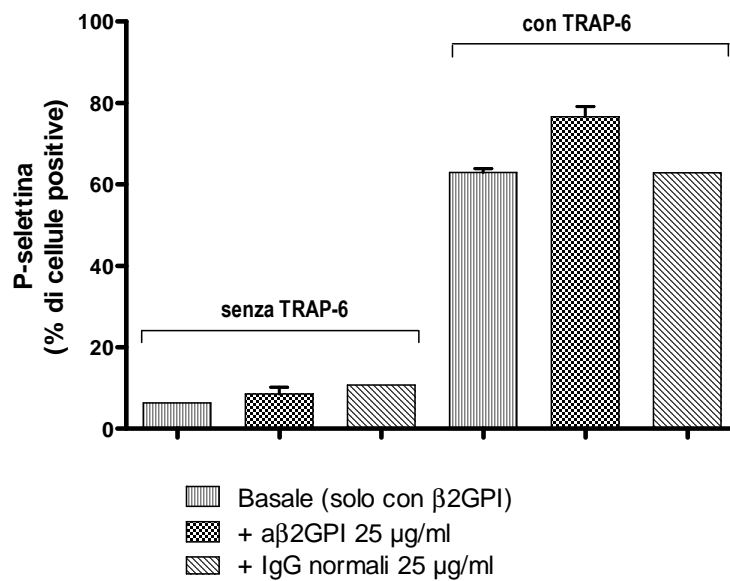
Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM (standard error of mean) calcolando l'intervallo di confidenza al 95%. I dati sono stati analizzati usando il test t di Student. Tutti i test erano a due code e il valore di  $p < 0,05$  è stato considerato significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 5 for Windows.

## **RISULTATI**

I risultati ottenuti sono illustrati nelle Figure 1 e 2, dove sono rappresentate le medie con le relative SEM delle percentuali di piastrine positive alla P-sel.

E' possibile osservare la stessa espressione di P-sel nelle piastrine incubate con e senza gli anti- $\beta_2$ GPI. Infatti la percentuale di piastrine positive alla P-sel non ha subito alcuna variazione in presenza degli anti- $\beta_2$ GPI a due diverse concentrazioni (5, 25  $\mu$ g/ml).

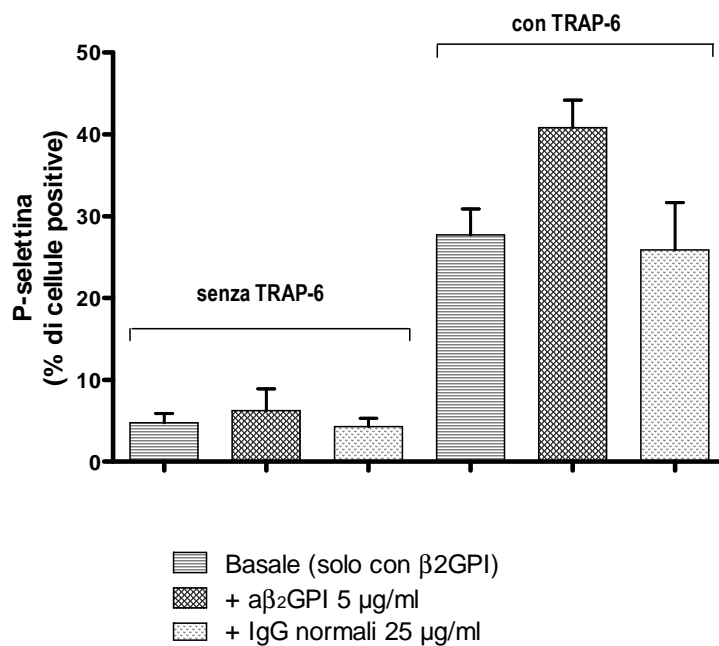
Diversamente, dopo l'aggiunta di una concentrazione sottosoglia dell'agonista TRAP-6 (3  $\mu$ M), gli anti- $\beta_2$ GPI isolati dal plasma nella fase quiescente di malattia alla concentrazione più alta (25  $\mu$ g/ml), hanno indotto un incremento dell'espressione piastrinica di P-sel del  $21,65\% \pm 1,87\%$  rispetto alle piastrine di controllo incubate senza gli anticorpi ( $p=0,04$ ) (Figura 1).



**Figura 1:** Espressione piastrinica di P-selettina con e senza stimolazione piastrinica con TRAP-6. Nelle piastrine stimolate con TRAP-6, possiamo osservare che nei campioni incubati con anti- $\beta_2$ GPI estratti dal plasma di una paziente con APS quiescente l'espressione di P-selettina è significativamente più alta ( $p=0,04$ ) rispetto ai campioni incubati con IgG normali o quelli senza anti- $\beta_2$ GPI.

Gli stessi esperimenti sono stati poi ripetuti incubando le piastrine con gli anti- $\beta_2$ GPI isolati dal plasma nella fase catastrofica dell'APS (Figura 2). I risultati hanno mostrato che anche questi anticorpi da soli non hanno alcun effetto sull'attivazione piastrinica.

Dopo l'aggiunta di dosi sottosoglia di TRAP-6, i risultati mostrano che le piastrine incubate con gli anti- $\beta_2$ GPI, già alla più bassa concentrazione (5  $\mu$ g/ml), aumentano in modo significativo l'espressione di P-sel ( $47,74\% \pm 3,83\%$ ) rispetto alle piastrine di controllo incubate senza gli anticorpi ( $p=0,009$ ) (Figura 2).



**Figura 2:** Espressione piastrinica di P-selettina con e senza stimolazione piastrinica con TRAP-6. Nelle piastrine stimulate con TRAP-6, possiamo osservare che nei campioni incubati con anti- $\beta_2$ GPI estratti dal plasma di una paziente con CAPS l'espressione di P-selettina è significativamente più alta ( $p=0,009$ ) rispetto ai campioni incubati con IgG normali o quelli senza anti- $\beta_2$ GPI.

## DISCUSSIONE

In base alle nostre conoscenze, si tratta del primo studio nel quale gli anti- $\beta_2$ GPI presenti nella variante catastrofica dell'APS vengono confrontati con quelli della fase quiescente.

I dati emersi mostrano che gli anti- $\beta_2$ GPI della CAPS inducono una maggiore attivazione piastrinica, anche quando usati a concentrazioni inferiori. Questa capacità di potenziare l'attivazione piastrinica potrebbe essere dovuta ad un aumento dell'avidità dell'anticorpo durante la fase attiva della malattia. Infatti, è stato dimostrato che l'ossidazione degli anti- $\beta_2$ GPI aumenta la natura idrofila dei paratopi e li rende più suscettibili al legame con le superfici cationiche [22], come l'antigene  $\beta_2$ GPI.

L'ipotesi potrebbe essere che durante la fase attiva della malattia, nella quale si verificano trombosi multiorgano, gli anti- $\beta_2$ GPI aumentino la loro avidità per l'antigene  $\beta_2$ GPI legato alla superficie piastrinica, potenziando così l'attivazione

piastrinica. Questo dato risulta di notevole interesse clinico perchè potrebbe spiegare la grave trombofilia associata alla variante catastrofica dell'APS.

I nostri risultati inoltre mostrano che l'innescò dell'attivazione piastrinica ha richiesto l'aggiunta dell'agonista TRAP-6 e solo conseguentemente è stata potenziata l'attivazione piastrinica da parte degli anti- $\beta_2$ GPI. Essi pertanto risultano in accordo con la "two hit theory" [23, 24] per l'innescò dell'evento trombotico nell'APS, secondo la quale solo in presenza di fattori scatenanti (infezioni, stress, farmaci etc.), gli aPL possono indurre la trombosi.

Risulta inoltre interessante osservare che per l'attivazione piastrinica da parte degli anti- $\beta_2$ GPI, è stato necessario aggiungere l'antigene  $\beta_2$ GPI estrattivo a quello nativo adeso alle piastrine. Questo dato potrebbe supportare l'ipotesi espressa da alcuni autori [11, 12] che il segnale di attivazione piastrinica venga evocato dall'unione degli anti- $\beta_2$ GPI all'antigene in forma dimerica che andrebbe poi a legarsi ai recettori della membrana piastrinica glicoproteina Iba e apolipoproteina E recettore 2' alterando l'emostasi in senso trombotico.

I dati emersi da questo studio concordano con l'ipotesi che attribuisce un ruolo attivo agli aPL nella patogenesi della trombosi attraverso l'attivazione piastrinica [25, 26]. Tuttavia essi necessitano di verifica su casistica più ampia di soggetti sia in fase acuta che quiescente di APS.

## Bibliografia

- [1] Salmon JE, de Groot PG. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2008 (10);17:405-411.
- [2] Font J, Espinosa G, Tàssies D, et al. Effects of beta2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies in platelet interaction with subendothelium under flow conditions. *Arthritis Rheum* 2002;46(12):3283-9.
- [3] 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.
- [4] Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335(8720):1544-1547.
- [5] McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, et al. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:4120-4.
- [6] Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of beta 2-glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2141-5.
- [7] Agar C, van Os GM, Morgelin M, et al. {beta}2-Glycoprotein I can exist in two conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010;116(8):1336-1343.
- [8] Koike T, Ichikawa K, Kasahara H, et al. Epitopes on beta2-GPI recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1998;7(suppl 2):S14-S17.
- [9] De Groot PG, Derksen RH. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005;3:1854-60.
- [10] Pennings MT, Derksen RH, van Lummel M, et al. Platelet adhesion to dimeric beta2-glycoprotein-I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein I $\alpha$  and APOER2'. *J Thromb Haemost* 2007;5:369-77.
- [11] Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, et al. Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies in complex with  $\beta$ 2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum* 2006;54:2558-67.
- [12] Urbanus RT, Pennings MT, Derksen RHW, et al. Platelet activation by dimeric  $\beta$ 2-glycoprotein I requires signaling via both glycoprotein I $\alpha$  and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost* 2008 Aug;6(8):1405-12.
- [13] Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG. Platelets and the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008;17(10):888-94.
- [14] Vlachoyiannopoulos PG, Routsias JG. A novel mechanism of thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2010;35(3):248-55.
- [15] Robbins DL, Leung S, Miller-Blair DJ, et al. Effect of anticardiolipin/beta2-glycoprotein I complexes on production of thromboxane A2 by platelets from patients with the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:51-6.

- [16] Lindemann S, Gawaz M. Platelets and atherosclerosis. In: Gresele P, Fuster V, Lopez J, et al. Platelets in cardiovascular and hemorrhagic disorders: a clinical handbook. eds Cambridge University press, Cambridge, UK 2007:293-307.
- [17] Pitchford SC, Momi S, Giannini S, et al. Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation. *Blood* 2005;105:2074-81.
- [18] Falcinelli E, Guglielmini G, Torti M, et al. Intraplatelet signaling mechanisms of the priming effect of matrix metalloproteinase-2 on platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2005;3:2526-35.
- [19] Falcinelli E, Giannini S, Boschetti E, et al. Platelets release active matrix metalloproteinase-2 in vivo in humans at a site of vascular injury: lack of inhibition by aspirin. *Br J Haematology* 2007,138,221–230.
- [20] Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40L on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4.
- [21] Pengo V, Brocco T, Biasiolo A, et al. Procoagulant effect of anti-beta2-glycoprotein I antibodies with lupus anticoagulant activity. *Blood* 1999;94(11):3814-9.
- [22] Bozic B, Cucnik S, Kveder T, et al. Changes in avidity and specificity of IgG during electro-oxidation. Relevance of binding of antibodies to  $\beta$ 2-GPI. *Autoimmun Rev.* 2006;6(1):28-32.
- [23] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, et al. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(6):330-9.
- [24] 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: 2340-6.
- [25] Forastiero R, Martinuzzo M, Carreras LO, et al. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid antibodies: association with increased excretion of platelet-derived thromboxane urinary metabolites. *Thromb Haemost.* 1998;79(1):42-5.
- [26] Jy W, Tiede M, Bidot CJ, et al. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2007;121(3):319-25.

**EFFETTO *EX VIVO* DEGLI ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI  
SULLE PIASTRINE E SULL'ENDOTELIO. DOSAGGIO DEI MARKERS DI  
ATTIVAZIONE PIASTRINICA ED ENDOTELIALE IN PAZIENTI IN FASE DI  
MALATTIA QUIESCENTE E CATASTROFICA.**

(Thrombosis and Haemostasis, submitted)

## **Introduzione**

### ***L'endotelio***

Gli aPL possono indurre uno stato pro trombotico anche attivando l'endotelio, inducendo una perturbazione che è responsabile del fenotipo pro-infiammatorio e pro-coagulante [1, 2]. Gli aPL potrebbero riconoscere le molecole espresse sulle cellule endoteliali (EC) e, una volta formato il complesso, indurre una perturbazione cellulare [2, 3]. Ci sono evidenze che infusioni passive di frazioni di IgG con attività aPL  $\beta_2$ GPI-dipendente in animali naive, potrebbero legarsi alle pareti del vaso, co-localizzarsi con le componenti del complemento, indurre l'adesione dei leucociti e aumentare i livelli nel siero delle isoforme solubili delle molecole di adesione [2, 4, 5]. Nel complesso queste scoperte supportano fortemente le ipotesi che gli aPL  $\beta_2$ GPI-dipendenti potrebbero essere responsabili della perturbazione delle EC. Inoltre studi *in vivo* effettuati sui topi hanno confermato che l'effetto trombogenico degli anti- $\beta_2$ GPI è associato con l'attivazione endoteliale [6].

Cellule endoteliali attivate esprimono molecole che mediano l'adesione di cellule infiammatorie (P-sel, E-selettina, la molecola di adesione cellulare vascolare-1 (VCAM-1) e la molecola di adesione intercellulare-1) e rilasciano inoltre la proteina chemiotattica dei monociti-1 (MCP-1), l'interleuchina-8 coinvolta nella migrazione cellulare e le metalloproteinasi di matrice (MMPs) che degradano la matrice extracellulare.

### ***MMPs***

La matrice extracellulare (ECM) gioca un ruolo centrale nel mantenimento dell'integrità e dell'architettura tissutale. Le interazioni tra diverse cellule e la matrice extracellulare regolano il normale sviluppo e funzione dell'organismo

come anche i processi patologici [7]. I principali gruppi di enzimi degradanti la ECM sono le MMPs che appartengono ad una famiglia di endopeptidasi zinco dipendenti. In particolare, le gelatinasi A e B (MMPs-2 e -9) tagliano preferenzialmente l'elastina ed un numero di legami peptidici nel collagene denaturato di vario tipo producendo piccoli peptidi di degradazione.

Sia le cellule endoteliali che i macrofagi e le piastrine contengono e rilasciano la MMP-2, coinvolta nella degradazione e nel rimodellamento della ECM e nel potenziamento dell'attivazione piastrinica. La MMP-2 è coinvolta in processi infiammatori ed aterosclerotici. Elevati livelli plasmatici di MMP-2 sono stati riscontrati in diverse manifestazioni cliniche della patologia aterotrombotica, in particolare nelle sindromi coronariche acute, nella cerebrovasculopatia e nell'artereopatia periferica. La MMP-2 è secreta come zimogeno inattivo (successivamente attivato per via proteolitica) e la sua attività enzimatica è finemente regolata a livello trascrizionale, traduzionale e da inibitori solubili e tissutali ( $\alpha 2$  antiplasmina, TIMP-2).

### ***Fattore di von Willebrand***

Il fattore di von Willebrand (VWF) è una glicoproteina multimerica circolante nel sangue, sintetizzata dalle cellule endoteliali e dai megacariociti. Il VWF è essenziale nel trasporto e nella stabilizzazione del fattore VIII e nella mediazione dell'interazione piastrina-matrice extracellulare e piastrina-piastrina possedendo siti di legame per le glicoproteine piastriniche Ib $\alpha$  e IIb/IIIa e per il collagene sottoendoteliale [8]. Il grado di polimerizzazione del VWF è correlato alla sua attività protrombotica in quanto i multimeri a più alto peso molecolare sono quelli a maggiore attività proemostatica [9]. Dopo essere rilasciati i multimeri ad alto peso molecolare sono rapidamente clivati dalla metalloproteinasi ADAMTS-13.

Il VWF solubile presenta siti di legame per diversi ligandi, in particolare il suo dominio A1 è in grado di interagire con il collagene subendoteliale in seguito a lesione del vaso. Lo stesso dominio costituisce anche il sito di legame per la glicoproteina GPIb $\alpha$  delle piastrine con cui interagisce dopo modificazione conformazionale indotta da elevato shear stress, condizione che si verifica, ad

esempio, in vasi arteriosi aterosclerotici in cui, infatti, l'attivazione piastrinica risulta strettamente dipendente dal VWF.

La  $\beta_2$ GPI lega il dominio A1 del VWF in questa sua conformazione attiva e blocca l'adesione piastrinica dipendente dal VWF. Invece, gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI contrastano questa funzione inibitoria e sono associati ad un aumento dei livelli di VWF attivo, potenziando così il rischio trombotico nei pazienti con APS [10].

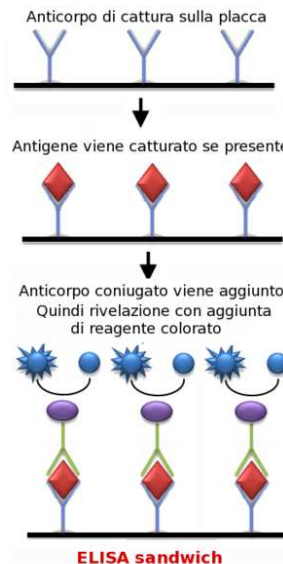
## **Pazienti e metodi**

Sono stati raccolti 15 prelievi di sangue venoso in provette vacutainer con citrato di sodio 1:10, rispettivamente da quattro pazienti con CAPS, sei con APS quiescente e cinque controlli sani. Il plasma, ottenuto centrifugando i campioni a 3000 g per 10 min', è stato immediatamente congelato e conservato a - 80°C.

### ***Dosaggio dei marcatori di attivazione piastrinica***

La concentrazione plasmatica di P-selettina solubile (sP-sel) è stata quantificata mediante l'utilizzo di un kit ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

Questo test impiega la tecnica immunoenzimatica a sandwich (Figura 1) per la determinazione quantitativa della sP-sel. Vengono usati un anticorpo monoclonale specifico per la sP-sel precoattato nelle micropiastre e un anticorpo policlonale specifico per la sP-sel coniugato con perossidasi di rafano.



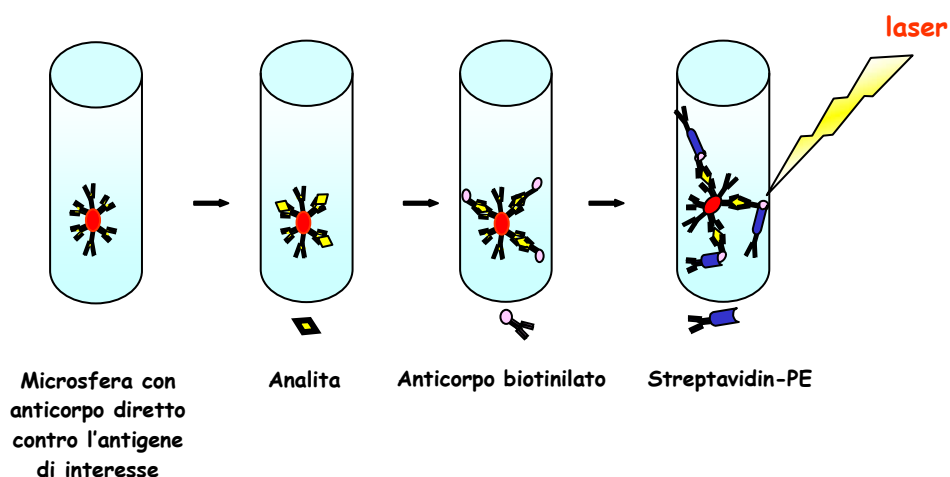
**Figura 1. Schema del metodo ELISA a sandwich**

Le concentrazioni totali di MMP-2 e MMP-9 sono state misurate con la tecnica della zimografia su un gel di poliacrilammide all' 8,5% contenente 1 mg/ml di gelatina [11, 12]. La zimografia è una tecnica elettroforetica usata per identificare e quantificare l'attività proteolitica di alcune metalloproteinasi di matrice separate in gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti. I campioni per l'analisi sono stati diluiti in sample buffer, costituito da 0,4M Tris, pH 6,8, 5% SDS, 20% glicerolo, 0,03% blu di bromofenolo e caricati in un gel di poliacrilamide al 8,5% contenente lo 0,01% di gelatina, un substrato dell'enzima. L'elettroforesi è stata condotta in Tris glicina a corrente costante di 20mA ed interrotta prima dell'uscita del fronte. I gel sono stati rimossi e incubati per 1 ora a temperatura ambiente in Triton X-100 al 2,5% (detergente in grado di allontanare l'SDS). La soluzione di Triton X-100 è stata decantata e i gel incubati nel tampone adatto per l'enzima in esame costituito da 50mM Tris, pH 7,5, 20mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01% Brij-35. I gel sono stati quindi incubati a 37°C per 18 ore. Ogni gel è stato poi colorato con 0,5% Coomassie blue G-250 in 30% metanolo, 10% acido acetico per 3 ore e decolorato con tre cambi di una soluzione contenente metanolo al 30% e acido acetico al 10% (per 15, 30, 60 minuti rispettivamente per ogni cambio). Le aree di digestione, evidenza di attività enzimatica e visibili come regioni del gel non colorate, sono state quantificate utilizzando una curva standard ottenuta con concentrazioni crescenti di MMP-2 o MMP-9 ricombinante. L'attività gelatinolitica dell'enzima è

stata poi quantificata analizzando le zimografie tramite densitometria utilizzando il software Quantity One, version 4.1.1 (Bio-Rad, Italy).

### ***Dosaggio dei marcatori di attivazione endoteliale***

La concentrazione plasmatica della VCAM-1 solubile e della MCP-1 è stata misurata mediante citometria a flusso usando il “FlowCytomix human cardiovascular 7plex kit” (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Questo kit è un test immunologico per la determinazione quantitativa con citometria a flusso di analiti solubili umani in supernatanti di colture cellulari o in siero, plasma, sangue intero o altri fluidi corporei; il test utilizza come supporto solido delle microsfere. Essendo queste microsfere di due tipi diversi di grandezza e avendo diversi spettri di emissione in fluorescenza, permettono di discriminare contemporaneamente al citofluorimetro la presenza di fino a 20 diverse specie di analiti (nel nostro caso due), usando il principio dell'ELISA nello stesso campione plasmatico [13]. Lo strumento è dotato di un argon laser operante a 488nm. Le due popolazioni sono state fatte incubare con una mix di microsfere e identificate dalla loro dimensione e da una diversa intensità di fluorescenza di un dye interno, misurata mediante un filtro banda passante operante a 675 nm. Gli analiti catturati dalle beads sono stati rilevati con diversi anticorpi biotinilati anti-complesso, e la presenza degli anticorpi biotinilati è stata rivelata da Streptavidin-PE (Figura 2).



**Figura 2: FlowCytomix multiplex kit**

L'intensità di fluorescenza della PE per ogni popolazione, individuata usando un filtro banda passante operante a 575 nm, era direttamente proporzionale alla concentrazione degli antigeni del campione, permettendo così la quantificazione contemporanea dei due differenti analiti. Le curve standard per ogni analita e i dati sono stati analizzati con il software FlowCytomixPro 1.0.

### ***Studi sul VWF***

Nei campioni plasmatici sono state inoltre effettuate misurazioni relative ai livelli e all'attività del VWF.

La concentrazione di VWF circolante (VWF:Ag) è stata quantificata con un test ELISA (Asserachrom VWF:Ag Kit, Diagnostica Stago, Asnieres, France). I pozzetti delle micropiastre sono stati coattati con un anticorpo monoclonale murino purificato anti-VWF, che riconosce un epitopo funzionale del VWF.

La sua capacità di legare il collagene (VWF:CB) è stata valutata mediante test ELISA (VWF:CB Kit, Life Diagnostics, Clarkston, USA). Durante il primo step di incubazione i multimeri del VWF presenti nel campione si sono legati al collagene attaccato alla superficie dei pozzetti. Nella seconda reazione, gli anticorpi anti-VWF coniugati alla perossidasi hanno legato i multimeri del VWF catturati. L'intensità del colore, che è proporzionale al peso molecolare dei multimeri del VWF presenti nel campione, è stata determinata con la spettrofotometro.

Il cofattore ristocetinico (VWF:RCo), che ne misura l'attività, è stato misurato usando un kit commerciale (Helena Biosciences Europe, Sunderland, UK) che valuta l'aggregazione di piastrine di controllo fissate con la formalina dopo l'aggiunta di 1 mg/ml di ristocetina in presenza del plasma del paziente.

### ***Analisi statistica***

Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM (standard error of mean) calcolando l'intervallo di confidenza al 95%. I dati sono stati analizzati usando il test U di Mann Whitney. Tutti i test erano a due code e il valore di  $p < 0,05$  è stato considerato significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 5 for Windows.

## RISULTATI

I dati ottenuti confrontando i campioni plasmatici dei pazienti con APS con quelli dei controlli sono indicati nella Tabella 1.

Come si può osservare le concentrazioni plasmatiche dei markers di attivazione piastrinica ed endoteliale erano significativamente più elevate nei pazienti con APS per tutti i marcatori esaminati, ad eccezione del VWF:CB.

**Tabella 1: Livelli plasmatici dei marcatori di attivazione piastrinica ed endoteliale nei pazienti con APS e nei controlli.**

	<b>Pazienti con APS (media±SEM)</b>	<b>Controlli (media±SEM)</b>	<b>p&lt;</b>
<b>sP-sel (ng/ml)</b>	630,6±70,4	402,1±56,3	<b>0,04</b>
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>	488,8±3,1	464,6±2,7	<b>0,005</b>
<b>MMP-9 (ng/ml)</b>	148,6±2,3	122,7±1,1	<b>0,002</b>
<b>sVCAM-1 (ng/ml)</b>	658,7±74,6	312,9±98,9	<b>0,02</b>
<b>MCP-1 (pg/ml)</b>	293,3±32,8	146,0±39,5	<b>0,02</b>
<b>VWF:CB (%)</b>	96,2±5,9	67,9±14,0	<b>NS</b>
<b>VWF:Ag (%)</b>	104,5±8,3	70,0±8,0	<b>0,03</b>
<b>VWF:Rco (%)</b>	136,6±22,1	53,5±15,3	<b>0.009</b>

APS = Sindrome da anticorpi antifosfolipidi, P-sel = P-selettina, MMP = Metalloproteinasi di matrice, sVCAM-1 = Molecola di adesione cellulare vascolare-1 solubile, MCP-1 = Proteina chemiotattica dei monociti-1, VWF = Fattore di von Willebrand, Ag = Antigene, CB = Collagen binding, Rco = Cofattore risotcetinico.

Nella Tabella 2, invece, vengono messe a confronto le concentrazioni dei markers nel plasma di pazienti con APS in fase di quiescenza con quelle nei pazienti con CAPS.

**Tabella 2: Livelli plasmatici dei marcatori di attivazione piastrinica ed endoteliale nei pazienti con APS quiescente e in quelli con CAPS.**

	<b>Pazienti con APS quiescente (media±SEM)</b>	<b>Pazienti con CAPS (media±SEM)</b>	<b>P&lt;</b>
<b>sP-sel (ng/ml)</b>	479,36±38,9	749,4±104,9	<b>0,03</b>
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>	485,9±2,5	493,2±2,5	<b>NS</b>
<b>MMP-9 (ng/ml)</b>	147,5±2,6	150,3±4,5	<b>NS</b>
<b>sVCAM-1 (ng/ml)</b>	627,0±120,9	706,3±63,0	<b>NS</b>
<b>MCP-1 (pg/ml)</b>	288,7±56,3	300,2±11,3	<b>NS</b>
<b>VWF:CB (%)</b>	93,6±6,2	101,4±14,3	<b>NS</b>
<b>VWF:Ag (%)</b>	95,6±8,1	122,4±16,2	<b>NS</b>
<b>VWF:Rco (%)</b>	110,5±10,4	188,7±57,3	<b>0,01</b>

APS = Sindrome da anticorpi antifosfolipidi, P-sel=P-selettina, MMP=Metalloproteinasi di matrice, sVCAM-1=Molecola di adesione cellulare vascolare-1 solubile, MCP-1=Proteina chemiotattica dei monociti-1, VWF=Fattore di von Willebrand, Ag=Antigene, CB=Legame con il collagene, Rco=Cofattore ristocetinico.

Come si può osservare le concentrazioni plasmatiche dei markers di attivazione piastrinica ed endoteliale erano significativamente più elevate nei pazienti con CAPS soltanto per la sP-sel e per il VWF:Rco.

## DISCUSSIONE

Gli studi *ex vivo* hanno mostrato che nei pazienti con APS, c'è una prevalenza significativa di quasi tutti i marcatori di attivazione piastrinica ed endoteliale rispetto ai soggetti sani di controllo. Tali risultati sono in accordo con quelli di altri autori [6, 14, 15] e rappresentano una conferma delle ipotesi patogenetiche che sostengono che gli aPL possono indurre uno stato protrombotico anche attivando l'endotelio, inducendo così una perturbazione che è responsabile del fenotipo pro-infiammatorio e pro-coagulante [1, 2].

Inoltre, i livelli di sP-sel nei plasmi dei pazienti con CAPS sono risultati significativamente più alti che in quelli dei pazienti con APS quiescente, suggerendo così la presenza di un'attivazione piastrinica maggiore nella variante più severa dell'APS. Quest'ultimo dato è in accordo con i risultati ottenuti *in vitro* nello studio precedente, che ha mostrato un significativo aumento dell'espressione piastrinica della P-sel nelle piastrine incubate con gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI della fase catastrofica rispetto all'aumento dell'espressione di P-sel mostrato dagli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI della fase quiescente dell'APS.

I livelli plasmatici degli altri markers sono anch'essi risultati più alti nei plasmi dell'APS catastrofica, ma non hanno raggiunto la significatività. Questo dato può essere probabilmente spiegato dal ridotto numero di casi studiati che non è risultato sufficiente per esprimere una significatività statistica.

L'originalità ed il maggior interesse di questo studio è costituito dai risultati ottenuti attraverso il confronto dei livelli dei marcatori di attivazione delle piastrine e dell'endotelio nelle due diverse fasi dell'APS.

Se tali dati saranno confermati da studi su casistica più ampia, l'importanza dell'attivazione delle piastrine e dell'endotelio nella patogenesi della fase acuta dell'APS, potrebbe essere ulteriormente supportata.

## Bibliografia

- [1] Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, et al. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007;109:422–30.
- [2] Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:236–50.
- [3] Meroni PL. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: an additional example of the mosaic of autoimmunity. *J Autoimmun* 2008;30:99–103.
- [4] Simantov R, La Sala JM, Lo SK, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96: 2211-9.
- [5] 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;106:2340–6.
- [6] Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, et al. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 1999; 99: 1997-2002.
- [7] Massova I, Kotra LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12: 1075–95.
- [8] Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003;1:1335-42.
- [9] Arya M, Anvari B, Romo GM, et al. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood* 2002; 99:3971-7.
- [10] Hulstein JJ, Lenting PJ, de Laat B, et al. Beta2-glycoprotein I inhibits von Willebrand factor dependent platelet adhesion and aggregation. *Blood* 2007; 110: 1483–91.
- [11] Falcinelli E, Giannini S, Boschetti E, et al. Platelets release active matrix metalloproteinase-2 in vivo in humans at a site of vascular injury: lack of inhibition by aspirin. *Br J Haematol.* 2007 Jul;138(2):221-30.
- [12] Falcinelli E, Guglielmini G, Torti M, et al. Intraplatelet signaling mechanisms of the priming effect of matrix metalloproteinase-2 on platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2005; 3:2526-35.
- [13] Francisci D, Giannini S, Baldelli F, et al. HIV type 1 infection, and not short-term HAART, induces endothelial dysfunction. *AIDS.* 2009 Mar 13;23(5):589-96.
- [14] Robbins DL, Leung S, Miller-Blair DJ, et al. Effect of anticardiolipin/beta2-glycoprotein I complexes on production of thromboxane A2 by platelets from patients with the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1998; 25: 51-6.
- [15] Simantov R, La Sala JM, Lo SK, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96: 2211-9.



## **RINGRAZIAMENTI**

***Volevo ringraziare di cuore chi mi ha accompagnato e seguito in questi anni di lavoro. Innanzitutto il professor Punzi e tutta l'equipe della Reumatologia.***

***Un ringraziamento particolare alla prof.ssa Ruffatti, per il suo aiuto e per tutto quello che mi ha insegnato dal punto di vista professionale e umano. Al suo grande gruppo, dalle care colleghe dottoresse Teresa, Mariangela, Antonella, Chiara, Manuela, Ariela, Serena, Miriam, Serena alle preziose compagne e amiche di laboratorio, Marta, Anna, Silvia e infine Elena. Un grazie particolare a Elisa per il supporto statistico.***

***Un ringraziamento anche al professor Pengo, Elisa e Alessandra e a tutta la fantastica equipe dell' Immunotrasfusionale.***

***Un pensiero speciale a tutti i dottorandi, specializzandi e borsisti con i quali ci siamo fatti compagnia nella stanza 63.***

***Infine saluto e ringrazio il gruppo del professor Paolo Gresele dell'Università di Perugia.***