

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η παθογένεια του ενδοθηλίου στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

ΠΑΤΣΟΥΡΑΣ ΜΑΡΚΟΣ

ΙΑΤΡΟΣ, ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΣΤΗΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

Διδακτορική διατριβή του Μάρκου Πατσούρα στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα:

<< Η παθογένεια του ενδοθηλίου στο σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων>>

Ημερομηνία ορισμού συμβουλευτικής επιτροπής: 09/04/2014

Ημερομηνία κατάθεσης πρωτοκόλλου της διδακτορικής διατριβής: 10/10/2014

Ημερομηνία κατάθεσης 1ης έκθεσης προόδου: 09/08/2017

Ημερομηνία κατάθεσης 2ης έκθεσης προόδου: 06/11/2018

Ημερομηνία κατάθεσης 3ης έκθεσης προόδου: 24/1/2020

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή:

- 1. Καθηγητής κ. Παναγιώτης Γ Βλαχογιαννόπουλος**
- 2. Καθηγητής κ. Μενέλαος Μανουσάκης**
- 3. Καθηγητής κ. Εμμανουήλ Βουλγαρέλης**

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΎΞ ΩΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΪΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΎΞ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ. ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

(απόδοση στη Νεοελληνική)

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Σ' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΤΗ ΜΑΡΤΥΡΙΑ ΤΟΥΣ, ΝΑ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΑΥΤΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΑΥΤΗ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΙΣΟ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΜΟΙΡΑΣΤΩ ΜΑΖΙ ΤΟΥ ΤΑ ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΧΡΗΜΑΤΑ ΜΟΥ ΑΝ ΕΧΕΙ ΑΝΑΓΚΗ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΙΣΟΥΣ ΜΕ Τ' ΑΔΕΛΦΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΚΑΙ ΝΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΜΕ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΕΣ, ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΕΣ ΟΛΗ ΤΗΝ ΥΠΟΛΟΙΠΗ ΓΝΩΣΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΕΚΕΙΝΟΥ ΜΕ ΔΙΔΑΞΕ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΕΙ ΓΡΑΠΤΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΚΑΙ Σ' ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΟΡΚΙΣΘΕΙ ΣΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟ ΝΟΜΟ ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑΝ ΑΛΛΟ ΚΑΙ ΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΩ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΧΩΡΙΣ ΠΟΤΕ, ΕΚΟΥΣΙΩΣ, ΝΑ ΤΟΥΣ ΒΛΑΨΩ Ή ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΔΙΚΗΣΩ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΕΣΤΩ ΚΙ ΑΝ ΜΟΥ ΤΟ ΖΗΤΗΣΕΙ, ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ, ΟΥΤΕ ΝΑ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΟΜΟΙΩΣ ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΓΙΑ Ν' ΑΠΟΒΑΛΕΙ. ΝΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΔΕ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΙ ΑΓΝΗ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΛΙΘΟΥΣ ΑΛΛΑ Ν' ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΙΔΙΚΟΥΣ. ΚΑΙ Σ' ΟΠΟΙΑ ΣΠΙΤΙΑ ΚΙ ΑΝ ΜΠΩ, ΝΑ ΜΠΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ ΑΠΟΦΕΥΓΟΝΤΑΣ ΚΑΘΕ ΕΚΟΥΣΙΑ ΑΔΙΚΙΑ ΚΑΙ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΚΑΘΕ ΓΕΝΕΤΗΣΙΑ ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΜΕ ΓΥΝΑΪΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕ ΑΝΔΡΕΣ, ΕΛΕΥΘΕΡΟΥΣ ΚΑΙ ΔΟΥΛΟΥΣ. ΚΑΙ Ο,ΤΙ ΔΩ Ή ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ ΜΟΥ, Ή ΚΙ ΕΚΤΟΣ, ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΘΕΙ, ΝΑ ΣΙΩΠΗΣΩ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΜΥΣΤΙΚΟ. ΑΝ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΑΘΕΤΗΣΩ, ΕΙΘΕ Ν' ΑΠΟΛΑΥΣΩ ΓΙΑ ΠΑΝΤΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΑΘΕΤΗΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΝΑ ΥΠΟΣΤΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ

Βιογραφικό σημείωμα Μάρκου Πατσούρα

Προσωπικά Δεδομένα	
Όνομα	Μάρκος
Επώνυμο	Πατσούρας
Όνομα Πατρός	Δημήτριος
Όνομα Μητρός	Παυλίνα
Ημερομηνία γεννήσεως	08/08/1987
Τηλέφωνο	6989638910
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο	patsouras.markos@gmail.com
Σπουδές και κλινική πράξη	
2020	Εκπαίδευση στη ΜΕΘ στο ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ
2019-2020	Ειδικευόμενος εσωτερικής παθολογίας στο Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Αττικής
2018	Ιατρική κάλυψη στρατοπέδου ΚΕΕΔ και εκπαιδευτής ATLS σε εκπαιδευομένους στην ειδικότητα νοσοκόμων καταδρομέων
2014-σημερα	Υποψήφιος διδάκτορας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα "Η παθογένεια του ενδοθηλίου στο Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων".
2013-2014	Ερευνητικός συνεργάτης στο εργαστήριο ανοσολογίας της Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών
2005-2013	Φοίτηση στην Ιατρική Σχολή Αθηνών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
2005	Αποφοίτηση από την Ελληνογαλλική σχολή Άγιος Παύλος

Ξένες Γλώσσες	
Αγγλικά	C2
Γαλλικά	C2
Ισπανικά	C2
Γερμανικά	B2
Εκπαιδευτικά σεμινάρια	
2020	ERC certified ALS provider
2020	Σεμινάριο υπερηχογραφίας στην εσωτερική παθολογία
2020	APCA Point-of-Care Ultrasound (POCUS) Fundamentals Certificate
2018	ATLS Military
2017	6th Summer School of Immunology
2015	5th Summer School of Immunology
2013	4th Summer School of Immunology
2011	Training in acupuncture for 1 month in Federal University of Pernambuco, Brazil
2008	Group leading and immigrant rights workshop in IFMSA General Assembly, Tunis
2006	Disaster medicine workshop in Erasmus University, The Netherlands
2005	Training in basic molecular techniques for 1 month in Ain Shams University, Egypt
Δημοσιεύσεις	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Evidence of epigenetic alterations in thrombosis and coagulation: A systematic review, MD Patsouras, PG Vlachoyiannopoulos, Journal of autoimmunity, 102347 2. Differential CpG methylation of the promoter of interleukin 8 and the first intron of tissue factor in Antiphospholipid syndrome, MD Patsouras, P Karagianni, P Kogionou, PG Vlachoyiannopoulos, Journal 	

<p>of autoimmunity 102, 159-166</p> <p>3. Elevated expression of platelet-derived chemokines in patients with antiphospholipid syndrome, MD Patsouras, MP Sikara, EP Grika, HM Moutsopoulos, AG Tzioufas, Journal of autoimmunity 65, 30-37</p>	
<p>Παρουσιάσεις σε συνέδρια</p>	
<p>ACR 2019</p>	<p>Whole Transcriptome Analysis Maps Proinflammatory and Procoagulant Pathways in aPL Treated HUVECs</p> <p>Markos Patsouras, Panagiota Karagianni, Marios Agelopoulos, Spyros Foutadakis, Eirini Alexopoulou and Panagiotis Vlachoyiannopoulos</p>
<p>EULAR 2019</p>	<p>SURVIVAL OF BIOLOGIC AGENTS WITHIN A COHORT OF GREEK PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS. REAL WORLD DATA FREE</p> <p>Olga Katsouli, Georgia Liantinioti, Panagiota Katsouli, Mary Pappa, Markos Patsouras, Theodoros Angelopoulos, Sotiris Roussos, PG Vlachoyiannopoulos</p>
<p>EULAR 2019</p>	<p>Differential CpG methylation of the promoter of interleukin 8 and the first intron of tissue factor in Antiphospholipid syndrome, MD Patsouras, P Karagianni, P Kogionou, PG Vlachoyiannopoulos, CXCL4-L1 Levels Are Elevated in Systemic Sclerosis Patients and Correlate with Pulmonary Arterial Hypertension and Capillaroscopic Indices of Vascular Damage</p>
<p>ACR 2019</p>	<p>Vasiliki Kalliopi Bournia, Markos Patsouras, Nikolaos Vlachoyiannis, Athanasios Tzioufas, Petros Sfikakis and Panagiotis Vlachoyiannopoulos</p>
<p>EWRR 2017</p>	<p>Pharmaceutical Disruption of B2GPI CXCL4 Complex Using Computationally Designed Oligopeptides</p> <p>Markos Patsouras, Elenh Papakonstantinou, Elias Eliopoulos and Panayiotis G Vlachoyiannopoulos</p>
<p>EWRR 2017</p>	<p>Thrombospondin-1 Is Elevated in the Plasma of Patients with Antiphospholipid Syndrome and Is Correlated with Free Active TGF-β1 Levels, IL-1β and IL-17A</p> <p>Markos Patsouras, Athanasios G. Tzioufas and Panayiotis G Vlachoyiannopoulos,</p> <p>Type I interferon signature in the peripheral blood and CXCL4 plasma</p>

<p>EULAR 2017</p>	<p>levels in patients with systemic sclerosis FREE NI Vlachogiannis, V-K Bournia, A Nezos, PF Christopoulos, M Patsouras, PG Vlachoyiannopoulos, CP Mavragani, PP Sfikakis Thrombospondin-1 Is Highly Expressed By Salivary Gland Epithelial Cells of Sjögren’s Syndrome Patients, Both Constitutively and upon Exposure to Necrotic Cells Debris</p>
<p>ACR 2016</p>	<p>Aglaia G Vakrakou, Markos D Patsouras, Panagiotis G Vlachoyiannopoulos, Athanasios G Tzioufas and Menelaos N Manoussakis Thrombospondin-1 Is Elevated in the Plasma of Patients with Antiphospholipid Syndrome and Is Correlated with Free Active TGF-b1 Levels, IL-1b and IL-17A</p>
<p>ACR 2016</p>	<p>Markos Patsouras, Athanasios G. Tzioufas and Panayiotis G Vlachoyiannopoulos, Pharmaceutical Disruption of B2GPI CXCL4 Complex Using Computationally Designed Oligopeptides Markos Patsouras, Elenh Papakonstantinou, Elias Eliopoulos and Panayiotis G Vlachoyiannopoulos</p>
<p>ACR 2016</p>	<p>Thrombospondin-1 Is Elevated in the Plasma of Patients with Antiphospholipid Syndrome and Is Correlated with Soluble Fas Ligand and Free Active TGF-B levels</p>
<p>ACR 2014</p>	<p>Markos Patsouras, Marina Sikara, Athanasios G. Tzioufas and Panayiotis Vlachoyiannopoulos Plasma Levels Of PF-4var/CXCL4L1, A Non Allelic Variant Of Platelet Factor-4 (PF-4/CXCL4), Are Elevated In Patients With Antiphospholipid Syndrome (APS)</p>
<p>ACR 2013</p>	<p>Marina Sikara, Markos Patsouras, Elias Eliopoulos and Panayiotis Vlachoyiannopoulos</p>

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω στον έχοντα την επιστημονική επίβλεψη της παρούσας διατριβής, καθηγητή κ. Παναγιώτη Γ. Βλαχογιαννόπουλο. Ο κ. Βλαχογιαννόπουλος με εμπιστεύθηκε αναθέτοντάς μου το θέμα αυτής της μελέτης και δεν έλειψε στιγμή από δίπλα μου, εκπαιδεύοντάς με, καθοδηγώντας με, εμπυχώνοντάς με και δίνοντας λύση στα προβλήματα που κατά καιρούς ανέκυπταν. Οφείλω να αναγνωρίσω ότι απετέλεσε για εμένα ένα λαμπρό παράδειγμα ερευνητή και ανθρώπου!

Ιδιαιτέρως θα πρέπει, επίσης, να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιούφα, διευθυντή της Κλινικής και του Εργαστηρίου Παθολογικής Φυσιολογίας για το ενδιαφέρον του, την αμέριστη υποστήριξη του και την καθοριστική επιστημονική του καθοδήγησή σε όλη την πορεία μέχρι την ολοκλήρωση αυτής μου της προσπάθειας, γιατί συγκαταλέγοντάς με στους διδακτορικούς φοιτητές του Εργαστηρίου Παθολογικής Φυσιολογίας, μου έδωσε τη δυνατότητα να μαθητεύσω δίπλα σε καταξιωμένους δασκάλους, μέσα σε ένα περιβάλλον υψηλού ακαδημαϊκού επιπέδου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον ομότιμο καθηγητή Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Χαράλαμπο Μουτσόπουλο, γιατί η διδασκαλία του και η γενικότερη ακαδημαϊκή του παρουσία πυροδότησαν το αρχικό μου ενδιαφέρον για τη ρευματολογία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω, επίσης, στην αναπληρώτρια καθηγήτρια Παθολογικής Φυσιολογίας κ. Ευσταθία Καψογιώργου, και στη κ. Παναγιώτα Καραγιάννη για την βοήθεια και επιστημονική επίβλεψη που μου παρείχαν. Καθως και επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συνεργάτες κ. Παρασκευή Κογιώνου, κ. Ειρήνη Τσική (εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας), κ. Νίκο Βλαχογιάννη (ρευματολογική μονάδα Α' προπαιδευτικής παθολογικής κλινικής), κ. Μάριο Αγγελόπουλο, κ. Ειρήνη Αλεξοπούλου, κ. Σπυρίδωνα Φουταδάκη (Ίδρυμα ιατροβιολογικών ερευνών αθηνών) για τη βοήθεια που μου παρείχαν, καθώς και σε όλα τα μέλη και το προσωπικό του εργαστηρίου Παθολογικής Φυσιολογίας για την υποστήριξή τους. Ξεχωριστά θα ήθελα, τέλος, να ευχαριστήσω όλους τους ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων που δέχθηκαν να μου αφιερώσουν το χρόνο τους και να ενταχθούν στις διαδικασίες αυτού του ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Αναγνωρίζοντας ότι εκείνοι είναι οι τελικοί αποδέκτες όλων μας των προσπαθειών ελπίζω να φανώ αντάξιος της εμπιστοσύνης που μου έδειξαν. Κλείνοντας αυτόν τον σύντομο πρόλογο θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για την αγάπη τους, την υπομονή τους και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Συντομεύσεις

2-HG	2-υδροξυγλουταρικού
aCL	αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης
AGT	αγγειοτενσινογόνο
aPL	αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα
aPTT	χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης
ARID5B	πλούσιας σε AT πρωτεΐνης 5B
BMP-6	μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 6
BMP-9	μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 9
C5	πρωτεΐνη 5 του συμπληρώματος
CALCA	πολυπεπτίδιο άλφα που σχετίζεται με καλσιτονίνη
CCC	καρκινώματος από διαυγή κύτταρα (
CD11b	Συστοιχία διαφοροποίησης 11β
CD18	Συστοιχία διαφοροποίησης 18
CD36	Συστοιχία διαφοροποίησης 36
CD4	Συστοιχία διαφοροποίησης 4
CD40	Συστοιχία διαφοροποίησης 40
CD40-L	Συνδέτης της πρωτεΐνης συστοιχίας διαφοροποίησης 40
cDNA	συμπληρωματικό DNA
Chip-seq	αλληλούχιση DNA ύστερα από ανασοκατακρήμνιση χρωματίνης
CpG	νησιδία γουανίνης και κυτοσίνης
CXCL4	χημειοκίνη γνωστή και ως παράγοντας ενεργοποίησης αιμοταλίων 4
DAPI	4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη
DDAH1	διμεθυλαμμωνοϋδρολάση 1 της διμεθυλαργινίνης
DNA	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNMT 3a	DNA μεθυλοτρανσφεράση 3a
DNMT1	DNA μεθυλοτρανσφεράση 1
DNMT3b	DNA μεθυλοτρανσφεράση 3b
EAE	αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα
EDN1	ενδοθηλίνη-1
EGF	επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EPCR	υποδοχέας της πρωτεΐνης C
EZH2	ενισχυτή ιστονικής μεθυλοτρανσφεράσης του zeste homolog 2
F3	ιστικός παράγοντας
FBS	εμβρυικός βόειος ορός
FGF-b	αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών β
FII	παράγοντας πήξης 2
FLT1	υποδοχέας 1 του αυξητικού ενδοθηλιακού παράγοντα
FVII	παράγοντα πήξης 7
FVII	παράγοντας πήξης 7
FVIII	παράγοντας πήξης 8
FX	παράγοντας πήξης 10
GPIb-V-IX	γλυκοπρωτεΐνη Ib-V-IX

GPIIb/IIIa	γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa
H3K4me3	3μεθυλίωση στην 4 λυσίνη της ιστόνης 3
H3K9ac	ακετυλίωση στην 9 λυσίνη της ιστόνης 3
HATs	ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης
HDAC9	αποακετυλάση των ιστονών 9
HDACs	αποακετυλάσες των ιστονών
HELLP	αιμόλυση, τρανσαμινασαιμία, θρομβοπενία
Hippo	αυξητικό σηματοδοτικό μονοπατι με κύρια πρωτεΐνη την HPO
HNF1B	πυρηνικού παράγοντα φαγοκυττάρων 1-βήτα
HUVECs	ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας
ICAM-1	μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 1
IDH1	ισοκυτταρική δεϋδρογενάση 1
IFN-γ	Ιντερφερόνη γάμμα
IGF-1,	αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με την ινσουλίνη
IgG	ανοσοσφαιρίνη Γ
IL-17A	ιντερλευκίνη-17A
IL-18	ιντερλευκίνη-18
IL-1β	ιντερλευκίνη-1β
IL-6	ιντερλευκίνη 6
IL-8	ιντερλευκίνη 8
iNOS	επαγόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
INR	χρόνος προθρομβίνης
ITGA2B	ιντεγκρίνη άλφα-IIβ
KLF2	παράγοντας τύπου Kruppel 2
LA	Αντιπηκτικό του λύκου
MAPK14	γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση p38
MAPK38	πρωτεϊνική κινάση p38
miR-223	μικροRNA 223
miRNAs	μικροRNAs
mRNA	αγγελιοφόρο RNA
mTOR	μηχανιστικού στόχου της ραπαμυκίνης
NETs	εξωκυτταριών παγίδων των ουδετερόφιλων
NF-KB1	πυρηνικό παράγοντα ενεργοποιημένων B κυττάρων 1
NF-κB	πυρηνικό παράγοντα ενεργοποιημένων B κυττάρων
NOS3	συνθετάση οξειδίου του αζέτου-3
oxLDL	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών χοληστερόλης
p65	υπομονάδα του NF-κB
PAI-1	Αναστολέας του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου 1
PAI-2	Αναστολέας του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου 2
PAR1	Υποδοχέας 1 ενεργοποιούμενος από πρωτεάση
PAR4	Υποδοχέας 4 ενεργοποιούμενος από πρωτεάση
PCI	Αναστολέας της πρωτεϊνής C
PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RNA	ριβονουκλεϊκό οξύ

RNA-seq	αλληλούχιση του συνόλου των μεταγεγραμμένων γονιδίων
SELE	E-σελεκτίνη
SELP	P-σελεκτίνη
SMAD	πρωτείνες που μεσολαβούν τη σηματοδότηση του TGF-β
Sr1	αλληλουχίες δέσμευσης πρωτεΐνης
TBXAS1)	συνθετάσης της θρομβοξάνης (,
TGFR1	υποδοχέας 1 του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης
TGF-β1	αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β1
TGF-β2	αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β2
Th-17	T 17 απόκριση των T βοηθητικών κυττάρων
TLR	toll like receptor (υποδοχέας φυσικής ανοσίας)
TM	θρομβομοντουλίνης
TNF-α	παράγοντα νέκρωσης όγκων α
tPA	ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου
TSP-1	θρομβοσπονδίνη 1
TET1,	Δέκα-έντεκα μετατοπισμένη μεθυλ-κυτοσίνης διοξυγενάσης 1
TXA2	θρομβοξάνη A2
uPA	ενεργοποιητή πλασμινογόνου ουροκινάσης
VCAM-1,	αγγειακό ενδοθηλιακό μόριο προσκόλλησης 1
VEGF	ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VWF	Παράγοντας von Willebrand
AEE	αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
β2GPI	β2-γλυκοπρωτεΐνη I
ΔΕΓ	γονιδίων που εκφράστηκαν διαφορετικά
MECP2	πρωτεΐνη 2 που συνδέεται με μέθυλ-CpG
MMT	μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών
MΣ	μικροσωματίδια
OEM	έμφραγμα του μυοκαρδίου
OΣΝ	οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
ΠΜΙ	πρωτοπαθής μυελοϊνωση
ΣΑ	σταθερή απόκλιση
ΣΑΦ	σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων
ΣΕΛ	συστηματικός ερμηματώδης λύκος
ΥΔ	υγιείς δότες
ΧΑΠ	Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

Περιεχόμενα

- 1. Περίληψη**
- 2. Κεφάλαιο 1: Σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων: αιτοπαθογένεια, κλινική εικόνα, διάγνωση και θεραπεία**
 - 2.1. Εισαγωγή**
 - 2.2. Παθογένεση των κλινικών συμβάντων διαμεσολαβούμενων από αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα**
 - 2.3. Επιτόλασμος των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων**
 - 2.4. Κλινική εικόνα ασθενών με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα**
 - 2.5. Διάγνωση του συνδρόμου αντιφωσφολιπιδικών**
 - 2.6. Πρόληψη και θεραπεία του θρομβωτικού συνδρόμου αντιφωσφολιπιδίων**
 - 2.6.1. Πρωτογενής πρόληψη της θρόμβωσης
 - 2.6.2. Δευτερογενής Πρόληψη φλεβικής θρόμβωσης
 - 2.6.3. Δευτερογενής πρόληψη αρτηριακής θρόμβωσης
 - 2.6.4. Δευτερογενής πρόληψη σε φλεβική και αρτηριακή θρόμβωση σε ασθενείς στους οποίους η βαρφαρίνη αποτυγχάνει
 - 2.6.5. Απευθείας αντιπηκτικά από του στόματος
 - 2.7. Θεραπεία του καταστροφικού αντιφωσφολιπιδικού Σύνδρομου**
 - 2.8. Πρόληψη και θεραπεία του μαιευτικού αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου**
 - 2.9. Φαρμακευτικές επιλογές πέραν των αντιπηκτικών παραγόντων**
- 3. Κεφάλαιο 3: Επιγενετικές αλλαγές στη θρόμβωση και την πήξη: μια συστηματική ανασκόπηση**
 - 3.1. Εισαγωγή**
 - 3.1.1. Θρομβωτικές διαταραχές
 - 3.1.2. Επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων
 - 3.1.3. Μεθυλίωση του DNA
 - 3.1.4. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών (MMT)
 - 3.2. Υλικά και Μέθοδοι**
 - 3.3. Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην καρδιαγγειακή νόσο και αθηροσκλήρωση**

- 3.4.** Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην παθογένεση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου
- 3.5.** Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην παθογένεση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου
- 3.6.** Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην προεκλαμψία
- 3.7.** Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης σε θρόμβωση σχετιζόμενη με τον καρκίνο
- 3.8.** Στοιχεία επιγενετικών αλλαγών του DNA σε καταστάσεις που προδιαθέτουν σε θρόμβωση
 - 3.8.1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες
 - 3.8.2. Το κάπνισμα και η ΧΑΠ
 - 3.8.3. Διαβήτης και Υπερτριγλυκεριδαιμία
 - 3.8.4. Συστηματικές αυτοάνοσες ασθένειες
 - 3.8.5. Χρόνια νεφρική νόσος
- 3.9.** Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης προθρομβωτικών γονιδίων in vitro μοντέλα
 - 3.9.1. Ενδοθηλιακά κύτταρα
 - 3.9.2. Μεγακαρυοκύτταρα
- 3.10.** Συμπεράσματα
- 4.** Κεφαλαίο 3: Διαφορική μεθυλίωση σε CpG στον υποκινητή της ιντερλευκίνης 8 και στο πρώτο εσώνιο του ιστικού παράγοντα στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
 - 4.1.** Εισαγωγή
 - 4.1.1. Επιγενετικές αλλαγές και αυτοανοσία
 - 4.1.2. Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων
 - 4.2.** Υλικά και Μέθοδοι
 - 4.2.1. Πληθυσμός μελέτης και δείγματα
 - 4.2.2. Απομόνωση Αντί-β2GPI ανοσοσφαιρίνης Γ (IgG)
 - 4.2.3. Διέγερση των HUVECs.
 - 4.2.4. Απομόνωση RNA και ποσοτική PCR
 - 4.2.5. Απομόνωση DNA, επεξεργασία με διθειώδες και ειδική ως προ τη μεθυλίωση PCR
 - 4.2.6. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση για πρωτεΐνες IL-8 και F3
 - 4.2.7. Στατιστική ανάλυση
 - 4.3.** Αποτελέσματα

- 4.3.1. Μειωμένη σχετική μεθυλίωση στον υποκινητή της IL-8 στους ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσfolιπιδίων
- 4.3.2. Αυξημένη Σχετική μεθυλίωση των CpG στο πρώτο εσώνιο του F3
- 4.3.3. Διέγερση μονοκύτταρων απομονωμένα από υγιείς δότες με αντί-β2GPI IgG/β2GPI/CXCL4 οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση και δυναμικές αλλαγές στην μεθυλίωση των γονιδίων IL-8 και F3
- 4.3.4. Η διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων από υγιείς δότες με το μείγμα αντί-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 επάγει έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο και ρυθμίζει τη μεταγραφή πολλαπλών παραγόντων
- 4.3.5. Η διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων με το μείγμα αντί-β2GPI IgG - β2GPI - CXCL4 επάγει αλλαγές στη σχετική μεθυλίωση του πρώτου εσωνίου του F3.

4.4. Συμπεράσματα

5. Κεφαλαίο 4: Η θρομβοσπονδίνη 1 είναι αυξημένη στο σύνδρομο αντιφωσfolιπιδίων. Επιπτώσεις στην παθογένεια του συνδρόμου.

5.5. Εισαγωγή

5.6. Υλικά και μέθοδοι

- 5.6.1. Ασθενείς και δείγματα
- 5.6.2. Απομόνωση αντι-β2GPI IgG
- 5.6.3. Ενεργοποίηση μονοκυττάρων
- 5.6.4. Διαφοροποίηση των CD4 + T κυττάρων σε Th17 υποσύνολο
- 5.6.5. Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων in vitro
- 5.6.6. Διέγερση των HUVECs
- 5.6.7. Αξιολόγηση των TSP-1, ελεύθερου ενεργού TGF-β1, IL-1β και IL-17A σε υπερκείμενα πλάσματος και κυτταροκαλλιέργειας.
- 5.6.8. Απομόνωση RNA και PCR πραγματικού χρόνου και Στατιστική ανάλυση

5.7. Αποτελέσματα

- 5.7.1. Αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών πλάσματος και επίπεδα mRNA αιμοπεταλίων της TSP-1 και του ελεύθερου ενεργού TGF-β1 σε ασθενείς με ΣΑΦ
- 5.7.2. Σύνδεση μεταξύ επιπέδων πλάσματος TSP-1 και σχετικής έκφρασης mRNA της TSP-1 στα αιμοπετάλια με κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με ΣΑΦ

- 5.7.3. Τα υψηλά επίπεδα TSP-1 συσχετίζονται με τα επίπεδα των IL-1β και IL-17A σε ασθενείς που υπόκεινται σε κλινικό συμβάν.
- 5.7.4. Τα αιμοπετάλια που διεγείρονται με σύμπλοκα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 απελευθερώνουν υψηλότερα επίπεδα TSP-1
- 5.7.5. Το πλάσμα ΣΑΦ και το αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 επάγουν την έκκριση της TSP-1 από ΥΔ HUVECs.
- 5.7.6. Η TSP-1 επάγει την έκφραση SELE σε HUVECs και η σίγαση της TSP-1 στα HUVECs εξασθενεί την απόκριση στη διέγερση με αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4
- 5.7.7. Τα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 συμπλέγματα επάγουν την έκφραση του TSP-1 και της IL-1 β σε μονοκύτταρα Αυξημένα επίπεδα mRNA των IL-1β, IL-6, IL-8 και TSP-1 σε μονοκύτταρα που υποβλήθηκαν σε διέγερση με αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4
- 5.7.8. Τα μονοκύτταρα που διεγείρονται με σύμπλοκα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 επάγουν έκφραση IL-17A από CD4 + λεμφοκύτταρα

5.8. Συζήτηση

- 6. Κεφάλαιο 5: Αλληλούχιση του συνολικού mRNA σε HUVECs που έχουν υποστεί διέγερση με IgG από ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων αναδεικνύει προφλεγμονώδη και προπηκτικά μονοπάτια

6.5. Εισαγωγή

6.6. Υλικά και μέθοδοι

- 6.6.1. Ασθενείς και δείγματα
- 6.6.2. Απομόνωση ολικής IgG και διέγερση HUVECs
- 6.6.3. Παρασκευή βιβλιοθήκης και αλληλούχιση του συνολικού mRNA (RNA-seq)
- 6.6.4. Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο
- 6.6.5. Βιοπληροφορικές αναλύσεις των RNA-seq και CHIP-seq
- 6.6.6. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση για IL-6, IL-8, NF-κB1, Ιστικό Παράγοντα, ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη, TGF-β2 και TGFR1
- 6.6.7. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση δειγμάτων πλακούντα
- 6.6.8. Στατιστική ανάλυση

6.7. Αποτελέσματα

- 6.7.1. Η διέγερση των HUVECs επάγει με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI τη διαφορική έκφραση 900 γονιδίων

6.7.2. Η διέγερση των υγιών HUVECs με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης προ-φλεγμονωδών και προπηκτικών μεσολαβητών

6.7.3. Η τομή του RNA-seq με τα δεδομένα ChIP-seq αποκαλύπτει αρκετούς στόχους NF-κB και SMAD μεταξύ των ΔΕΓ

6.7.4. Αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης φλεγμονωδών μορίων και μορίων προσκόλλησης σε βιοψίες πλακούντα ΣΑΦ

6.8. Συζήτηση

7. Αναφορές

8. Δημοσιευμένα άρθρα σε διεθνή περιοδικά

Περίληψη

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι μια συστηματική αυτοάνοση ασθένεια που χαρακτηρίζεται από θρομβωτικά επεισόδια ή και νοσηρότητα εγκυμοσύνης που εμφανίζονται σε ασθενείς με επίμονα υψηλούς τίτλους αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Τα αυτοαντισώματα οδηγούν σε ενεργοποίηση μονοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων και επακόλουθη έκκριση παράγοντα ιστικού παράγοντα (F3) και προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι ιντερλευκίνες 6 (IL-6) και 8 (IL-8). Η αιτιολογία του συνδρόμου παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, με τη συμβολή των περιβαλλοντικών, γενετικών και επιγενετικών παραγόντων που θεωρούνται σημαντικές. Η διερεύνηση της παθογένειας του ενδοθηλίου στο σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων αποτέλεσε στόχο της παρούσας μελέτης και απαρτίζεται από 3 επιμέρους τμήματα.

Στο πρώτο τμήμα της στόχος ήταν να περιγραφούν οι αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης που εμφανίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα στο πλαίσιο του ΣΑΦ, πραγματοποιήσαμε μεταγραφική ανάλυση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας (HUVECs) διεγερμένων με ολική ανοσοσφαιρίνη Γ (IgG) και β2GPI.

Μέθοδοι: Τα HUVECs απομονώθηκαν από 2 υγιείς γυναίκες και διεγέρθηκαν με IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI. Συνεπώς απομονώθηκε το ολικό mRNA, δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες cDNA και διεξήχθη αλληλούχιση του συνόλου των μεταγεγραμμένων γονιδίων (RNA-seq). Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης αξιολογήθηκαν επίσης σε πρωτεϊνικό επίπεδο με δοκιμασίες ανοσοφθορισμού σε διεγερμένα κύτταρα και βιοψίες πλακούντα από ασθενείς με ΣΑΦ και υγιή άτομα.

Αποτελέσματα: Η ανάλυση του συνόλου των μεταγεγραμμένων γονιδίων σε HUVECs που διεγέρθηκε με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI αποκάλυψε 906 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια, μεταξύ των οποίων 395 υπερκεφράζονταν και 511 υποεκφράζονταν στα διεγερμένα ενδοθηλιακά κύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Μεταξύ των αυξημένων γονιδίων αναγνωρίζουμε τα IL-6, IL-8, VCAM-1, E-σελεκτίνη και TGF-β2 και TGFR1. Η βιοπληροφορική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα αυξημένα γονίδια ανήκουν κατά κύριο λόγο στο σηματοδοτικό TNF-α, του TGF-β, MAPK38 και το Hippo μονοπάτι. Η συναλήθευση με διαθέσιμα δεδομένα από αλληλούχιση DNA ύστερα από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντισώματα για τον NF-κB και SMAD (NF-κB και SMAD

ChIP-seq) αποκαλύπτει περαιτέρω ότι πολλά από τα υπερεκφρασμένα γονίδια αντιπροσωπεύουν τους πιθανούς άμεσους στόχους αυτών των παραγόντων μεταγραφής. Η ανάλυση ανοσοφθορισμού σε διεγερμένα HUVECs και βιοψίες πλακούντα από ασθενείς με ΣΑΦ αποκαλύπτει επίσης αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών σε ορισμένα από τα βασικά γονίδια που έχουν προκύψει από το σύνολο των δεδομένων του RNA-seq.

Συμπεράσματα: Η αλληλούχιση του RNA των HUVECs που έχουν υποστεί διέγερση με IgG από ασθενείς με ΣΑΦ αποκαλύπτει έναν προφλεγμονώδη και προπηκτικό φαινότυπο

Στο δεύτερο τμήμα της σκοπός μας ήταν να προσδιορίσουμε τις επιγενετικές αλλαγές και παράγοντες που ενδεχομένως εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ΣΑΦ. Για το σκοπό αυτό, συγκρίναμε τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA των γονιδίων IL-8 και F3 μεταξύ υγιεινών δοτών και APS ασθενών, χρησιμοποιώντας πλήρες αίμα ως πηγή.

Αποτελέσματα: Η μεθυλίωση μειώθηκε σημαντικά στον υποκινητή της IL-8 και σημαντικά αυξήθηκε στο σώμα του γονιδίου F3 σε ασθενείς με ΣΑΦ σε σύγκριση με υγιείς δότες και συσχετίστηκε με ειδικές κλινικές παραμέτρους. Σε ένα μοντέλο ex vivo που μιμείται μερικώς το ΣΑΦ, η διέγερση μονοκυττάρων με ένα μείγμα β2GPI, αντι-β2GPI και CXCL4 επάγει επίσης αλλαγές μεθυλίωσης DNA στα παραπάνω γονίδια, μαζί με αύξηση της έκφρασής τους. Η διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινων ομφάλιων φλεβών (HUVECs) με το ίδιο μείγμα έχει επίσης ως αποτέλεσμα τη θετική μεταγραφική ρύθμιση επιγενετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των MECP2, DNMT3, TET1, HDAC9 και ARID5B.

Συμπεράσματα: Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι επιγενετικές αλλαγές θα μπορούσαν να εμπλακούν στην παθοφυσιολογία του ΣΑΦ και να προωθήσουν περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής διαγνωστικής ή θεραπευτικής τους χρησιμότητας.

Στο τρίτο τμήμα της με δεδομένο ότι τα αντισώματα αντι-β2GPI αναγνωρίζουν σύμπλοκα διμερών β2GPI με χημειοκίνη CXCL4 και ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και ότι η θρομβοσπονδίνη 1 (TSP-1) εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια και διαθέτει προθρομβωτικές και προφλεγμονώδεις ιδιότητες σκοπός μας ήταν να ερευνήσουμε την συσχέτιση της με το ΣΑΦ.

Μέθοδοι: Το πλάσμα από ασθενείς με ΣΑΦ (n = 100), συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ) (n = 27) και υγιείς δότες (ΥΔ) (n = 50) αναλύθηκε για TSP-1, IL-1β, TGF-β1 με ELISA. Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας (HUVECs) και τα μονοκύτταρα από ΥΔ υποβλήθηκαν σε επώαση με ολική ΥΔ-IgG ή αντι-β2GPI, β2GPI και CXCL4 και CD4 + T-κύτταρα διεγέρθηκαν από υπερκείμενα μονοκυττάρων. Τα επίπεδα των TSP-1, IL-1β, IL-6 ποσοτικοποιήθηκαν με ELISA και Real-Time PCR.

Αποτελέσματα: Τα υψηλότερα επίπεδα πλάσματος TSP-1 και TGF-β1 (αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β1), τα οποία συσχετίζονται θετικά μεταξύ τους, παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με ΣΑΦ αλλά όχι στους ΥΔ ή ασθενείς με ΣΕΛ. Ασθενείς με αρτηριακά θρομβωτικά επεισόδια ή ασθενείς που υπόκειντο σε κλινικό συμβάν είχαν τα υψηλότερα επίπεδα TSP-1. Αυτοί οι ασθενείς είχαν επίσης ανιχνεύσιμη IL-1β και IL-17A στο πλάσμα τους. Τα προερχόμενα από ΥΔ μονοκύτταρα και τα HUVECs που διεγέρθηκαν με αντι-β2GPI-IgG-β2GPI-CXCL4 εκκρίνουν τα υψηλότερα επίπεδα TSP-1 και IL-1β. Τα υπερκείμενα από μονοκύτταρα που έχουν υποβληθεί σε διέγερση με αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 προκάλεσαν έκφραση IL-17A από CD4 + T-κύτταρα. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης ακολούθησαν παρόμοιο πρότυπο.

Συμπεράσματα: Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την πιθανή συσχέτιση της TSP-1 στην παθογένεια του ΣΑΦ. Τα in vitro πειράματα κυττάρων μαζί με μετρήσεις πλάσματος ασθενών με ΣΑΦ υποδηλώνουν ότι τα υψηλά επίπεδα TSP-1 θα μπορούσαν να σηματοδοτήσουν μια προθρομβωτική κατάσταση και μια υποκείμενη φλεγμονώδη διαδικασία.

Abstract

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune thrombophilia characterized by recurrent thromboembolism and/or pregnancy morbidity in the presence of Antiphospholipid antibodies, mainly anti- β 2glycoprotein I (anti- β 2GPI). The autoantibodies lead to monocyte and endothelial cell activation and subsequent secretion of tissue factor (F3) and proinflammatory cytokines, like interleukins 6 (IL6) and 8 (IL8). The etiology of the syndrome remains largely unknown, with the contribution of environmental, genetic and epigenetic factors considered significant. The evaluation of the endothelial pathogenesis in antiphospholipid syndrome was the objective of this study and is divided in three main sections.

In the first section we sought to identify the whole transcriptome of endothelial cells that have been stimulated with aPL-B2GPI complexes.

Methods: Human umbilical Vein Endothelial cells (HUVECs) were isolated from 2 healthy women and stimulated with IgG isolated from APS patients in the presence of B2GPI. Consequently, total mRNA was isolated, cDNA libraries were created and whole transcriptome sequencing (RNA-seq) was performed. Gene expression data were validated in protein levels with immunofluorescent assays in treated cells and placenta biopsies from APS patients and healthy individuals.

Results: Whole transcriptome analysis of HUVECs stimulated with APS total IgG and β 2GPI complexes and IgG from healthy individuals revealed 906 differentially expressed genes, among which 395 were upregulated and 511 downregulated in the aPL stimulated endothelial cells. Characteristic examples of the upregulated genes are IL-6, IL-8, VCAM-1, E-selectin and TGF- β 2 and TGFR1. Bioinformatics analysis revealed that the upregulated genes belong mainly to the TNF- α signaling, TGF- β signaling, MAPK38-signaling and Hippo pathways. Several transcription factors in APS treated HUVECs are upregulated and NF- κ B and SMAD chip-seq intersection with RNA-seq reveals target genes such as IL-6, IL-8, E-Selectin and Tissue factor. Immunofluorescent assays on treated HUVECs and placenta biopsies from APS patients for the above molecules further validate the RNASeq results.

Conclusions: RNA-seq of APS treated HUVECs reveals a thoroughly analysed proinflammatory and procoagulant phenotype.

In the second section we aimed to identify epigenetic changes and factors potentially implicated in the pathophysiology of APS. To this end, we compared DNA methylation levels of the IL8 and F3 genes between healthy donors (HDs) and APS patients, using whole blood as a source.

Results: Methylation was significantly reduced in the IL8 promoter and significantly increased in the F3 gene body in APS patients compared to HDs and correlated with specific clinical parameters. In an *ex vivo* model partially mimicking APS, stimulation of monocytes with a mixture of β 2GPI, anti- β 2GPI and CXCL4 also induces DNA methylation changes in the above genes, along with increase of their expression. Stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with the same mixture also results in transcriptional upregulation of epigenetic factors, including MECP2, DNMT3, TET1, HDAC9 and ARID5B.

Conclusions: The above data support that epigenetic alterations could be implicated in the pathophysiology of APS and prompt further investigation of their potential diagnostic or therapeutic utility.

In the third section, given the fact that anti- β 2GPI antibodies recognize complexes of β 2GPI dimers with CXCL4 chemokine and activate platelets and Thrombospondin 1 (TSP-1) is secreted by platelets and exhibits prothrombotic and proinflammatory properties. Therefore, we investigated its implication in APS.

Methods: Plasma from APS patients (n=100), Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (n=27) and healthy donors (HD) (n=50) was analyzed for TSP-1, IL-1 β , IL-17A and free active TGF- β 1 by ELISA. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) and HD monocytes were treated with total HD-IgG or anti- β 2GPI, β 2GPI and CXCL4 and CD4⁺T-cells were stimulated by monocyte supernatants. TSP-1, IL-1 β , IL-17A TGF- β 1 levels were quantified by ELISA and Real-Time PCR.

Results: Higher plasma levels of TSP-1 and TGF- β 1, which positively correlated each other, were observed in APS but not HDs or SLE patients. Patients with arterial thrombotic events or those undergoing a clinical event had the highest TSP-1 levels. These patients also had detectable IL-1 β , IL-17A in their plasma. HD-derived monocytes and HUVECs stimulated

with anti- β 2GPI-IgG- β 2GPI-CXCL4 secreted the highest TSP-1 and IL-1 β levels. Supernatants from anti- β 2GPI- β 2GPI-CXCL4 treated monocytes induced IL-17A expression from CD4⁺ T-cells. Transcript levels followed a similar pattern.

Conclusions: These findings support a possible implication of TSP-1 in APS pathology. In vitro cell treatments along with patient plasma measurements in APS patients suggest that high TSP-1 levels could mark a prothrombotic state and an underlying inflammatory process.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

Σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων: αιτοπαθογένεια, κλινική εικόνα, διάγνωση και θεραπεία

1. Εισαγωγή

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι μια συστηματική αυτοάνοση ασθένεια που χαρακτηρίζεται από θρομβωτικά επεισόδια ή και νοσηρότητα εγκυμοσύνης που εμφανίζονται σε ασθενείς με επίμονα υψηλούς τίτλους αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων [1].

Το θρομβωτικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από φλεβική, αρτηριακή ή μικροαγγειακή θρόμβωση. Ασθενείς με καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εμφανίζουν μια κλινική εικόνα που παρουσιάζεται με θρόμβωση που περιλαμβάνει πολλαπλά όργανα [2].

Το μαιευτικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από απώλεια εμβρύου μετά τη 10η εβδομάδα κύησης, επαναλαμβανόμενες πρώιμες αποβολές, ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης ή σοβαρή προεκλαμψία [1].

Οι κύριες μη θρομβωτικές εκδηλώσεις της θετικότητας των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων περιλαμβάνουν τη βαλβιδική καρδιακή νόσο, το έμφραγμα, τη σχετιζόμενη με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα νεφροπάθεια, τη θρομβοπενία, την αιμολυτική αναιμία και τη γνωστική δυσλειτουργία. Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο συσχετίζεται συχνά με άλλες συστηματικές αυτοάνοσες ασθένειες όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ). Ωστόσο, αυτό συμβαίνει συνήθως χωρίς άλλες αυτοάνοσες εκδηλώσεις (πρωτοπαθές αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο). Μολονότι υπάρχουν κριτήρια για την ταξινόμηση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου ο ορισμός της κλινικά σημαντικής θετικότητας του αντισώματος έναντι των φωσφολιπιδίων δεν είναι καλά καθιερωμένος και η θρόμβωση είναι γενικά πολυπαραγοντική [1].

2. Παθογένεση των κλινικών συμβάντων διαμεσολαβούμενων από αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα

Στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ο κύριος στόχος των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων είναι η β2-γλυκοπρωτεΐνη Ι (β2GPI), μια πρωτεΐνη του πλάσματος που δεσμεύεται με τις

φωσφολιπιδικές επιφάνειες, ακόμη περισσότερο όταν διμερίζεται μέσω πρόσδεσης σε αντι-β2GPI αντισώματα. Συγγενής ανεπάρκεια β2GPI δεν συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης [3], αλλά η σύνδεση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων με τη β2GPI επί των κυτταρικών επιφανειών ρυθμίζει εκ των άνω την έκφραση των προθρομβωτικών κυτταρικών μορίων προσκόλλησης όπως η E-σελεκτίνη και ο Ιστικός παράγοντας. Επιπλέον, η δέσμευση των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στη β2GPI καταστέλλει τη δραστικότητα του αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα [4], μειώνει τη δραστικότητα της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C [5] και ενεργοποιεί το συμπλήρωμα [6, 7]. Ένα μοντέλο μύος προτείνει ότι η αννεξίνη A2, ένας ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου, μπορεί να είναι ένα σημαντικό μόριο για τη παθογένεση της νόσου [8]. Η έκθεση των αιμοπεταλίων από υγιείς δότες σε αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα *in vitro* αυξάνει την έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa (GPIIb/IIIa, ο υποδοχέας του ινωδογόνου) [9], και τα αιμοπετάλια μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στις προθρομβωτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και ενδοθηλιακών κυττάρων [10]. Η ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης τόσο του ιστικού παράγοντα όσο και της απελευθέρωσης εξωκυτταρίων παγίδων των ουδετερόφιλων (NETs) και ιντερλευκίνης-8, μπορεί είναι επίσης σημαντικό στοιχείο της θρομβωτικής διαδικασίας που σχετίζεται με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα [11-13]. Επιπλέον, μονοκύτταρα και μικροσωματίδια που προέρχονται από αυτά απομονωμένα από ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εκφράζουν υψηλά επίπεδα Ιστικού παράγοντα [14]. Το μικροθρομβωτικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί από την επαγωγή από αντισώματα έναντι των φωσφολιπιδίων του μηχανιστικού στόχου της ραπαμυκίνης (mTOR) σε ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε αγγειοπάθεια που σχετίζεται με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα [15]. Η διαμεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου και των νευροβλαστών [16] εξηγεί εν μέρει τις επιπλοκές της εγκυμοσύνης και τις μικροθρομβώσεις που σχετίζονται με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα.

3. Επιπολασμός των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων

Δεδομένης της απουσίας μελετών στον ευρή πληθυσμό, ο πραγματικός επιπολασμός της θετικότητας των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στον γενικό πληθυσμό δεν είναι γνωστός. Το 10% των υγιών αιμοδοτών είναι θετικοί για αντισώματα έναντι της

καρδιολιπίνης και 1% είναι θετικοί για το αντιπηκτικό του λύκου. Ωστόσο, μετά από 1 χρόνο, λιγότερο από το 1% εξακολουθούν να είναι θετικοί για αυτές τις δοκιμασίες [17]. Είναι σπάνιο να εντοπιστεί ένα υψηλού κινδύνου προφίλ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (Πίνακας 1) σε υγιή άτομα. Μεταξύ 20% και 30% των ασθενών με ΣΕΛ έχουν επίμονα μέτριου έως υψηλού κινδύνου προφίλ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κλινικών συμπτωμάτων [18]. Σε ασθενείς χωρίς συνωδά αυτοάνοσα νοσήματα, ο επιπολασμός της θετικότητας των αντισωμάτων έναντι των φωσφολιπιδίων είναι 6% σε γυναίκες με επιπλοκές εγκυμοσύνης, 10% σε ασθενείς με φλεβική θρόμβωση, 11% σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου, και το 17% σε ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο που είναι ηλικίας μικρότερης των 50 ετών [19]. Ωστόσο οι εκτιμήσεις επικινδυνότητας προήλθαν κυρίως από μελέτες που συμπεριέλαβαν ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ορολογική δοκιμασία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων μόνο μία φορά, ή ασθενείς των οποίων τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ήταν οριακά θετικά [19].

4. Κλινική εικόνα ασθενών με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα

Οι ασθενείς που είναι θετικοί για αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα μπορεί να εμφανιστούν χωρίς συναφή συμπτώματα. Αυτοί οι ασθενείς εντοπίζονται συνήθως κατά τη διάρκεια μιας αξιολόγηση για συστηματικές αυτοάνοσες νόσους, πρώιμων αποβολών, αυξημένου χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT), ή ψευδώς θετικού αποτελέσματος μια δοκιμασίας σύφιλης. Οι συμπτωματικοί ασθενείς αναζητούν ιατρική φροντίδα για θρομβωτικές, μαιευτικές ή άλλες κλινικές επιπλοκές των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Το εγκεφαλικό επεισόδιο και το παροδική ισχαιμικό επεισόδιο είναι τα συνηθέστερα αρτηριακά συμβάντα σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Ασθενείς με φλεβική θρομβοεμβολή συνήθως προσέρχονται με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση κάτω άκρων, πνευμονική εμβολή ή και τα δύο. Οι σχετιζόμενες με αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα επιπλοκές της εγκυμοσύνης αναπτύσσονται γενικά έπειτα από τη 10η εβδομάδα κύησης. Απώλειες πριν την 10η εβδομάδα, ειδικά εάν δεν επαναλαμβάνονται, είναι περισσότερο πιθανό να οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Αν και δεν αποτελεί μέρος των κριτηρίων ταξινόμησης, επιπρόσθετες κλινικές εκδηλώσεις του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου παρατίθενται στον Πίνακα 2. Μεταξύ των ασθενών με ΣΕΛ, ο επιπολασμός της θρόμβωσης, οι επιπλοκές της εγκυμοσύνης, η νόσος των

βαλβίδων, η πνευμονική υπέρταση, η δικτυωτή πελίδνωση, η θρομβοπενία, η αιμολυτική αναιμία, η οξεία ή η χρόνια νεφρική αγγειακή βλάβη και μέτρια ή σοβαρή η γνωστική έκπτωση είναι υψηλότερη στους ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα σε σχέση με αυτούς που είναι αρνητικοί για τα αντισώματα [18].

Πινάκας 1. Σημεία κλειδιά για την αξιολόγηση των ορολογικών δοκιμασιών των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων	
Σημεία κλειδιά	
Βήμα 1. κατανοώντας τα βασικά	Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι παράγοντας κίνδυνου για θρόμβωση. Πρέπει να συναξιολογούνται με άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου. Παροδική αύξηση των τίτλων είναι συχνή σε λοιμώξεις.
Βήμα 2. Αξιολογώντας τις δοκιμασίες	Δεν είναι κάθε θετική δοκιμασία αξιολογήσιμη.
Αντιπηκτικό του λύκου (LA)	Το αντιπηκτικό του λύκου συσχετίζεται καλύτερα με τα κλινικά συμβάντα σε σχέση με τα aCL (αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης) και αντίβ2GPI αντισώματα
ELISA	Επηρεάζεται από τη λήψη αντιπηκτικών Μετρία έως υψηλοί τίτλοι aCL και αντί-β2GPI IgG και IgM (99η εκατοστιαία θέση ή 40 GPL) συσχετίζονται καλύτερα με τα κλινικά συμβάντα του ΣΑΦ
Βήμα 3. Αξιολογώντας το ορολογικό προφίλ του ασθενούς	
	Σταθερά υψηλοί τίτλοι: με 12 εβδομάδες απόκλιση από τις δυο μετρήσεις
Υψηλού κινδύνου	LA θετικό με μετρίους ή υψηλούς τίτλους aCL και αντί-β2GPI IgG και IgM
Μέτριου κινδύνου	LA αρνητικό με μετρίους ή υψηλούς τίτλους aCL και αντί-β2GPI IgG και IgM
Χαμηλού κινδύνου	LA αρνητικό με χαμηλούς τίτλους aCL και αντί-β2GPI IgG και IgM

Πινάκας 2 Μείζονες κλινικές εκδηλώσεις του Αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου

Αιματολογικές

Θρομβοπενία

Συνήθως ήπια, συμπτωματική: 50000-100000/μl.

Σπανίως σοβαρή (<20000/μl) με ή χωρίς μικροαγγειοπάθεια

Αιμολυτική αναιμία

Χωρίς σχιστοκύτταρα

Με σχιστοκύτταρα

Νεφρικές

Οξεία θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια

Χρόνιες φλεβοαποφρακτικές βλάβες

Καρδιακές

Βαλβιδικές εκβλαστήσεις ή πάχυνση

Δερματολογικές

Δικτυωτή πελίδνωση

Livedoid αγγειοπάθεια

Νευρολογικές

Γνωστική δυσλειτουργία απουσία AEE

Υποφλοιώδεις αλλοιώσεις της λευκής ουσίας

5. Διάγνωση του συνδρόμου αντιφωσφολιπιδικών

Η θετικότητα των αντισωμάτων έναντι των φωσφολιπιδίων πρέπει να περιλαμβάνεται στη διαφορική διάγνωση εάν πρόκειται για ασθενή που παρουσιάζεται με θρόμβωση σε νεαρή ηλικία, σε ασυνήθιστο σημείο ή υποτροπιάζουσα θρόμβωση, με καθυστερημένη νοσηρότητα της εγκυμοσύνης, με πρόωρη ή σοβαρή προεκλαμψία, ή με το σύνδρομο HELLP (αιμόλυση, αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων). Όταν συνδυάζεται με θρόμβωση ή μαιευτικές επιπλοκές, τα ακόλουθα κλινικά ευρήματα μπορεί να είναι ένδειξη ότι ένας ασθενής έχει το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο: δικτυωτή πελίδνωση, σημεία ή συμπτώματα άλλης συστηματικής αυτοάνοσης ασθένειας, ανεξήγητη παράταση του aPTT ή ήπια θρομβοπενία. Σοβαρή θρομβοπενία (αριθμός αιμοπεταλίων, <20.000 ανά κυβικό χιλιοστό) είναι σπάνιο και θα πρέπει να παρακινήσει τον κλινικό ιατρό να εξετάσει άλλα αίτια χαμηλού αριθμού αιμοπεταλίων. Σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια του Sapporo για την ταξινόμηση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, η ασθένεια χαρακτηρίζεται από θρόμβωση, επιπλοκές της εγκυμοσύνης ή και τα δύο σε ασθενείς με επίμονα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (αντιπηκτικό λύκο, αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης ή αντισώματα αντι-β2GPI).

Δεδομένου ότι τα ισχύοντα κριτήρια ταξινόμησης δεν ενσωματώνουν το πλήρες φάσμα των κλινικών ευρημάτων για το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο διεξάγεται διεθνής προσπάθεια για την ανάπτυξη ενός πιο ολοκληρωμένου συστήματος ταξινόμησης, με τη χρήση των ίδιων μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των πλέον πρόσφατων κριτηρίων ταξινόμησης για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον ΣΕΛ [20-22]. Κριτήρια ταξινόμησης χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό ομοιογενών μελετών για κλινική ή μεταφραστική έρευνα, ενώ τα διαγνωστικά κριτήρια προορίζονται να περιλάβουν όλους τους ασθενείς με μια συγκεκριμένη διαταραχή, συμπεριλαμβανομένων αυτών με ασυνήθιστες κλινικές εκδηλώσεις [23]. Το σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων πρέπει να τεθεί στη διαφοροδιάγνωση σε ασθενείς με επίμονα, μέτρια έως υψηλού κινδύνου προφίλ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (διαπιστωμένα με επικυρωμένες μεθόδους) με ταυτόχρονο οποιοδήποτε εύρημα που σχετίζεται με το αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα [24]. Ο πίνακας 1 και το σχήμα 2 δείχνουν βασικές αρχές για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών για αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα που μπορεί να είναι χρήσιμες για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου [24].

6. Πρόληψη και θεραπεία του θρομβωτικού συνδρόμου αντιφωσφολιπιδίων

Το πρώτο βήμα στη θεραπεία των ασθενών που έχουν αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα απουσία θρόμβωσης είναι η διαστρωμάτωση κινδύνου με βάση την ηλικία, το προφίλ των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, ταυτόχρονους άλλους παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση και συνωδά συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα. Ενώ οι δοκιμασίες θρομβωτικού κινδύνου για ασθενείς με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα βρίσκονται υπό ανάπτυξη [25, 26], είναι σημαντικό οι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάντα όπως το κάπνισμα, η υπέρταση, ο διαβήτης, και υπερχοληστερολαιμία, καθώς και ενεργές συστηματικές αυτοάνοσες ασθένειες, να αντιμετωπίζονται κατάλληλα. Ένα προφίλ μέτριου έως υψηλού κινδύνου αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων εγγυάται την αποφυγή χορήγησης οιστρογόνων όταν είναι εφικτό και επιθετική μετεγχειρητική προφύλαξη κατά της θρόμβωσης αντίστοιχα [24].

6.1. Πρωτογενής πρόληψη της θρόμβωσης

Δεδομένου του χαμηλού κινδύνου της θρόμβωσης στο γενικό πληθυσμό, ο απόλυτος κίνδυνος μιας πρώτης θρόμβωσης σε ασθενείς με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα

που δεν έχουν άλλους παράγοντες κινδύνου είναι κατά πάσα πιθανότητα λιγότερο από 1% ετησίως [27, 28]. Όπως και στο γενικό πληθυσμό, επεισόδια αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης σε ασθενείς με θετικούς τίτλους αντισωμάτων κατά των φωσφολιπιδίων είναι συχνά πολυπαραγοντικά [29-32]. Ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο που παρουσιάζουν θρόμβωση έχουν και έναν άλλο παράγοντα κινδύνου θρόμβωσης κατά τη στιγμή του κλινικού συμβάντος [30]. Ο ετήσιος κίνδυνος μιας πρώτης θρόμβωσης σε ασθενείς με διαρκώς μέτριου έως υψηλού κίνδυνου προφίλ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και μια άλλη συστηματική αυτοάνοση νόσο ή πρόσθετους παράγοντες κινδύνου θρόμβωσης μπορεί να φτάσει το 5% [33]. Η χρήση χαμηλής δόσης ασπιρίνης για πρωτογενή πρόληψη της θρόμβωσης εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη, δεδομένης της χαμηλής ποιότητας των ερευνητικών δεδομένων και της έλλειψης προοπτικών μελετών που τεκμηριώνουν ότι αυτή η στρατηγική είναι αποτελεσματική [34]. Προτείνεται η τήρηση των κατευθυντήριων γραμμών για την πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου στο γενικό πληθυσμό και ύστερα από στάθμιση των υπέρ και των κατά, η χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης ως πρωτογενή προφύλαξη σε ασθενείς με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα [24]. Αν και υπάρχουν πειραματικά και κλινικά δεδομένα ότι η υδροξυχλωροκίνη μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο θρόμβωσης σε ασθενείς με ΣΕΛ [35, 36], απαιτούνται επιπλέον μελέτες για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της υδροξυχλωροκίνης ως πρωτογενή προφύλαξη σε ασθενείς με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα χωρίς αλλά συνοδά συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα. Ως εκ τούτου δε συστήνεται η χορήγηση υδροξυχλωροκίνης για την πρόληψη της πρωτογενούς θρόμβωσης [24].

6.2. Δευτερογενής πρόληψη φλεβικής θρόμβωσης

Για ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εμφανιζόμενο με επεισόδιο φλεβικής θρόμβωσης, συνιστάται αρχική θεραπεία με μη κλασματοποιημένη ή χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη, ακολουθούμενη από μακροχρόνια αντιπηκτική θεραπεία με ένα ανταγωνιστή βιταμίνης Κ όπως η βαρφαρίνη (στόχος διεθνής κανονικοποιημένη αναλογία [INR], 2 έως 3). Υψηλότερης έντασης θεραπεία με βαρφαρίνη (στόχος INR, 3 έως 4), αν και σχετίζεται με λιγότερα θρομβωτικά συμβάντα σε αναδρομικές μελέτες [37, 38], δεν μειώνει περαιτέρω τον κίνδυνο επανεμφάνισης θρόμβωσης με βάση τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες [39, 40]. Αν και το ποσοστό των ασθενών με INR εντός θεραπευτικού εύρους ήταν

μικρότερο από την ιδανικό στις προοπτικές μελέτες, ο μέσος όρος των INR αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία με βαρφαρίνη υψηλότερης έντασης συγκριτικά με τις ομάδες που έλαβαν χαμηλότερη έντασης θεραπεία. Για τους περισσότερους ασθενείς με επίμονα θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και επεισόδιο θρόμβωσης χωρίς κάποιο γνωστό εκλυτικό παράγοντα θρομβοεμβολής, η διακοπή της αντιπηκτικής θεραπείας συσχετίζεται με έναν απaráδεκτα υψηλό κίνδυνο επανεμφάνισης της θρόμβωσης [41]. Ωστόσο, το όφελος της παρατεταμένης αντιπηκτικής αγωγής είναι λιγότερο βέβαιο σε ασθενείς που είναι θετικοί για αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και στους οποίους προκλήθηκε η θρόμβωση από κάποιο άλλο παράγοντα, για παράδειγμα χειρουργική επέμβαση, καθώς και σε ασθενείς με θετικούς τίτλους αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων που γίνονται αρνητικοί με την πάροδο του χρόνου.

6.3. Δευτερογενής πρόληψη αρτηριακής θρόμβωσης

Πολλοί ειδικοί συστήνουν βαρφαρίνη ή άλλο ανταγωνιστή της βιταμίνης K για αρτηριακή θρόμβωση έκτος του εγκεφαλικού αγγειακού δικτύου. Για τους ηλικιωμένους ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο και με μια μόνο δοκιμασία που δείχνει χαμηλό τίτλο αντισωμάτων αντικαρδιολιπίνης, μόνο η ασπιρίνη μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματική με την βαρφαρίνη [42, 43]. Ωστόσο, οι ασθενείς με μέτριου έως υψηλού κινδύνου προφίλ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων πρέπει αντιμετωπίζονται συχνά με βαρφαρίνη (στόχος INR, 2 έως 3), με ή χωρίς χαμηλή δόση ασπιρίνης [44, 45]. Αν και υπάρχει βιολογική λογική για την προσθήκη ασπιρίνης στην αντιπηκτική θεραπεία, η διπλή αντιθρομβωτική θεραπεία - επειδή αυξάνεται ο κίνδυνος μαζικής αιμορραγίας - χρησιμοποιείται σε ασθενείς με κλινικά σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για τις καρδιαγγειακές παθήσεις και στους ασθενείς στους οποίους ένας μοναδικός αντιθρομβωτικός παράγοντας απέτυχε να αποτρέψει την επανεμφάνιση ενός κλινικού επεισοδίου. Θεραπεία με βαρφαρίνη υψηλότερης έντασης (στόχος INR, 3 έως 4) προτιμάται για την αρτηριακή θρόμβωση σε ορισμένα κέντρα [39, 40].

6.4. Δευτερογενής πρόληψη σε φλεβική και αρτηριακή θρόμβωση σε ασθενείς στους οποίους η βαρφαρίνη αποτυγχάνει

Υποτροπιάζουσα φλεβική θρόμβωση παρά τη χρήση βαρφαρίνης είναι μια καλά αναγνωρισμένη επιπλοκή του αντιφωσφολιπιδικού σύνδρομου [46]. Δεν υπάρχει υψηλή ποιότητα ερευνητικών δεδομένων για την υποστήριξη οποιασδήποτε συγκεκριμένης

στρατηγικής όταν η θεραπεία με βαρφαρίνη αποτυγχάνει παρά το γεγονός ότι η τιμή του INR βρίσκεται εντός του θεραπευτικού εύρους. Άλλες επιλογές περιλαμβάνουν την υψηλότερη έντασης θεραπεία με βαρφαρίνη (στόχος INR, 3 έως 4), την προσθήκη χαμηλής δόσης ασπιρίνης, υδροξυχλωροκίνης, ή μια στατίνης, τη χρήση ενός διαφορετικού αντιπηκτικού, όπως ως ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους ή και ένα συνδυασμό αυτών των προσεγγίσεων. Επιπλέον, τα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα μπορούν προκαλούν τεχνητή παράταση του χρόνου προθρομβίνης, οδηγώντας σε ψευδώς αυξημένα τιμές INR και υποθεραπευτική δόση βαρφαρίνης. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο συνηθισμένο με συσκευές χειρός. Οι συνήθεις εργαστηριακοί αναλυτές είναι ακριβείς [47]. Επιβεβαιώνοντας ότι η δραστηριότητα του παράγοντα X, μετρημένη με τη χρήση χρωμογόνου ποσοτικού προσδιορισμού, είναι σύμφωνη με το INR (όπως μετράται από τη συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί για την προσαρμογή της δόσης της βαρφαρίνης) μπορεί να μειώσει την πιθανότητα της ανεπάρκειας της αντιπηκτικής αγωγής [24].

6.5. Απευθείας αντιπηκτικά από του στόματος

Από το 2010, πέντε άμεσοι αντιπηκτικοί παράγοντες από του στόματος έχουν εγκριθεί για χρήση σε πολλές χώρες. Αν και τα περισσότερα από αυτά τα φάρμακα έχουν συγκριθεί ευνοϊκά με τη βαρφαρίνη για την πρόληψη του εγκεφαλικού επεισοδίου σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή και για τη θεραπεία της φλεβικής θρομβοεμβολής, δημοσιευμένα δεδομένα για απευθείας αντιπηκτικά από το στόμα σε εξαιρετικά προθρομβωτικές καταστάσεις όπως το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο και η επαγόμενη από ηπαρίνη θρομβοκυτταροπενία είναι αρκετά περιορισμένα. Μια τυχαίοποιημένη μελέτη συνέκρινε το ριβαροξαβάνη με τη βαρφαρίνη (στόχος INR, 2 έως 3) για δευτερογενή πρόληψη θρομβοεμβολής φλεβών σε 116 ασθενείς με αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο. Η μελέτη αυτή χρησιμοποίησε ως καταληκτικό σημείο την εκατοστιαία μεταβολή του ενδογενούς δυναμικού της θρομβίνης στις δύο ομάδες από την τυχαίοποίηση έως την 42η ημέρα χωρίς τις κλινικές επιπτώσεις των ευρημάτων να είναι γνωστές. Κάνεις ασθενής σε οποιαδήποτε ομάδα δεν εμφάνισε αιμορραγία ή θρόμβωση κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης 6 μηνών [48]. Άλλες δοκιμές των άμεσων αντιπηκτικών από του στόματος για τους ασθενείς με το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο είναι σε εξέλιξη. Προς το παρόν, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για να προσδιοριστεί η σχετική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια αυτών των παραγόντων σε αυτόν τον πληθυσμό ασθενών [49].

7. Θεραπεία του καταστροφικού αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου

Οξεία νεφρική ανεπάρκεια και σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, διάχυτη κυψελιδική αιμορραγία, εγκεφαλοπάθεια, και επινεφριδιακές αιμορραγίες είναι κοινά ευρήματα σε ασθενείς με καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Η διάγνωση μπορεί να είναι δύσκολη, ειδικά εάν δεν υπάρχει ιστορικό θετικότητας αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Έχουν προταθεί κριτήρια ταξινόμησης για οριστικό και πιθανό καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο [2]. Η διαταραχή ταξινομείται ως οριστική σε έναν ασθενή με πολλαπλές (τρεις ή περισσότερες) θρομβώσεις οργάνων (με μικροθρομβωτική συμμετοχή σε τουλάχιστον ένα όργανο) που αναπτύσσεται εντός 7 ημερών σε έναν ασθενή με επίμονα θετικά αποτελέσματα σε δοκιμασίες για τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Στη κλινική πράξη το καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι δύσκολο να γίνει διακριτό από άλλες θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες [50]. Η πρώιμη θεραπεία είναι κρίσιμη για τους ασθενείς με καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και χαρακτηρίζεται συνήθως από ένα συνδυασμό αντιπηκτικών, γλυκοκορτικοειδών, ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης και πλασμαφαίρεσης. Πιθανές θεραπείες πέραν των αντιθρομβωτικών παραγόντων συζητούνται παρακάτω. Δεδομένης της σπανιότητας του συνδρόμου, δεν έχουν γίνει μελέτες και οι προτεινόμενες θεραπείες βασίζονται σε δεδομένα χαμηλής ποιότητας (π.χ., αναφορές περιπτώσεων). Μη θρομβωτικές επιπλοκές όπως η αιμορραγία ή οι λοιμώξεις που σχετίζονται με την αντιπηκτική αγωγή ή την ανοσοκαταστολή συχνά επηρεάζουν την σχέση κινδύνου-οφέλους και πρέπει να συνυπολογίζονται.

8. Πρόληψη και θεραπεία του μαιευτικού αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου

Η τρέχουσα στρατηγική για την πρόληψη των επιπλοκών της εγκυμοσύνης σε ασθενείς με μαιευτικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι η χρήση χαμηλής δόσης ασπιρίνης και προφυλακτικής δόσης μη κλασματοποιημένης ή χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης σε χαμηλή δόση ενώ θεραπευτική δόση ηπαρίνης θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε έγκυες γυναίκες με γνωστό θρομβωτικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ανεξάρτητα από το ιστορικό εγκυμοσύνης. Χαμηλή δόση ασπιρίνης, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης προτείνεται συχνά για ασθενείς με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα οι οποίες δεν έχουν ιστορικό θρόμβωσης ή επιπλοκές εγκυμοσύνης. Ωστόσο, κανένα δεδομένο δεν υποστηρίζει αυτή τη στρατηγική. Προτείνεται οι ασθενείς με θετικά αντιφωσφολιπιδικά

αντισώματα χωρίς ιστορικό θρόμβωσης να λαμβάνουν προφυλακτική δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης για τουλάχιστον 6 εβδομάδες μετά τον τοκετό, δεδομένου του αυξημένου κινδύνου θρόμβωσης κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου [51]. Ο μακροχρόνιος κίνδυνος θρόμβωσης για τις γυναίκες με μαιευτικό αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο είναι χαμηλότερος από τον κίνδυνο για τις γυναίκες με θρομβωτικό συμβάν [52, 53] και υψηλότερος από τον κίνδυνο για τις γυναίκες με επιπλοκές της εγκυμοσύνης λόγω άλλων παραγόντων πέραν των αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων [54]. Γενικά δεν συνίσταται μακροχρόνια αντιθρομβωτική θεραπεία για γυναίκες που έχουν ιστορικό μαιευτικού αντιφωσfolιπιδικού συνδρόμου χωρίς άλλους παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση [24].

9. Φαρμακευτικές επιλογές πέραν των αντιπηκτικών παραγόντων

Η αντιπηκτική αγωγή δεν είναι συνήθως αποτελεσματική για τις μη θρομβωτικές εκδηλώσεις του αντιφωσfolιπιδικού συνδρόμου, όπως η νεφροπάθεια και οι μικροθρομβώσεις. Στην πραγματικότητα, μερικές μη θρομβωτικές εκδηλώσεις μπορεί να αναπτύσσονται παρά την πλήρη αντιπηκτική θεραπεία. Έτσι, στρατηγικές θεραπείας πέραν των αντιαιμοπεταλιακών και αντιπηκτικών παραγόντων έχουν χρησιμοποιηθεί και διερευνούνται όλο και περισσότερο. Παρόλο που οι ασθενείς με αριθμό αιμοπεταλίων μεγαλύτερο από τις 50.000 ανά κυβικό χιλιοστό συνήθως δεν απαιτούν θεραπεία, γλυκοκορτικοειδή με ή χωρίς ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με αριθμό αιμοπεταλίων κάτω των 20.000 ανά κυβικό χιλιοστό. Η σπληνεκτομή δεν είναι πρώτη γραμμής θεραπεία λόγω αυξημένου κινδύνου θρόμβωσης σε ασθενείς με αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση. Η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία αρχικά αντιμετωπίζεται με γλυκοκορτικοειδή. Θεραπείες δεύτερης γραμμής με ανοσοκαταστολή για τη θρομβοπενία και την αιμολυτική αναιμία περιλαμβάνουν τη μυκοφαινόλη, την κυκλοφωσφαμίδη και την αζαθειοπρίνη. Η σχετιζόμενη με αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα νεφροπάθεια είναι μια προοδευτική χωρίς θεραπεία κατάσταση. Ενώ η οξεία νεφρική ανεπάρκεια λόγω θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας συχνά αντιμετωπίζεται με πλασμαφαίρεση. Οι αντιθρομβωτικοί παράγοντες δεν σταματούν την εξέλιξη της νόσου των βαλβίδων. Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ασπιρίνη ή βαρφαρίνη για εκβλαστήσεις που σχετίζονται με υψηλό θρομβοεμβολικού κινδύνου. Η πελιδνοειδής

αγγειοπάθεια είναι συνήθως ανθεκτική σε γλυκοκορτικοειδή, χαμηλή δόση ασπιρίνης, διπυριδαμόλη, κλοπιδογρέλη, πεντοξυφυλλίνη, σιλденаφίλη, ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη, ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου ή συνδυασμός των παρεμβάσεων αυτών, με ή χωρίς αντιπηκτική θεραπεία. Παρότι παραδοσιακοί ανοσοτροποιοτικοί παράγοντες (π.χ., αζαθειοπρίνη και μυκοφαινόλη μοφετίλη) έχουν χρησιμοποιηθεί για μερικές από τις μη θρομβωτικές ή μικροθρομβωτικές εκδηλώσεις των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων που συζητήθηκαν παραπάνω, η σχέση κινδύνου-οφέλους που συνδέονται με αυτούς δεν ευνοούν τη χρήση τους. Με βάση τους ανοσοτροποιοτικούς μηχανισμούς διάφορες προσεγγίσεις που στοχεύουν το mTOR, τα B κύτταρα και το συμπλήρωμα έχουν προταθεί. Στατίνες και αγωνιστές του υποδοχέα της αδενοσίνης έχουν επίσης διερευνηθεί. Η αναστολή της οδού mTOR (σιρόλιμους) εμποδίζει τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό επαγόμενο από αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, τη συσσώρευση αγγειακών κυτταρικών διηθήσεων και μειώνει την ίνωση του έσω και μέσου χιτώνα των αγγείων. Σε μια μικρή ομάδα ασθενών με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο που υπεβλήθησαν σε μεταμόσχευση νεφρού και έλαβαν σιρόλιμους εμφάνισαν σημαντικά λιγότερο αγγειακό πολλαπλασιασμό μετά τη μεταμόσχευση σε δείγματα βιοψίας και σημαντικά υψηλότερο ποσοστό λειτουργικού αλλομοσχεύματος σε σχέση με αυτούς που δεν έλαβαν σιρόλιμους [15]. Τα μοντέλα μυών υποδηλώνουν ότι η αναστολή των B-κυττάρων θα μπορούσε να έχει κάποιο ρόλο στη διαχείριση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου [55] και αναφορές περιπτώσεων περιγράφουν τη ριτουξιμάμπη για ασθενείς που πάσχουν από αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο με θρομβοπενία, αιμολυτική αναιμία, αγγειοπάθεια, νεφροπάθεια και καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Μια πιλοτική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 19 ασθενείς έδειξε ότι παρά την απουσία αλλαγής στο προφίλ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, η ριτουξιμάμπη μπορεί να ελέγξει μερικές από τις εκδηλώσεις του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου που δεν αποτελούν μέρος της τρέχουσας ταξινόμησης [56]. Αντι-C5 (της πρωτεϊνής C5 συμπληρώματος) μονοκλωνικά αντισώματα και πεπτιδία ανταγωνιστές του C5aR (υποδοχέα της πρωτεϊνής C5 του συμπληρώματος) παρεμποδίζουν τη διαμεσολαβούμενη από τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα νοσηρότητα της εγκυμοσύνης και τη θρόμβωση σε προκλινικά μοντέλα [57]. Υπάρχουν αναφορές περιπτώσεων χρήσης της εκουλιζουμάμπης, ενός αντι-C5 μονοκλωνικού αντισώματος, σε ασθενείς με οξεία θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια μετά από μεταμόσχευση νεφρού ή καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο [58]. In vitro, in

νίνο, και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι οι στατίνες μειώνουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού κυττάρου και την έκφραση ιστικού παράγοντα που προκαλείται από αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Αυτές οι παρατηρήσεις, μαζί με τη διαπίστωση ότι οι στατίνες μειώνουν σημαντικά την φλεγμονώδη και προθρομβωτικά μόρια όπως η ιντερλευκίνη-6 και διαλυτό ιστικό παράγοντα σε ασθενείς με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα έχουν δημιουργήσει την υπόθεση ότι οι στατίνες μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο θρόμβωσης στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο [59, 60].

Οι αγωνιστές υποδοχέα αδενোসίνης 2A, που επάγουν το σχηματισμό κυκλικού AMP στα ουδετερόφιλα, μπορεί να μειώσουν το θρομβωτικού κινδύνου αναστέλλοντας το σχηματισμό εξωκυττάρων παγίδων των ουδετεροφίλων (NETs). Η χρήση του defibrotide, ενός αγωνιστή του υποδοχέα αδενোসίνης- εγκεκριμένος για ηπατική φλέβο-αποφρακτική νόσο, μετά από μεταμόσχευση αδιαφοροποίητων αιμοποιητικών κυττάρων σε έναν ασθενή με καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο που είχε περιορισμένο απόκριση σε ηπαρίνη, ασπιρίνη και διπυριδαμόλη οδήγησε σε πλήρη ύφεση [61].

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο έχει ένα ευρύ φάσμα θρομβωτικών και της μη θρομβωτικών κλινικών εκδηλώσεων. Η διάγνωση απαιτεί θετική δοκιμασία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Ωστόσο, ο θετικός έλεγχος απο μόνος του δεν έχει διαγνωστική σημασία. Έτσι, λανθασμένη διάγνωση λόγω τόσο της μη αναγνώρισης των σημείων ή των συμπτωμάτων και όσο και η υπερεκτίμηση των εργαστηριακών δοκιμασιών είναι συχνό φαινόμενο. Αν και αντιθρομβωτικά φάρμακα εξακολουθούν να αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας, η πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών με την οποία τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα προκαλούν τη νόσο έχουν αποκαλύψει πρόσθετους στόχους που μπορεί να οδηγήσουν σε νέες ανοσοτροποποιητικούς θεραπευτικές επιλογές.

Κεφάλαιο 2

Επιγενετικής αλλαγές στη θρόμβωση και την πήξη: μια συστηματική ανασκόπηση

Περίληψη

Η θρόμβωση λόγω καρδιαγγειακής νόσου επηρεάζει κυρίως τα αιμοφόρα αγγεία που τροφοδοτούν την καρδιά, τον εγκέφαλο και την περιφέρεια και είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Οι παθοφυσιολογικοί θρομβωτικοί μηχανισμοί είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η κληρονομικότητα συμβάλλει στο 30% της επίπτωσης της καρδιαγγειακής νόσου. Τα υπόλοιπα συμβάντα μπορεί να εξηγηθούν από άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, οι διατροφικές συνήθειες και η άσκηση, η έκθεση στο περιβάλλον σε τοξίνες και η χρήση ναρκωτικών και άλλες συνοσηρότητες.

Η επιγενετική τροποποίηση του γονιδιώματος μπορεί να αποκτηθεί ή να κληρονομηθεί και αποτελεί αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν εμπλακεί στην αθηροσκλήρωση, βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και την καρδιαγγειακή απόκριση στην υποξία. Οι επιγενετικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης είναι κυρίως η μεθυλίωση των νησιδίων γουανίνης και κυτοσίνης (CpG), οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών (MMT) και τα μικρό-ριβονουκλεϊκά οξέα (miRNAs). Αυτοί οι επιγενετικοί ρυθμιστές ελέγχουν την έκφραση γονιδίων είτε μέσω ενεργοποίησης είτε μέσω αποσιώπησης αυτών. Η επιγενετική ρύθμιση είναι ως επί το πλείστον δυναμική και μπορεί ενδεχομένως να χειραγωγηθεί για την πρόληψη ή την αναστροφή της ανεξέλεγκτης έκφρασης των γονιδίων, χαρακτηριστικό που την καθιστά πιθανό θεραπευτικό στόχο.

Στην τρέχουσα ανασκόπηση, μελετήσαμε συστηματικά και παρουσιάσαμε τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με τις επιγενετικές αλλαγές που εμπλέκονται στη θρόμβωση που προέρχονται από μελέτες σε ανθρώπους. Επιγενετικές αλλαγές παρατηρούνται σε πολλές θρομβωτικές ασθένειες όπως η στεφανιαία νόσος και η παθήσεις των αγγείων του εγκεφάλου, η προεκλαμψία και το σύνδρομο των αντιφωσfolιπιδίων. Η διαφοροποιημένη μεθυλίωση σε CpG και συγκεκριμένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών που ελέγχουν τη μεταγραφή προθρομβωτικών και προφλεγμονωδών γονιδίων έχουν επίσης συσχετιστεί με προδιαθεσιακούς παράγοντες θρόμβωσης και καρδιαγγειακή νόσο, όπως το

κάπνισμα, την ατμοσφαιρική ρύπανση, την υπερτριγλυκεριδαιμία, την επαγγελματική έκθεση σε μικροσωματίδια και διάφορες συννοσηρότητες συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και της χρόνιας νεφρικής νόσου. Αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποστηρίζονται περαιτέρω από in vitro πειράματα και υποδεικνύουν ότι η επιγενετική ρύθμιση επηρεάζει την παθοφυσιολογία θρομβωτικών διαταραχών, μια παρατήρηση με πιθανή διαγνωστική ή θεραπευτική χρησιμότητα.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΘΡΟΜΒΩΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Η θρόμβωση εμφανίζεται κυρίως στα αιμοφόρα αγγεία που τροφοδοτούν την καρδιά, τον εγκέφαλο και την περιφέρεια, οδηγώντας σε κλινικές οντότητες που συλλογικά αναφέρονται ως καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο σχηματισμός αθηρωματικών πλακών, ο οποίος προηγείται του θρομβωτικού συμβάντος, εμφανίζεται συνήθως σε πολλαπλές θέσεις και παρά την πληθώρα κλινικών εκδηλώσεων (έμφραγμα του μυοκαρδίου (ΟΕΜ), αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ), εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση και καρδιακή αρρυθμία), αυτές οι ασθένειες έχουν κοινό παθοφυσιολογικό μηχανισμό. Οι καρδιαγγειακές παθήσεις είναι η συχνότερη αιτία θανάτου, με 85% αυτών των θανάτων να οφείλονται σε καρδιακή προσβολή και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας [62]. Το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι ένα κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από οξεία απώλεια νευρολογικής λειτουργίας, με συμπτώματα που διαρκούν περισσότερο από 24 ώρες, ενώ το παροδικό ισχαιμικό αγγειακό επεισόδιο διαρκεί <24 ώρες χωρίς μόνιμο νευρολογικό έλλειμμα [63]. Τα ΑΕΕ και τα παροδικά ισχαιμικά είναι συνήθως δευτερογενή σε έδαφος θρόμβωσης ή εμβολής των αρτηριών που τροφοδοτούν τον εγκέφαλο. Οι εντατικές ερευνητικές προσπάθειες αποκάλυψαν αρκετά γενετικά στοιχεία και περιβαλλοντικούς προδιαθεσιακούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα, που συμβάλλουν στη θρομβωτική διαδικασία, ωστόσο βασικές πτυχές του θρομβωτικού μηχανισμού, συμπεριλαμβανομένης της απορρύθμισης του σε παθοφυσιολογικό πλαίσιο, παραμένουν μέχρι σήμερα άγνωστες. Οι εκτιμήσεις σε σχέση με την κληρονομικότητα υποδηλώνουν ότι οι κληρονομικοί γενετικοί παράγοντες αντιπροσωπεύουν περίπου το 30% της διακύμανσης της επίπτωσης των περισσότερων καρδιαγγειακών παθήσεων [64]. Η υπόλοιπη παραλλαγή πιστεύεται ότι

εξηγείται από τους παράγοντες του τρόπου ζωής όπως οι διατροφικές συνήθειες και οι συνήθειες άσκησης, η περιβαλλοντική έκθεση σε τοξίνες και η χρήση φαρμάκων.

Η επιγενετική παραλλαγή μπορεί να αποκτηθεί ή να κληρονομηθεί και αποτελεί αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων και του περιβάλλοντος. Οι επιγενετικές αλλοιώσεις περιγράφηκαν για πρώτη φορά πριν από περίπου 80 χρόνια, αλλά οι μηχανιστικές μελέτες μόλις πρόσφατα έχουν ρίξει φως στο πεδίο. Ο ρόλος της επιγενετικής στον προσδιορισμό μιας σειράς διαδικασιών που πιστεύεται ότι είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη και την έκβαση της καρδιαγγειακής νόσου και της θρόμβωσης μελετάται όλο και περισσότερο [65]. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν εμπλακεί στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης, της αγγειογένεσης, της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, της καρδιαγγειακής απόκρισης στην υποξία και του στρες από επαναιμάτωση. Η αντιστρεψιμότητα των επιγενετικών αλλοιώσεων τους καθιστά πολύτιμους θεραπευτικούς στόχους στην εποχή της ιατρικής ακριβείας.

1.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Οι επιγενετικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης είναι κυρίως οι ακόλουθοι τρεις: (α) μεθυλίωση νησιδίων CpG, (β) μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών (PTM) και (γ) τα μικροRNAs (miRNAs). Αυτοί οι επιγενετικοί ρυθμιστές ελέγχουν την έκφραση γονιδίων είτε μέσω ενεργοποίησης είτε μέσω σίγασης. Ο επιγενετικός έλεγχος είναι ως επί το πλείστον δυναμικός και μπορεί ενδεχομένως να χειραγωγηθεί για να αποτρέψει ή να αναστρέψει την ανεξέλεγκτη έκφραση γονιδίων [66].

1.3. Μεθυλίωση του DNA

Η πλέον μελετημένη όψη των επιγενετικών μηχανισμών είναι η μεθυλίωση του DNA σε νησίδια CpG. Η μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων θεωρείται γενικά ότι οδηγεί σε σίγαση αυτών. Η μεθυλίωση του DNA είναι η διαδικασία όπου μια μεθυλομάδα προστίθεται στην πέμπτη θέση του δακτυλίου έξι ατόμων της κυτοσίνης (5-μεθυλοκυτοσίνη). Μια ομάδα ενζύμων γνωστών ως DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) καταλύουν την προσθήκη της μεθυλομάδας στην κυτοσίνη, μια διαδικασία που είναι δυναμική [67]. Οι ομάδες μεθυλίου στο DNA μπορούν να απομακρυνθούν είτε με μεθυλοτρανσφεράσες είτε με εκτομή και επιδιόρθωση του DNA [68, 69]. Οι DNMTs υποδιαιρούνται σε δύο ομάδες με βάση τη λειτουργία τους, είτε για τη διατήρηση της

μεθυλίωσης του DNA (DNMT1) είτε για τη de novo μεθυλίωση (DNMT 3a και 3b). Η μεθυλίωση του DNA το οδηγεί σε πιο συμπαγή δομή η οποία αποτρέπει την αλληλεπίδραση των παραγόντων μεταγραφής με τις θέσεις πρόσδεσης τους. Επιπλέον, πρωτεΐνες δέσμευσης των μεθυλομάδων (MBP) που δεσμεύουν το μεθυλιωμένο DNA και ακολούθως προσδένουν δεακετυλάσες ιστονών (HDACs) μπορούν να οδηγήσουν σε σίγαση γονιδίων [70].

1.4. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών (MMT)

Η επίδραση των μεταβολών των ιστονών στη μεταγραφή γονιδίων είναι πιο πολύπλοκη λόγω των διαφορετικών τύπων MMT. Οι κύριες MMT είναι η ακετυλίωση, η μεθυλίωση και η φωσφορυλίωση [71]. Το αποτέλεσμα αυτών των τροποποιήσεων στη ρύθμιση των γονιδίων εξαρτάται από το ποιο κατάλοιπο έχει τροποποιηθεί και σε ποιο βαθμό. Οι τροποποιήσεις ιστονών παρέχουν θέσεις πρόσδεσης για αρκετές πρωτεΐνες, επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων. Αυτό το συσσωρευτικό αποτέλεσμα αναφέρεται ως «κώδικας ιστόνης» [72].

Η πιο διεξοδικά μελετημένη MMT ιστόνης είναι ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης. Η ακετυλίωση μεταβάλλει το φορτίο της ιστόνης από θετικό σε ουδέτερο. Αυτή η διαδικασία αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ιστονών προκαλώντας την πιο εύκολη πρόσβαση στη χρωματίνη. Η ακετυλίωση ρυθμίζεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (HATs) και η απακετυλίωση ρυθμίζεται από τις HDACs [73, 74]. Η μεθυλίωση των ιστονών λαμβάνει χώρα σε κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης χωρίς να επηρεάζεται το ηλεκτρικό φορτίο των ιστονών. Είτε μία, δύο ή τρεις ομάδες μεθυλίου μπορούν να προστεθούν στα κατάλοιπα της λυσίνης ενώ ένα ή δύο στα κατάλοιπα αργινίνης [75], μια διαδικασία που συνδέεται με τη θετική και αρνητική ρύθμιση των γονιδίων [72]. Η φωσφορυλίωση των ιστονών μεταβάλλει το φορτίο των ιστονών από θετικό σε αρνητικό. Αυτό το «στίγμα» σχετίζεται κυρίως με τη μεταγραφική καταστολή [76]. Τέλος, αρκετές άλλες MMT ιστόνης έχουν αναφερθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό [77]. Για παράδειγμα, οι ιστόνες μπορούν να υποβληθούν σε ισομερισμό, βουτυρυλίωση, φορμυλίωση, 2-υδροξυϊσοβουτυρυλίωση, γλουταθειονυλίωση, ηλεκτρουλίωση και γλουταρυλίωση [78].

Στην τρέχουσα ανασκόπηση, μελετήσαμε και παρουσιάζουμε συστηματικά διαθέσιμα δεδομένα που προέρχονται από μελέτες σε ανθρώπους σχετικά με επιγενετικές αλλαγές

στη θρόμβωση και την πήξη. Ο κύριος στόχος του κειμένου είναι να συνοψίσει την τρέχουσα γνώση και να αποκαλύψει πιθανούς θεραπευτικούς στόχους στο πλαίσιο των θρομβωτικών διαταραχών.

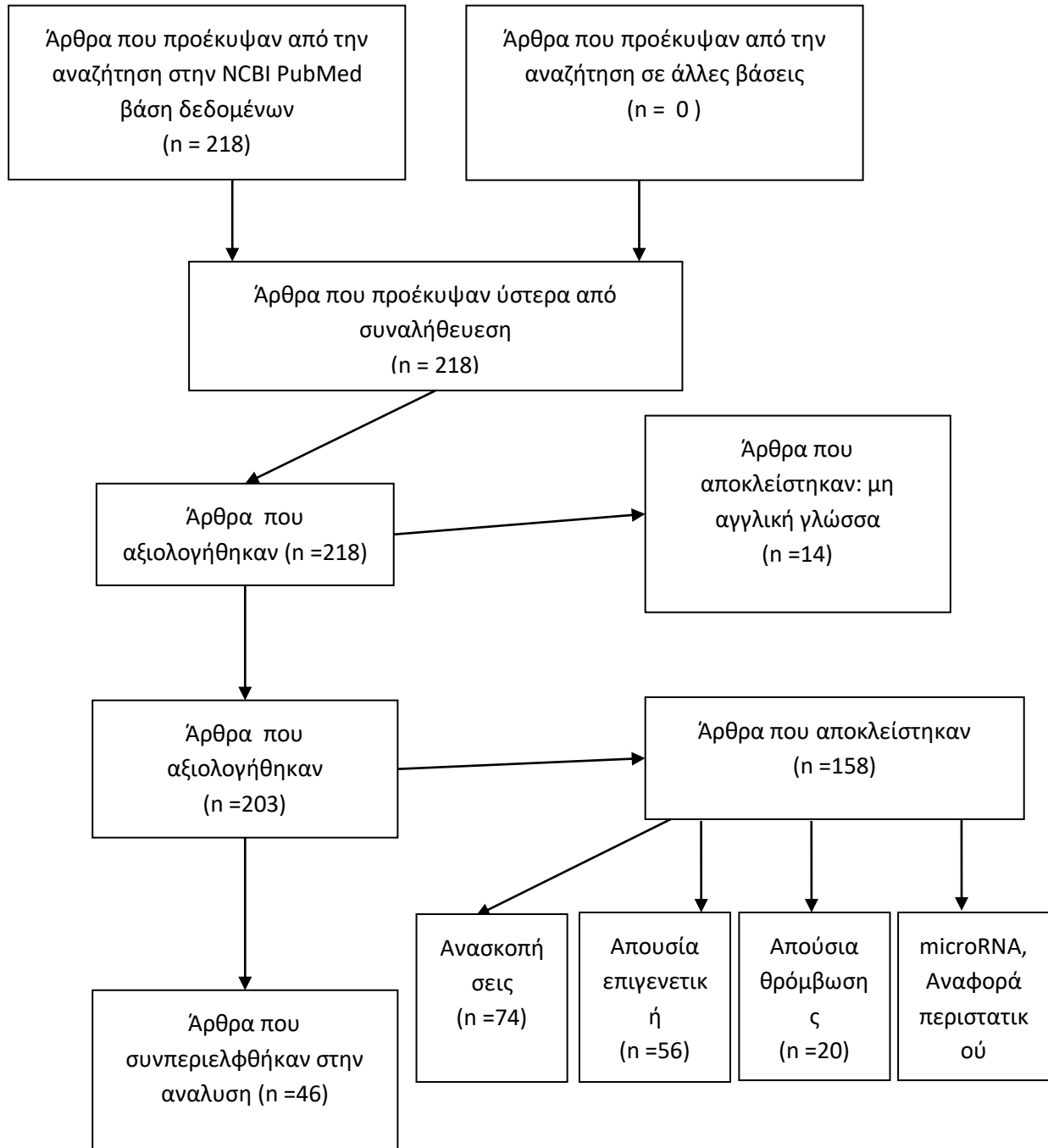
Μετά από συστηματική βιβλιογραφική έρευνα προσδιορίσαμε ερευνητικά άρθρα σχετικά με τρεις κύριες κατηγορίες: επιγενετικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις διάφορες μορφές καρδιαγγειακών νοσημάτων, επιγενετικές αλλαγές που προκλήθηκαν από προδιαθεσιακούς παράγοντες καρδιαγγειακής νόσου και επιγενετικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν σε *in vitro* μοντέλα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η βάση δεδομένων MEDLINE αναζητήθηκε σε τίτλο και περίληψη για θρόμβωση ή πήξη σε συνδυασμό με έναν από τους ακόλουθους όρους: επιγενετική, επιγενετικές, μεθυλίωση, υπομεθυλίωση, υδροξυμεθυλίωση, αποακετυλίωση ιστόνης και ακετυλίωση ιστόνης. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και αποκαλύφθηκαν 218 μοναδικές καταχωρίσεις. Δεν πραγματοποιήθηκε αναζήτηση για miRNAs. Από τις συμπεριλαμβανόμενες μελέτες αρκετές αφορούν miRNAs στο πλαίσιο είτε μεθυλίωσης είτε MMTs ιστονών στο γονίδιο που κωδικοποιεί τα miRNAs, αλλά όχι miRNA ως επιγενετικό ρυθμιστή *per se*. Μετά την αξιολόγηση των πλήρων κειμένων, 46 μελέτες συμπεριλήφθηκαν σε αυτήν την ανασκόπηση. Από τις 172 μελέτες που εξαιρέθηκαν ήταν οι 74 ανασκοπήσεις, οι 56 ήταν άσχετες με επιγενετικούς μηχανισμούς και 20 άσχετες με τη θρόμβωση και οι υπόλοιποι ήταν σε άλλη γλώσσα ή αφορούσαν miRNA ή άλλα είδη. Το πρωτόκολλο ένταξης παρουσιάζεται στο διάγραμμα ροής Prisma (Εικόνα 1).



PRISMA 2009 Flow Diagram



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της διαλογής των άρθρων προς συστηματική ανασκόπηση

3. Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην καρδιαγγειακή νόσο και αθηροσκλήρωση

Το 2019, η καρδιαγγειακή νόσος που περιλαμβάνει το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΝ) είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Τα δεδομένα από αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η επιγενετική ρύθμιση αποτελεί τη βάση της παθοφυσιολογίας της καρδιαγγειακής νόσου.

Δύο ανεξάρτητες μελέτες που εξετάζουν το προφίλ μεθυλίωσης σε γενετικό επίπεδο σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο (ΟΣΝ, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, υπέρταση, θρόμβωση και καρδιακή αρρυθμία), ενσωματώνοντας συνολικά 1080 περιστατικά αποκάλυψαν διαφορική μεθυλίωση του DNA μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Οι απορυθμισμένες θέσεις CpG εντοπίστηκαν σε γονίδια που εμπλέκονται στην καρδιακή λειτουργία, στην ανάπτυξη του μυοκαρδίου, την καρδιογένεση, την ανταπόκριση σε ισχαιμική βλάβη και άλλες διεργασίες [79, 80]. Σε απομονωμένα T και B κύτταρα, η ανάλυση αποκάλυψε ζωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την αθηρογενή σηματοδότηση, την προσαρμοστική ανοσοαπόκριση και τη στεφανιαία θρόμβωση [80]. Μια άλλη ομάδα στο ίδιο πλαίσιο της νόσου αποκάλυψε μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης υποκινητή και των επιπέδων του παράγοντα πήξης 7 (FVII) στο πλάσμα, ενός γνωστού βιοδείκτη της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) [81] και κρίσιμης συνιστώσας για την έναρξη της ενδοαγγειακής πήξης. Ο FVII σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τον ιστικό παράγοντα (επίσης γνωστό ως F3) και ξεκινά τον εγγενή καταρράκτη πήξης εξηγώντας γιατί η αυξημένη δραστηριότητα πήξης, λόγω υψηλότερων επιπέδων FVII, έχει συσχετιστεί με τάση θρόμβωσης και αυξημένο στεφανιαίο κίνδυνο [82].

Τέλος, σε μονοκύτταρα ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ) και συνακόλουθου ΣΝ, ο υποκινητής του CD40 υπομεθυλιώνεται και συσχετίζεται με υπερομοκυστεϊναιμία, ένα καθιερωμένο παράγοντα κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου και την έκφραση φλεγμονωδών μορίων όπως η ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η ιντερφερόνη γάμμα (IFN-γ) [83]. Το CD40 (συστοιχία διαφοροποίησης 40) και ο συνδέτης του (CD40-L) σχηματίζουν ένα προθρομβωτικό και προφλεγμονώδες σύστημα που ενισχύει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τη συσσωμάτωση και τη προσκόλληση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης και της αθηροθρόμβωσης [84, 85].

4. Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην παθογένεση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου

Οι επιγενετικές αλλαγές έχουν αποδειχθεί ότι εμπλέκονται και στην αρτηριακή νόσο των αγγείων το εγκεφάλου. Σε μία ομάδα 23 ασθενών με αθηροσκληρωτικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) και 32 υγιή άτομα, η μεθυλίωση του υποκινητή του miRNA 223 ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε ασθενείς με ΑΕΕ σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, και σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με καρωτιδική αθηροσκλήρωση σε σύγκριση με τους μάρτυρες τους και αντιστρόφως συσχετισμένη με τα miR-223 επίπεδα [86]. Το miR-223 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και του ισχαιμικού ΑΕΕ και εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός της χοληστερόλης, η λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και η θρόμβωση [87].

Επιπλέον, οι ασθενείς με εγκεφαλικό έμφρακτο έχουν βρεθεί να έχουν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης της θρομβομοντουλίνης (TM) από τους μάρτυρες, με παράλληλη μείωση των επιπέδων mRNA TM και αύξηση των συνολικών επιπέδων ομοκυστεΐνης στο πλάσμα [88]. Η θρομβομοντουλίνη είναι μια ιδιαίτερα σημαντική πρωτεΐνη για την ισορροπία της πήξης και της αντιπηκτικότητας [89]. Λειτουργεί ως ένας επιφανειακός υποδοχέας της θρομβίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τη θρομβίνη, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C, μιας πρωτεάσης της σερίνης με αντιθρομβωτική δραστηριότητα [90] η οποία, με τη σειρά της, αποικοδομεί πρωτεολυτικά τους παράγοντες πήξης Va και VIIIa [91]. Οι πολυμορφισμοί της TM που οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης συσχετίζονται σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο ΣΝ και φλεβικής θρομβοεμβολής [92].

5. Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην παθογένεση του αντιφωσfolιπιδικού συνδρόμου

Το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (ΣΑΦ) είναι μια αυτοάνοση θρομβοφιλία που εμφανίζεται κλινικά ως υποτροπιάζουσα θρομβοεμβολή και/ή νοσηρότητα εγκυμοσύνης. Οι ορολογικοί δείκτες είναι τα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα, κυρίως τα αντι-β2 γλυκοπρωτεΐνη I (αντι-β2GPI) αυτοαντισώματα, τα οποία ενεργοποιούν αιμοπετάλια, μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα που επάγουν την έκφραση ιστικού παράγοντα και προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ιντερλευκίνες 6 (IL-6) και 8 (IL-8), μια διαδικασία που τελικά οδηγεί σε σχηματισμό θρόμβων.

Στη μελέτη μας διαπιστώσαμε ότι η σχετική μεθυλίωση μειώθηκε σημαντικά στον υποκινητή της IL-8 και αυξήθηκε σημαντικά στον πρώτο εσώνιο του ιστικού παράγοντα σε ασθενείς με ΣΑΦ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, φαινόμενο που συσχετίζεται με αρτηριακά θρομβωτικά συμβάντα [93]. Στο μοντέλο *in vitro* που προσομοιώνει το ΣΑΦ, η διέγερση με αντι-β2GPI IgG, β2GPI και CXCL4 τόσο των μονοκυττάρων όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί επίσης σε αλλαγές στην κατάσταση μεθυλίωσης του DNA των παραπάνω γονιδίων και στην παράλληλη αύξηση της έκφρασής τους. Αυτές οι πληροφορίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές επειδή ο ιστικός παράγοντας, μια γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας που κανονικά δεν εκτίθεται στην κυκλοφορία του αίματος, είναι ο κύριος εκκινητής του συστήματος πήξης. Μετά από τραυματισμό στο αιμοφόρο αγγείο εκτίθεται και ενεργοποιεί τον παράγοντα πήξης FVII σε FVIIa. Ο Ιστικός Παράγοντας και ο FVIIa σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα το οποίο ενεργοποιεί τόσο τον FIX όσο και τον FX. Συνεπώς, ο ενεργοποιημένος FX (FXa) μαζί με τον συμπαράγοντα του FVa πρωτεολυτικά διασπούν την προθρομβίνη σε θρομβίνη, η οποία με τη σειρά της καταλύει τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες δημιουργώντας έναν σταθερό θρόμβο ινικής [94, 95]. Η ιντερλευκίνη-8, από την άλλη πλευρά, είναι ένας φλεγμονώδης μεσολαβητής οξείας φάσης ο οποίος καταλήγει σε στρατολόγηση των μονοκυττάρων και αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων σε θέσεις αυξημένης συγκέντρωσης χημειοκίνης. Η IL-8 έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένη τόσο στις αθηρωματικές πλάκες όσο και στον ορό ασθενών με ΣΝ και οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [96]. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα που υποβλήθηκαν σε διέγερση όπως περιγράφηκε ανωτέρω παρατηρήσαμε την θετική μεταγραφική ρύθμιση των επιγενετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης 2 που συνδέεται με μέθυλ-CpG (MECP2), της DNMT3B, της Δέκα-έντεκα μετατοπισμένης μεθυλ-κυτοσίνης διοξυγενάσης 1 (TET1), της HDAC9 και της πλούσιας σε AT πρωτεΐνης 5B (ARID5B). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η επιγενετική ρύθμιση μπορεί να επηρεάσει τις παθοφυσιολογικές διεργασίες στο ΣΑΦ με πιθανή διαγνωστική ή θεραπευτική αξία [93].

Επιπλέον, σε άλλη μελέτη σε ουδετερόφιλα που απομονώθηκαν από ΣΑΦ, ασθενείς ΣΕΛ και υγιείς μάρτυρες, προσδιορίστηκαν 42 διαφορετικά μεθυλιωμένες θέσεις CpG. Η ανάλυση της οντολογίας των γονιδίων έδειξε ότι τα διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια εμπλέκονται κυρίως στην εγκυμοσύνη [97].

6. Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης στην προεκλαμψία

Η προεκλαμψία, μια κλινική οντότητα που χαρακτηρίζεται από νέα εμφάνιση υπέρτασης και πρωτεϊνουρία κατά την εγκυμοσύνη, αποτελεί κύρια αιτία μητρικής θνησιμότητας και νοσηρότητας εγκυμοσύνης [98]. Παθογενετικά, η προεκλαμψία σχετίζεται με μη φυσιολογική ενεργοποίηση και κατανάλωση αιμοπεταλίων, παραγόντων πήξης και ινωδολυτικού συστήματος [99]. Δύο διαφορετικές ομάδες έχουν αξιολογήσει τη διαφορική γονιδιακή μεθυλίωση στην προεκλαμψία. Σε δύο ξεχωριστές μελέτες οι Mousa et al. μελέτησαν της κατάσταση της μεθυλίωσης του DNA στις επιπλοικές αρτηρίες και ταυτοποίησαν διάφορα γονίδια με μειωμένη μεθυλίωση του DNA σε προεκλαμπτικά δείγματα. Η χαρτογράφηση της γονιδιακής οντολογίας αποκάλυψε ότι η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, η θρόμβωση και οι οδούς της φλεγμονής υπερεκπροσωπούνταν στα προεκλαμπτικά αγγεία [100]. Από τα γονίδια που αναγνωριστήκαν σχετικά με την πήξη και τη θρόμβωση ήταν αυτά της θρομβίνης, του FV, του FXII, του GPV, του GPIBA, της πρωτεΐνης C και της TBXAS1. Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της συνθετάσης της θρομβοξάνης (TBXAS1), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της θρομβοξάνης A2, ενός ισχυρού αγγειοσυσπαστικού παράγοντα και ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων, μειώθηκε ενώ η έκφραση της συνθετάσης της θρομβοξάνης αυξήθηκε κατά 2,5 φορές στις επιπλοικές αρτηρίες των προεκλαμπτικών γυναικών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες [101]. Η ενεργοποίηση του παράγοντα πήξης (FXII) είναι ένας εναλλακτικός τρόπος για την έναρξη της ενδοαγγειακής πήξης. Τα πολυφωσφορικά όπως το ADP ενεργοποιούν τον FXII ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τους FXI, FIX και τελικά τον FX [102]. Οι γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων Ib και V είναι συστατικά του συστήματος Ib-V-IX επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών που αποτελούν τον υποδοχέα του παράγοντα von Willebrand που μεσολαβεί στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων σε τραυματισμένες αγγειακές επιφάνειες, εστιάζει τη δραστηριότητα της θρομβίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και παρέχει τον παράγοντα VIII (FVIII) στον αναπτυσσόμενο θρόμβο [103, 104]. Ως εκ τούτου, το σύμπλεγμα GPIb-V-IX είναι ένα κεντρικό συστατικό στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τον παράγοντα von Willebrand (VWF), τη θρομβίνη και την ινική. Μια άλλη ομάδα στο DNA μητρικών λευκοκυττάρων που προέρχεται από 14 υγιείς και 14 προεκλαμπτικές γυναίκες εντόπισε διαφοροποιημένη μεθυλίωση σε γονίδια εμπλεκόμενα στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και ενδοθηλιακή ομοιοστάση μεταξύ των οποίων ήταν το αγγειοτενσινογόνο (AGT), το πολυπεπτίδιο άλφα που σχετίζεται με καλσιτονίνη (CALCA)

και η διμεθυλαμμωνοϋδρολάση 1 της διμεθυλαργινίνης (DDAH1) [105]. Το αγγειοτενσινογόνο (AGT) είναι ο πρόδρομος της αγγειοτενσίνης II, η οποία αν και είναι κυρίως ισχυρός αγγειοσυσταλτικός παράγοντας [106], έχει επίσης προθρομβωτικές ιδιότητες μέσω διέγερσης των PAI-1 και PAI-2 με συνακόλουθη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων [106, 107]. Το CALCA και η DDAH1 από την άλλη πλευρά μεσολαβούν στην ισχυρή χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και εμπλέκονται στην φλεγμονώδη απόκριση και στη στεφανιαία νόσο αντίστοιχα [108, 109].

Οι οδοί και τα γονίδια που προσδιορίστηκαν από τις παραπάνω μελέτες απεικονίζονται στον Πίνακα 1.

7. Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης σε θρόμβωση σχετιζόμενη με τον καρκίνο

Θρομβοεμβολικά κλινικά περιστατικά χαρακτηρίζουν διάφορα καρκινώματα [110]. Στις επόμενες παραγράφους θα περιγράψουμε την επιγενετική ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στον σχηματισμό θρόμβου και την πήξη στη κακοήθεια.

Οι θρομβωτικές εκδηλώσεις μέσω επιγενετικής ρύθμισης, σε έδαφος καρκινώματος από διαυγή κύτταρα (CCC) (ένα ιστολογικά διακριτό καρκίνωμα που χαρακτηρίζεται από κυτταροπλασματική διαύγαση, λόγω συσσώρευσης ενδοκυτταρικού γλυκογόνου) έχουν διερευνηθεί από δύο ανεξάρτητες ομάδες. Οι Cuff et al. αποκαλύπτουν την επιγενετική ρύθμιση του πυρηνικού παράγοντα φαγοκυττάρων 1-βήτα (HNF1B) ως παράγοντα μεταγραφής θρομβωτικών γονιδίων που σχετίζονται με τον καταρράκτη πήξης αίματος όπως το ινωδογόνο, η προθρομβίνη και ο παράγοντας πήξης XIII (FXIII). Στη συνδυασμένη ομάδα ασθενών CCC με κακοήθεια ωθηκών και νεφρών, δείχνουν ότι αμφότερα τα επίπεδα πρωτεΐνης και η υπομεθυλίωση του υποκινητή του εν λόγω παράγοντα μεταγραφής συνδέθηκαν σημαντικά με 2,3 φορές αυξημένο κίνδυνο κλινικά σημαντικής φλεβικής θρόμβωσης [111]. Η μελέτη ωθηκικού CCC των Koizume et al. δείχνει ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου του παράγοντα πήξης VII (FVII) εξαρτάται από την αποακετυλίωση ιστόνης και την μετακίνηση της HDAC4 στον υποκινητή του FVII [112].

Ένας άλλος τύπος καρκινώματος στον οποίο έχουν αποδοθεί θρομβωτικές επιπλοκές με συνοδές επιγενετικές αλλαγές είναι το γλοίωμα, γεγονός που αποδίδεται στην υπερέκφραση του ιστικού παράγοντα και του παράγοντα πήξης X.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του FX και του ιστικού παράγοντα βρέθηκαν να είναι χαμηλότερα στα δείγματα γλοιώματος και παρατηρήθηκε επίσης παράλληλη αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης, ένα φαινόμενο που συσχετίζεται με τη συνολική επιβίωση, τους ενδοθωρακικούς μικροθρόμβους και τη φλεβική θρομβοεμβολή [113, 114]. Είναι ενδιαφέρον ότι η υπερέκφραση του ιστικού παράγοντα χαρακτήρισε τα γλοιώματα που έφεραν τη μορφή άγριου τύπου ενός ενζύμου που ονομάζεται ισοκυτταρική δεϋδρογενάση 1 (IDH1), ενώ εκείνα που φέρουν το μη λειτουργικό αλληλίο προστατεύθηκαν. Η IDH1 είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος στο μεταβολισμό της γλυκόζης και οι μεταλλάξεις οδηγούν σε απώλεια της ενζυματικής λειτουργίας και στην επακόλουθη μη φυσιολογική παραγωγή 2-υδροξυγλουταρικού (2-HG) [115], το οποίο αναστέλλει την ενζυματική δραστηριότητα πολλών διοξυγενασών, και απομεθυλάσες των ιστονών και του DNA προκαλώντας εκτεταμένες αλλαγές στις ιστόνες και τη μεθυλίωση του DNA [116]. Αυτό μπορεί να εξηγεί γιατί σε IDH1 μεταλλαγμένα γλοιώματα ο υποκινητής του ιστικού παράγοντα υπερμεθυλιώθηκε με μια παράλληλη μείωση του επιπέδου του mRNA και της πρωτεΐνης αυτού [114], ένα φαινόμενο που καταργήθηκε με τη χορήγηση ενός παράγοντα απομεθυλίωσης DNA [117].

Αντιστρόφως, υπάρχουν ενδείξεις ότι η αδράνεια του γλοιώματος επηρεάζεται από τον ιστικό παράγοντα. Η ανεπάρκεια του ιστικού παράγοντα οδηγεί τα κύτταρα του γλοιώματος σε αδράνεια, αλλά όχι στον θάνατο, ενώ η έκφραση του ιστικού παράγοντα προκαλεί εκ νέου ανάπτυξη όγκου. Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση του ιστικού παράγοντα μεταβάλλει μόνιμα την έκφραση γονιδίων και το προφίλ μεθυλίωσης του DNA των κυττάρων του γλοιώματος που δεν είναι πλέον αδρανείς [118].

Ένα άλλο νεόπλασμα στο οποίο η νοσηρότητα και η θνησιμότητα των ασθενών επηρεάζονται συνήθως από τις θρομβωτικές επιπλοκές είναι η πρωτοπαθής μυελοϊνωση (PMI). Σε ασθενείς με PMI η κατάσταση μεθυλίωσης του CD18 (συστοιχία διαφοροποίησης 18) ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τους μάρτυρες, γεγονός που σχετίζεται με θρομβωτικές επιπλοκές και αποδείχθηκε ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα θρόμβωσης [119]. Αυτή η πληροφορία έχει αξία επειδή η αυξημένη έκφραση του επιφανειακού υποδοχέα ιντεγκρίνης CD18 / CD11b σε λευκοκύτταρα ασθενών προάγει την διαπήδηση των ουδετερόφιλων, διευκολύνει την μέσω GPIIb ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και επάγει ενδοθηλιακή βλάβη και ενδεχομένως θρόμβωση [120].

8. Στοιχεία επιγενετικών αλλαγών του DNA σε καταστάσεις που προδιαθέτουν σε

θρόμβωση

Στις επόμενες παραγράφους θα αναθεωρήσουμε μελέτες που δείχνουν ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες ή ασθένειες που προδιαθέτουν σε θρόμβωση χαρακτηρίζονται από επιγενετικές αλλαγές των γονιδίων που εμπλέκονται στην πήξη και στην ενδοθηλιακή απορρύθμιση.

8.1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η ατμοσφαιρική ρύπανση είναι μια διαδεδομένη περιβαλλοντική επιβάρυνση που χαρακτηρίζει περίπου 4,2 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο παγκοσμίως, κυρίως λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων [121]. Τα μικροσωματίδια στο περιβάλλον (ΜΣ) έχουν συσχετιστεί με αυξημένο χρόνο νοσηλείας και θνησιμότητα λόγω καρδιαγγειακής νόσου στον γενικό πληθυσμό [122]. Επιπλέον, το σωματιδιακό περιεχόμενο των ΜΣ έχει συσχετιστεί με αυξημένη πήξη και κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης [123].

Η επαγγελματική έκθεση σε μέταλλα οδηγεί σε διαφορική μεθυλίωση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με θρόμβωση και καρδιαγγειακές παθήσεις. Η έκθεση σε σωματίδια ψευδαργύρου και σιδήρου σχετίζονται αρνητικά με τη σχετική μεθυλίωση του λευκοκυτταρικού DNA της NOS3 (συνθετάση οξειδίου του αζέτου-3), της EDN1 (ενδοθηλίνη-1), τα επίπεδα H3K4me3 και H3K9ac στο πλάσμα και του ενδογενούς δυναμικού της θρομβίνης (μια παράμετρος που αντικατοπτρίζει τη γενεά της θρομβίνης ποσοτικά και αξιολογεί την πήξη) υποδεικνύοντας ότι η υπομεθυλίωση NOS3 και EDN1 μεσολαβεί στην επίδραση στην πήξη [124, 125]. Η συγκόλληση μετάλλων ως επαγγελματική απασχόληση συσχετίζεται έντονα με τη μειωμένη μεθυλίωση του ολικού αίματος στο γονίδιο του υποδοχέα 4 των αιμοπεταλίων (PAR4) που κωδικοποιεί τον αντίστοιχο υποδοχέα θρομβίνης [126]. Ακολούθως, η έκθεση σε μόλυβδο συσχετίζεται αντιστρόφως με τη μεθυλίωση του DNA από ολικό αίμα στον υποκινητή της γλυκοπρωτεΐνης IV επίσης γνωστή ως CD36 ((συστοιχία διαφοροποίησης 36) [127]. Τέλος, σε μια ομάδα 704 ηλικιωμένων ανδρών, περιβαλλοντικοί και ψυχολογικοί παράγοντες όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, η θερμοκρασία περιβάλλοντος, η σχετική υγρασία, η ικανοποίηση της ζωής και η επιθετικότητα συνδέονται με την υπομεθυλίωση των υποκινητών του ιστικού παράγοντα, του υποδοχέα TLR-2, του μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1), της iNOS και της IFN-γ υποδηλώνοντας μια παθογενετική σχέση

της υψηλότερης επίπτωσης της καρδιαγγειακής νόσου λόγω έκθεσης σε αυτούς τους παράγοντες [128-132].

Αυτά τα ευρήματα έχουν ιδιαίτερη σημασία επειδή όλα αυτά τα μόρια είναι μέρος ενός δικτύου που επάγει και ενισχύει το σχηματισμό θρόμβων. Ο PAR4 μαζί με τον PAR1 είναι υποδοχείς θρομβίνης συζευγμένοι με πρωτεΐνη G, η οποία ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια πιο ισχυρά από οποιοδήποτε άλλο συνδέτη και προάγει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και το σχηματισμό θρόμβων [133]. Το CD36 είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, που εκφράζεται σε μονοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια. Το CD36 συμμετέχει στην πρόσληψη της οξειδωμένης LDL (oxLDL), σχηματισμού αφρωδών κύτταρων και σχηματισμού αθηροσκληρωτικών βλαβών [134], ενώ το CD36 των αιμοπεταλίων είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό θρόμβων μετά από ρήξη αθηροσκληρωτικής πλάκας [135, 136]. Το ICAM-1 εκφράζεται σε θέσεις ενεργοποίησης ενδοθηλιακών κυττάρων και επιτρέπει τη σταθερή προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασής του με τις λευκοκυτταρικές β2 ιντεγκρίνες CD11a/CD18 και CD11b/CD18 (συστοιχίες διαφοροποίησης 11a, 11b, 18) [137] διευκολύνοντας τον σχηματισμό θρόμβων στη φλεβική θρόμβωση που επάγεται από ενδοθηλίνη [138]. Η ενδοθηλίνη-1, ένας ισχυρός αγγειοσυσταλτικός και προ-φλεγμονώδης μεσολαβητής που παράγεται στην απόκριση σε υποξία και είναι αυξημένος σε ασθενείς με ΣΝ [139], εντοπίζεται στην αθηροσκληρωτική πλάκα και έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη στεφανιαία φλεγμονή και επιδεινώνει την ισχαιμία του μυοκαρδίου [140, 141]. Η eNOS, αντίθετα, είναι το ένζυμο που παράγει οξείδιο του αζώτου (NO) στα ενδοθηλιακά κύτταρα [142], προκαλεί αγγειοδιαστολή και αναστέλλει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων [143], την ενεργοποίηση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τοίχωμα των αγγείων και τον ήδη σχηματισμένο θρόμβο [144]. Τέλος, ο TLR2, ένας υποδοχέας αναγνώρισης παθογόνων και η κυτταροκίνη IFN γ είναι κρίσιμα συστατικά της έμφυτης ανοσίας, τα οποία έχουν αποδειχθεί ότι καθιστούν τα αιμοπετάλια υπεραντιδραστικά και προθρομβωτικά [145] και είναι κρίσιμα για την επαγωγή της έκφρασης του ιστικού παράγοντα και άλλων μορίων προσκόλλησης και είναι παρόντα σε αθηροσκληρωτικές βλάβες, αντίστοιχα [146-148].

8.2. Το κάπνισμα και η ΧΑΠ

Το συστηματικό κάπνισμα συνδέεται με μια μεγάλη ποικιλία συνδρόμων όπως η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), ο καρκίνος του πνεύμονα, η παχυσαρκία, ο διαβήτης

τύπου 2, η περιφερική αρτηριακή νόσος και η στεφανιαία νόσος. Η ΧΑΠ είναι η κλινική οντότητα που χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη πνευμονική βλάβη λόγω του χρόνιου καπνίσματος και φέρει αυξημένο κίνδυνο περιφερικής αρτηριακής νόσου και στεφανιαίας νόσου [149]. Οι έρευνες δείχνουν ότι οι μεταβολές στην κατάσταση μεθυλίωσης του DNA στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος συνοδεύουν το τακτικό κάπνισμα και την ΧΑΠ.

Αρκετές ομάδες έχουν διεξάγει ανάλυση της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος DNA που έχει απομονωθεί από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος που προέρχονται από καπνιστές και μάρτυρες. Γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση των καρδιαγγειακών παθήσεων, της φλεγμονής, της πήξης και της ανοσολογικής απόκρισης έχουν αναδειχθεί σε όλες αυτές τις μελέτες. Η υπεραντιπροσώπωση του μονοπατιού σηματοδότησης της θρομβίνης εξηγεί εν μέρει την ευαισθησία σε καρδιαγγειακές παθήσεις που χαρακτηρίζει τους βαριούς καπνιστές. Ένα από τα πιο κορυφαία ταξινομημένα διαφορικά μεθυλωμένα γονίδια ήταν ο υποδοχέας θρομβίνης PAR4 ακολουθούμενος από τον PAR1, τον von Willebrand Factor και τη γλυκοπρωτεΐνη 5 [150-153]. Η μεθυλίωση του PAR4 συνδέθηκε με τα επίπεδα ορού ιντερλευκίνης-18 (IL-18) με πιθανή αιτιώδη συνάφεια [90]. Η IL-18 είναι μια ισχυρή προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, που έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καρδιαγγειακών επεισοδίων και παίζει ρόλο στον σχηματισμό της αθηροσκληρωτικής πλάκας [154, 155]. Εκτεταμένη ανάλυση της μεθυλίωσης του γονιδιώματος σε 1454 ασθενείς με ΧΑΠ και/ή ταυτόχρονη συστηματική χρήση κορτιζόλης απέδωσε παρόμοια αποτελέσματα. Τα PAR4, PAR3, FXII και CD11b γονίδια αποκαλύφθηκαν να χαρακτηρίζονται από διαφοροποιημένη σχετική μεθυλίωση [156, 157].

Τα παραπάνω μόρια είναι ιδιαίτερης σημασίας στην παθοφυσιολογία των θρομβωτικών διαταραχών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι PAR 1 και 4, όταν ενεργοποιηθούν από τη θρομβίνη, οδηγούν στην αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων με ακόλουθη απελευθέρωση του ADP, την παραγωγή της θρομβοξάνης A₂ (TXA₂) και της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης αIIbβ₃ (GPIIb/IIIa) που είναι υποδοχέας του ινωδογόνου [158-160]. Η ενεργοποίηση του PAR1 στο αγγειακό ενδοθήλιο οδηγεί επίσης σε αυξημένη επιφανειακή έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1 (ενδοθηλιακό μόριο προσκόλλησης 1), P-σελεκτίνης και E-σελεκτίνης και της γονιδιακής μεταγραφής κυτταροκινών και χημειοκινών

όπως ιντερλευκίνη-8 [161]. Ο PAR3 είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας που διευκολύνει την ενεργοποίηση του PAR4 από τη θρομβίνη [162].

8.3. Διαβήτης και Υπερτριγλυκεριδαιμία

Ο διαβήτης και η υπερτριγλυκεριδαιμία είναι γνωστοί παράγοντες κινδύνου για τη ΣΝ και το περιφερική αρτηριακή νόσο και υπάρχουν ενδείξεις ότι επιγενετικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν τις θρομβωτικές επιπλοκές τους. Τα μονοκύτταρα από ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 χωρίς επιπλοκές έχουν βρεθεί ότι έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ακετυλιωμένης ιστόνης 4 σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες ή ασθενείς με διαβητικές επιπλοκές, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό προστατευτικό μηχανισμό [163]. Η υπερτριγλυκεριδαιμία παρεμποδίζει την κατάλληλη ινωδολυτική λειτουργία στη ΣΝ και άλλες αθηροθρομβωτικές διαταραχές. Ο αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1), ένας αναστολέας ινωδόλυσης, αυξάνεται από πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες με μια διαδικασία που εξαρτάται από τη μεθυλίωση του DNA στον υποκινητή PAI-1 [164]. Η βασική φυσιολογική λειτουργία του PAI-1 είναι η αναστολή του ενεργοποιητή πλασμινογόνου ουροκινάσης (uPA) και του ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου (tPA), των ενζύμων που ευθύνονται για τη διάσπαση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη, η οποία με τη σειρά της αποικοδομεί τη δομή ινώδους των ενδοαγγειακών θρόμβων [165, 166]. Η ανεπάρκεια του PAI-1 προκαλεί επιταχυνόμενη ινωδόλυση και αιμορραγία, ενώ τα αυξημένα επίπεδα πλάσματος του PAI-1 σχετίζονται με ενδαγγειακή θρόμβωση [167, 168].

8.4. Συστηματικές αυτοάνοσες ασθένειες

Αυξημένος είναι ο κίνδυνος για ΣΝ και σε συστηματικές αυτοάνοσες νόσους [169]. Το DNA που απομονώθηκε από ασθενείς που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα και νόσο Kawasaki φέρει ένα διακριτικό «στίγμα» μεθυλίου, χαρακτηριστικό διαφορετικό από τις ομάδες ελέγχου [170, 171]. Μεταξύ των οδών που εκπροσωπούνται στην βιοπληροφορική ανάλυση είναι εκείνες του συμπληρώματος, της πήξης, της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της φλεγμονής. Ιδιαίτερα σχετικές με τις θρομβωτικές διεργασίες είναι τα γονίδια von Willebrand Factor, του αναστολέα της πρωτεΐνης C (PCI), P-σελεκτίνη (SELP), ICAM-1, ITGA2B και MAPK14 [170, 171].

Όλα αυτά τα μόρια συμμετέχουν στην κυτταρική προσκόλληση και τον σχηματισμό θρόμβων. Το ITGA2B κωδικοποιεί την ιντεγκρίνη άλφα-IIβ που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου GPIIb/IIIa στα αιμοπετάλια. Η P-σελεκτίνη είναι αποθηκευμένη στα

αιμοπεταλιακά κοκκία και στα σωμάτια Weibel-Palade των ενδοθηλίων [172], και μετά την διέγερση των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου μετατοπίζεται ταχέως στην κυτταρική επιφάνεια, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό θρόμβων [173]. Η P-σελεκτίνη είναι κρίσιμη για τον σχηματισμό θρόμβων, καθώς μεσολαβεί στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων σε περιοχές αγγειακής βλάβης και φλεγμονής, μια δράση που ασκείται μέσω του συνδέτη της, PSGL-1 [174]. Τα επίπεδα της διαλυτής μορφής της είναι υψηλότερα σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση και θρόμβωση και σχετίζονται με τη μελλοντική εμφάνιση AEE και OEM [175, 176]. Η PCI, από την άλλη πλευρά, αναστέλλει όχι μόνο την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C αλλά και το σύμπλεγμα θρομβίνης-θρομβομοντουλίνης [177]. Τέλος, η MAPK14, γνωστή και ως p38α, επάγει έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, ρυθμίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [178] και παίζει βασικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση, στην έκταση του εμφράγματος, την καρδιακή λειτουργία και την φλεγμονώδη απόκριση [179].

8.5. Χρόνια νεφρική νόσος

Η χρόνια νεφρική νόσος (XNN) χαρακτηρίζεται από προοδευτική μείωση της σπειραματικής διήθησης και αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου [180].

Η απαμπεταλόνη είναι ένας επιγενετικός τροποποιητικός παράγοντας ο οποίος διακόπτει την αλληλεπίδραση μεταξύ των BET πρωτεϊνών και ακετυλιωμένων ιστονών, αποκτώντας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* αντιφλεγμονώδη και αντιαθηροσκληρωτικά χαρακτηριστικά [181]. Σε μια ομάδα ασθενών με σταδίου 4 και 5 του XNN, η χορήγηση μίας μόνο δόσης απαμπεταλόνη αναστέλλει την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με φλεγμονή, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και πήξη. Μεταξύ αυτών ιδιαίτερα σχετικές με τη θρόμβωση ήταν η IL-6, η PAI-1, η P-σελεκτίνη, η tPA και η uPA, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι οι καρδιαγγειακές επιπλοκές στο XNN είναι επιρρεπείς σε επιγενετική ρύθμιση [182]. Οι οδοί και τα γονίδια που εντοπίστηκαν από μελέτες σχετιζόμενες με τον καρκίνο και ασθενειών με αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο απεικονίζονται στον Πίνακα 2.

9. Στοιχεία επιγενετικής ρύθμισης προθρομβωτικών γονιδίων *in vitro* μοντέλα

Οι ακόλουθες μελέτες επικεντρώνονται στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους με βάση *in vitro* πειράματα. Παρόλο που δεν υπάρχουν αποδείξεις τέτοιων μηχανισμών σε ανθρώπινες ασθένειες, αυτά τα μοντέλα ασθενειών είναι καλά καθιερωμένα και αποδεκτά.

9.1. Ενδοθηλιακά κύτταρα

Η απορρύθμιση των ενδοθηλιακών κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στις θρομβωτικές διαταραχές. Για το λόγο αυτό, αρκετές ομάδες έχουν μελετήσει επιγενετικές τροποποιήσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η υπερχοληστερολαιμία με κυρίαρχη αύξηση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών χοληστερόλης (LDL) είναι ένας σημαντικός τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για την αθηροσκλήρωση και τη στεφανιαία νόσο. Σε δύο διαφορετικές μελέτες, η διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων με LDL έχει αποδειχθεί ότι επάγει έναν προθρομβωτικό φαινότυπο μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων.

Η διέγερση με LDL επηρεάζει την έκφραση των παραγόντων μεταγραφής KLF2 (παράγοντας τύπου Kruppel 2) και του p66shc μέσω τροποποίησης DNA και ιστονών [183, 184]. Τα επίπεδα του KLF2, τα οποία έχουν προταθεί ότι διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο κατά την αθηροθρομβωτική διαδικασία [185], μαζί με τα γονίδια-στόχους του TM, eNOS και PAI-1, περιορίζονται από την LDL. Η διέγερση με LDL διεγείρει την έκφραση και την ενζυματική δραστηριότητα της DNMT1, με παράλληλη δέσμευση των MECP2 και EZH2 (ενισχυτή ιστονικής μεθυλοτρανσφεράσης του zeste homolog 2) στον υποκινητή του KLF2, ένα φαινόμενο που καταργείται με αναστολή των DNMT και αποσιώπηση του EZH2 [183]. Το p66shc από την άλλη πλευρά είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που μεσολαβεί στην προκαλούμενη από υπερχοληστερολαιμία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τον σχηματισμό αθηρωματικών πλακών προκαλώντας την έκφραση του ICAM-1 και την αρνητική ρύθμιση της TM. Η LDL διεγείρει την έκφραση του p66shc μέσω υπομεθυλίωσης DNA με συνακόλουθη ακετυλίωση της ιστόνης 3 στον υποκινητή της σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ένα αποτέλεσμα που αναιρείται από την αναστολή της DNMT [184].

Επιπλέον, η μεταγραφική ενεργοποίηση της θρομβομοντουλίνης, του υποδοχέα της πρωτεΐνης C (EPCR) στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και του ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του DNA και τις τροποποιήσεις των ιστονών. Η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με ρετινοϊκό οξύ επάγει τη συσσώρευση τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3K4, ενός δείκτη για την ενεργή χρωματίνη, στον υποκινητή της TM [186]. Ο EPCR, που είναι ο υποδοχέας της πρωτεΐνης C και ενισχύει την ενεργοποίησή του από το σύμπλοκο θρομβίνης-θρομβομοντουλίνης [187], περιέχει πολλαπλές αλληλουχίες δέσμευσης πρωτεΐνης 1 (Sp1) που προστατεύονται από μεθυλίωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεισφέρουν συλλογικά στη γονιδιακή έκφραση

[188]. Τέλος, η μεταγραφή του tPA επηρεάζεται από την ακετυλίωση των ιστονών, καθώς η σίγαση των HDAC3, HDAC5 και HDAC7 καταργεί τη μεταγραφική ενεργοποίηση του tPA όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωαστούν με βαλπροϊκό οξύ [189].

9.2. Μεγακαρυοκύτταρα

Τα αιμοπετάλια, τα οποία προέρχονται από μεγακαρυοκύτταρα, είναι βασικά κύτταρα για τον σχηματισμό θρόμβων. Η γονιδιακή έκφραση του ITGA1, γονίδιο που κωδικοποιεί ιντεγκρίνη, καταστέλλεται επιγενετικά σε μεγακαρυοκύτταρα λόγω εκτεταμένης μεθυλίωσης στον υποκινητή του και επαγωγή της έκφρασης αυτού μπορεί να προκαλέσει η de novo χρήση παράγοντα απομεθυλίωσης του DNA [190]. Παρόλο που το ITGA1 δεν έχει αποδεδειγμένο ρόλο στη θρόμβωση, αυτή η μελέτη δείχνει ότι η επιγενετική ρύθμιση επηρεάζει επίσης τα αιμοπετάλια.

Τα γονίδια που προσδιορίζονται από τις in vitro μελέτες απεικονίζονται στον Πίνακα 3.

10. Συμπεράσματα

Ενδείξεις επιγενετικών αλλοιώσεων παρατηρούνται σε αρκετές θρομβωτικές ασθένειες όπως η στεφανιαία νόσος, η εγκεφαλική αγγειακή νόσος, η προεκλαμψία και το σύνδρομο των αντιφωσφολιπιδίων. Η διαφορική μεθυλίωση του DNA και οι MMT των ιστονών που ελέγχουν τη μεταγραφή προθρομβωτικών και προφλεγμονωδών γονιδίων εντοπίζονται στη καρδιαγγειακή νόσο καθώς και σε προδιαθεσιακούς παράγοντες θρόμβωσης όπως το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η υπερτριγλυκεριδαιμία, η επαγγελματική έκθεση σε σωματιδιακή ύλη, ο καρκίνος, η Χρόνια αποφρακτική Πνευμονοπάθεια και η Χρόνια Νεφρική Νόσος. Αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποστηρίζονται περαιτέρω από in vitro πειράματα.

Σε μοριακό επίπεδο, οι επιγενετικές τροποποιήσεις ρυθμίζουν τα κύρια συστατικά της πήξης, του αντιπηκτικού μηχανισμού, της ινωδόλυσης και της κυτταρικής προσκόλλησης κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των θρόμβων.

Ολόκληρη η εξωγενής οδός του καταρράκτη πήξης, η οποία περιλαμβάνει έκφραση ιστικού παράγοντα επί των ενδοθηλιακών κυττάρων και η σειριακή ενεργοποίηση των παραγόντων πήξεως FVII, FV και FX, θρομβίνης και τέλος ινωδογόνου βρίσκεται υπό επιγενετικό έλεγχο. Στην ενδογενή οδό επηρεάζεται επίσης ο εκκινητής FXII και ο ενδιάμεσος παράγοντας FVIII.

Η έκφραση των γονιδίων και τα επίπεδα πρωτεϊνών σχεδόν του συνόλου του συστήματος αντίπραξης, συμπεριλαμβανομένου του αρχικού συμπλόκου θρομβίνης-θρομβομοντουλίνης, του ενισχυτή EPCR, του τελικού προϊόντος Πρωτεΐνης C και του αναστολέα αυτής PCI και συστατικών της οδού ινωδόλυσης, μεταξύ των οποίων είναι ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου ιστού και ο αναστολέας PAI1, επηρεάζονται από επιγενετικές τροποποιήσεις.

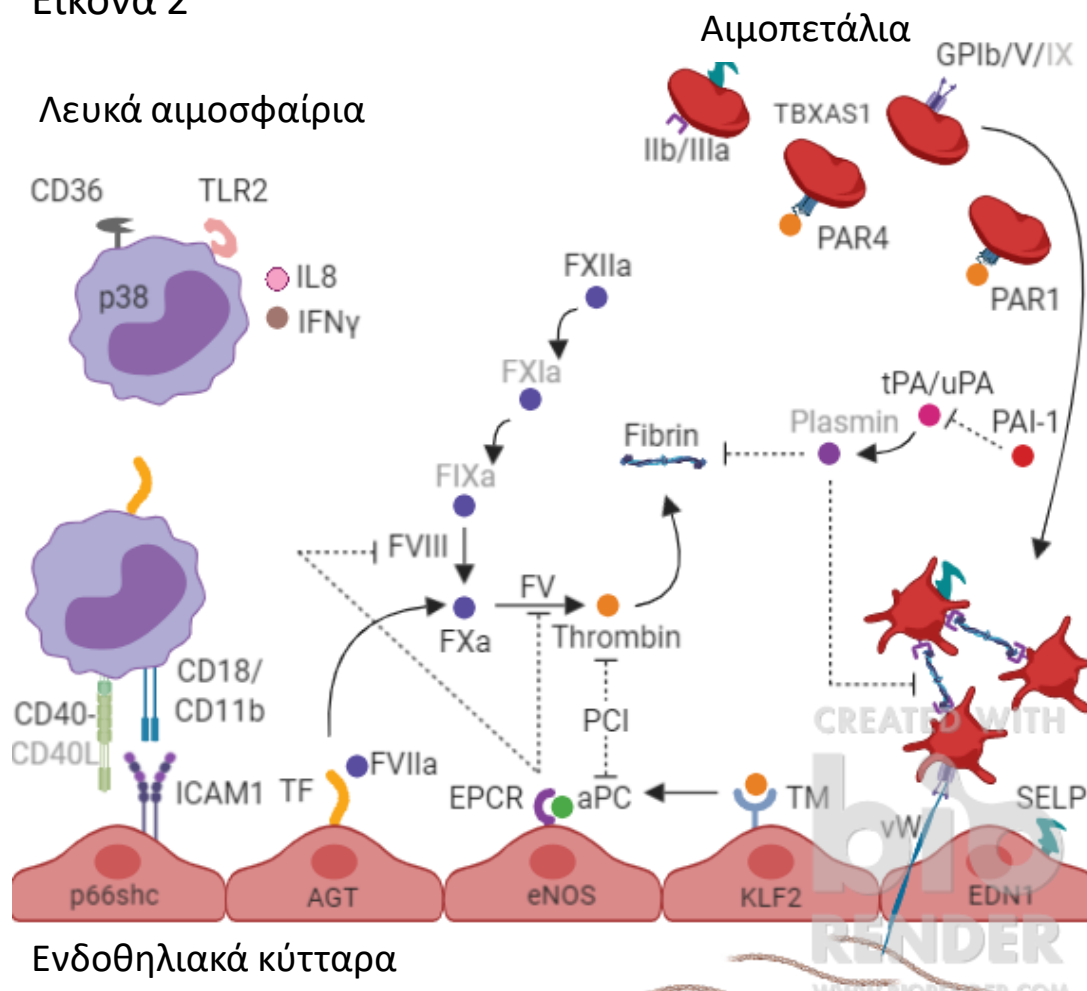
Εκτός από τη διαδικασία πήξης που χαρακτηρίζει το αρχικό στάδιο σχηματισμού θρόμβου, αρκετά μόρια κυτταρικής επιφάνειας που μεσολαβούν στην προσκόλληση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων και τη μετανάστευση αυτών στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως τα PAR1, PAR4, P-σελεκτίνη, GPIIb/IIIa, CD18/CD11b, CD36, TLR2, ICAM-1 και VWF χαρακτηρίζονται επίσης από διαφοροποιημένη μεθυλίωση σε αρκετές καταστάσεις.

Τελικά, οι κυτταροκίνες όπως οι IL-8 και IFN γ , οι ρυθμιστές αγγειακού τόνου μεταξύ των οποίων η ενδοθηλίνη 1, η αγγειοτενσίνη, η συνθετάση του μονοξειδίου αζώτου και η TBXAS1 και οι παράγοντες μεταγραφής όπως οι KLF2, p38 α και p66shc είναι όλα επιρρεπείς στη ρύθμιση με βάση τη μεθυλίωση του DNA σε θρομβωτικές νόσους και μοντέλα νοσημάτων. Όλα τα παραπάνω μόρια και η σημειωμένη θέση τους σε θρομβωτικές οδούς απεικονίζονται στο Σχήμα 2.

Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι η επιγενετική ρύθμιση επηρεάζει την παθοφυσιολογία θρομβωτικών διαταραχών με πιθανή διαγνωστική ή θεραπευτική χρησιμότητα.

Χρηματοδότηση: Το έργο αυτό υποστηρίχθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών Ελλάδος (αριθμός υποτροφίας: 3285, 23/3/2016).

Εικόνα 2



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση μεσολαβητών που υφίστανται επιγενετική ρύθμιση στη θρόμβωση και την πήξη. Η χρήση μαύρου χρώματος γραμματοσειράς σημαίνει αποδεδειγμένη επιγενετική τροποποίηση των απεικονιζόμενων μορίων σε τουλάχιστον έναν κυτταρικό τύπο, ενώ η ανοιχτόχρωμη γραμματοσειρά υποδηλώνει την έλλειψη ενδείξεων επιγενετικής ρύθμισης. Λόγω της σημασίας τους όμως, αυτοί οι διαμεσολαβητές απεικονίζονται στο σχήμα. Αυτές οι οδοί και οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εξάγονται από προηγούμενες μελέτες. Όλες οι συντομογραφίες εξηγούνται στο κύριο κείμενο. Το σχήμα δημιουργήθηκε με BioRender.com.

Πινάκας 1. Επιγενετικές αλλαγές σε θρομβωτικές διαταραχές

Κλινική οντότητα	πηγή DNA	Επηρεασμένο γονίδιο	Επιγενετική τροποποίηση	Συσχέτιση με θρόμβωση
Στεφανιαία Νόσος	Ολικό αίμα	47 CpGs	Διαφορική μεθυλίωση	Χημειοταξία, στεφανιαία θρόμβωση, φλεγμονώδης απόκριση
-	T και B λεμφοκύτταρα	διάφορα CpGs	Διαφορική μεθυλίωση	Αθηρογενής και φλεγμονώδης σηματοδότηση
-	Ολικό αίμα	211 CpGs	Διαφορική μεθυλίωση	Καρδιακή λειτουργία, ανταπόκριση σε ισχαιμική βλάβη
-	Λευκά αιμοσφαίρια	FVII υποκινητής	Υπομεθυλίωση	Μηχανισμός πήξης
-	Μονοκύτταρα	CD40	Υπομεθυλίωση	Συγκόλληση αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων
Αγγειακό εγκεφαλικό	Λευκά αιμοσφαίρια	miR-223 υποκινητής Θρομβομοντουλίνη υποκινητής	Υπομεθυλίωση	Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία
-			Υπερμεθυλίωση	Μηχανισμός αντιπήξης
Προεκλαμψία	Επιπλοικές αρτηρίες	TBXAS1 υποκινητής	Υπομεθυλίωση	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, αγγειοσύσπαση
-	Επιπλοικές αρτηρίες	Θρομβίνη, FV, FXII, GPV, GPIBA, Protein C	Διαφορική μεθυλίωση	Μηχανισμός πήξης
-	Λευκά αιμοσφαίρια	AGT, CALCA, DDAH1	Διαφορική μεθυλίωση	Φλεγμονώδης απόκριση, αγγειακός τόνος και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία
ΣΑΦ	Ολικό αίμα	IL-8 υποκινητής	Υπομεθυλίωση	Χημειοταξία και προσκόλληση ουδετεροφίλων
	Ολικό αίμα	Ιστικός παράγοντας	Υπερμεθυλίωση	Μηχανισμός πήξης
	Ουδετερόφιλα	42 CpGs	Υπομεθυλίωση	Εγκυμοσύνη και ανοσολογική απόκριση

Πινάκας 2. Επιγενετικές αλλαγές σε προθρομβωτικές διαταραχές και θρόμβωση συσχετιζόμενη με κακοήθεια

Προδιαθεσιακός παράγοντας	Γονίδιο σχετικό με θρόμβωση	Επιγενετική τροποποίηση	Συσχέτιση με θρόμβωση
Χαλβουργοί	EDN 1, NOS 3	Υπομεθυλίωση υποκινητή	Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία
Συγκόλληση μετάλλων	PAR4	Υπομεθυλίωση υποκινητή	Υποδοχέας θρομβίνης, ενεργοποίηση αιμοπεταλίων
Μόλυβδος	CD36	Υπομεθυλίωση υποκινητή	ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, αθηροσκλήρυνση
Ατμοσφαιρική ρύπανση	Ιστικός παράγοντας, TLR2, ICAM-1, IFN γ	Υπομεθυλίωση υποκινητή	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη,
Κάπνισμα	PAR4, PAR1, von Willebrand factor, GPV	Διαφορική μεθυλίωση	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη
ΧΑΠ	PAR4, PAR3, FXII and CD11b	Διαφορική μεθυλίωση	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη
Διαβήτης	H4 ακετυλίωση	Αυξημένα επίπεδα	Προστατευτικό ρόλος
Υπερτριγλυκεριδαιμία	PAI-1 υποκινητής	Μεθυλίωση υποκινητή	Ινωδόλυση
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	vW, Protein C Inhibitor,	Υπομεθυλίωση υποκινητή	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη
Kawasaki νόσος	P-selectin, ICAM-1, ITGA2B, MAPK14	Διαφορική μεθυλίωση	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη
Ψυχολογική κατάσταση	Ιστικός παράγοντας, ICAM-1, TLR2	Υπομεθυλίωση υποκινητή	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη, ινωδόλυση
Θερμοκρασία και υγρασία	Ιστικός παράγοντας, ICAM 1, INOS, TLR2, IFN γ	Υπομεθυλίωση υποκινητή	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη, ινωδόλυση
ΧΝΝ	P-σελεκτίνη, PAI1, Ουροκινάση, ινωδογόνο	Μείωση με αναστολή BET	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη, ινωδόλυση
Καρκίνωμα ωοθηκών από διαυγή κύτταρα	HNF1B FVII	Υπομεθυλίωση υποκινητή HDAC4 αποακετυλίωση	Επάγει την έκφραση της θρομβίνης, του ινωδογόνου και του FVIII Πήξη
Γλοίωμα	FX, Ιστικός παράγοντας	Υπομεθυλίωση υποκινητή	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, πήξη, ινωδόλυση
Πρωτοπαθής μυελοϊνωση	CD18	Υπερμεθυλίωση υποκινητή	Κυτταρική προσκόλληση και φλεγμονώδης απόκριση

Πινάκας 3. Επιγενετικές αλλαγές σε in vitro μοντέλα

Κυτταρικός τύπος	Επηρεασμένο		Πειραματικό ερέθισμα	Συσχέτιση με θρόμβωση
	γονίδιο	Επιγενετική αλλαγή		
Ενδοθηλιακά κύτταρα	KLF2	Μεθυλίωση υποκινητή, μεθυλίωση ιστονών	LDL	Υποέκφραση θρομβομοντουλίνης και υπερέκφραση PAI1
	p66shc	Υπομεθυλίωση υποκινητή, H3 ακετυλίωση	LDL	Σχηματισμός θρόμβου και προσκόλληση αιμοπεταλίων στο ενδοθηλιακό κύτταρο
	tPA	Ακετυλίωση ιστονών H3 και H4	Βαλπροϊκό οξύ	Ινωδύλυση
	EPCR	Μεθυλίωση υποκινητή, Θρομβομοντουλίνη H3K4 στον υποκινητή	κανένα	Ενίσχυση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C
			all-trans Retinoic	Μηχανισμός αντιπήξης
Μεγακαρυοκύτταρα	ITGA1	Μεθυλίωση υποκινητή	Απομεθυλιωτικός παράγοντας	Καμία

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφαλαίο 3: Διαφορική μεθυλίωση σε CpG στον υποκινητή της ιντερλευκίνης 8 και στο πρώτο εσώνιο του ιστικού παράγοντα στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

1. Εισαγωγή

1.1. Επιγενετικές αλλαγές και αυτοανοσία

Τα αυτοάνοσα νοσήματα είναι σύνθετες και πολυπαραγοντικές διαταραχές στις οποίες το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται έναντι του οργανισμού. Μεγάλες μελέτες έχουν δείξει ότι το γονιδιακό υπόβαθρο προσδίδει μια ευαισθησία για πιθανή εμφάνιση αυτοάνοσου νοσήματος. Ωστόσο το γεγονός ότι μονοζυγωτικοί δίδυμοι συχνά δεν εμφανίζουν το ίδιο αυτοάνοσο νόσημα υποδεικνύει ότι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη παθογένεια των νοσημάτων αυτών.

Οι επιγενετικές αλλαγές είναι απαραίτητες για την ορθή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος [191]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μη αντιστρεπτή διαφοροποίηση των T- αθώνων κύτταρων σε Th-1 κύτταρα που παράγουν IFN- γ ή Th-2 που παράγουν IL-4 και IL-13. Τα Th-1 έχουν υπομεθυλιωμένο τον υποκινητή της IFN- γ και μεθυλιωμένους τους υποκινητές των IL-4 και IL-13, ενώ ακριβώς το αντίστροφο συμβαίνει στα Th-2 κύτταρα. Είναι εύλογο λοιπόν ότι η απορύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να παίζει ρόλο στην εμφάνιση αυτοανόσων νοσημάτων. Σε αυτό το πλαίσιο αυξανόμενος αριθμός μελετών αναδεικνύει τη παρουσία επιγενετικών τροποποιήσεων σε γονίδια που αφορούν προφλεγμονώδη μόρια με καλύτερα μελετημένο το Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο [192-194] και τη Ρευματοειδή αρθρίτιδα [195, 196]. Στις περισσότερες από τις μελέτες οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν μελετηθεί σε μονοπύρνα κύτταρα από το περιφερικό αίμα ενώ οι μελέτες που αφορούν όργανα στόχους είναι περιορισμένες.

1.2. Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων

Το Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων είναι μία αυτοάνοση επίκτητη θρομβοφιλία που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσες αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις καθώς και από νοσηρότητα εγκυμοσύνης παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό τα οποία στρέφονται εναντίον πρωτεϊνών που προσδέουν φωσφολιπίδια όπως η Βήτα-2 γλυκοπρωτεΐνη-I (β 2GPI) και η προθρομβίνη. Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα συμμετέχουν στην

προθρομβωτική τάση που συναντάμε στο σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων μέσω ενεργοποίησης διάφορων κυττάρων με πιο σημαντικά από αυτά τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η επώαση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας (HUVECs) με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα επάγει την αυξημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1 και E-selectin, και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6) καθώς και η αυξημένη έκφραση του ιστικού παράγοντα (TF).

Προηγούμενα πειράματα μας δείξαν ότι τα τετραμερή της CXCL4 διμερίζουν τη β2GPI, και το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζεται από αντί-β2GPI αντισώματα, ενεργοποιώντας τα αιμοπετάλια. Πρόσφατα δείξαμε ότι άλλες χημειοκίνες που προέρχονται από αιμοπετάλια όπως η CXCL7, CXCL4L1 και η CCL5 βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα ασθενών με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων. Ξέρουμε σήμερα ότι οι χυμοκίνες αυτές έχουν κάποια αντιαγγειογενετική δράση και η αλληλεπίδρασή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα θα πρέπει να διερευνηθεί.

Καμία μελέτη μέχρι στιγμής δεν αναφέρει την εγγενή ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων λόγω της δυσκολίας απομόνωσης αυτών από ασθενείς ενώ επιγενετικές αλλαγές στο σύνδρομο έχουν αναφερθεί μόνο στα ουδετερόφιλα. Για τους λόγους αυτούς θέλουμε στη παρούσα μελέτη να επικεντρωθούμε στην επιγενετική ανάλυση και ενδοθηλιακών κυττάρων απομονωμένων από το περιφερικό αίμα και από την ομφαλική φλέβα του πλακούντα (HUVECs), τα οποία έχουν εξαχθεί από υγιείς γυναίκες με επιτυχείς γέννες.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Πληθυσμός μελέτης και δείγματα

Η μελέτη περιλαμβάνει 27 ασθενείς με Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων και 25 υγιείς εθελοντές (ΥΔ). Η μελέτη ενεκρίθη από την Επιτροπή Βιοηθικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Από τους συμμετέχοντες ελήφθη αίμα για διενέργεια γενικής εξέτασης αίματος, ταχύτητα καθίζησης ερυθρών, χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (αPTT), και προσδιορισμού του τίτλου των αντισωμάτων έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης (αντί-β2GPI) και της καρδιολιπίνης (αντί-CL). Αίμα συνετάχθη επίσης για

απομόνωση DNA. Κατεγράφη το ιστορικό των ασθενών με βάση το αρχείο της κλινικής Παθολογικής Φυσιολογίας.

Ενδοθηλιακά Κύτταρα Ομφαλικής Φλέβας (HUVECs) απομονώθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Baudin et al. από 3 υγιείς δότες ύστερα από φυσιολογικό τοκετό και καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (Endothelial Basal Medium, EBM-2 medium, Lonza CC-3162).

2.2. Απομόνωση Αντί-β2GPI ανοσοσφαιρίνης Γ (IgG)

Ανθρώπινη β2GPI απομονώθηκε από πλάσμα υγιών δοτών σύμφωνα με πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί νωρίτερα [197] και ακινητοποιήθηκε σε σφαιρίδια σεφαρόζης (CNBr-Activated Sepharose 4B, GE Healthcare Life Sciences 17-0430-01) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα σφαιρίδια συζευγμένα με τη β2GPI τοποθετήθηκαν σε κλώνες χρωματογραφίας για την απομόνωση αντισωμάτων.

Ολική ανοσοσφαιρίνη Γ απομονώθηκε από 8 ασθενείς με ΣΑΦ και 8 υγιείς εθελοντές με τη χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη G σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Protein G Sepharose beads, GE Healthcare Life Sciences 17061801).

Τα παρασκευάσματα ολικής ανοσοσφαιρίνης Γ αναμείχθηκαν καταλήγοντας σε ένα μείγμα για τους ασθενείς και ένα για τους υγιείς. Το παρασκεύασμα ολικής ανοσοσφαιρίνης Γ των ασθενών επώαστηκε με τα σφαιρίδια σεφαρόζης συζευγμένα με β2GPI κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C. Τα αντί-β2GPI IgG εκλούστηκαν με τη χρήση διαλύματος Glycine-HCl buffer pH=2.5 και το pH εξισορροπήθηκε με διάλυμα 1M Tris-HCl pH= 8. Τα αντισώματα συμπυκνώθηκαν με συμπυκνωτές 30KMWCO.

2.3. Διέγερση των HUVECs.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs) διεγέρθηκαν με την IgG που απομονώθηκε από τους ασθενείς με ΣΑΦ και τους υγιείς. Συγκεκριμένα αντί-β2GPI IgG (50 µg/ml), β2GPI (20 µg/ml) και CXCL4 (40 ng/ml) προστέθηκαν στα κύτταρα για 4 ώρες. Τα κύτταρα συνελέχθησαν και ολικό mRNA απομονώθηκε από αυτά.

2.4. Απομόνωση RNA και ποσοτική PCR

Το ολικό mRNA απομονώθηκε από τα διεγερμένα HUVECs χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ (QIAGEN 74034). Πεντακόσια ng ολικού RNA μεταγράφηκαν αντίστροφα σε

cDNA (RR037B, PrimeScript™ RT Reagent Kit). Ποσοτική PCR χρησιμοποιώντας SYBR green MM (Kappa Biosystems KK4618) διεξήχθη για να προσδιοριστεί η σχετική έκφραση των SELE (μόριο προσκόλλησης λευκοκυττάρων, E-σελεκτίνης), IL-8, F3 (Ιστικός παράγοντας), VEGFC (υποδοχέας αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα C), TMBD (Θρομβομοντουλίνη), DNMT3A (DNA μεθυλοτρανσφεράση 3 άλφα), DNMT3B (DNA-μεθυλοτρανσφεράση 3 βήτα), SMYD4 (πρωτεΐνη 4 που περιέχει την περιοχή SET και MYND), ARID3A (πλούσια σε AT αλληλεπίδραση πρωτεΐνης 3A) (πρωτεΐνη που δεσμεύεται με μεθυλ-CpG 2), HDAC4 (αποακετυλάση ιστόνης 4), HDAC7 (αποακετυλάση ιστόνης 7), HDAC9 (αποακετυλάση ιστόνης 9), TET1 (Tet Διοξυγενάση μεθυλοκυτοσίνης 1) και EZH2 (ενισχυτής του zeste homolog 2) χρησιμοποιώντας β2 μικροσφαιρίνη ως γονίδιο αναφοράς.

2.5. Απομόνωση DNA, επεξεργασία με διθειώδες και ειδική ως προ τη μεθυλίωση PCR

Το DNA από πλήρες αίμα συλλεγμένο σε φιαλίδια με EDTA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας εμπορικό κιτ απομόνωσης DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Macherey-Nagel 740951). Η μετατροπή με διθειώδες διεξήχθη χρησιμοποιώντας το EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research D5005). Το μετατρεπόμενο DNA στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σε PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικά σχεδιασμένους για μεθυλιωμένο ή μη μεθυλιωμένο υπόστρωμα. Οι εκκινητές της IL-8 έχουν αναφερθεί προηγουμένως και αναγνωρίζουν 3 CpGs στην περιοχή του υποκινητή [35]. Οι αλληλουχίες εκκινητών για το F3 είναι: έμπροσθεν 5'GGAAAAAGATAAATTTATAC 3', αντιστρόφως 5'ACATACCCCATATTTCTACG3' για μεθυλιωμένο υπόστρωμα και έμπροσθεν 5'GGAAAAAGATAAATTTATAT3', αντιστρόφως 5'ACATACCCCATATTTCTACA3' για μη μεθυλιωμένο υπόστρωμα και αναγνωρίζει 2 CpGs στις θέσεις Chr1: 95006322 και Chr1: 95006539 (hg19 assembly) στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου. Για απλότητα, αναφέρουμε τους στόχους ως IL-8 υποκινητή και CpG του σώματος του γονιδίου F3 αντιστοίχως. Πλήρως μεθυλιωμένο και πλήρως μη μεθυλιωμένο DNA επεξεργασμένο με διθειώδες χρησιμοποιήθηκε ως θετικό και αρνητικό υπόστρωμα για να εκτιμηθεί η ειδικότητα των εκκινητών. Η qPCR πραγματοποιήθηκε με SYBR Green MM (Kapa Biosystems KK4618).

2.6. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση για πρωτεΐνες IL-8 και F3

Τα μονοκύτταρα απομονώθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως και τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες για ολονύχτια προσκόλληση. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα διεγέρθηκαν όπως παραπάνω για 4 ώρες. Μετά την επεξεργασία, το μέσο αναρροφήθηκε και οι

καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με PBS 1X. Ακολούθως τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με PBS 1X παραφορμαλδεΐδη 4% για 10 λεπτά. οι καλυπτρίδες εκλύθηκαν τρεις φορές με PBS 1X και τα κύτταρα διαπερατώθηκαν με PBS 1X Triton-X 0,1% επί 10 λεπτά. οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS 1X και η μη ειδική πρόσδεση παρεμποδίστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού που περιείχε PBS 1X αίγιο ορό 10% για 30 λεπτά. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού αναρροφήθηκε και οι καλυπτρίδες επώασθηκαν όλη τη νύκτα στους 4°C με πρωτογενή αντισώματα έναντι IL-8 (Cusabio, CSB-PA08327A0Rb, κουνελίου αντί-ανθρώπου) και F3 (American Diagnostica, 4509, μύς αντί-ανθρώπου) σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού σε τελική συγκέντρωση 20 µg/ml και 10 µg/ml αντιστοίχως. Την επόμενη ημέρα απομακρύνθηκε το πρωτεύον διάλυμα αντισώματος και οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν τρεις φορές με PBS 1X. οι καλυπτρίδες επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος που περιείχε συζευγμένα αντισώματα αιγός αντί-κουνελίου CF-568 (Biotum, 20102, κόκκινο) και αιγός αντι-μύς CF-488 (Biotum, 20010, πράσινο) σε τελική συγκέντρωση 2,6 µg/ml. Το διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος απομακρύνθηκε, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με PBS 1X και για την πυρηνική απεικόνιση επώαστηκαν με διάλυμα DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη, ThermoFischer Scientific D1306) σε νερό σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ml για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με νερό και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίας.

2.7. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (ΣΑ). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το GraphPad Prism 6.0. Οι τιμές και οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αξιολογήθηκαν με τα Mann-Whitney, τις δοκιμασίες paired t tests ή Kruskal-Wallis (One-Way ANOVA). Για συνεχείς μεταβλητές η συσχέτιση Spearman καθώς και η ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών πραγματοποιήθηκαν, όπως υποδεικνύεται στα υπόμνημα των εικόνων. Οι τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

3. Αποτελέσματα

3.1. Μειωμένη σχετική μεθυλίωση στον υποκινητή της IL-8 στους ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων

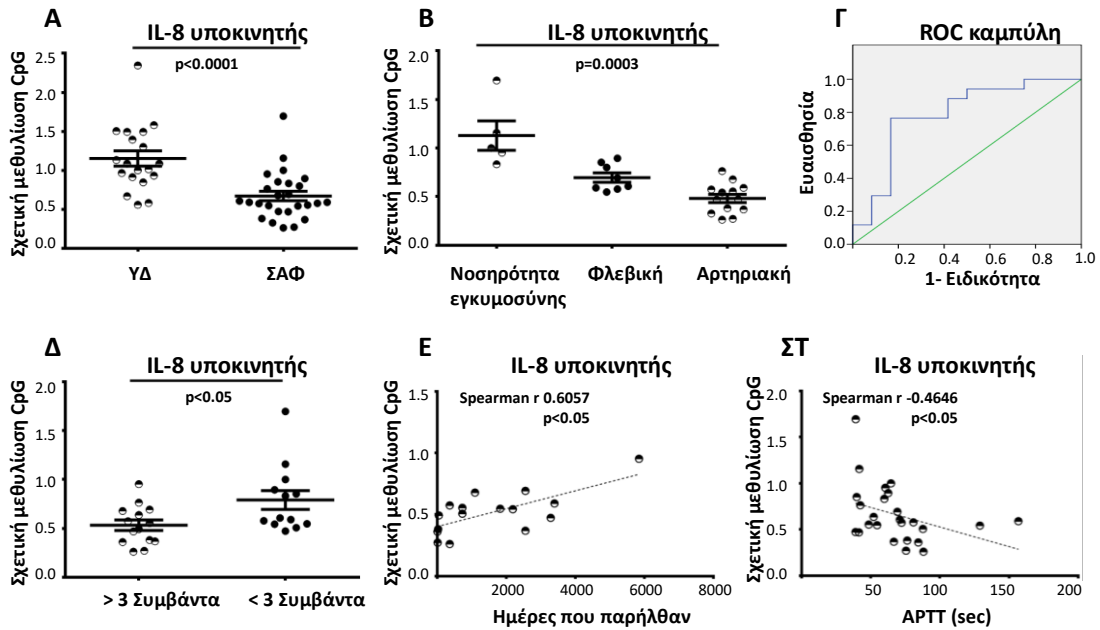
Το DNA που απομονώθηκε από τους ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων είχε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σχετικής μεθυλίωσης στον υποκινητή της ιντερλευκίνης 8 σε σχέση με τους υγιείς δότες (μέση τιμή \pm ΣΑ: ΣΑΦ 0.6715 ± 0.3090 έναντι ΥΔ 1.153 ± 0.4244 , $p < 0.0001$, Εικόνα 1Α).

Η ανάλυση των κλινικών υποομάδων ανέδειξε ότι οι ασθενείς με ιστορικό αρτηριακής θρομβοεμβολής είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στον υποκινητή της IL-8 σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ιστορικό εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης ή/και νοσηρότητα εγκυμοσύνης (Kruskal-Wallis analysis, $p=0.0003$).

Στατιστικά σημαντική ήταν επίσης η διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης ανάμεσα στους ασθενείς με εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση και νοσηρότητα εγκυμοσύνης (Εικόνα 1Β). Η μεθυλίωση της ιντερλευκίνης 8 μπορεί να διαχωρίσει με καλή ευαισθησία και καλή ειδικότητα τους ασθενείς με ιστορικό αρτηριακής θρομβοεμβολής από όλους τους υπόλοιπους (1Γ).

Οι ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων που είχαν στο ιστορικό τους πάνω από τρία κλινικά συμβάντα παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με αυτούς που είχαν υποστεί λιγότερα από τρία κλινικά συμβάντα (Εικόνα 1Δ). Μία αντίστροφη συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στα επίπεδα μεθυλίωσης των εν λόγω CpGs στον υποκινητή της ιντερλευκίνης 8 και στον χρόνο που έχει παρέλθει από το τελευταίο κλινικό συμβάν (Εικόνα 1Ε). Οι μέσες τιμές \pm ΣΑ όλων των συγκρίσεων απεικονίζονται στον Πίνακα 1. Εντός της ομάδας των ασθενών μία στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στη μεθυλίωση των CpG στον υποκινητή της ιντερλευκίνης 8 και τις τιμές του APTT (Εικόνα 1ΣΤ).

Εικόνα 1



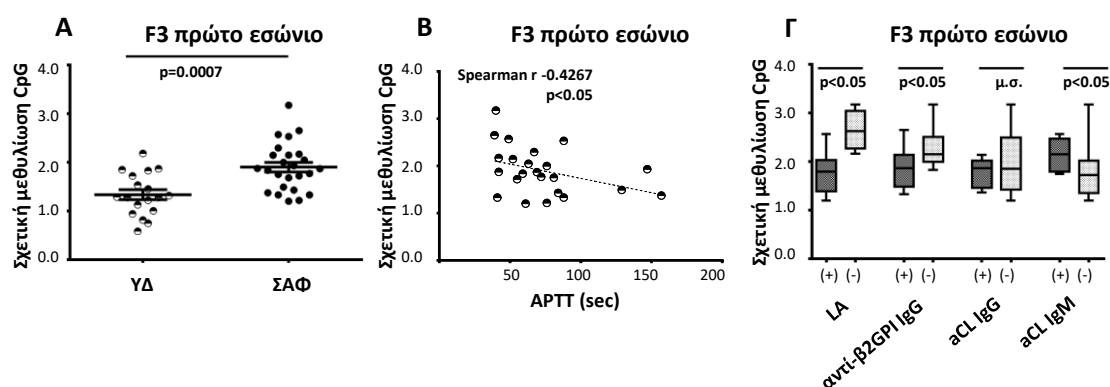
Εικόνα 1. Σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης προαγωγού IL-8 σε DNA που προέρχεται από ολικό αίμα ασθενών με ΣΑΦ και υποκατηγοριών και υγιών μαρτύρων. Α) Οι ασθενείς με ΣΑΦ έχουν μειωμένη σχετική μεθυλίωση υποκινητή της IL-8 σε σύγκριση με τους υγιείς δότες (μέσος όρος ± ΣΑ: ΣΑΦ 0,6715 ± 0,3090 έναντι ΥΔ 1,153 ± 0,4244, $p < 0,0001$). Β) Διαφορικά επίπεδα μεθυλίωσης IL-8 υποκινητή μεταξύ των ασθενών με ΣΑΦ με ιστορικό αρτηριακού θρομβωτικού συμβάντος, φλεβικής θρομβοεμβολής ή νοσηρότητας εγκυμοσύνης (μέσος όρος: 0,4815 έναντι 0,6954 έναντι 1,128 αντίστοιχα, *Kruskal-Wallis* ανάλυση, $p = 0,0003$). Γ) Η μεθυλίωσης της IL-8 διακρίνει τους ασθενείς με ιστορικό αρτηριακής θρομβοεμβολής από αυτούς με φλεβικής θρόμβωσης ή νοσηρότητας εγκυμοσύνης (περιοχή κάτω από την καμπύλη 0.786, $p = 0.0010$). Δ) Τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου IL-8 συσχετίζονται αρνητικά με το χρόνο από το τελευταίο κλινικό συμβάν (*Spearman* r 0.6057, $p = 0.0129$). Ε) Διαφορικά επίπεδα μεθυλίωσης IL-8 μεταξύ των ασθενών με ΣΑΦ που υπέστησαν περισσότερα ή λιγότερα από 3 κλινικά συμβάντα (μέσος όρος: 0,533 έναντι 0,7907, $p = 0,0348$). F) Σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης IL-8 και των τιμών ΑΤΤΤ σε ασθενείς με ΣΑΦ (*Spearman* r -0.4646, $p = 0.0193$).

3.2. Αυξημένη Σχετική μεθυλίωση των CpG στο πρώτο εσώνιο του F3

Η σχετική μεθυλίωση των υπό εξέταση CpG στο πρώτο εσώνιο του F3 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στο DNA που απομονώθηκε από ολικό αίμα από ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων σε σχέση με τους υγιείς δότες (μέση τιμή \pm ΣΑ: ΣΑΦ 1.902 ± 0.4920 έναντι ΥΔ 1.335 ± 0.4356 , $p < 0.0001$, Εικόνα 2Α).

Η ανάλυση ανάμεσα στις κλινικές υποομάδες των ασθενών δεν ανέδειξε διαφορά στη μεθυλίωση ανάμεσα στους ασθενείς με ιστορικό αρτηριακής θρομβοεμβολής, εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης ή νοσηρότητας εγκυμοσύνης (Πίνακας 1). Αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στα επίπεδα της μεθυλίωσης και τις τιμές του APTT (Spearman $r = -0.4267$, $p = 0.0212$, Εικόνα 2Β). Συσχέτιση παρατηρήθηκε Επίσης με την παρουσία αυτοαντισωμάτων LA, αντί-β2GPI και aCL (Εικόνα 2Γ).

Εικόνα 2



Εικόνα 2. Α) Οι ασθενείς με ΣΑΦ παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα σχετικής μεθυλίωσης στο πρώτο εσώνιο F3 σε σύγκριση με τους υγιείς δότες (μέσος όρος \pm ΣΑ: ΣΑΦ 1.902 ± 0.4920 έναντι ΗC 1.335 ± 0.4356 , $p < 0.0001$). Β) Η σχετική μεθυλίωση του πρώτου εσωνίου του F3 συσχετίζεται αρνητικά με τις τιμές APTT (Spearman $r = -0,4267$, $p = 0,0212$). Γ) Σύγκριση της μεθυλίωσης του F3 μεταξύ θετικών ή αρνητικών ασθενών με ΣΑΦ θετικών ή αρνητικών για αντι-β2GPI IgG, LA, aCL IgM και IgG αυτοαντισώματα (αντι-β2GPI IgG: 1.89 έναντι 2.278, LA: 1.786 έναντι 2.648, aCL IgM: 2.138 έναντι 1.79, 0,05).

Πίνακας 1. Συσχέτιση κλινικών εκδηλώσεων με τη μεθυλίωση του υποκινητή της IL-8 και του πρώτου εσωνίου του F3

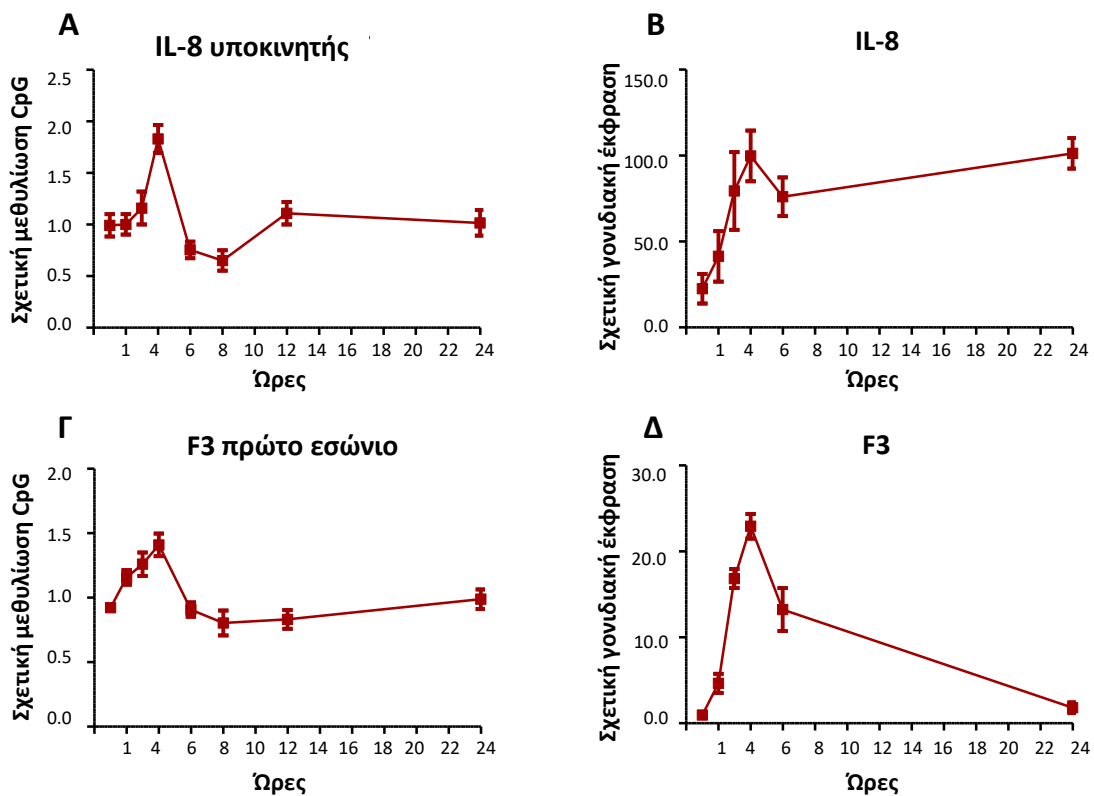
Κλινική εκδήλωση	Σχετική μεθυλίωση CpG	
	Σε ασθενείς με θετικούς για το κλινικό συμβάν Εκφρασμένη ως έναν υγιή (μέση ± ΣΑ)	
	IL-8 υποκινητής	F3 πρώτο εσώνιο
Κλινικό συμβάν		
Αρτηριακό	0.4815 ± 0.1545	1.832 ± 0.3916
Φλεβικό	0.6954 ± 0.1363	1.982 ± 0.5203
Νοσηρότητα εγκυμοσύνης	1.128 ± 0.3377	1.876 ± 0.5177
Kruskal-Wallis δοκιμασία	p=0.0003	p=0.9331
Ημέρες από το τελευταίο συμβάν		
Spearman r	0.6057	0.2363
	p=0.0129	p=0.1892
Αριθμός συμβάντων		
>3	0.533 ± 0.199	1.832 ± 0.4234
<3	0.7907 ± 0.3455	1.965 ± 0.5573
Mann-Whitney δοκιμασία	p=0.0348	p=0.8066

3.3. Διέγερση μονοκύτταρων απομονωμένα από υγιείς δότες με αντί-β2GPI IgG/β2GPI/CXCL4 οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση και δυναμικές αλλαγές στην μεθυλίωση των γονιδίων IL-8 και F3

Έπειτα αξιολογήσαμε τη συμμετοχή επιγενετικών ρυθμιστικών μηχανισμών σε ένα in vitro μοντέλο ενεργοποίησης με αντί-β2GPI-IgG/β2GPI/CXCL4. Αρχικά τα μονοκύτταρα επωαστήκαν με το σύμπλεγμα αντί-β2GPI-β2GPI για 30 λεπτά, 1, 2, 4, 6, 8, 12 και 24 ώρες έτσι ώστε να αναδειχθεί το ιδανικό χρονικό σημείο όπου παρατηρείται η μέγιστη απόκριση. Και για τα δύο γονίδια μέγιστη απόκριση σε επίπεδα mRNA παρατηρήθηκε στις 4 ώρες (Εικόνα 3A και 3Γ). Τα επίπεδα mRNA της IL-8 παρέμειναν μέχρι το τέλος της δοκιμασίας υψηλά ενώ το επίπεδα του F3 επέστρεψαν στα αρχικά επίπεδα 24 ώρες μετά το αρχικό ερέθισμα. Η διέγερση των υγιών μονοκύτταρων με αντί-β2GPI, αντί-β2GPI-β2GPI σύμπλεγμα, ή ένα μείγμα με αντί-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 για τέσσερις ώρες τα στρέφει σε έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο. Το μείγμα με είχε το μέγιστο αποτέλεσμα και οδήγησε στην υπερέκφραση του γονιδίου της IL-8 η οποία είναι ένας χημειοτακτικός παράγοντας των ουδετερόφιλων και του γονιδίου F3 είναι εκκινητής του μηχανισμού πήξης του αίματος. Η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν 200 φορές πάνω από τα βασικά επίπεδα για το

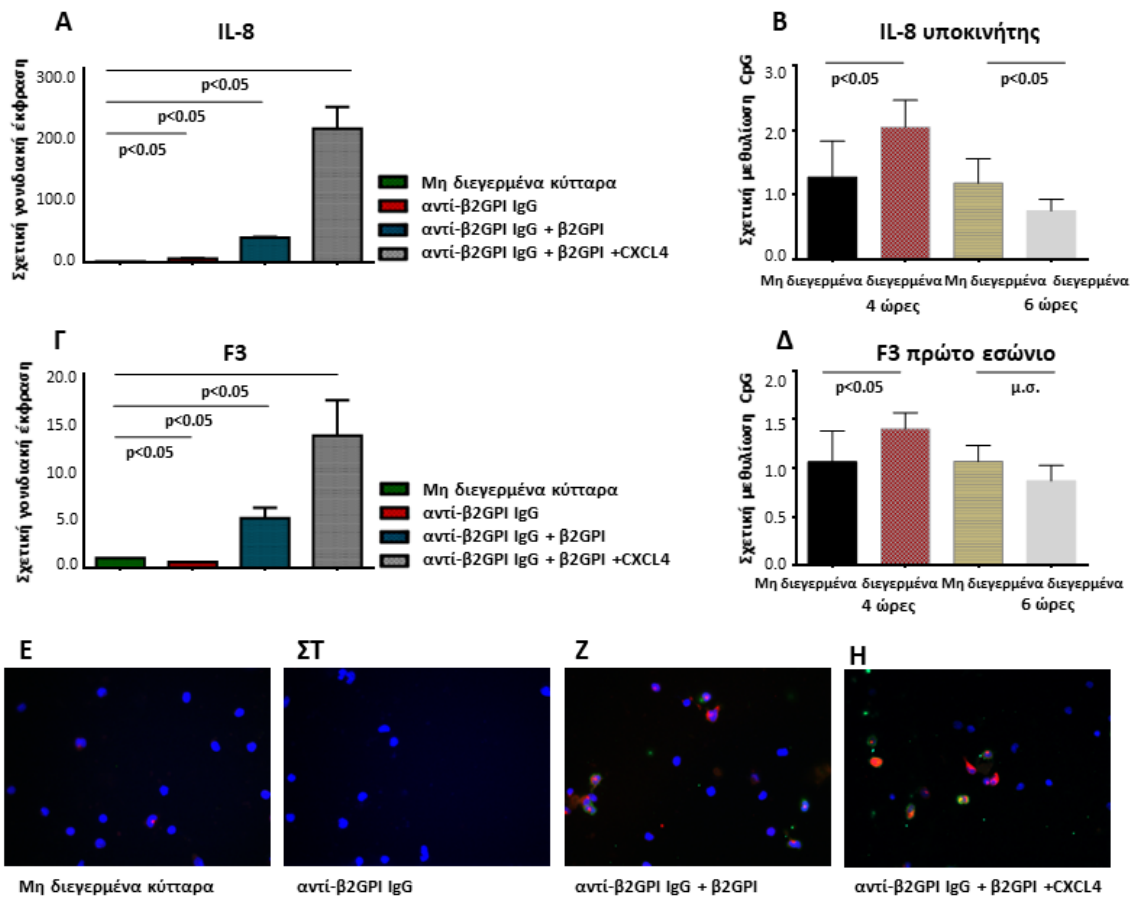
γονίδιο της IL-8 (Εικόνα 4Α) και 15 φορές για το γονίδιο F3 (Εικόνα 4Γ) σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία δεν υπέστησαν διέγερση. Η διέγερση των κυττάρων επάγει και την έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών όπως αναδείχθηκε με βάση την τεχνική της ανοσοκύτταροχημείας σε διεγερμένα μονοκύτταρα για τέσσερις ώρες με τα ανωτέρω ερεθίσματα. (Εικόνα 4Ε ως 4Η).

Εικόνα 3



Εικόνα 3. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης και μεθυλίωσης IL-8 και F3 σε μονοκύτταρα υγιών σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά από διέγερση με αντι-β2GPI-β2GPI. Α) Η διέγερση προκαλεί έκφραση της IL-8, με το mRNA να φτάνει τα μέγιστα επίπεδα σε 4 ώρες και να παραμένει επίμονα υψηλό στη συνέχεια. Β) Δυναμικές μεταβολές στα επίπεδα μεθυλίωσης υποκινητή IL-8 μετά από διέγερση. Γ) Η διέγερση μονοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου F3 και την (Δ) αύξηση μεθυλίωση στην πρώτο εσώνιο του F3, με τα μέγιστα επίπεδα να παρατηρούνται στις 4 ώρες μετά το ερέθισμα. Τόσο τα επίπεδα mRNA όσο και η μεθυλίωση του DNA επιστρέφουν στις βασικές τιμές στις 24 ώρες. Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 ανεξάρτητα πειράματα.

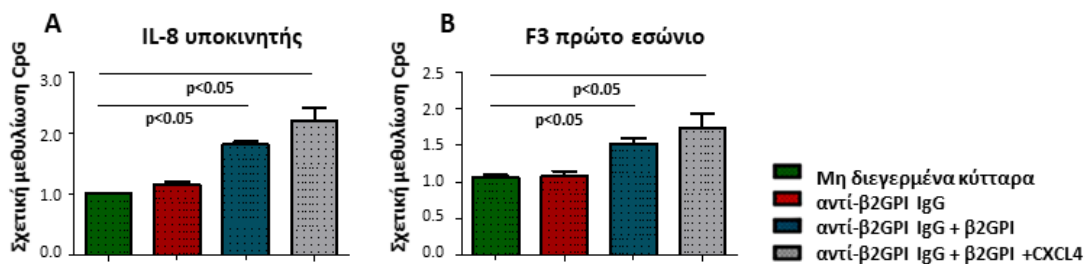
Εικόνα 4



Εικόνα 4. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης και μεθυλίωσης IL-8 και F3 σε μονοκύτταρα διεγερμένα με σύμπλεγμα αντι-β2GPI, αντι-β2GPI-β2GPI και μείγμα αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4. Α) Η διέγερση προκαλεί επαγωγή έκφρασης της IL-8 και (Β) δυναμικές μεταβολές στην μεθυλίωση του υποκινητή της IL-8. Το τριπλό μίγμα του αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 έχει το μέγιστο αποτέλεσμα. Γ) Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου F3 και (Δ) δυναμικές μεταβολές στην μεθυλίωση του F3 κατά τη διέγερση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από 5 ανεξάρτητα πειράματα. Ε-Η) Υψηλότερη ένταση φθορισμού κατά την χρώση για ιστικό παράγοντα και IL-8 σε μονοκύτταρα κατά την διέγερση. Το πράσινο φθορίζον σήμα υποδεικνύει τον Ιστικό Παράγοντα και το κόκκινο την πρωτεΐνη IL-8.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε την επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων IL-8 και F3, γενωμικό DNA από μονοκύτταρα υπό διέγερση για 30 λεπτά, 1, 2, 4, 6, 8, 12 και 24 ώρες υπεβλήθη σε MSPCR έτσι ώστε να προσδιοριστεί η σχετική μεθυλίωση στο πρώτο εσώνιο του F3 και στον υποκινητή της IL-8. Ύστερα από διέγερση για 4 ώρες με το μείγμα αντί-β2GPI IgG-β2GPI τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή της IL-8 παρουσίασαν μία αρχική αύξηση η οποία έφτασε στο μέγιστο ακολουθούμενη από μία μείωση στις 6 και στις 8 ώρες και επιστροφή στα βασικά επίπεδα 24 ώρες μετά την αρχική διέγερση. Η σχετική μεθυλίωση στο πρώτο εσώνιο του F3 παρουσίασε επίσης μία αρχική αύξηση στις 4 ώρες, μια τάση για μείωση στις 6 και στις 8 ώρες καθώς και μία επιστροφή στα βασικά επίπεδα στις 24 ώρες. Η διαφορά ανάμεσα στα μη διεγερμένα και στα διεγερμένα κύτταρα στις 6 ώρες δεν ήταν στατιστικά σημαντική για τα επίπεδα της μεθυλίωσης του F3 (Εικόνα 3B και 3Δ). Ύστερα από διέγερση για 4 ώρες με το μείγμα αντί-β2GPI IgG-β2GPI και οι δύο περιοχές υπό εξέταση παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με τα κύτταρα που δεν υπέστησαν διέγερση (Εικόνα 4B και 4Δ). Το ίδιο ερέθισμα οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της σχετικής μεθυλίωσης στον υποκινητή της IL-8 ενώ για το πρώτο εσώνιο του F3 η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα. Στις 4 ώρες ύστερα από το αρχικό ερέθισμα οπότε και παρατηρείται απόκριση όπως αυτή προσδιορίζεται τα επίπεδα του mRNA, διαφορετικά ερεθίσματα οδηγούν σε διαφορετική μεθυλίωση του DNA με τρόπο ανάλογο και αντίστοιχο της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 5). Το μείγμα αντί-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 παρουσίασε τη μέγιστη απάντηση και οδήγησε σε αυξημένη μεθυλίωση και στις δύο υπό εξέταση περιοχές. Τα αποτελέσματα από 5 ανεξάρτητα πειράματα και υποστηρίζουν ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση και των δύο γονιδίων συνοδεύεται από δυναμικές αλλαγές στη μεθυλίωση τους.

Εικόνα 5



Εικόνα 5. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεθυλίωσης IL-8 και F3 DNA σε μονοκύτταρα υγιών διεγερμένα για 4 ώρες με σύμπλοκο αντι-β2GPI, αντι-β2GPI-β2GPI και μείγμα αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4. Η διέγερση προκαλεί δυναμικές αλλαγές στη μεθυλίωση του υποκινητή της IL-8 (A) και στο πρώτο εσώνιο του F3 (B). Το τριπλό μίγμα του αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 έχει το μέγιστο αποτέλεσμα.

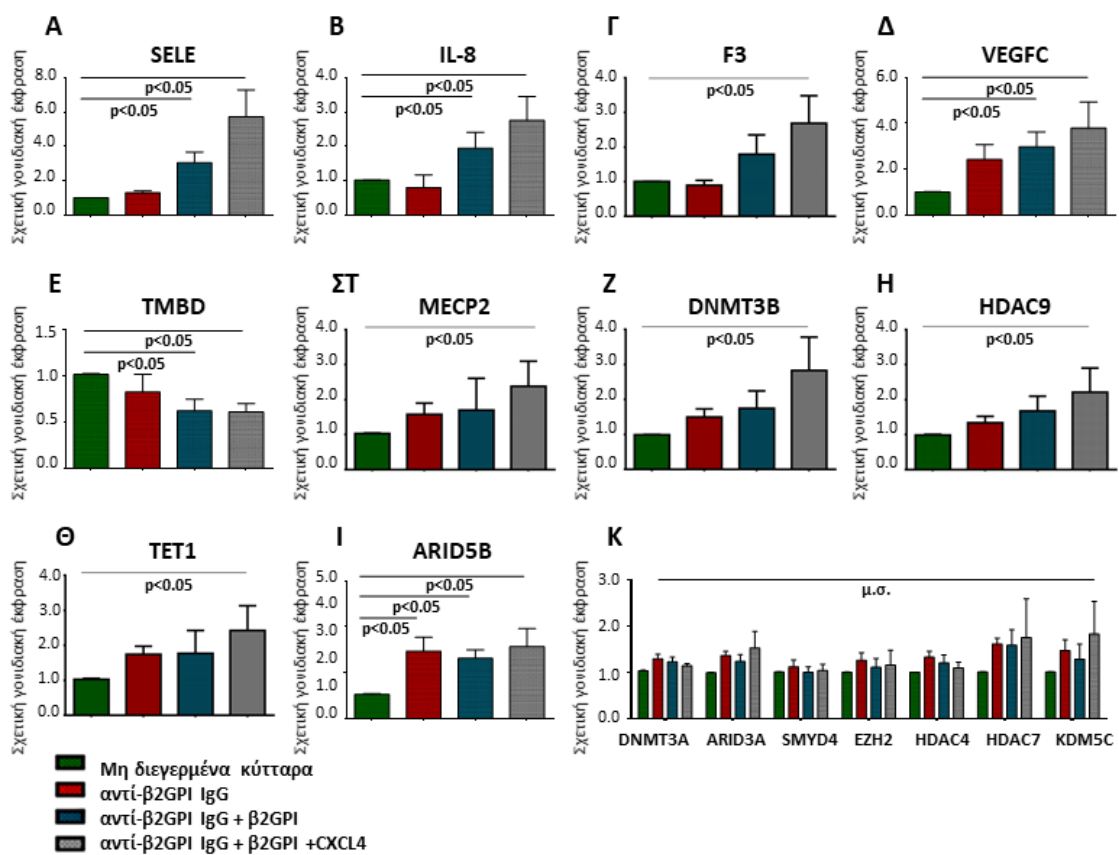
3.4. Η διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων από υγιείς δότες με το μείγμα αντί-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 επάγει έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο και ρυθμίζει τη μεταγραφή πολλαπλών παραγόντων

Έπειτα αποφασίσαμε να διερευνήσουμε την συμμετοχή επιγενετικών ρυθμιστικών μηχανισμών σε ένα μοντέλο που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση ενδοθηλιακών κυττάρων με αντί-β2GPI IgG- β2GPI-CXCL4. για αυτό το λόγο HUVECs απομονωμένα από υγιείς δότες ενεργοποιήθηκαν in vitro. Όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπέστησαν διέγερση με αντί-β2GPI, αντί-β2GPI-β2GPI σύμπλεγμα η το μίγμα αντί-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 απέκτησαν έναν ενεργοποιημένο και προθρομβωτικό φαινότυπο. Το μείγμα αντί-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 επήγαγε την έκφραση του γονιδίου SELE, που είναι ένας παράγοντας προσκόλλησης των ουδετερόφιλων , της IL-8, του F3 και του VEGFc, που είναι ένας αυξητικός παράγοντας ενδοθηλιακών κυττάρων και ρυθμιστικό ρόλο στο φλεγμονώδες περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα μείωσε την έκφραση του γονιδίου TMBD ο οποίος είναι ένας συμπαράγοντας της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C με καθοριστικό ρόλο στο μονοπάτι της αντί-πήξης. Το τριπλό μείγμα οδήγησε σε εντονότερη επαγωγή (Εικόνα 6A ως 6E).

Η in vitro ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων με συνδυασμούς αντί-β2GPI IgG - β2GPI - CXCL4 οδήγησε σε διαφορεική έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν επιγενετικούς

παράγοντες. Συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία δεν υπέστησαν κανένος είδους διέγερση στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε την σχετική έκφραση των MECP2 (2φορες), DNMT3B (2 φορές), TET1 (2.5 φορές) HDAC9 (3 φορές) και ARID5B (3 φορές) (Εικόνα 6ΣΤ ως 6Ι). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην σχετική έκφραση των παρακάτω γονιδίων: DNMT3A, ARID3A, SMYD4, EZH2, HDAC4, HDAC7 και KDM5C (Εικόνα 6Κ).

Εικόνα 6

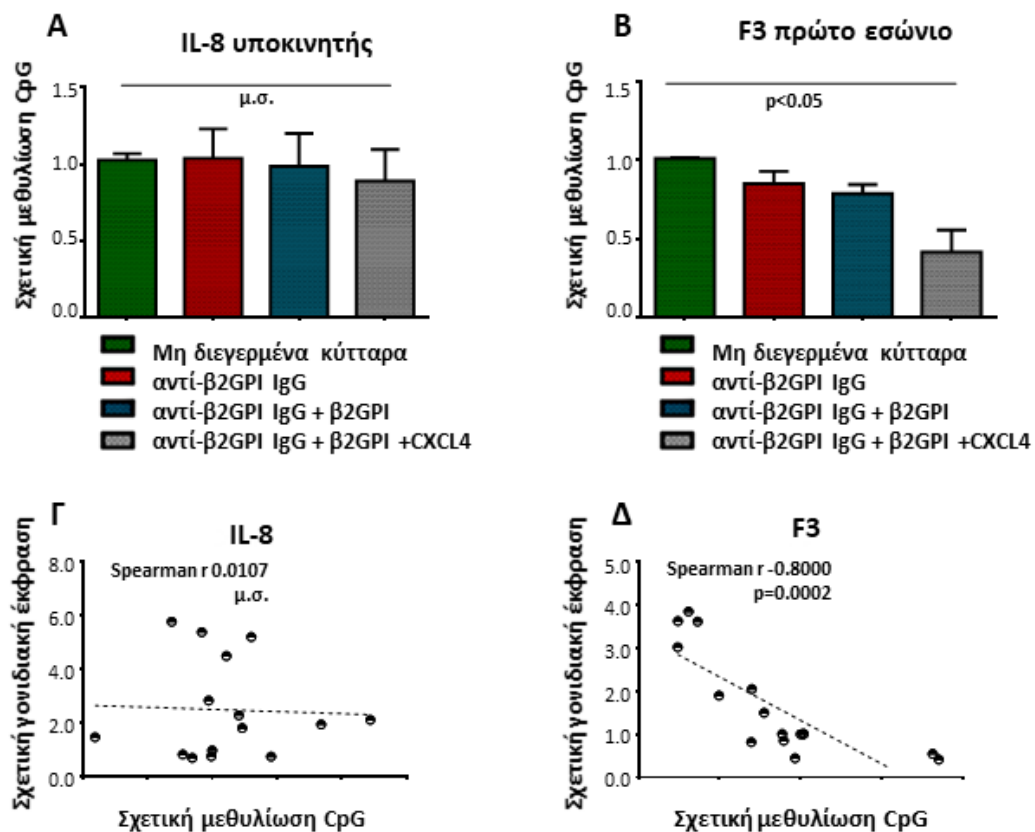


Εικόνα 6. Η διέγερση υγιών HUVECs με αντι-β2GPI, αντι-β2GPI-β2GPI σύμπλοκο και ένα μείγμα αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 επάγει έναν ενεργοποιημένο και προπηκτικό φαινότυπο (A-E) καθώς και αυξημένη έκφραση των MECP2 (ΣΤ) γονίδια DNMT3B (Ζ), TET1 (Η), HDAC9 (Θ) και ARID5B (Ι) σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα. Όλες οι διαφορές έναντι μη διεγερμένων ήταν στατιστικά σημαντικές, $p < 0,05$. Κ) Δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά για τα γονίδια DNMT3A, ARID3A, SMYD4, EZH2, HDAC 4, HDAC7 και KDM5C.

3.5. Η διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων με το μείγμα αντί-β2GPI IgG - β2GPI - CXCL4 επάγει αλλαγές στη σχετική μεθυλίωση του πρώτου εσωνίου του F3.

DNA από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία υπέστησαν διέγερση με ένα in vitro μοντέλο του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου εξετάστηκε με MSPCR για να προσδιοριστεί η μεθυλίωση του υποκινητή της IL-8 και του πρώτου εσωνίου του F3. Δεν παρατηρήσαμε καμία αλλαγή υπό καμία επίδραση στα επίπεδα της σχετικής μεθυλίωσης του υποκινητή της IL-8 ούτε καμία συσχέτιση με την γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 7A και 7Γ). Η διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων με το μείγμα αντί-β2GPI IgG, β2GPI και CXCL4 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της σχετικής μεθυλίωσης των υπό εξέταση CpG στο πρώτο εσώνιο του F3 (Εικόνα 7B). Παρατηρήσαμε μία στατιστικά σημαντικά ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της σχετικής μεθυλίωσης και της σχετικής έκφρασης του γονιδίου F3 (Spearman $r = -0.8000$, $p = 0.0002$, Εικόνα 7Δ).

Εικόνα 7



Εικόνα 7. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεθυλίωσης IL-8 (A) και F3 (B) σε ΥΔ HUVECS που έχουν υποστεί επώαση με αντι-β2GPI IgG, β2GPI και CXCL4. Γ) Η σχετική μεθυλίωση του

υποκινητή της IL-8 δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης σχετικού γονιδίου (Spearman $r = 0.01071$, $\rho = 0.9698$). Δ) Η σχετική μεθυλίωση του υποκινητή του F3 έχει ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση με τη σχετική έκφραση γονιδίου F3 σε HUVECs (Spearman $r = -0.8000$, $\rho = 0.0002$).

4. Συζήτηση

η παρούσα Μελέτη αναδεικνύει για πρώτη φορά ότι τα επίπεδα της σχετικής μεθυλίωσης στον υποκινητή της IL-8 είναι μειωμένα σε DNA απομονωμένο από ολικό αίμα από ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων σε σχέση υγιείς δότες. Αυτή η μείωση είναι πιο έντονη σε ασθενείς με αρτηριακή θρόμβωση και σε αυτούς που η δειγματοληψία έγινε κοντύτερα χρονικά στο κλινικό συμβάν αλλά και σε αυτούς που έχουν υποστεί παραπάνω από τρία κλινικά συμβάντα. Επιπλέον η σχετική μεθυλίωση της IL-8 συσχετίζεται αρνητικά με τις τιμές APTT το οποίο είναι ενδεικτικό το αντιπηκτικό του λύκου και ένας ισχυρός παράγοντας κινδύνου για υποτροπιάζοντα θρομβοεμβολικά επεισόδια και αυξημένη θνητότητα [198, 199]. σχετικά με το πρώτο εσώνιο του F3 τα CpG που εξετάστηκαν επέδειξαν διαφορετική μεθυλίωση ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς. Τα υπό εξέταση CpG αναδείχθηκαν να έχουν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης γεγονός που συσχετίστηκε με χαμηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί ενδεχομένως την κατανάλωση το αντισωμάτων [200]. Δεδομένου ότι η έκφραση του F3 έχει επανειλημμένως αναφερθεί να είναι υψηλότερη στο σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων [201, 202], τα ευρήματά μας συμφωνούν με τη γενική άποψη ότι η μεθυλίωση CpG στο 1 εσώνιο συσχετίζεται θετικά και μεσολαβεί τη γονιδιακή έκφραση [203-205].

Τα πειράματα με βάση την κυτταρικές καλλιέργειες έρχονται σε συμφωνία με τα κλινικά δεδομένα. Εστίασαμε σε δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων, καθοριστικής σημασίας για την κλινική εικόνα του συνδρόμου. Σε ένα *in vitro* μοντέλο του ΣΑΦ, ύστερα από διέγερση με συνδυασμό των αντι-β2GPI, β2GPI και CXCL4, τόσο τα μονοκύτταρα όσο και τα HUVECs αποκτούν έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο και εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα IL-8 και F3 mRNA και πρωτεΐνης αντίστοιχα. Η μεταγραφική ενεργοποίηση των δύο γονιδίων συνοδεύτηκε από αλλαγές στην κατάσταση της μεθυλίωσης του DNA. Η διέγερση μονοκυττάρων είχε ως αποτέλεσμα μια αρχική αύξηση της μεθυλίωσης τόσο στον υποκινητή της IL-8 όσο και στο πρώτο εσώνιο του F3, ακολουθούμενη από μια μείωση σε

σχεδόν βασικά ή κάπως χαμηλότερα επίπεδα. Η αρχική αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή της IL-8 είναι αινιγματική, καθώς γενικά παρατηρούμε μειωμένη μεθυλίωση όταν το γονίδιο ενεργοποιείται μεταγραφικά. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η αύξηση που παρατηρούμε αντιπροσωπεύει μάλλον τα επίπεδα υδροξυμεθυλίωσης της κυτοσίνης, στα συγκεκριμένα CpGs. Οι θέσεις δε προστατεύονται επίσης από τη διθειώδη μετατροπή και κατά συνέπεια δεν διακρίνονται από τις μεθυλιωμένες θέσεις με αυτή την προσέγγιση. Οι δυναμικές αλλαγές στην υδροξυμεθυλίωση της κυτοσίνης έχουν προταθεί ως ένα ενδιάμεσο στάδιο στην απομάκρυνση του στίγματος της μεθυλίωσης σε θηλαστικά [206, 207]. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα δυναμικά αυξημένα επίπεδα υδροξυμεθυλίωσης σε υποκινητές και ενισχυτές συσχετίζονται με τη πρόσδεση παραγόντων μεταγραφής κατά την διαφοροποίηση σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές σε ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα [208]. Μία παρόμοια αύξηση θα μπορούσε να συμβαίνει στο σύστημα του μοντέλου μας κατά την διέγερση, συσχετίζοντας την επιστράτευση μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή του υποκινητή της IL-8 για τη μεσολάβηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης. Ένας πιθανός ρόλος αυτού του επιγενετικού στίγματος ως απόκριση στη διέγερση υποστηρίζεται επίσης από τα αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του TET1, του ενζύμου που καταλύει την υδροξυμεθυλίωση, την οποία παρατηρούμε κατά τη διέγερση.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η διέγερση των HUVEC με αθρωματικά και προθρομβωτικά ερεθίσματα οδηγεί σε ενδοθηλιακή απορρύθμιση με τρόπο που εξαρτάται από τη μεθυλίωση του DNA και τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών [183, 184]. Θέλαμε να εξετάσουμε αυτή την αλληλεπίδραση στο πλαίσιο του ΣΑΦ. Για το σκοπό αυτό, στο *in vitro* μοντέλο μας, που περιλαμβάνει τη ενεργοποίηση των HUVECs από το σύμπλεγμα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4, αξιολογήσαμε τη σχετική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στους κύριους επιγενετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Παρατηρήσαμε ότι αρκετά γονίδια όπως τα DNMT3B, MECP2, TET1, HDAC9 και ARID5B εμφάνισαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των διεγερμένων και των μη διεγερμένων κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι όσο ισχυρότερο είναι το ερέθισμα και η κατάσταση ενεργοποίησης των κυττάρων, όπως σημειώνεται από δείκτες ενεργοποίησης όπως E-σελεκτίνη, τόσο πιο έντονη είναι η απορρύθμιση όσον αφορά επίπεδα των επιγενετικών ρυθμιστικών γονιδίων.

Η DNMT3B είναι ένα από τα ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση της κυτοσίνης. Πρόκειται για μία de novo DNA μεθυλοτρανσφεράση, κρίσιμη για την καθιέρωση μοτίβων μεθυλίωσης στο γονιδίωμα. Η πρωτεΐνη δέσμευσης κυτοσίνης 2 (MECP2) δεσμεύεται επιλεκτικά σε μεθυλιωμένα CpG και εμπλέκεται στη ρύθμιση τόσο της καταστολής όσο και της ενεργοποίησης των ευαίσθητων στη μεθυλίωση γονιδίων. Η TET1 είναι διοξυγενάση της μέθυλ-κυτοσίνης, η οποία μετατρέπει την μέθυλ-κυτοσίνη σε υδροξυμεθυλ-κυτοσίνη. Η δράση της είναι ανεξάρτητη από την αντιγραφή του DNA, ενώ μελέτες την εμπλέκουν σε αυτοάνοσες καταστάσεις [209, 210]. Η έκφραση των ανωτέρω γονιδίων αυξάνεται σε HUVECs ύστερα από διέγερση. Με άλλα λόγια, εκτός από το ίδιο το στίγμα της μεθυλίωσης, ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη ή την απομάκρυνσή του από την κυτοσίνη και τις πρωτεΐνες που την αναγνωρίζουν, μεταβάλλονται σημαντικά κατά την διέγερση, επισημαίνοντας ένα σημαντικό ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην ενορχήστρωση αυτής της αντίδρασης.

Τέλος, δεδομένου ότι η μεθυλίωση του DNA βρίσκεται σε διασταυρούμενη αλληλεπίδραση με τις τροποποιήσεις των ιστονών, επιδιώξαμε να αναγνωρίσουμε ως πρόσθετους επιγενετικούς τροποποιητές ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες και τα οποία θα μπορούσαν να εμπλακούν στην απόκριση του διεγερτικού ερεθίσματος από το σύμπλεγμα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4. Βρίσκουμε τα επίπεδα των HDAC9 και ARID5B αυξημένα κατά τη διέγερση. Η HDAC9 λειτουργεί γενικά ως μεταγραφικός καταστολέας. Έχει αναφερθεί ότι έχει θετική επίδραση στη σηματοδότηση TLR και στην έμφυτη ανοσίας κάνοντας τα μακροφάγα πιο ευαίσθητα στο LPS, καθώς και στην αθηροσκλήρυνση και το μεταβολικό σύνδρομο [211, 212]. Από την άλλη πλευρά, το ARID5B παίζει ένα ρόλο στην απομεθυλίωση της ιστόνης και μπορεί να λειτουργήσει ως μεταγραφικός ενεργοποιητής με απομάκρυνση του κατασταλτικού διμεθυλίου της ιστόνης H3 στη λυσίνη 9. Πρόσφατα, το ARID5B αποδείχθηκε ότι είναι μεταγραφικά ενεργοποιημένο στα μονοκύτταρα απομονωμένα από ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και απαραίτητο για την πλήρη φλεγμονώδη απόκριση σε μακροφάγα διεγερμένα με LPS [213]. Η σίγαση του ARID5B οδήγησε σε Υποέκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF-α) και της IL-1α και την ενεργοποίηση του τύπου I ιντερφερονών.

Στο μοντέλο μας που μιμείται το ΣΑΦ, η μεταγραφική ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων υποδηλώνει μια κρίσιμη επιγενετική συνιστώσα ως απόκριση της διέγερσης που θα

ενορχηστρώσει την έκφραση των γονιδίων. Για τον λόγο αυτό, θέλαμε να αξιολογήσουμε εάν αυτή η απορύθμιση οδηγεί σε επιγενετικές αλλαγές στις περιοχές που αξιολογήσαμε σε DNA που απομονώθηκε από περιφερικό αίμα από τους ασθενείς με ΣΑΦ. Στο μοντέλο μας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που διεγέρθηκαν σε συνθήκες που προσομοιάζουν το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είχαν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης στο πρώτο εσώνιο του F3 συγκριτικά με τους μάρτυρες και η σχετική μεθυλίωση συσχετίζεται έντονα με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Αυτό το εύρημα δείχνει ότι μετά την διέγερση το μεθύλιο απομακρύνεται από αυτά τα CpG, μία διαδικασία που πιθανώς διευκολύνει τη σύνδεση των παραγόντων μεταγραφής στην περιοχή και επάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου F3 στα HUVECs. Η παρατηρούμενη διαφορά στο πρότυπο μεθυλίωσης μεταξύ DNA ολικού αίματος και διεγερμένων HUVECs θα μπορούσε πιθανώς να αποδοθεί στο γεγονός ότι πρόκειται περί διαφορετικών τύπων κυττάρων με διαφορετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

5. Συμπεράσματα

Τα δεδομένα μας σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ένα μοντέλο για το ΣΑΦ στο οποίο τα σύμπλοκα αντισώματος αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 ενεργοποιούν μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα και τα οδηγούν σε ένα προφλεγμονώδη και προπηκτικό φαινότυπο, όπως σημειώνεται από την υπερέκφραση των IL-8, F3, SELE και VEGFC ως καθώς και μείωσης της έκφρασης της TMBD. Αυτή η ενεργοποιημένη κατάσταση χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση των MECP2, DNMT3B, TET1, HDAC9 και ARID5B που μπορεί να επηρεάσουν τις επιγενετικές αλλαγές που παρατηρούνται στον υποκινητή της IL-8 και το πρώτο εσώνιο του F3 σε ασθενείς με ΣΑΦ.

Από κλινική άποψη, η μεθυλίωση του υποκινητή της IL-8 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένας παράγοντας διάκρισης για την κλινική εικόνα και τα διαφορετικά επίπεδα IL-8 και F3 μεθυλίωσης θα μπορούσαν ενδεχομένως να υποδηλώνουν μια υποκείμενη ενεργό προθρομβωτική και φλεγμονώδη διαδικασία. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να αξιολογήσουν την πιθανή χρησιμότητα της μεθυλίωσης του υποκινητή της IL-8 και του πρώτου εσωνίου του F3 ως βιοδείκτες ή θεραπευτικούς στόχους στο πλαίσιο του ΣΑΦ.

Χρηματοδότηση: Το έργο αυτό υποστηρίχθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών Ελλάδος (αριθμός υποτροφίας: 3285, 23/3/2016).

Κεφαλαίο 4: Η θρομβοσπονδίνη 1 είναι αυξημένη στο σύνδρομο αντιφωσfolιπιδίων. Επιπτώσεις στην παθογένεια του συνδρόμου.

1. Εισαγωγή

Το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο είναι αυτοάνοση θρομβοφιλία που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσες θρομβώσεις και/ή από νοσηρότητα εγκυμοσύνης παρουσία αντι-β2Glycoprotein I (αντι-β2GPI) και αντισωμάτων αντιθρομβίνης ή αντιπηκτικού λύκου (LA) [1, 214]. Η ενδοθηλιακή απορρύθμιση συμβατή με την ενεργοποίηση της έμφυτη ανοσίας έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί χαρακτηριστικό του συνδρόμου [215-218]. Τα πειραματικά μοντέλα υποδεικνύουν ότι η αναστολή της αγγειογένεσης καθώς και η ενδοθηλιακή απόπτωση παίζουν σημαντικό ρόλο στην απώλεια εμβρύου στο ΣΑΦ [219-222]. Οι ασθενείς με ΣΑΦ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων προφλεγμονωδών κυτταροκινών [223, 224]. Η ενεργοποίηση των TLR 2, 4 και 6 οδηγεί σε ενεργοποίηση μονοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων και στην επακόλουθη έκφραση του ιστικού παράγοντα (TF) και προφλεγμονωδών κυτταροκινών [225-230]. Έχουμε δείξει προηγουμένως ότι οι χημειοκίνες που προέρχονται από αιμοπετάλια είναι αυξημένες στο πλάσμα των ασθενών με ΣΑΦ [231]. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από σύμπλοκα αντι-β2GPI αυτοαντισωμάτων και β2GPI, ειδικά όταν αυτή διμερίζεται μέσω σύνδεσης με χημειοκίνη CXCL4, [232-234].

Η θρομβοσπονδίνη 1 (TSP-1) - μια εξωκυττάρια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους, απελευθερώνεται μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [235, 236] και εκφράζει αντι-αγγειογενετικές και θρομβογόνες ιδιότητες με δέσμευση στον υποδοχέα της CD36 [136, 237, 238]. Η TSP-1, όπως και άλλοι συνδέτες του CD36, επάγει στείρα φλεγμονή στα μονοκύτταρα μέσω της επιστράτευσης των TLR 2, 4 και 6, οδηγώντας στη συνέχεια σε ενεργοποίησης του NF-κB και έκφραση ιστικού παράγοντα [239-241]. Μπορεί επίσης να προκαλέσει απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μειώνει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) και αναστέλλει άμεσα τη σηματοδότηση του VEGF, παρουσιάζοντας έτσι ισχυρές αντιαγγειογενετικές ιδιότητες [242-247].

Η θρομβοσπονδίνη 1 (TSP-1) - μια γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής θεμέλιας ουσίας εκφράζεται από πολλούς τύπους κυττάρων. Απελευθερώνεται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [236], έχοντας αντι-αγγειογενετικές και θρομβογόνες ιδιότητες μετά τη

σύνδεση με τον υποδοχέα της CD36 [237, 238]. Πράγματι, οι TSP-1 και TSP-2 συνδέονται μέσω των εξαιρετικά ομόλογων περιοχών επανάληψης τύπου 1 θρομβοσπονδίνης (TSR) στο CD36. Οι δεύτεροι και τρίτοι τομείς TSR του TSP-1 συνδέονται και ενεργοποιούν άμεσα τον αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β1 (TGF-β1) [248-252], τις πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης και ινωδονεκτίνη, ενώ προάγουν την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας CD36 [253, 254].

Το CD36 δεσμεύει πολλούς συνδέτες όπως το κολλαγόνο [255, 256], τα ερυθροκύτταρα που μολύνονται με το *Plasmodium falciparum*, την οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας [257, 258], φυσικές λιποπρωτεΐνες [259], οξειδωμένα φωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα μακράς αλύσου [260, 261]. Μια περιοχή εντός του CD36 που ονομάζεται CLESH (CD36, LIMP-2, Emp sequence homology) περιοχή είναι επαρκής για τη δέσμευση των TSR [262]. Η αντιαγγειογενετική δραστηριότητα μειώθηκε σημαντικά με μεταλλάξεις εξουδετέρωσης φορτίου της αλληλουχίας Arg-Trp στις TSR2. Επιπλέον, οι I438 και K464 του TSR2 αποδείχθηκε ότι απαιτούνται για σύνδεση του CD36 CLESH με τις TSR2. Απαιτείται επίσης ένα συμπληρωματικό όξινο σύμπλεγμα εντός του CD36 CLESH για τη αντιαγγειογενετική δράση της [263].

Η TSP-1 έχει εμπλακεί στην Th-17 απόκριση στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) και στα μοντέλα ξηροφθαλμίας [264, 265]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της TSP-1 επάγεται από τον CXCL4 σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ακρίβεια ως βιοδείκτης στο σύνδρομο Sjogren [266, 267].

Με βάση τα παραπάνω, επιδιώξαμε να διερευνήσουμε την πιθανή συμμετοχή της TSP-1 στην παθολογία του ΣΑΦ.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ασθενείς και δείγματα

Ασθενείς με ΣΑΦ (n = 100), συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), (n = 27), αρνητικοί για αντιπηκτικό λύκο (LA) και οποιαδήποτε σχετιζόμενη με ΣΑΦ κλινική εκδήλωση, ασθενείς με στεφανιαία νόσο (ΣΝ) (n=14) και υγιείς δότες (n = 50) περιληφθήκαν στη

μελέτη. Οι ασθενείς με ΣΑΦ ταξινομήθηκαν ως πρωτοπαθές ΣΑΦ (n = 33) ή δευτεροπαθές ΣΑΦ (n = 67). Οι ασθενείς με ΣΕΛ με ή χωρίς ΣΑΦ αξιολογήθηκαν για την ενεργότητα της νόσου με τη δοκιμασία SLEDAI-2K test [268]. Επιπλέον, οι ασθενείς με ΣΑΦ υποδιαιρέθηκαν σε ασθενείς με μόνο φλεβική, μόνο αρτηριακή ή μόνο νοσηρότητα κατά την εγκυμοσύνη, ενώ μια υποομάδα ασθενών με ΣΑΦ παρουσίασε τόσο αρτηριακά όσο και φλεβικά θρομβωτικά συμβάντα. Η νοσηρότητα της εγκυμοσύνης σημαίνει καθαρή νοσηρότητα της εγκυμοσύνης και μόνο. Ο χρόνος που πέρασε από τις επιπλοκές της εγκυμοσύνης στη συλλογή δείγματος αίματος για την παρούσα μελέτη ήταν $11,4 \pm 7,6$ έτη. Όταν η νοσηρότητα της εγκυμοσύνης συνοδευόταν επίσης από θρομβωτικά συμβάντα (8 ασθενείς), οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε αυτούς με είτε αρτηριακά, φλεβικά ή αμφότερα αρτηριακά και φλεβικά θρομβωτικά συμβάντα. Όλοι οι ασθενείς μας μετά το πρώτο θρομβωτικό επεισόδιο υποβλήθηκαν σε αντιπηκτική θεραπεία με στόχο INR μεταξύ 2,9 και 3,4 και εκείνοι με υποτροπιάζοντα αρτηριακά ή φλεβικά επεισόδια επίσης λάμβαναν ασπιρίνη 100 mg ημερησίως. Τέλος, 58 ασθενείς έλαβαν αντιπηκτικά συν ασπιρίνη, 21 ασθενείς έλαβαν μόνο αντιπηκτικά και 21 ασθενείς μόνο σε ασπιρίνη. Οι ασθενείς με ΣΕΛ όπως απεικονίζεται από τη χαμηλή βαθμολογία SLEDAI2-K ήταν υπό ύφεση και έλαβαν θεραπεία συντήρησης ως εξής: 14 έλαβαν υδροξυχλωροκίνη, 8 αζαθειοπρίνη και 5 μυκοφαινολάτη μοφετίλ. Ασθενείς με ΣΑΦ δευτερογενές σε ΣΕΛ ελάμβαναν αντίστοιχα υδροξυχλωροκίνη (n=24), αζαθειοπρίνη (n=21), μυκοφαινολάτη μοφετίλη (n=16), κυκλοφωσφαμίδη (n=4) και / ή μεθυλπρεδνιζολόνη (n=28). Το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Εθνικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πλάσμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια με CTAD (κιτρικό, θεοφυλλίνη, αδενοσίνη και διπυριδαμόλη) και ορός απομονώθηκε από όλους τους συμμετέχοντες και διατηρήθηκαν στους -80°C . Κλινικά συμβάντα συμβατά με ΣΑΦ εξήχθησαν από ιατρικά αρχεία των ασθενών.

Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας (HUVECs) απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4. Τα μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) απομονώθηκαν από 3 ΥΔ μέσω βαθμίδωσης πυκνότητας με Ficoll-Paque 1,077 gr/ml. Τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από τον πληθυσμό PBMC 3 ΥΔs μέσω αρνητικής επιλογής με το κιτ Mojo Sort (Biolegend 480009). Αιμοπετάλια και μονοκύτταρα απομονώθηκαν από 4 ΥΔs όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.2 Απομόνωση αντι-β2GPI IgG

Τα αντι-β2GPI IgG απομονώθηκαν όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4.

2.3 Ενεργοποίηση μονοκυττάρων

Τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 3 ΥΔς μέσω βαθμίδωσης πυκνότητας σε Ficoll-Paque 1.077 gr/ml. Πεντακόσια μl κυτταρικού εναιωρήματος ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία 48 φρεατίων σε RPMI με 10% FBS (εμβρυικός βόειος ορός) σε τελική συγκέντρωση 4×10^6 κυττάρων/ml και αφέθηκαν να προσκολληθούν όλη τη νύκτα. Την επόμενη ημέρα απομακρύνθηκαν τα μη προσκολλημένα κύτταρα και προστέθηκε νέο μέσο στα φρεάτια. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με 100 ng/ml LPS ως θετικό μάρτυρα, με RPMI μόνο ως αρνητικό έλεγχο ή με κάθε συνδυασμό IgG (50 μg/ml), β2GPI (20 μg/ml) και CXCL4 (40 ng/ml). Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

2.4 Διαφοροποίηση των CD4 + T κυττάρων σε Th17 υποσύνολο

CD4+T κύτταρα απομονώθηκαν μέσω αρνητικής επιλογής με μαγνητικά σφαιρίδια χρησιμοποιώντας το κιτ Mojo sort (Biologend). Τα T-κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε υπερκείμενα από τα πειράματα μονοκυττάρων παρουσία διεγερτικών 0,5 μg/ml αντί-CD28 και 0,5 μg/ml αντί-CD3 αντισωμάτων (Biolegend 302913 και 317325 αντίστοιχα). Τα T-κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες και τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

2.5 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων in vitro

Για τα in vitro πειράματα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, πλακίδια παρασκευάστηκαν ως εξής. Η πρωτεΐνη A (200 μg/ml) επικαλύφθηκε σε πλακίδια πολυστυρενίου υψηλής πρόσδεσης (Costar) εντός ρυθμιστικού διαλύματος διτανθρακικού νατρίου pH 9,6 καθ'όλη τη νύκτα στους 4°C. Την επόμενη ημέρα το πλακίδιο πλύθηκε τρεις φορές με PBS Tween 20 (0,05%) και η μη ειδική δέσμευση εμποδίστηκε με 1 % BSA (Sigma A8806) σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η επώαση με αντι-β2GPI IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και/ή ολική IgG από ΥΔς σε τελική συγκέντρωση 150 μg/ml και επώαστηκε για 1 ώρα σε RT. Συνεπώς, προστέθηκαν στα φρεάτια PBS που περιείχε 1% BSA και 100 μg/ml β2GPI (Fitzgerald 30-AB23) μόνο ή σε συνδυασμό με 40 ng/ml ανασυνδυασμένου CXCL4 (RD

Συστήματα 795-P4 / CF) . Η πλάκα στη συνέχεια πλύθηκε 3 φορές με PBST και 3 φορές με PBS.

Συλλέχθηκε πλήρες αίμα από 3 ΥΔ σε σωλήνες με αντίπηκτικό με όξινης κιτρικής δεξτρόζης (ACD) και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στους 180 G σε θερμοκρασία δωματίου για να ληφθεί πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Κατά συνέπεια, το PRP φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στα 700 G και το φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα απορρίφθηκε. Το ίζημα πλύθηκε μία φορά με ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς ασβέστιο με EDTA και επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό Herpes Tyrode (HT) χωρίς ασβέστιο σε τελική συγκέντρωση 250.000 κυττάρων / μL.

Εκατόν εξήντα μl παρασκευάσματος αιμοπεταλίων και 40 μl HT που περιέχει 20 mM CaCl₂ προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο φθάνοντας σε τελική συγκέντρωση CaCl₂ 4 mM. Το πλακίδιο ανακινήθηκε για 30 δευτερόλεπτα και επώαστηκε για 2,5 λεπτά στους 37°C. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τερματίστηκε με την προσθήκη 50 μl ACD. Τα υπόλειμμα φυγοκεντρήθηκαν στα 1200 G για 20 λεπτά και αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυση.

2.6 Διέγερση των HUVECs

Τα HUVECs διεγέρθηκαν σε 2 ξεχωριστές συνθήκες: α) με ανθρώπινο πλάσμα, χρησιμοποιώντας πλάσμα από ασθενείς με ΣΑΦ και ΥΔ ως μάρτυρα και β) και με αντι-β2GPI, είτε με ή χωρίς β2GPI και με ή χωρίς CXCL4 χημειοκίνη.

Δύο ξεχωριστά πρωτόκολλα που προσομοιάζουν το σύνδρομο ΣΑΦ χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση των HUVECs. Το πρώτο πρωτόκολλο αφορούσε τη διέγερση των HUVECs με ανθρώπινο πλάσμα. Τα HUVECs που απομονώθηκαν από 2 ΥΔ καλλιεργήθηκαν μέχρι την επικάλυψη του 70% της συνολικής επιφάνειας των καλλιεργητικών τρυβλίων. Ακολούθως τα τοποθετήθηκαν σε πλακίδια 24 φρεατίων και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες μέσο EBM-2 που περιείχε FGF-b, VEGF, IGF-1, EGF και 2,5% FBS. Τα κύτταρα επώαστηκαν ακολούθως σε μέσο πείνας που περιέχει EBM-2 και 1% FBS για 24 ώρες. Το EBM-2 που περιείχε 20% επαναπροσδιορισμένο πλάσμα είτε από ασθενείς με ΣΑΦ είτε ΥΔ προστέθηκε στα φρεάτια για 20 ώρες. Μετά από αυτή την περίοδο τα υπερκείμενα απομακρύνθηκαν, τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με PBS για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε υπολειμματικό πλάσμα και

φρέσκο μέσο χωρίς προσθήκη FBS τοποθετήθηκε στα φρεάτια για 2 ώρες. Τέλος, τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύθηκαν μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

Προκειμένου να απομακρυνθούν οι παράγοντες θρόμβωσης για τις *in vitro* επεξεργασίες σε HUVECs, το πλάσμα που προέρχεται από ασθενείς με ΣΑΦ και ΥΔς επανασβεστοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 25 mM CaCl₂ και επώαστηκε με θρομβίνη στους 37°C για 30 λεπτά. Τα παρασκευάσματα πλάσματος στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 4000 RCF και πέρασαν μέσω φίλτρων 0,2 μm.

Το δεύτερο πρωτόκολλο αφορούσε την διέγερση των HUVECs με IgG που απομονώθηκε από ασθενείς με ΣΑΦ και ΥΔς. Εν συντομία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και ο ορός λιμοκτονούσε όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια προστέθηκαν στα πηγαδάκια κάθε συνδυασμός αντι-β2GPI IgG (50 μg/ml), β2GPI (20 μg/ml) και CXCL4 (40 ng/ml) για 24 ώρες. Τέλος, τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύθηκαν μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

2.7 Αξιολόγηση των TSP-1, ελεύθερου ενεργού TGF-β1, IL-1β και IL-17A σε υπερκείμενα πλάσματος και κυτταροκαλλιέργειας.

Τα επίπεδα στο πλάσμα και στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών των TSP-1, ελεύθερου δραστικού TGF-β1, IL-1β και IL-17A προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα κιτ ανάπτυξης ELISA. Το κιτ για τη μέτρηση του TSP-1 (DY3075) αγοράστηκε από την R & D Systems (Abingdon, UK) και κιτ για τη μέτρηση των ελεύθερων ενεργών TGF-β1, IL-1β και IL-17A από Biolegend (London, UK).

2.8 Απομόνωση RNA και PCR πραγματικού χρόνου και Στατιστική ανάλυση

Η απομόνωση του RNA και ποσοτική PCR και η στατιστική ανάλυση έγινε όπως περιγράφεται στο κεφαλαίο 4.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

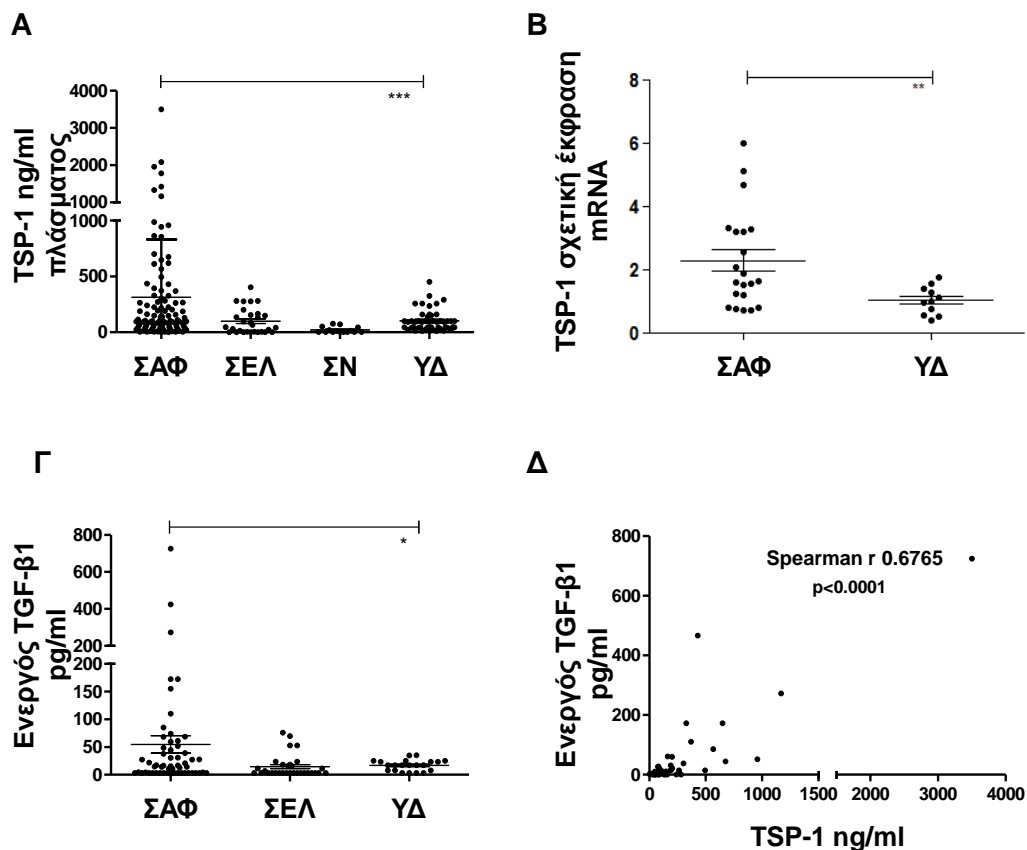
3.1 Αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών πλάσματος και επίπεδα mRNA αιμοπεταλίων της TSP-1 και του ελεύθερου ενεργού TGF-β1 σε ασθενείς με ΣΑΦ

Τα επίπεδα πλάσματος της TSP-1 ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΣΑΦ συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου (Εικόνα 1Α). Τα επίπεδα του mRNA της TSP-1 ήταν επίσης

σημαντικά (2,3 φορές) υψηλότερα στα αιμοπετάλια που απομονώθηκαν από ασθενείς με ΣΑΦ σε σύγκριση με την υγιή ομάδα ελέγχου (Εικόνα 1B).

Δεδομένου του γεγονότος ότι η TSP-1 είναι ένας κύριος ενεργοποιητής του TGF-β1 στη κυκλοφορία, αξιολογήσαμε τα ελεύθερα ενεργά επίπεδα του TGF-β1 και τα βρήκαμε σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΣΑΦ σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου ΥΔ και νοσημάτων (Εικόνα 1Γ). Επιπλέον, τα επίπεδα πλάσματος της TSP-1 συσχετίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με ελεύθερο ενεργό TGF-β1 σε ασθενείς με ΣΑΦ σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (Spearman $r = 0.6765$, $p < 0.0001$, (Εικόνα 1Δ).

Εικόνα 1



Εικόνα 1: (A) Τα επίπεδα πλάσματος της TSP-1 ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΣΑΦ συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. (B) Τα επίπεδα mRNA της TSP-1 ήταν σημαντικά υψηλότερα στα αιμοπετάλια που απομονώθηκαν από τους ασθενείς με ΣΑΦ σε σύγκριση με την υγιή ομάδα ελέγχου. Η γονιδιακή έκφραση κανονικοποιείται ως προς το γονίδιο της

G ακτίνης (GAPDH) και σε σχέση με ένα ΥΔ. (Γ) Τα επίπεδα του TGF-β1 στο πλάσμα είναι υψηλότερα μεταξύ των ασθενών με ΣΑΦ σε σύγκριση με τους ΥΔ. (Δ) Τα επίπεδα TSP-1 του πλάσματος συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τον ελεύθερο ενεργό TGF-β1 σε ασθενείς με ΣΑΦ σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (Spearman $r = 0,6765$, $p < 0,0001$). Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέση τιμή \pm SE.

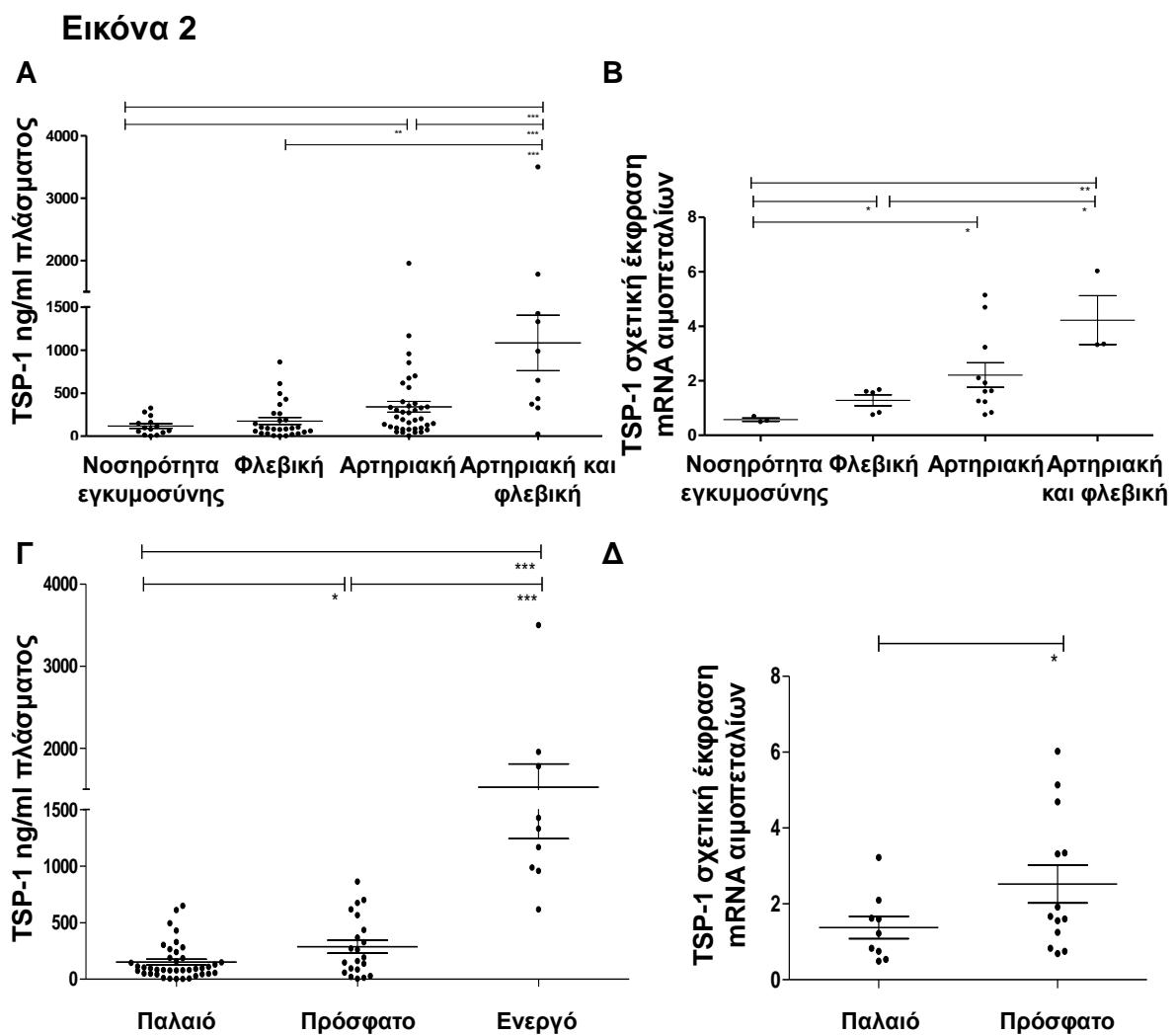
3.2 Σύνδεση μεταξύ επιπέδων πλάσματος TSP-1 και σχετικής έκφρασης mRNA της TSP-1 στα αιμοπετάλια με κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με ΣΑΦ

Οι ασθενείς με ιστορικό αρτηριακών και φλεβικών θρομβωτικών επεισοδίων είχαν τα υψηλότερα επίπεδα πλάσματος TSP-1 σε σύγκριση με ασθενείς με μόνο αρτηριακά θρομβωτικά επεισόδια και εκείνους με ιστορικό φλεβικής θρόμβωσης ή νοσηρότητας εγκυμοσύνης (Kruskall-Wallis ανάλυση των μέσων αποκάλυψε διαφορά στατιστικά σημαντική). Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε επίσης κατά τη σύγκριση των επιπέδων TSP-1 σε ασθενείς με αρτηριακά θρομβωτικά επεισόδια έναντι των ασθενών με νοσηρότητα εγκυμοσύνης ή μόνο με φλεβική θρόμβωση. Τα επίπεδα της TSP-1 δεν ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με φλεβική θρόμβωση μόνο έναντι εκείνων με νοσηρότητα εγκυμοσύνης (Εικόνα 2Α). Το ίδιο ισχύει και για τη σχετική έκφραση mRNA TSP-1 από τα αιμοπετάλια (Εικόνα 2Β).

Ορίσαμε τα κλινικά συμβάντα ως πρόσφατα (γεγονότα που συνέβησαν τα τελευταία πέντε χρόνια), μακρινά (γεγονότα που συνέβησαν πριν από 5 χρόνια) και ενεργά (κλινικά συμβάντα κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας). Οι ασθενείς που υπόκειντο σε ένα κλινικό συμβάν ($n = 9$) είχαν το υψηλότερο επίπεδο TSP-1 στο πλάσμα μεταξύ όλων των ασθενών με ΣΑΦ έναντι εκείνων που είχαν υποστεί τουλάχιστον ένα συμβάν τα τελευταία 5 χρόνια και εκείνους που είχαν βιώσει το τελευταίο τους επεισόδιο πριν από τα τελευταία 5 χρόνια, (Εικόνα 2Γ). Το ίδιο ισχύει για τη σχετική έκφραση mRNA του TSP-1 (Εικόνα 2Δ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα πλάσματος TSP-1 μεταξύ ασθενών με πρωτοπαθές ΣΑΦ και ασθενών με ΣΑΦ δευτεροπαθές σε έδαφος ΣΕΛ. Οι ασθενείς με ΣΑΦ δευτεροπαθές σε έδαφος ΣΕΛ είχαν σημαντικά υψηλότερη βαθμολογία SLEDAI-2 Κ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ΣΕΛ. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον χρόνο που πέρασε από το τελευταίο κλινικό συμβάν μεταξύ

ασθενών με ΣΑΦ και ασθενών με ΣΝ. Όλες τα μέσες τιμές \pm SD όλων των συγκρίσεων απεικονίζονται στον Πίνακα 1 και στον Πίνακα 2.

Εντός της ομάδας των ασθενών με ΣΑΦ, βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές της TSP-1 σε ασθενείς με παράταση του APTT έναντι των υπολοίπων. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων πλάσματος της TSP-1 με τους τίτλους αντι-β2GPI και aCL αυτοαντισωμάτων ή με θρομβοκυτταροπενία (Πίνακας 2).



Εικόνα 2: (A) Οι ασθενείς με ιστορικό τόσο αρτηριακής όσο και φλεβικής θρομβοεμβολής έχουν τα υψηλότερα επίπεδα πλάσματος TSP-1, ακολουθούμενα από ασθενείς που είχαν μόνο αρτηριακά θρομβωτικά επεισόδια, φλεβική θρομβοεμβολή και μετά εκείνους που είχαν μόνο νοσηρότητα εγκυμοσύνης ($p = 0,0007$). Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ της αρτηριακής και της φλεβικής έναντι αρτηριακής ($p = 0,0007$), αρτηριακής και φλεβικής έναντι φλεβικής ($p = 0,0008$),

αρτηριακής και φλεβικής έναντι εγκυμοσύνης νοσηρότητας ($p = 0,0006$), αρτηριακής έναντι θνησιμότητας κύησης ($p = 0,0111$). Η αρτηριακή έναντι φλεβικής ($p = 0,0754$) και η φλεβική έναντι της νοσηρότητας κατά την εγκυμοσύνη ($p = 0,7003$) δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά. (B) Επίπεδα mRNA της TSP-1 στα αιμοπετάλια στις παραπάνω υποομάδες ασθενών ακολουθούν το ίδιο πρότυπο ($p = 0.0069$). Συγκρίσεις: αρτηριακή και φλεβική έναντι φλεβικής ($p = 0,0357$), αρτηριακή και φλεβική έναντι νοσηρότητας εγκυμοσύνης ($p = 0,0153$), αρτηριακή έναντι εγκυμοσύνης νοσηρότητα ($p = 0,0127$), φλεβική έναντι εγκυμοσύνης νοσηρότητα ($p = 0.0357$) = 0.2566) και αρτηριακή και φλεβική έναντι αρτηριακής ($p = 0.0617$). (Γ) Τα επίπεδα TSP-1 πλάσματος ποικίλουν ανάλογα με το πόσο πρόσφατο ήταν το κλινικό συμβάν. Οι ασθενείς που υπόκειντο σε ένα κλινικό συμβάν κατά τη δειγματοληψία ($n = 9$) είχαν τα υψηλότερα επίπεδα TSP-1 στο πλάσμα, ακολουθούμενα από εκείνους με πρόσφατο συμβάν και έπειτα από άτομα με μακρινό στο χρόνο συμβάν ($p < 0,0001$). (Δ) Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται στα επίπεδα TSP-1 mRNA των αιμοπεταλίων. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέσες τιμές \pm SE.

Πίνακας 1. Συσχέτιση κλινικών εκδηλώσεων με τις τιμές TSP-1 στο πλάσμα και τη σχετική έκφραση στα αιμοπετάλια

Κλινικές Εκδηλώσεις	Μέση Τιμή πλάσματος σε ασθενείς θετικούς για την κλινική εκδήλωση (μέση \pm ΣΑ, σε ng/ml)	Μέση σχετική έκφραση mRNA στα αιμοπετάλια σε ασθενείς θετικούς για την κλινική εκδήλωση (μέση \pm ΣΑ)
Κλινικό συμβάν		
Αρτηριακό	342 \pm 433.7	2.213 \pm 1.5
Φλεβικό	175.4 \pm 210.4	1.283 \pm 0.4513
Αρτηριακό και φλεβικό	1084 \pm 1018	4.226 \pm 1.554
Νοσηρότητα εγκυμοσύνης	117.3 \pm 103.0	0.5739 \pm 0.105
<i>Kruskal-Wallis δοκιμασία</i>	$p=0.0007$	0.0069
Χρόνος από το τελευταίο συμβάν		
<5χρ.	287.4 \pm 260.7	2.521 \pm 0.8844
>5χρ.	151.9 \pm 158.9	1.376 \pm 1.801
Ενεργό συμβάν	1525 \pm 848.8	N/A
<i>Kruskal-Wallis t δοκιμασία</i>	$p=0.0001$	
<i>Mann-Whitney δοκιμασία</i>		0.0391
Αριθμός συμβάντων		
>3	379.4 \pm 643.9	1.89 \pm 1.443
<3	199.2 \pm 213.4	2.215 \pm 1.753
<i>Mann-Whitney test</i>	$p=0.182$	0.064

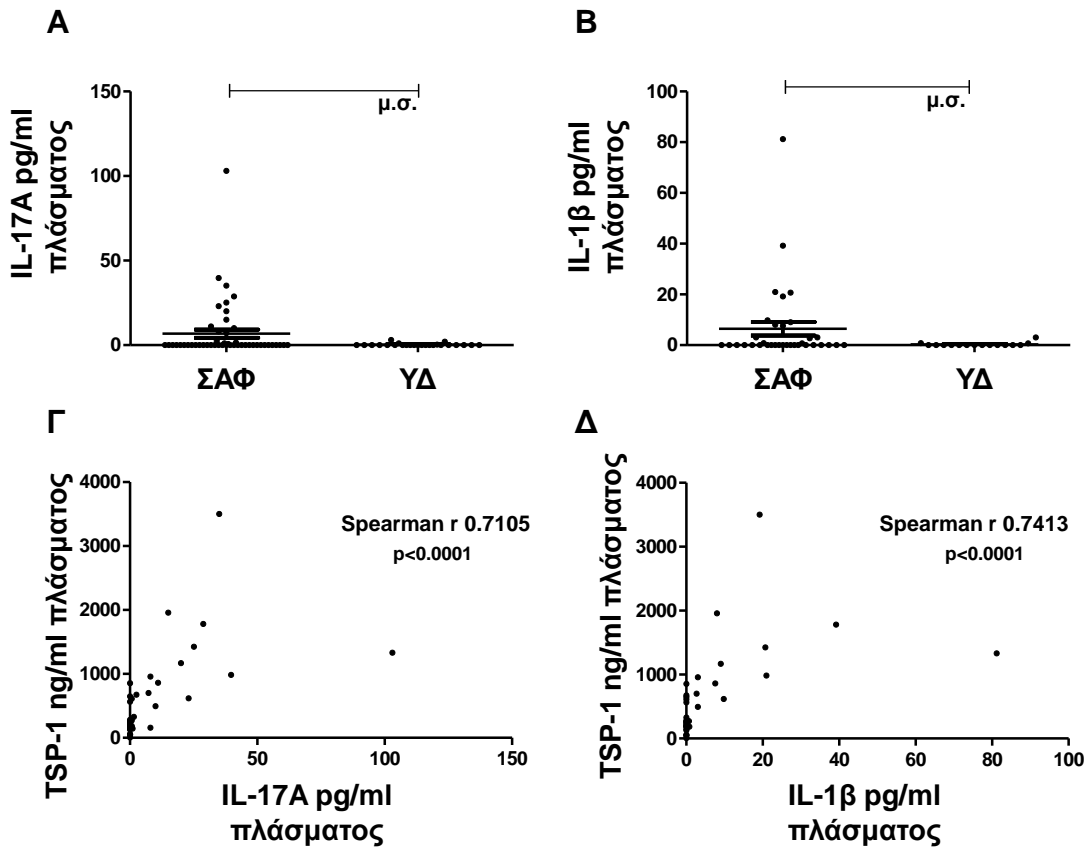
Πίνακας 2 .Συσχέτιση εργαστηριακών χαρακτηριστικών με τις τιμές TSP-1 στο πλάσμα και τη σχετική έκφραση στα αιμοπετάλια

Εργαστηριακή δοκιμασία	Μέση Τιμή πλάσματος σε ασθενείς θετικούς για την δοκιμασία (μέση± ΣΑ, σε ng/ml)	Μέση σχετική έκφραση mRNA Στα αιμοπετάλια σε ασθενείς θετικούς για την δοκιμασία (μέση± ΣΑ)
LA θετικό	321.9±528.6	2.094±1.651
LA αρνητικό	179.5±393.7	1.34±0.4811
<i>Mann-Whitney δοκιμασία</i>	<i>0.0098</i>	<i>0.7492</i>
Αντί-B2GP1 θετικό	215.7±230.0	2.051±1.55
Αντί-B2GP1 αρνητικό	368.3±675.5	2.055±1.708
<i>Mann-Whitney δοκιμασία</i>	<i>0.9796</i>	<i>0.8937</i>
a-CL IgG θετικό	342.9±637.8	1.998±1.545
a-CL IgG αρνητικό	248.1±366.1	2.084±1.525
<i>Mann-Whitney δοκιμασία</i>	<i>0.2615</i>	<i>0.9023</i>
a-CL IgM θετικό	189.8±235.2	2.053±1.042
a-CL IgM αρνητικό	374.3±538.1	2.085±1.822
<i>Mann-Whitney δοκιμασία</i>	<i>0.1051</i>	<i>0.9606</i>
Θρομβοπενία	254.1±265.4	2.073±1.49
Μη θρομβοπενία	299.9±526.6	1.625±1.769
<i>Mann-Whitney δοκιμασία</i>	<i>0.7066</i>	<i>1</i>

3.3 Τα υψηλά επίπεδα TSP-1 συσχετίζονται με τα επίπεδα των IL-1β και IL-17A σε ασθενείς που υπόκεινται σε κλινικό συμβάν.

Δεδομένου ότι η TSP-1 έχει εμπλακεί σε φλεγμονώδη ενεργοποίηση και έκκριση IL-1β καθώς και στη TH-17 διαφοροποίηση και έκφραση IL-17A αποφασίσαμε να αξιολογήσουμε τις τιμές των κυτταροκινών στο πλάσμα ασθενών με ΣΑΦ και ΥΔs. Μόνο 11 ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα αυτών των κυτταροκινών στον ορό ή το πλάσμα τους, έτσι η διαφορά μεταξύ των ασθενών και των ελέγχων δεν ήταν σημαντική σε σχέση με τα παραπάνω επίπεδα κυτταροκίνης (Εικόνα 3Α και Β). Παρόλα αυτά, οι ασθενείς που είχαν υψηλά επίπεδα TSP-1 στο πλάσμα τους είχαν επίσης ανιχνεύσιμα επίπεδα IL-1β και IL-17A όπως απεικονίζεται από τη σημαντική συσχέτιση μεταξύ TSP-1 με IL-17A ή IL-1β (Εικόνα 3 Γ και Δ). Η αναδρομική κλινική ανάλυση έδειξε ότι αυτοί οι ασθενείς νοσηλεύονταν για ένα κλινικό γεγονός.

Εικόνα 3



Εικόνα 3: Τα επίπεδα (A, B) IL-17A και IL-1β είναι ανιχνεύσιμα στο πλάσμα μιας μειοψηφίας ασθενών με ΣΑΦ. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά για την IL-1β, IL-17A μεταξύ ΣΑΦ και ΥΔ. (Γ, Δ) Τα επίπεδα TSP-1 του πλάσματος συσχετίζονται τόσο με IL-17A όσο και με IL-1β σε ασθενείς με ΣΑΦ με ανιχνεύσιμες ποσότητες των παραπάνω κυτταροκινών (Spearman $r = 0,7105$ και $r = 0,7413$ αντίστοιχα). Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέσες τιμές \pm SE.

3.4 Τα αιμοπετάλια που διεγείρονται με σύμπλοκα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 απελευθερώνουν υψηλότερα επίπεδα TSP-1

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα αιμοπετάλια ως πιθανή πηγή TSP-1 στο πλάσμα των ασθενών με ΣΑΦ διεγείραμε τα αιμοπετάλια in vitro χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τα αιμοπετάλια που απομονώθηκαν από ΥΔs διεγέρθηκαν με κεκαθαρμένη αντι-β2GPI IgG προερχόμενη από ασθενείς με ΣΑΦ σε συνδυασμό με ανθρώπινα φυσική β2GPI και CXCL4 μαζί με τους αντίστοιχους μάρτυρες τους και ακολούθως αξιολογήθηκαν τα επίπεδα TSP-1. Με την in vitro διέγερση

αποδείχθηκε ότι κατά την επώαση με κεκαθαυμένη αντι-β2GPI IgG μόνη ή σε συνδυασμό με β2GPI και/ή CXCL4, τα αιμοπετάλια απελευθέρωσαν υψηλότερα επίπεδα TSP-1 σε σύγκριση με τους μάρτυρες τους. Ειδικότερα, το σύμπλοκο του αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 επάγει το μέγιστο αποτέλεσμα όσον αφορά την παραγωγή TSP-1 ($\rho = 0,0074$, Εικόνα 4A).

3.5 Το πλάσμα ΣΑΦ και το αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 επάγουν την έκκριση της TSP-1 από ΥΔ HUVECs.

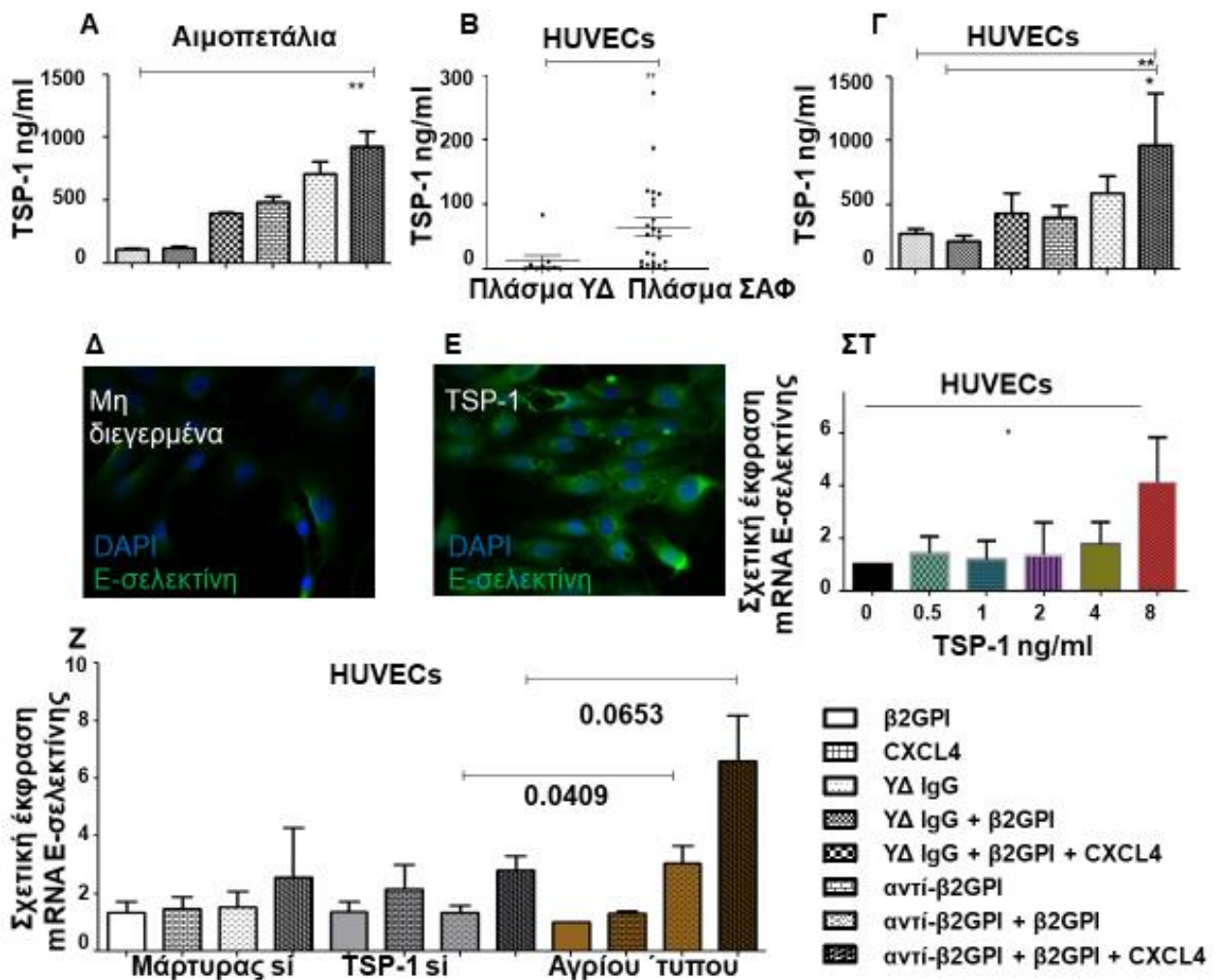
Η *in vitro* έκφραση της TSP-1 εκτιμήθηκε σε HUVECs που προέρχεται από ΥΔ (ΥΔ HUVECs) σε κυτταροκαλλιέργεια. Αποδείχθηκε ότι τα ΥΔ HUVECs που επώαστηκαν με πλάσμα από ασθενείς με ΣΑΦ εκκρίνουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα TSP-1 σε σύγκριση με αυτά που επώαστηκαν με πλάσμα ΥΔ (Σχήμα 4B). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν διεγέρθηκαν ΥΔ HUVECs με αντι-β2GPI, αντι-β2GPI-β2GPI σύμπλοκο και μείγμα αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4 που έδωσε τα υψηλότερα επίπεδα TSP-1, ενώ η ΥΔ IgG δεν επήγαγε την έκκριση της TSP-1 (Σχήμα 4Γ). Τα επίπεδα mRNA της TSP1 αξιολογήθηκαν με ποσοτική PCR στις 4 ώρες μετά τη διέγερση, αλλά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά, υποδηλώνοντας ότι εντός αυτού του χρονικού πλαισίου η ρύθμιση λαμβάνει χώρα κυρίως σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

3.6 Η TSP-1 επάγει την έκφραση SELE σε HUVECs και η σίγαση της TSP-1 στα HUVECs εξασθενεί την απόκριση στη διέγερση με αντι-β2GPI IgG-β2GPI-CXCL4

Στη συνέχεια, αποφασίσαμε να αξιολογήσουμε την επίδραση της TSP-1 στην κατάσταση ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Για αυτόν τον λόγο, διεγείραμε HUVEC με ανασυνδυασμένη TSP-1 και αξιολογήσαμε τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της E-σελεκτίνης. Η E-σελεκτίνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο SELE, είναι ένας καθιερωμένος δείκτης ενεργοποίησης ενδοθηλιακών κυττάρων. Η επώαση με TSP-1 των HUVEC είχε ως αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης E-σελεκτίνης όπως αποδεικνύεται από ανοσοκυτταροχημική ανάλυση (Σχήμα 4Δ-4Ε). Μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων της TSP-1 μόνο η συγκέντρωση των 8 $\mu\text{g/ml}$ έχει ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική διαφορική γονιδιακή έκφραση της E-σελεκτίνης (Σχήμα 4ΣΤ). Από την άλλη πλευρά, τα HUVECs που διαμολύνθηκαν με si-RNA που στοχεύουν το γονίδιο της TSP-1, έδειξαν χαμηλότερα σχετικά επίπεδα mRNA της E-σελεκτίνης όταν υποβλήθηκαν σε επώαση με αντι-β2GPI IgG και β2GPI. Ωστόσο, το μείγμα αντι-β2GPI IgG,

β2GPI και CXCL4 σε HUVECs μείωσε επίσης τα σχετικά επίπεδα mRNA της E-σελεκτίνης σε σύγκριση με τα άγριου τύπου HUVECs, αλλά αυτή η διαφορά δεν έφτασε σε στατιστική σημασία. (Σχήμα 4Z),

Εικόνα 4



Εικόνα 4: (A) Η επώαση αιμοπεταλίων με αντι-β2GPI IgG συνδυασμένη με β2GPI ή β2GPI/CXCL4 οδηγεί σε έκκριση σημαντικά υψηλότερων επιπέδων TSP-1 σε σύγκριση με επώαση με IgG προερχόμενη από YΔs ($n = 3$, $p < 0.05$). (B) Τα YΔ HUVECs που επώαστηκαν με πλάσμα ΣΑΦ εκκρίνουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα TSP-1 σε σύγκριση με αυτά που επώαστηκαν με πλάσμα YΔ ($p = 0,0029$). (Γ) Η επώαση με αντι-β2GPI IgG συνδυασμένη με β2GPI ή β2GPI/CXCL4 οδηγεί σε έκκριση σημαντικά υψηλότερων επιπέδων TSP-1 σε σύγκριση με επώαση με IgG προερχόμενη από YΔs ($n = 3$, $p < 0.05$). (Δ-Ε) Η διεγερση των

HUVECs με TSP-1 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης E-σελεκτίνης όπως αναδεικνύεται από ανοσοκυτταροχημική ανάλυση. (ΣΤ) Διαφορετικές συγκεντρώσεις της TSP-1 οδηγούν σε διαφορετική έκφραση γονιδίου της E-σελεκτίνης, με μόνο τη συγκέντρωση 8 $\mu\text{g/ml}$ να δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$). Τα HUVEC που διαμολύνθηκαν με si-RNA με στόχο το γονίδιο της TSP-1, έδειξαν μια τάση για χαμηλότερα σχετικά επίπεδα mRNA της E-σελεκτίνης όταν υποβλήθηκαν σε επώαση με αντι- $\beta 2\text{GPI}$ IgG και $\beta 2\text{GPI}$ ή το μείγμα αντι- $\beta 2\text{GPI}$ IgG, $\beta 2\text{GPI}$ και CXCL4 σε σύγκριση με τα άγριου τύπου HUVECs. Στατιστικά σημαντική βρέθηκε η διαφορά μεταξύ των διαμολυσμένων HUVECs με TSP-1 si RNA και των ομολόγων άγριου τύπου κατά την αγωγή με αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ ($p = 0,0409$). Η αγωγή με το μείγμα αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ -CXCL4 σε HUVECs είχε ως αποτέλεσμα μια μειωμένη απόκριση που δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέσος όρος \pm SE

3.7 Τα αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ -CXCL4 συμπλέγματα επάγουν την έκφραση του TSP-1 και της IL-1 β σε μονοκύτταρα

Η διέγερση των μονοκυττάρων ΥΔ ($n = 4$) με το μείγμα αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ -CXCL4 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη έκκριση TSP-1 ενώ η επώαση με αντι- $\beta 2\text{GPI}$ ή αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 5Α). Τα μείγματα αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ ή το σύμπλοκο αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ -CXCL4 οδήγησε επίσης σε υψηλότερη έκκριση IL-1 β , ενώ η επώαση με ΥΔ IgG και αντι- $\beta 2\text{GPI}$ IgG δεν είχαν καμία επίδραση (5B). Στα υπερκείμενα μονοκυττάρων θετικά για IL-1 β , τα επίπεδα IL-1 β συσχετίστηκαν με την TSP-1 (Σχήμα 5Γ). Τα αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα.

3.8 Αυξημένα επίπεδα mRNA των IL-1 β , IL-6, IL-8 και TSP-1 σε μονοκύτταρα που υποβλήθηκαν σε διέγερση με αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ -CXCL4

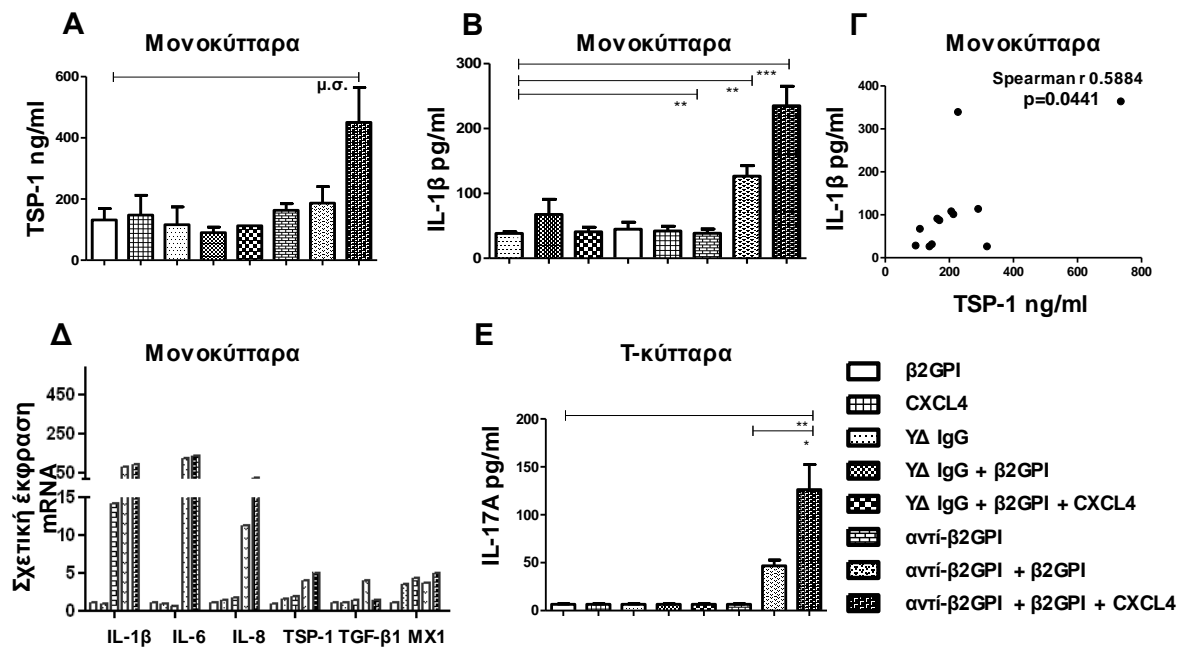
Για να εκτιμηθεί κατά πόσο οι παρατηρούμενες μεταβολές στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες απεικονίζουν επίσης μεταγραφικά γεγονότα, αναλύσαμε τα επίπεδα mRNA των IL-1 β , IL-6, IL-8 και TSP-1 σε καλλιεργημένα ΥΔ μονοκύτταρα διεγερμένα για 4 ώρες με αντι- $\beta 2\text{GPI}$ αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ ή την αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ -CXCL4. Η επώαση με αντι- $\beta 2\text{GPI}$ IgG είχε ως αποτέλεσμα 10-πλάσια, η θεραπεία με αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ είχε ως αποτέλεσμα 70 φορές και η θεραπεία με το σύμπλοκο αντι- $\beta 2\text{GPI}$ - $\beta 2\text{GPI}$ -CXCL4 είχε σαν αποτέλεσμα 100-πλάσια επαγωγή προ-IL-1 β mRNA επίπεδα, ενώ οι επίδραση με ΥΔ IgG δεν είχε καμία επίδραση. Παρόμοια μοτίβα παρατηρήθηκαν για τα επίπεδα mRNA των IL-6 και IL-8. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα mRNA του TGF- $\beta 1$. Για να εκτιμηθεί η

εξειδίκευση της ενεργοποίησης, μετρήσαμε επίσης τα επίπεδα mRNA του MX1, το οποίο είναι ένα επαγόμενο από ιντερφερόνη γονίδιο. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου MX1 στο πειραματικό μας σύστημα, υποδηλώνοντας ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις απεικονίζουν ειδικές οδούς ενεργοποίησης (Σχήμα 5Δ).

3.9 Τα μονοκύτταρα που διεγείρονται με σύμπλοκα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 επάγουν έκφραση IL-17A από CD4 + λεμφοκύτταρα

Δεδομένης της παρατηρούμενης συσχέτισης του TSP-1 με την IL-17A στο πλάσμα των ασθενών με ΣΑΦ, αξιολογήσαμε το δυναμικό μονοκυττάρων που υποβλήθηκαν σε επώαση υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες να μετατρέψουν τα CD4+ T-κύτταρα προς τον φαινότυπο Th-17. Υπερκείμενα από μονοκύτταρα με αντι-β2GPI, αντι-β2GPI-β2GPI και το σύμπλεγμα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 και οι αντίστοιχοι μάρτυρες τους χρησιμοποιήθηκαν για να διεγείρουν τα CD4+ T-κύτταρα για 72 ώρες. Τα υπερκείμενα μονοκυττάρων που υπέστησαν διέγερση με αντι-β2GPI-β2GPI ή αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 προκάλεσαν την έκφραση της IL-17A ενώ τα υπερκείμενα από μονοκύτταρα διεγερμένα με ΥΔ IgG και αντι-β2GPI IgG δεν είχαν επίδραση (Σχήμα 5ΣΤ).

Εικόνα 5



Εικόνα 5: (Α) Τα μονοκύτταρα που υποβλήθηκαν σε επώαση με αντι-β2GPI-β2GPI και το συμπλοκό αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 εκκρίνουν υψηλότερα επίπεδα IL-1β ενώ τα ΥΔ IgG και

αντι-β2GPI IgG δεν έχουν παρατηρήσαμε αποτέλεσμα ($n = 4, p < 0,05$). (B) Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα TSP-1. (Γ) Στα υπερκείμενα μονοκυττάρων θετικών για IL-1β, τα επίπεδα IL-1β συσχετίζονται με τα επίπεδα TSP-1. (Δ) Η διέγερση με αντι-β2GPI-β2GPI και το σύμπλοκο αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 οδηγεί σε μέγιστη ενεργοποίηση μονοκυττάρων. Το γράφημα απεικονίζει τα επίπεδα mRNA των προ-IL-1β, IL-6, IL-8, TSP-1, TGF-β1 και του γονιδίου ελέγχου MX1. (E) Διέγερση κυττάρων T CD4 + με υπερκείμενα από μονοκύτταρα επωασμένα με αντι-β2GPI-β2GPI -CXCL4 προκαλεί την έκκριση IL-17A ($p < 0,05$). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέσες τιμές \pm SE.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει για πρώτη φορά ότι η TSP-1 είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΣΑΦ σε σύγκριση με ασθενείς με ΣΕΛ, ή ΣΝ και ΥΔς. Αυτή η αύξηση παρατηρήθηκε τόσο στο επίπεδο της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης TSP1 όσο και στο mRNA των αιμοπεταλίων και αφορά κυρίως εκείνους με ιστορικό αρτηριακής θρόμβωσης ή εκείνους που υποβλήθηκαν σε ένα κλινικό συμβάν κατά τη στιγμή της αξιολόγησης. Στο πλάσμα η TSP-1, συσχετίζεται επίσης με την ελεύθερη ενεργό TGF-β1 και τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1β και IL-17A, γεγονός που υποδηλώνει ότι συστατικά αυτού του προφλεγμονώδους άξονα θα μπορούσαν να εξεταστούν ως πιθανός θεραπευτικός στόχος.

Τα πειράματα με βάση την κυτταρική καλλιέργεια ήταν σε συμφωνία με τα κλινικά δεδομένα. Εστίασαμε σε τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων, οι οποίοι είναι κρίσιμοι για την κλινική εικόνα του συνδρόμου. Πρώτον, τα HUVECs που υποβλήθηκαν σε διέγερση με πλάσμα ΣΑΦ εκκρίνουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης TSP-1 σε σύγκριση με κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επώαση με πλάσμα ΥΔ. Επιπλέον, σε ένα in vitro μοντέλο ΣΑΦ, που αποτελείται από διέγερση με συνδυασμό αντι-β2GPI, β2GPI και CXCL4, τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα και τα HUVECs εκκρίνουν υψηλότερα επίπεδα TSP1. Παρατηρήσαμε επίσης ότι μονοκύτταρα που έχουν υποστεί επώαση με αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 αποκτούν έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο και επίσης εκκρίνουν υψηλότερα επίπεδα IL-1β, σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Έχουμε δείξει προηγουμένως με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους υψηλής απόδοσης ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-β2GPI μαζί με ανασυνδυασμένη β2GPI και CXCL4 σχηματίζουν αυθόρμητα σύμπλοκα ικανά να συνδέονται με τις επιφάνειες

αιμοπεταλίων και να τα ενεργοποιούν [19]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με καθένα από αυτά τα συστατικά μόνο του σε σχέση με το σύμπλεγμα αντι-β2GPI / β2GPI / CXCL4 φαίνεται απίθανη. Ο ρόλος του CXCL4 στη διατήρηση της διεγερτικής δραστηριότητας αυτού του συμπλόκου φαίνεται σημαντικός καθώς το αντι-β2GPI συν β2GPI δεν αύξησε σημαντικά την παραγωγή TSP-1 απουσία CXCL4 (Σχήμα 4 πάνελ A και C αντίστοιχα). Ωστόσο, ο σχηματισμός του συμπλέγματος αντι-β2GPI / β2GPI / CXCL4 δεν αποκλείει τη σύνδεση αυτού του συμπλόκου με τους των υποδοχείς αιμοπεταλίων GPIIb/IIIa [232] ή με αροER2 '[234], καθώς έχουμε δείξει ότι το CXCL4 είναι ένα ικρίωμα που επιτρέπει τον διμερισμό της β2GPI, αλλά ο ελεύθερος πέμπτος επίτοπος της β2GPI είναι ικανός να συνδεθεί με οποιονδήποτε από τους παραπάνω υποδοχείς που είναι διαθέσιμος. Η GPIIb/IIIa ως πρωτεΐνη συνδέτης της β2GPI ανιχνεύθηκε με πείραμα άμεσης σύνδεσης θραυσμάτων της β2GPI που παράγονται με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση [18], ενώ το αροER2 'ανιχνεύθηκε με ανοσοκαθίζηση τεχνητά διμερισμένης β2GPI [50]. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, δημιουργήσαμε μια στήλη ανοσοσυγγένειας Sepharose 4B / β2GPI ενεργοποιημένη με CNBr και περάσαμε από αυτήν τις πρωτεΐνες μεμβράνης που εξήχθησαν από φυσιολογικά καθώς και από αιμοπετάλια ασθενών με ΣΑΦ. Εκλούστηκε η χημειοκίνη CXCL4 [19]. αλλά όχι ο αροER2 ή GPIIb/IIIa. Ο τρόπος με τον οποίο το β2GPI συνδέθηκε με τη στήλη σεφαρόζης πιθανώς επηρέασε τη περιοχή δέσμησης με τον αροER2 και τη GPIIb/IIIa που δεν εκλούστηκαν από τη στήλη. Παρ'όλα αυτά, το εκλούσιμο CXCL4 προσέφερε ένα καλό μοντέλο φυσικού διμερισμού της β2GPI το οποίο κατά την αναγνώριση από τα αντι-β2GPI ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα.

Σε αυτήν την μελέτη αξιολογούμε τις προθρομβωτικές αλλαγές στα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα κατά την αλληλεπίδραση με αντι-β2GPI / β2GPI / CXCL4. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς με ΣΑΦ εμφάνισαν φλεβικά θρομβωτικά συμβάντα [269] όπως περιγράφεται επίσης στη βιβλιογραφία [270]. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η εμπλοκή των αιμοπεταλίων σχετίζεται κυρίως με αρτηριακή και όχι με φλεβική θρόμβωση. Παραδεχόμαστε ότι αυτή η διαφορά μπορεί να υπάρχει, αν και όχι τόσο αυστηρή όσο θεωρήθηκε προηγουμένως. Πράγματι, ένας ρόλος αιμοπεταλίων στην υποτροπιάζουσα θρόμβωση έχει αναγνωριστεί σε προηγούμενες αναφορές σε ανθρώπους [271], ενώ η πειραματική θρόμβωση που προκλήθηκε από φλεβική στάση σε αρουραίους

απαιτούσε επίσης αιμοπετάλια [272]. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε μια σειρά παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με αιμοπετάλια για φλεβική θρόμβωση, όπως μικροσωματίδια αιμοπεταλίων, αυξημένη συσσωμάτωση, αυξημένη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και μέσος όγκος αιμοπεταλίων. Αυτοί οι παράγοντες υπογράμμισαν το ρόλο των αιμοπεταλίων στη φλεβική θρόμβωση [273]. Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, η TSP-1 απελευθερώνεται από αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα φυσιολογικών ατόμων κατά τη διέγερση με αντι-β2GPI / β2GPI / CXCL4, ενώ η πρωτεΐνη TSP-1 πλάσματος και το σχετικό mRNA αιμοπεταλίων TSP-1 αυξάνεται σε ασθενείς με ΣΑΦ, ειδικά σε ασθενείς με αρτηριακά ή αμφότερα φλεβικά και αρτηριακά θρομβωτικά συμβάντα. Επιπλέον, το TSP-1 επάγει τη θρομβίνη [274] και αυτό το στοιχείο συνδέει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με το σύστημα παραγόντων πήξης. Πιο πρόσφατα, η πρωτεωμική των θρόμβων ινώδους πλάσματος έδειξε ότι σε ασθενείς με ΣΑΦ η TSP-1 σε φλεβικούς θρόμβους ινικής αυξήθηκε σε σύγκριση με τους θρόμβους ινικής των ασθενών με φλεβική θρόμβωση για άλλους λόγους [275], ένα εύρημα που συμβαδίζει με τα δεδομένα μας.

Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα είναι γνωστό ότι οδηγούν τη διαφοροποίηση Th-17 όταν διεγείρονται μέσω του TGF-β1, της IL-1β και άλλων κυτταροκινών, κυρίως της IL-6 [276]. Θέλαμε να εξετάσουμε αυτή την αλληλεπίδραση στο πλαίσιο του ΣΑΦ. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήσαμε ένα *in vitro* μοντέλο, το οποίο περιλαμβάνει μια αρχική ενεργοποίηση μονοκυττάρων από το σύμπλεγμα αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τα υπερκείμενα από αυτές τις καλλιέργειες για τη διέγερση απομονωμένων T-κυττάρων. Όπως εκτιμάται από την έκκριση IL-17A, τα ενεργοποιημένα με ΣΑΦ συνθήκες μονοκύτταρα επάγουν διαφοροποίηση T-κυττάρων σε Th-17 με παρακρινή τρόπο.

Η TSP-1 έχει εμπλακεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ως δείκτης θνησιμότητας σε ΑΕΕ [277, 278], επιπλοκών περιφερικής αρτηριακής νόσου [277, 279] και διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης σχετιζόμενης με σήψη [280]. Τα επίπεδα του TGF-β1 μαζί με την IL-1β και την IL-17A αυξάνονται επίσης στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις υποδεικνύοντας πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των παραγόντων [281].

Τα ζωικά μοντέλα νοσημάτων υποστηρίζουν επίσης μια σύνδεση μεταξύ της TSP-1 και της θρόμβωσης καθώς και της φλεγμονής. Τόσο στα φλεγμονώδη όσο και στα ισχαιμικά

μοντέλα, όπως στα ποντίκια με EAE [265], οφθαλμική φλεγμονή [264] ή πειραματική νεφρική ισχαιμική βλάβη [282] και εγκεφαλική ισχαιμία [283], η TSP-1 φαίνεται να είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την εμφάνιση της πλήρους κλινικής εικόνας. Εκτεταμένες μελέτες με τέτοια μοντέλα περιγράφουν επίσης αυξημένα επίπεδα TGF-β1, IL-1 β και IL-17A [284-286]. Για παράδειγμα, σε τραυματισμό ιστών μετά από πειραματική ισχαιμία στην καρδιά [287], στο έντερο [288], στον εγκέφαλο [289] και στους πνεύμονες [278, 290] αυτές οι πρωτεΐνες αυξάνονται τοπικά στο σημείο της βλάβης. Έτσι, η σύνδεση μεταξύ TSP1, TGF-β1, IL-1β και IL-17A θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε διάφορες φλεγμονώδεις και θρομβωτικές καταστάσεις.

Σε κυτταρικό επίπεδο, το TSP-1 έχει περιγραφεί ως ένας ευαίσθητος δείκτης ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (19) σε μια ποικιλία ερεθισμάτων. Επιπλέον, TSP1, μαζί με TGF-β1, IL-1β και άλλες κυτταροκίνες, προκαλείται σε μονοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση του TLR4 [291]. Ενεργοποιημένα μονοκύτταρα μπορούν να οδηγήσουν τα T-κύτταρα προς τον φαινότυπο Th-17 και ο TGF-β1 μαζί με την IL-6 θεωρούνται βασικοί μοριακοί μεσολαβητές σε αυτή τη διαδικασία [292]. Η TSP-1 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του κυκλοφορούντος TGF-β1 διαχωρίζοντας τον από το πεπτίδιο που σχετίζεται με τη λανθάνουσα κατάσταση αυτού ρυθμίζοντας έτσι τη βιολογική δραστηριότητα του [248].

Λαμβανόμενα μαζί, τα δεδομένα μας σε συνδυασμό με τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν ένα μοντέλο για το ΣΑΦ στο οποίο τα σύμπλοκα αντισώματος αντι-β2GPI-β2GPI-CXCL4 ενεργοποιούν αιμοπετάλια, μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγώντας στην έκκριση της TSP-1. Η εκκρινόμενη TSP-1 θα μπορούσε να λειτουργήσει μέσω πολλαπλών στόχων. Και στα αιμοπετάλια και στα μονοκύτταρα, η TSP-1 μπορεί να δράσει αυτο-ενισχυτικά για να ενισχύσει την ενεργοποίησή τους και να επάγει τον σχηματισμό θρόμβου και τη φλεγμονή. Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα εκφράζουν έναν αριθμό φλεγμονωδών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένων των TGF-β1, IL-1β, IL-6 και άλλων κυτταροκινών. Αυτό δημιουργεί έναν φλεγμονώδες περιβάλλον ικανό να οδηγήσει στη Th-17 διαφοροποίηση, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει το κλινικό αποτέλεσμα. Έτσι, η TSP-1 θα μπορούσε να μεσολαβήσει στην κυτταρική επικοινωνία για να επάγει τη φλεγμονή και τον σχηματισμό θρόμβων.

Τα φαινόμενα που περιγράφονται παραπάνω όπως η ενεργοποίηση αιμοπεταλίων υπογραμμίζουν τη συστηματική φύση αυτής της ασθένειας. Ωστόσο, η θρόμβωση εμφανίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του αγγειακού συστήματος που είναι εξ ορισμού τοπικό φαινόμενο. Βρήκαμε πολύ δύσκολο να εξηγήσουμε αυτήν την απόκλιση. Πράγματι, εμείς και άλλοι έχουμε δείξει [269] ότι στις περισσότερες περιπτώσεις φλεβική ακολουθείται συνήθως από φλεβική και αρτηριακή από αρτηριακή θρομβωση γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τοπικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στη διέγερση της θρόμβωσης. Ωστόσο, ακόμη και η ύπαρξη αντισωμάτων αντι-β2GPI που κυκλοφορούν σε όλο το σώμα είναι ένα συστηματικό φαινόμενο, ενώ η επίδρασή τους που είναι η θρόμβωση, είναι τοπικό. Πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι εκτός από τα αντι-β2GPI αντισώματα, ένα δεύτερο χτύπημα, πιθανώς τοπικό, όπως τραυματισμός λόγω υπέρτασης, στένωση λόγω αυξημένου πάχους μέσου χιτώνα, τοπική μεμβρανώδης έκφραση αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη θρόμβωσης [293]. Η μελέτη μας υποστηρίζει την ιδέα ότι στο ΣΑΦ, η TSP-1 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης της δραστηριότητας της νόσου, ως ένας πρόσθετος μηχανισμός που σχετίζεται με το ΣΑΦ που οδηγεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε έναν προπηκτικό φαινότυπο, καθώς και ένα βιοδείκτη που διακρίνει τους μηχανισμούς της θρόμβωσης σε διακριτές κλινικές υποομάδες. Μια αδυναμία της μελέτης μας είναι ότι τα δείγματα ορού δεν ελήφθησαν σε όλους τους ασθενείς σε χρονικό σημείο κοντά στο τελευταίο θρομβωτικό ή μαιευτικό συμβάν. Ωστόσο, η μελέτη μας έθεσε πολλά ζητήματα που αξίζουν περαιτέρω έρευνα.

Κεφάλαιο 5: Αλληλούχηση του συνολικού mRNA σε HUVECs που έχουν υποστεί διέγερση με IgG από ασθενείς με σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων αναδεικνύει προ-φλεγμονώδη και προπηκτικά μονοπάτια

1. Εισαγωγή

Το σύνδρομο αντιφωσφολιπιδικού αντισώματος είναι μια αυτοάνοση επίκτητη θρομβοφιλία που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσες αρτηριακές ή φλεβικές θρομβώσεις και / ή από νοσηρότητα εγκυμοσύνης παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό έναντι πρωτεϊνών του πλάσματος που δεσμεύουν φωσφολιπίδια όπως η β2 γλυκοπρωτεΐνη-I (β2GPI) [294] και η προθρομβίνη [295]. Η κλινική εικόνα του ΣΑΦ περιλαμβάνει εκδηλώσεις διαφόρων οργάνων και συστημάτων, όπως αιμοφόρα αγγεία, κεντρικό νευρικό σύστημα, δέρμα, νεφρό, γαστρεντερική οδό, καρδιά και πλακούντα, με τη θρόμβωση στα όργανα αυτά να αποτελεί το χαρακτηριστικό γνώρισμα του συνδρόμου [296]. Οι θρομβωτικές υποτροπές αναστέλλονται από κουμαρινικούς ανταγωνιστές, ενώ οι απώλειες εμβρύων με χορήγηση ηπαρίνης και ασπιρίνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Πολλοί μηχανισμοί δράσης των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPL) έχουν προταθεί μέχρι στιγμής για να αποκαλύψουν την παθογένεση του συνδρόμου [297]. Παρά τις υπάρχουσες γνώσεις στον τομέα, πολλά ζητήματα παραμένουν ανεπίλυτα: α) πολλοί ασθενείς αναπτύσσουν θρομβώσεις ή αμβλώσεις παρά την εντατική αντιπηκτική αγωγή [298], β) τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου συχνά εκτείνονται πέρα από τη θρόμβωση όπως: πρόωρη αθηροσκλήρωση, βαλβιδική νόσο, δικτυωτή πελίδνωση, καθώς και πρόωρη άνοια, γνωστική δυσλειτουργία, συμπτώματα τύπου πολλαπλής σκλήρυνσης, ημικρανία και επιληψία, απουσία μόνιμου ή παροδικού εγκεφαλικού επεισοδίου [1] γ) τα άτομα διαθέτουν αυτο-αντισώματα έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης-I και της προθρομβίνης, αλλά παραμένουν ασυμπτωματικά και δεν αναπτύσσουν τις κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου [299], δ) έχει περιγραφεί μια ομάδα ασθενών που έχουν πολλά χαρακτηριστικά της ΣΑΦ, συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης, της δικτυωτής πελίδνωσης και της νοσηρότητας της εγκυμοσύνης απουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων [300, 301]

Η ενδοθηλιακή απορρύθμιση συμβατή με την έμφυτη ενεργοποίηση ανοσίας έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί χαρακτηριστικό του συνδρόμου [215, 218]. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η επώαση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφαλική φλέβα (HUVECs) με aPL επάγει την αυξημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνη. Παρατηρήθηκε επίσης η παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, IL-8) καθώς και αλλοιωμένου μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος [302, 303]. Μεταξύ των προτεινόμενων μηχανισμών που εξηγούν τις προ-θρομβωτικές και προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες του aPL, περιλαμβάνεται αυξημένη έκφραση του ιστικού παράγοντα με μια διαδικασία που περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της p38 (MAP κινάσης) και τη μετατόπιση στον πυρήνα του NF-κΒ [304, 305]. Οι ασθενείς με ΣΑΦ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων κυτταροκινών [223, 224]. Διάφορα μέλη της οικογένειας υποδοχέων τύπου Toll (Toll Like Receptor, TLR) έχουν προταθεί ως δυνητικοί υποδοχείς, υποδεικνύοντας ότι τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα μπορούν να ενεργοποιήσουν τη φυσική ανοσία. Η ενεργοποίηση των TLR 2, 4 και 6 οδηγεί σε ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών και επακόλουθη έκφραση του ιστικού παράγοντα ιστού και προφλεγμονωδών κυτταροκινών [226, 228, 229, 302, 306, 307]. Τα πειραματικά μοντέλα υποδεικνύουν ότι η αναστολή της αγγειογένεσης καθώς και η ενδοθηλιακή απόπτωση διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απώλεια του εμβρύου στην ΣΑΦ [219, 221]. Οι χημειοκίνες που προέρχονται από αιμοπετάλια είναι αυξημένες στο πλάσμα των ασθενών με ΣΑΦ [231]. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από σύμπλοκα αντι-β2GPI αυτοαντισωμάτων και β2GPI, ειδικά όταν αυτή διμερίζεται μέσω δέσμησης σε χημειοκίνη CXCL4 [308, 309].

Εκτός από μελέτες *in vitro*, τα ζωικά μοντέλα υποδεικνύουν επιπλέον ότι τα aPL ενεργοποιούν το ενδοθήλιο και ενισχύουν τον σχηματισμό θρόμβων *in vivo*. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πειράματα σε ποντίκια με γενετική διαγραφή των ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνης και P-σελεκτίνης κατέδειξαν τη σημαντική σημασία αυτών των μορίων στην ενδοθηλιακή ενεργοποίηση που προκαλείται από aPL [310]. Πράγματι, σε ασθενείς με ΣΑΦ έχουν εντοπιστεί αυξημένα επίπεδα διαλυτών μορίων προσκόλλησης [224].

Η ακριβής φύση των aPL-υποδοχέων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων παραμένει ασαφής. Αποδείχθηκε ότι η πρόσδεση της β2GPI με την αννεξίνη A2 προάγει την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου από τα αντισώματα αντι-β2GPI [311]. Διάφορες μελέτες

έχουν ήδη περιγράψει μηχανισμούς ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας σε ΣΑΦ που σχετίζονται με θρόμβωση ή το μαιευτικό ΣΑΦ με ή χωρίς θρόμβωση, συμπεριλαμβανομένης απελευθέρωσης μονοξειδίου του αζώτου μέσω ενεργοποίησης του ApoER2 [312] και του συμπληρώματος C5 ακολουθούμενη από αυξημένη έκφραση ιστικού παράγοντα [313-315].

Σκοπός μας ήταν να διερευνήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που λειτουργούν εντός των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων (EC) κατά την απόκριση τους στα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα. Για το σκοπό αυτό παρουσιάσαμε τα αρχικά μεταγραφικά συμβάντα που εμφανίζονται στα EC κατά την ενεργοποίησή τους από την ολική IgG ασθενών με ΣΑΦ. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν επίσης σε επίπεδο των πρωτεϊνών σε δείγματα βιοψίας και σε καλλιεργημένα κύτταρα. Η βιοπληροφορική ανάλυση αποκάλυψε κρίσιμες οδούς που εμπλέκονται στον τροποποιημένο ενδοθηλιακό φαινότυπο μετά από την επώαση με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ. Επιπρόσθετα, η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων RNA-seq μαζί με τα δημοσιευμένα σε μικροσυστοιχίες και CHIP-seq σε HUVECs [316-318] αποκαλύπτει κύριες οδούς μεταγωγής σήματος που είναι υπεύθυνες για την δημιουργία της νέας μεταγραφικής κατάστασης των κυττάρων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Ασθενείς και δείγματα

HUVECs απομονώθηκαν από 2 υγιείς γυναίκες (ΥΔ) μετά τον απλό τοκετό σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Baudin et al [319]. Στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε ενδοθηλιακό βασικό μέσο 2 (EBM-2, Lonza CC-3162). Ορός απομονώθηκε από 8 ασθενείς με ΣΑΦ και διατηρήθηκε κατεψυγμένος στους -80°C . Το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.2. Απομόνωση ολικής IgG και διέγερση HUVECs

Η ολική IgG απομονώθηκε από τους ορούς των ασθενών με ΣΑΦ χρησιμοποιώντας σφαιρίδια πρωτεΐνης G σεφαρόζης (GE Healthcare Life Sciences 17061801).

Τα ΥΔ HUVECs καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικά τρυβλία και όταν είχαν καλύψει το σύνολο της επιφάνειας αυτών το καλλιεργητικό μέσο αντικαταστάθηκε με νέο χωρίς την παρουσία ορού 16 ώρες και διεγέρθηκαν για 6 ώρες χρησιμοποιώντας καθαρή ολική IgG (1 mg / ml) σε συνδυασμό με ανθρώπινη β 2GPI (20 μg / ml) (Fitzgerald 30-AB23). Τα ΥΔ HUVECs που επωαστήκαν μόνο με EBM χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα

κύτταρα λύθηκαν για ακόλουθη απομόνωση mRNA ή μονιμοποιήθηκαν για ανοσοκυτταροχημική ανάλυση.

2.3. Παρασκευή βιβλιοθήκης και αλληλούχιση του συνολικού mRNA (RNA-seq)

Το RNA απομονώθηκε με αντιδραστήριο Trizol (ThermoFischer 15596018) και καθαρίστηκε με το κιτ καθαρισμού RNeasy MinElute (Qiagen 74204). Δύο μάρτυρες και δύο διεγερμένα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία για παρασκευή βιβλιοθήκης για προσδιορισμό αλληλουχίας RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο IlluminaTruSeq RNA Library Prep Kit (Illumina 15026495 F). Το Πόλυ-A επιλεγμένο RNA αποσπάσθηκε και εγχύθηκε, ακολουθούμενο από σύνθεση πρώτου και δεύτερου κλώνου cDNA. Ακολούθως, επισκευάστηκαν τα άκρα του DNA, προσδέθηκαν προσαρμογείς αλληλούχισης και τα δείγματα ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για 11-12 κύκλους. Οι βιβλιοθήκες ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το QubitFluorometer και εκτιμήθηκαν ποιοτικά χρησιμοποιώντας τον Agilent 2100 Bioanalyzer. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό αλληλουχίας χρησιμοποιώντας έναν μονό τελικό τρόπο 75 bp με τον αλληλουχητή Illumina NextSeq500 στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιώματος (GGC) που βρίσκεται στην Ακαδημία Αθηνών του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών (Σχήμα 1Α).

2.4. Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο

Το RNA που προέρχεται από τα ίδια δείγματα που υποβλήθηκαν σε RNA-seq υπέστη αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA χρησιμοποιώντας το Superscript III. Για την ποσοτική PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix και οι αντιδράσεις διεξήχθησαν εις διπλούν σε ένα σύστημα ανίχνευσης PCR πραγματικού χρόνου με το Biorad CFX96. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Delta-Delta Ct.

2.5. Βιοπληροφορικές αναλύσεις των RNA-seq και CHIP-seq

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε ένα μέσο βάθος 43 εκατομμυρίων ανά δείγμα (εύρος 40.767.385- 48.281.423). Η ποιότητα των πρωτοβάθμιων αναλύσεων αλληλουχίας αξιολογήθηκε με υπολογιστική εφαρμογή του αλγορίθμου FastQC (Galaxy version 0.69) [320] που φιλοξενήθηκε στην πλατφόρμα Galaxy [321] με προεπιλεγμένες παραμέτρους. Οι αλληλουχίες ανάγνωσης χαρτογραφήθηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα (έκδοση hg19) χρησιμοποιώντας το Tophat (Galaxy έκδοση 2.1.0) με προεπιλεγμένες παραμέτρους [322]. Το Htseq-count (Galaxy Version 0.6.1 galaxy3) χρησιμοποιήθηκε για την ανάγνωση των

μετρήσεων [323]. Το Deseq2 (Galaxy έκδοση 2.2.1.3) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση διαφορικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ συνθηκών [324]. Τα αρχεία κάλυψης BigWig δημιουργήθηκαν εφαρμόζοντας την εντολή bamCoverage από τη σουίτα DeepTools (έκδοση Galaxy 3.1.2.0.0) [325]. Οι χάρτες θερμότητας (HeatmΣΑΦ) κατασκευάστηκαν με το λογισμικό Morpheus [326]. Η ανάλυση οντολογίας των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με υπολογιστική λειτουργία του λογισμικού Enrichr [327].

Τα δεδομένα από το p65 ChIP-seq που προέρχονται από HUVECs που έχουν υποστεί αγωγή με TNF- α για 1 ώρα (GSM1154044) [317] αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος περιήγησης δεδομένων Cistrome [328]. Μόνο οι ισχυρές θέσεις δέσμησης που εμφανίζουν πάνω από 20 φορές τον εμπλουτισμό πάνω από το υπόβαθρο διατηρήθηκαν. Ο αλγόριθμος GREAT χρησιμοποιήθηκε για την εκχώρηση γονιδίων σε θέσεις δέσμησης p65 με το μοναδικό πλησιέστερο γονίδιο σε επιλογή 10 kb [329].

2.6. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση για IL-6, IL-8, NF- κ B1, Ιστικό Παράγοντα, ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη, TGF- β 2 και TGFR1

Τα HUVECs απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες για ολονύκτια προσκόλληση. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα διεγέρθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω για 6 ώρες. Η ανίχνευση των επιπέδων πρωτεΐνης των IL-6, IL-8, NF- κ B1, Ιστικού Παράγοντα, ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη, TGF- β 2 και TGFR1 πραγματοποιήθηκε ακολούθως. Οι καλυπτρίδες επώαστηκαν όλη τη νύκτα στους 4 ° C με πρωτογενή αντισώματα έναντι των IL-6 (5 μ g/ml, CSB-PA06757A0Rb, Cusabio), IL-8 (5 μ g/ml, CSB-MA083271A0m, Cusabio), TGF- β 2 (5 μ g/ml, CSB-PA07319A0Rb, Cusabio), Ιστικού Παράγοντα (5 μ g/ml, 4509, American Diagnostica) (4 μ /ml, sc-271267, Santa Cruz Biotechnology), P-σελεκτίνης (4 μ g/ml, sc-18854, Santa Cruz Biotechnology) 137054, Santa Cruz Biotechnology) και TGFR1 (5 μ g/ml, CSB-PA023451LA01HU, Cusabio). Οι καλυπτρίδες επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος που περιείχε συζευγμένα αντισώματα αιγός αντί-κουνελιού CF-568 (20102, Biotium, κόκκινο σήμα) και αιγός αντί-ποντικού CF-488 (20010, Biotium, πράσινο σήμα) τελική συγκέντρωση 2,6 μ g/ml. Η πυρηνική απεικόνιση επιτεύχθηκε με διάλυμα DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη, D1306, ThermoFischer Scientific) σε νερό σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ml για 8 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου και οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροσκοπίας και αναλύθηκαν οπτικά.

2.7. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση δειγμάτων πλακούντα

Τα δείγματα κατεψυγμένου ιστού κόπηκαν σε πάχος 10 mm, εφαρμόστηκαν σε κατάλληλες πλάκες μικροσκοπίας και μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη για 10 λεπτά ακολουθούμενη από ακετόνη για 2 λεπτά στους -20°C . Η μη ειδική δέσμευση αντισώματος παρεμποδίστηκε με επώαση με 2% ορό εμβρυϊκού βόειου ορού σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος 1x. Η χρώση διεξήχθη με ολονύκτια επώαση στους 4°C , ακολουθούμενη από επώαση 30 λεπτών με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριόχρωμα σε θερμοκρασία δωματίου σε θάλαμο υγραποίησης. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτεύοντα, δευτερογενή αντισώματα και συγκεντρώσεις DAPI όπως περιγράφεται παραπάνω. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αναλύθηκαν οπτικά.

2.8. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση \pm τυπική απόκλιση (ΣΑ). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το GraphPad Prism 5.0. Οι τιμές και οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αξιολογήθηκαν από τις δοκιμασίες Mann-Whitney για συνεχείς μεταβλητές. Οι τιμές $P < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

3. Αποτελέσματα

3.1. Η διέγερση των HUVECs επάγει με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI τη διαφορική έκφραση 900 γονιδίων

Η διέγερση με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI μεταβάλλει σημαντικά το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των HUVECs. Για την επίτευξη της υψηλότερης ποιότητας των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήσαμε τα πειράματα σε βιολογικά αντίγραφα. Η σύγκριση του πολύ-A RNA μεταξύ των HUVECs που υποβλήθηκαν σε επώαση με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI για 6 ώρες και τα κύτταρα μάρτυρες που δεν υποβλήθηκαν σε αγωγή αποκάλυψαν ένα πλήθος γονιδίων που εκφράστηκαν διαφορετικά (ΔΕΓ) (Σχήμα 1B, Συμπληρωματικός Πίνακας 1 και 2). Τα ΔΕΓ περιλαμβάνουν τόσο τα υπερεκφρασμένα όσο και υποεκφρασμένα γονίδια, υποδεικνύοντας ουσιαστική μεταβολή στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης των HUVECs κατά την διέγερση (Σχήμα 1B, Συμπληρωματικός Πίνακας 2). Σχεδόν

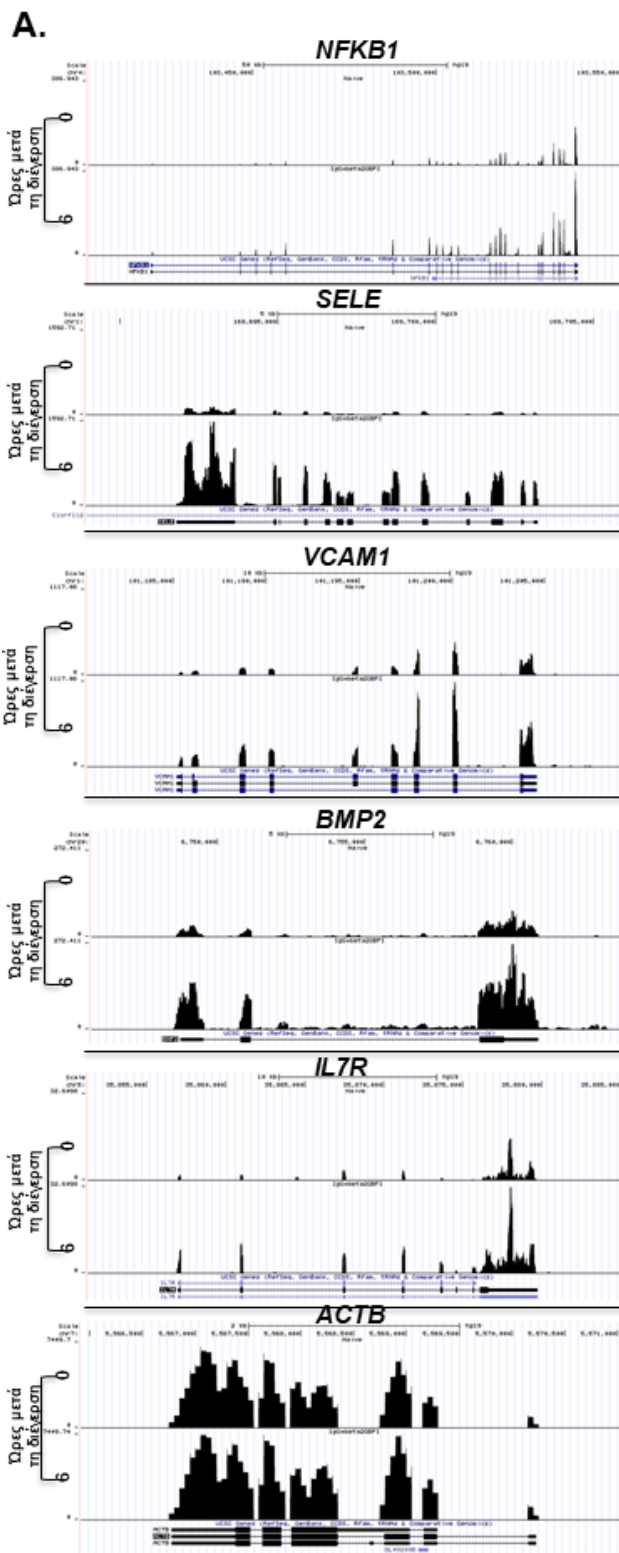
400 γονίδια βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στο 6ωρο χρονικό σημείο μετά τη διέγερση. Αυτά περιλαμβάνουν γνωστούς δείκτες του ΣΑΦ καθώς και κρίσιμους ρυθμιστές των οδών ανοσοαπόκρισης. Έχουν περιγραφεί αρκετά χαρακτηριστικά γονίδια φλεγμονώδους απόκρισης που έχουν προηγουμένως συνδεθεί με ανθρώπινη επαγωγίμη γονιδιακή έκφραση σε διάφορα μοντέλα-συστήματα. Μία ποικιλία γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής (π.χ. NF-κB, SMAD), χημειοκίνες (π.χ. IL-6, IL-8), αυξητικούς παράγοντες (TGF-β2, ICAM-1), πρωτεΐνες επιφάνειας (π.χ. ιστικός παράγοντας), μόρια μεταγωγής σήματος (π.χ. MAPK2K3, MAP3K5) και γονίδια που ανήκουν σε εναλλακτικές κατηγορίες. Η πρώτη μας συναλήθευση με προηγούμενες μελέτες αποκαλύπτει αρκετά γονίδια που σχετίζονται με το ΣΑΦ, όπως SELE, VCAM-1, IL-6, IL-8 και F3, τα οποία ενεργοποιούνται 6 ώρες μετά τη διέγερση των HUVECs. Έπειτα, επαληθεύσαμε τα αποτελέσματα της ανάλυσης RNA-seq με εφαρμογή ειδικών για κάθε γονίδιο qPCR προσδιορισμών για επιλεγμένα γονίδια όπως SELE, VEGF, FLT1 (Σχήμα 1Γ αριστερό πλαίσιο). Η άμεση σύγκριση των ανεξάρτητων μεθοδολογιών RNA-seq και qPCR οδήγησε σε στατιστικά εγκεκριμένη συσχέτιση του αποτελέσματος που προέκυψε από αυτές τις ανεξάρτητες δοκιμασίες ($R^2 = 0.994$).

(1B). Τα γονίδια φλεγμονώδους και ανοσολογικής απόκρισης καθώς και οι γνωστοί δείκτες του ΣΑΦ που περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής (π.χ. NF-κB, SMAD), χημειοκίνες (π.χ. IL-6, IL-8), αυξητικούς παράγοντες (TGFβ-2) (π.χ. E-Selectin, VCAM-1, ICAM-1), πρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας (π.χ. ιστικός παράγοντας), μόρια μεταγωγής σήματος (π.χ. MAPK2K3, MAP3K5). Επαλήθευση των αποτελεσμάτων από της ανάλυσης του συνόλου των μεταγεγραμμένων γονιδίων χρησιμοποιώντας qPCR ειδικές για επιλεγμένα γονίδια όπως SELE, VEGF, FLT1 (αριστερό πλαίσιο 1Γ). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αποτελεσμάτων RNA-seq / qPCR (1Γ δεξιά στήλη).

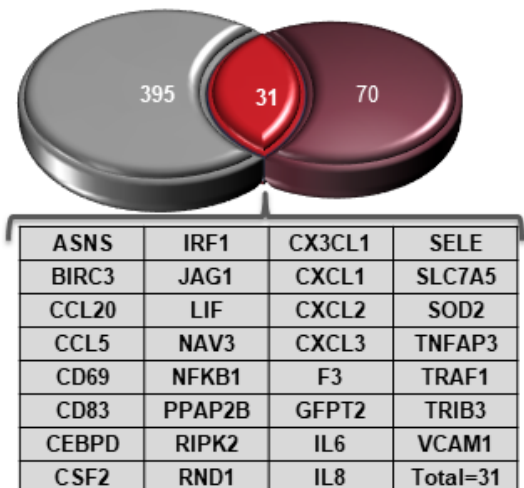
Το Σχήμα 2Α απεικονίζει αντιπροσωπευτικά παραδείγματα γονιδίων πριν και κατά την ενεργοποίηση των HUVECs όπως απεικονίζονται στον Genome Browser. Η άμεση τομή των πληροφοριών που περιγράφηκαν από τα προηγούμενα δημοσιευμένα πειράματα μικροσυστοιχιών [28] με τα αποτελέσματα RNA-seq μας αποκάλυψε ότι και οι δύο μελέτες μοιράζονται ένα εκτεταμένο φάσμα κοινών γονιδίων που έχουν ρυθμιστεί θετικά (Εικόνα 2B).

Για να κατανοήσουμε τις μοριακές οδούς που εμπλέκονται στην απόκριση των HUVECs στην αγωγή με ολική IgG, πραγματοποιήσαμε ανάλυση οντολογίας γονιδίων των ΔΕΓ. Η επαγωγή των HUVECs φαίνεται να επηρεάζει ποικίλες κυτταρικές οδούς που προφανώς συντονίζουν ξεχωριστές λειτουργίες, καθώς το ρεπερτόριο των αναγνωρισμένων επαγωγίμων γονιδίων χαρακτηρίζεται από ακραία ετερογένεια. Οι σημαντικές οδοί περιλαμβάνουν την σηματοδότηση του TNF-α, του TGF-β, της MAPK38 και το Hippo σηματοδοτικό μονοπάτι, υποδεικνύοντας ότι η παρατηρούμενη μεταγραφική εικόνα είναι το αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης πολλαπλών χημειοκινών, μορίων μεταγωγής σήματος και παραγόντων μεταγραφής (Σχήμα 4A). Ο μεγάλος αριθμός παραγόντων μεταγραφής μεταξύ των ΔΕΓ είναι επίσης σύμφωνος με τις ευρείες αλλαγές έκφρασης γονιδίων που παρατηρούνται στο κυτταρικό μας μοντέλο. Οι επακόλουθες αναλύσεις αποκάλυψαν ότι αυτοί οι ρυθμιστές ανήκουν στις ήδη περιγραφείσες οδούς μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν τη μετάβαση από την κατάσταση ηρεμίας στην κατάσταση διέγερσης (Σχήμα 2 Γ-Δ).

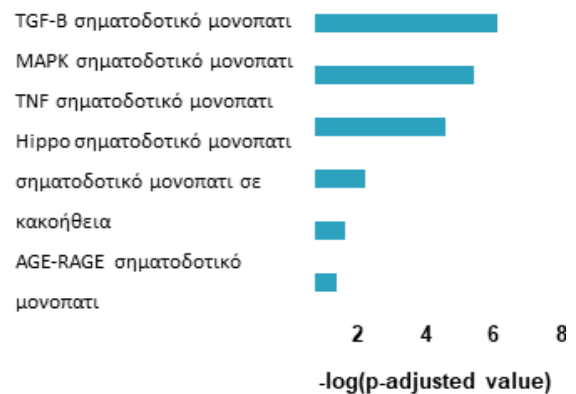
Εικόνα 2



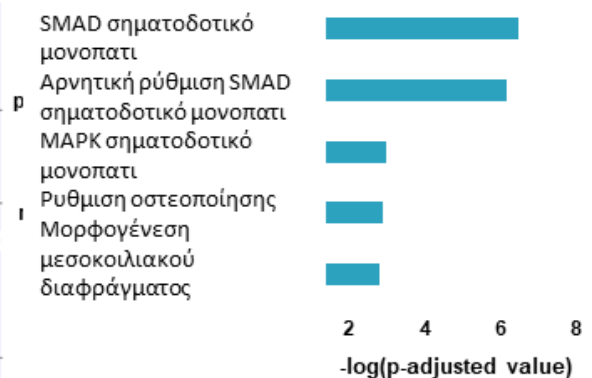
B.



Γ.



Δ.



Εικόνα 2. Στιγμιότυπα από το πρόγραμμα περιήγησης γονιδίων (*Genome Browser*) δείχνουν ότι οι αλληλουχίες εξωνίων των *NFKB1*, *SELE*, *VCAM1*, *BMP2* και *IL7R* ενισχύονται κατά κύριο λόγο στα διεγερμένα κύτταρα σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου, ενώ το σήμα του *ACTB* που

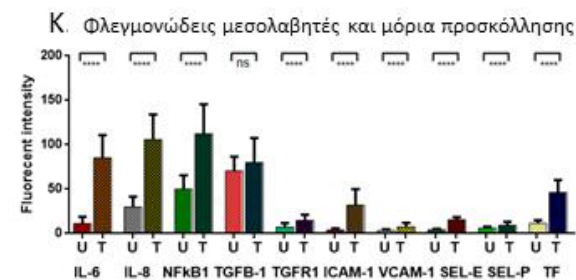
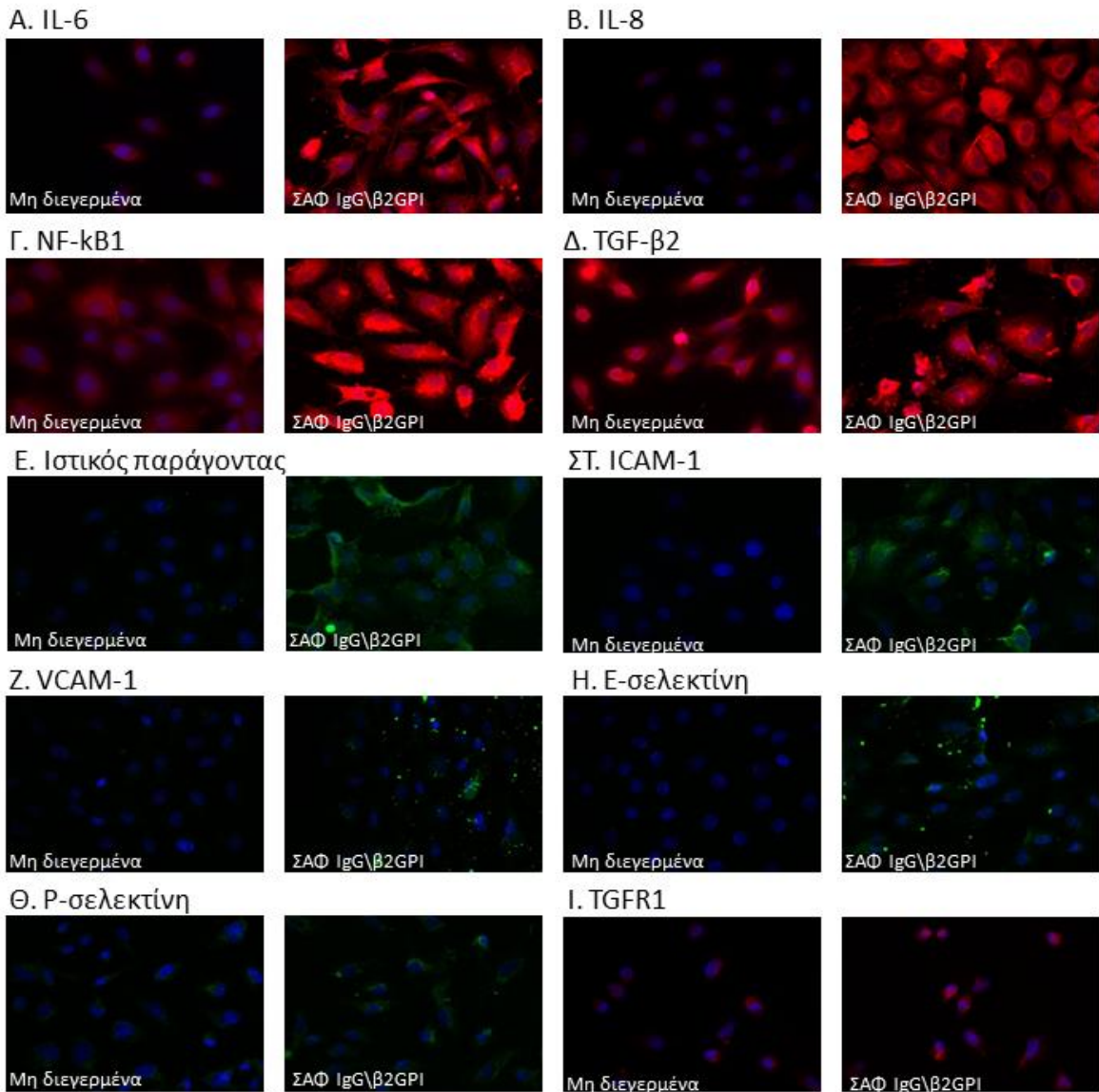
χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς παραμένει ανεπηρέαστο (2A). Η άμεση τομή των προηγουμένως δημοσιευμένων αποτελεσμάτων μικροσυστοιχίας με τα αποτελέσματα του RNA-seq αποκάλυψε 31 κοινά ρυθμισμένα γονίδια (2B). Η πλήρης ταξινόμηση των υπερκεφρασμένων γονιδίων μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης αποκαλύπτει ότι σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό του TNF- α , TGF- β , MAPK38 και το μονοπάτι Hippo, ενεργοποιούνται ταυτόχρονα στα HUVECs (2Γ-Δ).

3.2. Η διέγερση των υγιών HUVECs με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ και β 2GPI έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης προ-φλεγμονωδών και προπηκτικών μεσολαβητών

Προκειμένου να εκτιμηθεί εάν οι δυναμικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν σε γονιδιακό επίπεδο μεταφράζονται επίσης σε και στα επίπεδα πρωτεΐνης, τα ΥΔ HUVECs διεγέρθηκαν *in vitro* με το ίδιο μείγμα συγκεντρωμένης ολικής IgG που απομονώθηκε από ασθενείς με ΣΑΦ και β 2GPI για 6 ώρες. Κατά συνέπεια, αρκετά αντιπροσωπευτικά μόρια που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία του συνδρόμου μεταξύ των οποίων τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη, Ιστικός Παράγοντας, VCAM-1 και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-6, IL-8, οι οποίοι είναι δείκτες ενεργοποίησης και φλεγμονώδους τάσης των ενδοθηλιακών κυττάρων αξιολογήθηκαν με δοκιμασίες ανοσοφθορισμού.

Το μείγμα της ολικής IgG και της β 2GPI προκαλεί σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6, IL-8 όπως επίσης και του παράγοντα μεταγραφής NF- κ B1 (Σχήμα 3A-3Γ). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε επίσης, αλλά σε κάπως μικρότερο βαθμό για τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη, Ιστικός Παράγοντας και TGF- β 2 (Σχήμα 3Δ-3Θ). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά για τον TGFR1 στο πλαίσιο 6 ωρών μεταξύ των διεγερμένων και των μη διεγερμένων κυττάρων (Σχήμα 3Ι). Οι διαφορές μεταξύ διεγερμένων και μη κυττάρων αξιολογήθηκαν οπτικά και η ένταση του σήματος προσδιορίστηκε ποσοτικά με το λογισμικό Image J. Η στατιστική ανάλυση της ποσοτικοποιημένης έντασης του σήματος επικύρωσε την οπτική αξιολόγηση. Όλοι οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές και τα μόρια προσκόλλησης παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μη διεγερμένων και των διεγερμένων ενδοθηλιακών κυττάρων (Σχήμα 3Κ).

Εικόνα 3



Εικόνα 3. Ανοσοκυτταροχημεία σε HUVECs που έχουν υποβληθεί σε διέγερση. Το μίγμα ολικής IgG από ΣΑΦ και β2GPI προκαλεί έντονη αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6, IL-8 όπως επίσης και του παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ1 και των μορίων προσκόλλησης Ιστικό Παράγοντα, ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη, P-

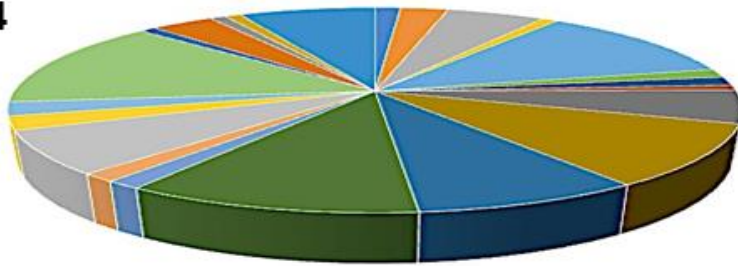
σελεκτίνη και *TGFR1* (3A-3Θ). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά για το μόριο *TGFR1* (3I). Η οπτική ανάλυση αποκάλυψε ότι όλοι οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές και μόρια προσκόλλησης παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μη διεγερμένων και των διεγερμένων ενδοθηλιακών κυττάρων (3K).

3.3. Η τομή του RNA-seq με τα δεδομένα ChIP-seq αποκαλύπτει αρκετούς στόχους NF-κB και SMAD μεταξύ των ΔΕΓ

Για τον εντοπισμό σημαντικών ρυθμιστών της απόκρισης των HUVEC στην διέγερση με αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα, εξετάσαμε τους παράγοντες μεταγραφής που ενεργοποιούνται κατά το πείραμα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4A, 44 γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς ρυθμιστές ενεργοποιούνται 6 ώρες μετά την διέγερση. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτοί οι παράγοντες ανήκουν σε ξεχωριστές οικογένειες και περιλαμβάνουν γνωστούς τελεστές διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στο ΣΑΦ. Λεπτομερέστερα, μεταξύ του συνολικού αριθμού των ρυθμισμένων μορίων οι NF-κB, SMAD, BMP2 και YAP1 αναγνωρίζονται να υπερεκφράζονται πιθανώς ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των μονοπατιών των TNF, TGF-β, MAPK38 και Hippo αντιστοίχως, αποτέλεσμα συμβατό με την ιδέα ότι αυτοί οι καταρράκτες συντονίζουν μεταγραφική διέγερση των κυττάρων (Εικόνα 2 Γ Δ). Για να παρασχεθούν επιπρόσθετα στοιχεία του μοριακού μηχανισμού του ΣΑΦ και για να εντοπιστούν οι υποτιθέμενοι άμεσοι στόχοι των βασικών μεταγραφικών ρυθμιστών, πραγματοποιήσαμε συνδυασμένες μετα-αναλύσεις βιοπληροφορικής των διαθέσιμων δημοσιευμένων αποτελεσμάτων ChIP-seq σε TNF-α ενεργοποιημένα HUVECs [29] με τα μεταγραφικά μας δεδομένα. Η διασταύρωση του δημοσιευμένου NF-κB-ChIP-seq [29] με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του RNA μας επισημαίνει γεγονότα δέσμησης NF-κB κοντά στην θέση έναρξης μεταγραφής 28 ρυθμισμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων γνωστών στόχων του παραπάνω μεταγραφικού παράγοντα όπως IL-6, IL-8, SELE, F3 (Ιστικός Παράγοντας), οι οποίοι έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη του ΣΑΦ (Σχήμα 4B). Η διασταύρωση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης του RNA με τα ήδη δημοσιευμένα δεδομένα Smad1/5-ChIP-seq σε HUVECs ενεργοποιημένα από BMP-6 ή BMP-9 (μορφογεννητική πτωτεινή των οστών 6 ή 9) [30] αναγνώρισε 14 άμεσα γονίδια-στόχους του Smad1/5, διαφορετικά εκφρασμένα συμπεριλαμβανομένων των SMAD9, IPPK, CCDC68 (Εικόνα 4Γ).

Εικόνα 4

A.



Extracellular matrix protein	0.80 %	Cytoskeletal protein	1.50 %
Transporter	3.10 %	Transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	0.50 %
Transferase	6.90 %	Oxidoreductase	0.50 %
Lyase	0.80 %	Cell adhesion molecule	5.90 %
Ligase	3.10 %	Nucleic acid binding	6.60 %
Signaling molecule	5.10 %	Enzyme modulator	0.80 %
Calcium – binding protein	0.80 %	Defense/immunity protein	1.30 %
Hydrolase	4.10 %	Transfer/carrier	8.20 %
Membrane traffic protein	1.30 %	Transcription factor	2 %
Chaperone	0.50 %	Cell junction protein	0.50 %
Structural protein	0.50 %	Isomerase	
Receptor	4.30 %		

Υπερεκφρασμένοι μεταγραφικοί παράγοντες

AHR	ARID5B	ARNTL	BMP2	CBFB	CNOT4	CREB5	DMRTA1	DNAJC1	E2F7	GLI2
HDX	HLX	HMGA2	JAZF1	KLF6	MECOM	MEF2A	NCOA7	NFKB1	NFKBIZ	NFYA
NR3C1	PBX3	RFX2	RUNX1	SMAD6	SMAD9	SOX17	TCF7	TFAP2A	THAP1	TSC22D2
XBP1	ZEB2	ZNF114	ZNF146	ZNF217	ZNF267	ZNF28	ZNF365	ZNF423	ZNF583	ZNF704

B.

p65-ChIP-seq HUVECs/ RNA-seq HUVECs



BMP2	BAZ1A	NFKBIZ	PANX1
FLT1	PMAIP1	CXCL6	PTGER4
IL1RL1	MAP2K3	IPPK	SELE
BIRC2	RAPH1	SEMA7A	FAM110A
TIFA	C8orf4	MAML2	RSPO3
ELL2	RIPK2	CACHD1	CREB5
NFKB1	VCAM1	PPTC7	PNRC1

Γ.

Smad-ChIP-seq HUVECs / RNA-seq HUVECs



ANKRD1	CLDN14	MECOM
BICD1	CMTM8	OSGIN2
BIRC2	EXT1	SMAD9
CBFB	IPPK	TES
CCDC68	JAG1	Total=14

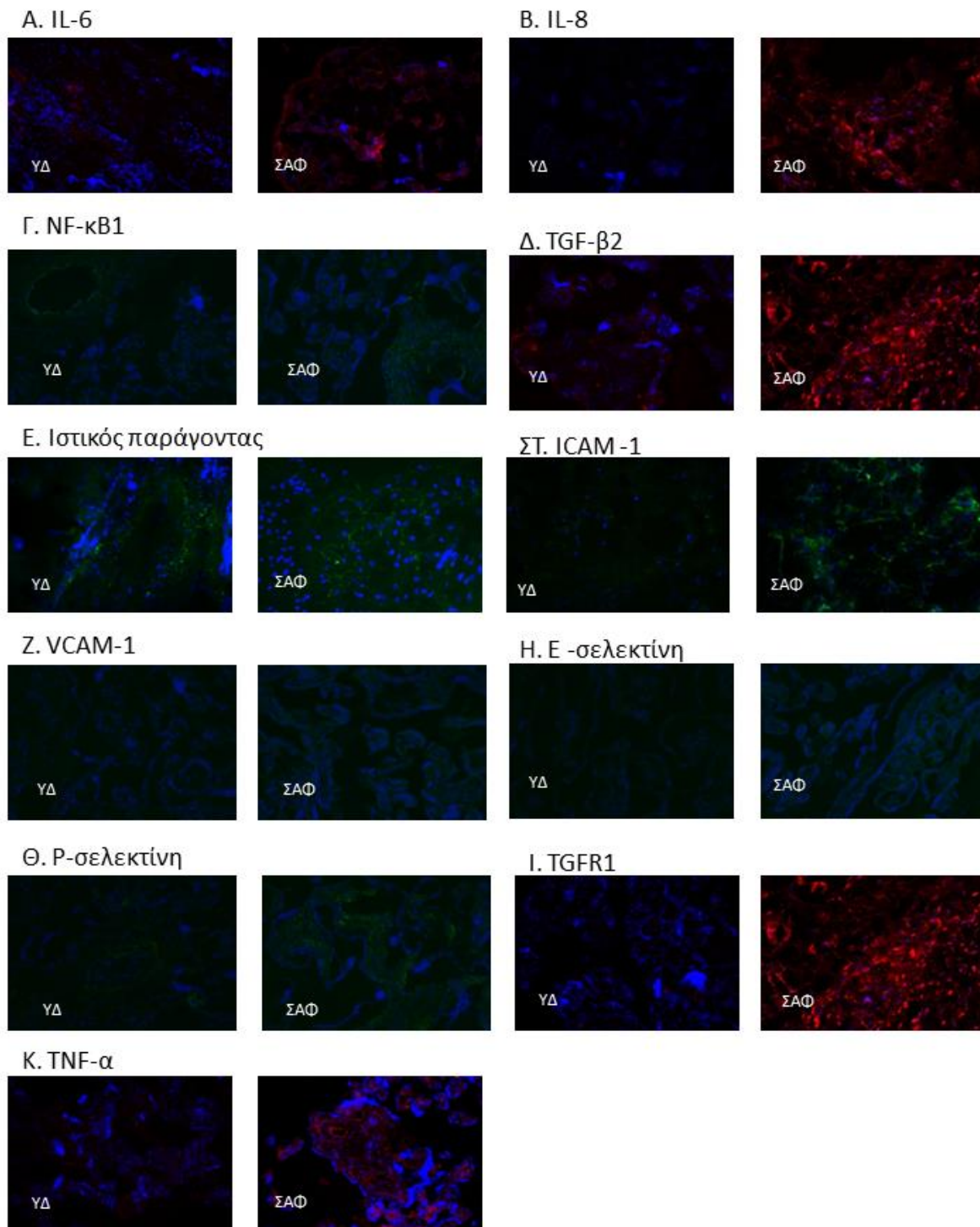
Εικόνα 4. Σαράντα τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες ενεργοποιούνται σε HUVECs μετά από διέγερση (4A). Οι συνδυασμένες μετα-αναλύσεις βιοπληροφορικής των διαθέσιμων δημοσιευμένων αποτελεσμάτων NF-κB-ChIP-seq σε

HUVECs με τα δεδομένα μας αποκαλύπτουν αρκετά γεγονότα δέσμευσης NF-κB σε 28 αυξημένα γονίδια που περιλαμβάνουν γνωστούς στόχους του παραπάνω μεταγραφικού παράγοντα όπως IL-6, IL-8, SELE, F3 (παράγοντας ιστικός) και έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη του ΣΑΦ (4B). Η διασταύρωση των αποτελεσμάτων του RNA-seq με το ήδη δημοσιευμένο πείραμα Smad1/5-ChIP-seq σε HUVECs αναγνωρίζει 14 γονίδια άμεσου στόχου Smad1/ όπως SMAD9, IPPK, CCDC68 (Εικόνα 4Γ).

3.4. Αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης φλεγμονωδών μορίων και μορίων προσκόλλησης σε βιοψίες πλακούντα ΣΑΦ

Προκειμένου να αξιολογηθεί εάν τα αποτελέσματα σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης που πρόεκυψαν από τα in vitro πειράματα σε HUVECs εφαρμόζονται επίσης στο πραγματικό πλαίσιο της νόσου, δείγματα βιοψίας από πλακούντα γυναικών που πάσχουν από ΣΑΦ και από υγιείς δότες αναλύθηκαν για τα παραπάνω μόρια χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές δοκιμασίες. Τα δείγματα πλακούντα που προέρχονται από ασθενείς με ΣΑΦ δείχνουν αυξημένη ένταση σήματος για IL-6, IL-8 καθώς επίσης και για τον παράγοντα μεταγραφής NF-κB1, TGF-β2 (αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β2) και TGFR1 (Εικόνα 5A-D, 5J). Η ίδια παρατήρηση παρατηρήθηκε επίσης αλλά σε μικρότερο βαθμό για τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη (Σχήμα 5P-5I). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ένταση φθορισμού μεταξύ ασθενών με ΥΔ και ΣΑΦ για ιστικό παράγοντα (Σχήμα 5E). Αυξημένη ένταση σήματος παρατηρήθηκε επίσης για το μόριο TNF-α στα δείγματα πλακούντα ΣΑΦ (Σχήμα 5K). Αποφασίσαμε να αξιολογήσουμε τα επίπεδα πρωτεΐνης TNF-α επειδή η οδός σηματοδότησής του ήταν μία από τις κύριες οδούς που αποκαλύφθηκαν στην ανάλυση της αλληλούχισης m-RNA.

Εικόνα 5



Εικόνα 5. Βιοψίες πλακούντα που προέρχονται από ασθενείς με ΣΑΦ παρουσιάζουν αυξημένη ένταση σήματος για τα IL-6, IL-8, NF-κB1, ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη, P-σελεκτίνη, TGF-β2 και TGFR1 (5A-5D, 5F-5J). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ένταση

φθορισμού μεταξύ ασθενών με ΣΑΦ και ΥΔ για ιστικό παράγοντα (5E). Αυξημένη ένταση σήματος παρατηρήθηκε επίσης για το μόριο TNF-α στις βιοψίες πλακούντα από ασθενείς με ΣΑΦ (5K).

4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη περιγράφει το προφίλ γονιδιακής έκφρασης ενδοθηλιακών κυττάρων που υποβλήθηκαν σε επώαση με IgG που απομονώθηκε από ασθενείς με ΣΑΦ και β2GPI σε ένα μοντέλο που μιμείται το ΣΑΦ. Η μεταγραφική ανάλυση των διεγερμένων HUVECs αποκάλυψε 906 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια, μεταξύ των οποίων 395 ήταν υπερεκφρασμένα και 511 υποεκφρασμένα. Μεταξύ των αυξημένων γονιδίων που σχετίζονται ιδιαίτερα με την παθοφυσιολογία του συνδρόμου είναι τα IL-8, VCAM-1, E-σελεκτίνη, IL-6, TGF-β2 και TGFR1. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι ο ενδοθηλιακός φαινότυπος μετά τη διέγερση με αυτοαντισώματα είναι το αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης διαφόρων διαφορετικών οδών σηματοδότησης και μεταγραφικών δικτύων. Η ανάλυσή μας αναδεικνύει τις οδούς των TNF, TGF-β, MAPK38 και Hippo ως κρίσιμα συστατικά της διαδικασίας ενεργοποίησης. Η πειραματική στρατηγική μας θέτει ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο «οι συνθήκες ΣΑΦ» μετατρέπουν τον αρχικό φαινότυπο των ενδοθηλιακών κυττάρων από την κατάσταση ηρεμίας σε έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο μέσω της ταυτόχρονης ενεργοποίησης και της πυρηνικής μετατόπισης ενός φάσματος ρυθμιστών μεταγραφής ικανών να ενεργοποιήσουν μεγάλο αριθμό γονιδίων που συμβάλλουν στην παθολογία του ΣΑΦ. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ο παρεκκλίνων μεταγραφικός επαναπρογραμματισμός που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη αντιπροσώπευση διαφόρων παραγόντων μεταγραφής συντονίζει τον φαινότυπο στο ΣΑΦ. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζονται περαιτέρω από την παρατήρηση αυξημένων επιπέδων πρωτεΐνης των παραπάνω μορίων τόσο σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε διέγερση *in vitro* όσο και σε βιοψίες πλακούντα από ασθενείς με ΣΑΦ.

Η ενεργοποίηση των EC στο ΣΑΦ χαρακτηρίζεται από την έκφραση επιφανειακών μορίων προσκόλλησης, κυτταροκινών όπως IL-8, IL-6 και του ιστικού παράγοντα [303, 330-332]. Η διαλεύκανση της παθογένειας του ενδοθηλίου στο ΣΑΦ θα συνέβαλε στη βελτίωση των συμβατικών θεραπευτικών αγωγών [333-335] ειδικά σε σοβαρές κλινικές περιπτώσεις.

Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί *in vivo* αναλύσεις ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας σε ασθενείς με ΣΑΦ και σημαντικά δεδομένα προέρχονται από μελέτες με *in vitro* μοντέλα με ενδοθηλιακά κύτταρα εκτεθειμένα σε ορό και πλάσμα ασθενούς, μονόκλωνο aPL ή IgG απομονωμένο από ασθενείς με ΣΑΦ [312, 336, 337]. Το μεταγραφικό προφίλ των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων στο ΣΑΦ έχει περιγραφεί εν μέρει [316] με μια κομψή ανάλυση βασισμένη σε μικροσυστοιχίες Affymetrix. Συγκεκριμένα, τα EC διεγέρθηκαν για 4 ώρες από αντισώματα αντι-β2GPI που προέρχονται από ασθενή [316] και αρκετές χημειοκίνες, υποδοχείς και αυξητικοί παράγοντες παρατηρήθηκαν να υπερκεφράζονται. Εδώ επεκτείνουμε και τα δύο αυτά κρίσιμα συμπεράσματα όσον αφορά τις προηγούμενες μελέτες μας [303], εφαρμόζοντας μια ολιστική προσέγγιση βασισμένη στην τεχνολογία ανάλυσης του συνόλου των γονιδίων που μεταγράφονται, σε συνδυασμό με αναλύσεις βιοπληροφορικής και εργαλεία υπολογιστικής βιολογίας. Η συνδυασμένη λογική της βιοπληροφορικής χρησιμοποιεί ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, ταξινόμηση οντολογίας γονιδίων, ταυτοποίηση οδών μεταγωγής σήματος και διασταύρωση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης του RNA.

Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω τα παραπάνω ευρήματα στο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, πραγματοποιήσαμε ανοσοκυτταροχημική αξιολόγηση σε διεγερμένα HUVECs και παρατηρήσαμε το ίδιο αποτέλεσμα σε επίπεδο πρωτεΐνης επίσης. Μεταξύ των αυξημένων γονιδίων που σχετίζονται ιδιαιτέρως με την παθοφυσιολογία του συνδρόμου είναι τα IL-8, VCAM-1, E-σελεκτίνη, NF-κB1, TGFB2 και TGFR1. Επιπλέον, εκτός από αυτά τα γονίδια επιλέξαμε να αξιολογήσουμε επίσης την έκφραση στενά σχετιζόμενων μορίων όπως τα ICAM-1, TF, IL-6 και P-σελεκτίνη τα οποία στην ομάδα μας έδειξαν τάση για διαφορετική γονιδιακή έκφραση αλλά δεν αποδείχθηκαν στατιστικά σημαντικά. Αυτά τα μόρια ανήκουν στις ίδιες οδούς σηματοδότησης που φαίνεται να υπερεκπροσωπούνται στην *in silico* ανάλυση και έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου. Πράγματι, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που υποβλήθηκαν σε διέγερση με το μείγμα του ολικής IgG και β2GPI για 6 ώρες εξέφρασαν υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης από όλα τα παραπάνω μόρια σε σύγκριση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Το ερέθισμα οδήγησε σε μια πιο έντονη αύξηση όσον αφορά τις κυτταροκίνες IL-6 και IL-8 και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-KB1. Ενώ η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της E-σελεκτίνης, του VCAM-1, του ICAM-1, του Ιστικού Παράγοντα και του TGF-

$\beta 2$ ήταν πιο μέτρια, πάρα ταύτα παρέμεινε στατιστικά σημαντική. Αυτή η διαφορά μεταξύ των δεδομένων από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και των παρατηρήσεων σχετικά με τις ανοσοκυτταροχημικές δοκιμασίες θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί στη διαφορική κινητική του κάθε μορίου και σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης. Πιθανότατα, καθένας από αυτούς τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης έχει το δικό του δυναμικό μοτίβο στο χρόνο τόσο σε επίπεδο έκφρασης γονιδίου όσο και πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό, οι παρατηρήσεις αυτές δεν μπορούν να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες αλλά πιθανότατα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πτυχές του ίδιου φαινομένου που συλλαμβάνεται στο χρονικό πλαίσιο των 6 ωρών. Στο ίδιο πλαίσιο μάλλον απροσδόκητο ήταν επίσης η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη TGF β -1 φάνηκε να εκφράζεται στα ίδια επίπεδα μεταξύ διεγερμένων και μη κυττάρων, κάτι που δεν αναμενόταν από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. Τα ίδια ευρήματα παρατηρήθηκαν επίσης στην Ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε βιοψίες πλακούντα από ασθενείς με ΣΑΦ και υγιείς μάρτυρες. Τα δείγματα ΣΑΦ είχαν υψηλότερα επίπεδα IL-6, IL-8, NF-KB1, ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνης και TGF- β 2 ανέδειξαν αυξημένη ένταση σήματος σε ιστούς από ασθενείς με ΣΑΦ. Μόνο στην περίπτωση του Ιστικού Παράγοντα, η ένταση του σήματος ήταν η ίδια μεταξύ ασθενών και υγιών δοτών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, προτείνουμε ότι η ενεργοποίηση με προοδευτικά κατασκευάζεται εντός των HUVECs και απαιτεί πιθανώς την συντονισμένη και λεπτομερέστερη δράση επαγωγίμων γονιδίων που ρυθμίζονται από διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτός ο συνδυαστικός τρόπος μεταγραφικής ρύθμισης ταιριάζει έντονα με την τελική έκβαση που είναι η δημιουργία ενός παθογόνου φαινοτύπου, αφού εκατοντάδες γονίδια μεταβάλλουν ταχέως την κατάσταση έκφρασης τους, ένα γεγονός που επηρεάζει εν μέρει την μη-κανονική κυτταρική απόκριση. Η επαγόμενη από ΣΑΦ IgG ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων προάγει τον μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό ή/και την απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων γεγονός που με τη σειρά του μπορεί να μεταφραστεί στην ανάπτυξη ενός επιθετικού παθογόνου αυτοάνοσου φαινοτύπου. Αρκετοί καταρράκτες μεταγωγής σήματος ενεργοποιούνται κατά την επώαση των HUVECs με ολική IgG από ασθενείς με ΣΑΦ που οδηγούν στη συνέχεια στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων και την επαγωγή των γονιδίων στόχων τους.

Συμπερασματικά, έχοντας καθιερώσει το παραπάνω μοντέλο-σύστημα μελέτης επωφελούμαστε από τις τεράστιες πληροφορίες που προκύπτουν ως αποτέλεσμα των πειραμάτων RNA-seq και προχωρήσαμε σε μια βαθύτερη ανάλυση που περιλάμβανε ενεργοποιημένα γονίδια στο ΣΑΦ.

Αναφορές

1. Miyakis, S., et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 295-306.
2. Asherson, R.A., et al., *Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines*. Lupus, 2003. **12**(7): p. 530-4.
3. Bancsi, L.F., I.K. van der Linden, and R.M. Bertina, *Beta 2-glycoprotein I deficiency and the risk of thrombosis*. Thromb Haemost, 1992. **67**(6): p. 649-53.
4. Liestol, S., et al., *Decreased anticoagulant response to tissue factor pathway inhibitor type 1 in plasmas from patients with lupus anticoagulants*. Br J Haematol, 2007. **136**(1): p. 131-7.
5. Arachchillage, D.R., et al., *Anti-protein C antibodies are associated with resistance to endogenous protein C activation and a severe thrombotic phenotype in antiphospholipid syndrome*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(11): p. 1801-9.
6. Breen, K.A., et al., *Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost, 2012. **107**(3): p. 423-9.
7. Oku, K., et al., *Autoantibodies against a complement component 1 q subcomponent contribute to complement activation and recurrent thrombosis/pregnancy morbidity in antiphospholipid syndrome*. Rheumatology (Oxford), 2016. **55**(8): p. 1403-11.
8. Romay-Penabad, Z., et al., *Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects in vitro and in vivo*. Blood, 2009. **114**(14): p. 3074-83.
9. Espinola, R.G., et al., *Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies*. Thromb Haemost, 2002. **87**(3): p. 518-22.
10. Proulle, V., et al., *Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS*. Blood, 2014. **124**(4): p. 611-22.
11. Meng, H., et al., *In Vivo Role of Neutrophil Extracellular Traps in Antiphospholipid Antibody-Mediated Venous Thrombosis*. Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(3): p. 655-667.
12. Yalavarthi, S., et al., *Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(11): p. 2990-3003.
13. Gladigau, G., et al., *A role for Toll-like receptor mediated signals in neutrophils in the pathogenesis of the anti-phospholipid syndrome*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42176.
14. Lopez-Pedreira, C., et al., *Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p. 301-11.
15. Canaud, G., et al., *Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome*. N Engl J Med, 2014. **371**(4): p. 303-12.
16. Agostinis, C., et al., *In vivo distribution of beta2 glycoprotein I under various pathophysiologic conditions*. Blood, 2011. **118**(15): p. 4231-8.
17. Vila, P., et al., *Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects*. Thromb Haemost, 1994. **72**(2): p. 209-13.
18. Unlu, O., S. Zuily, and D. Erkan, *The clinical significance of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus*. Eur J Rheumatol, 2016. **3**(2): p. 75-84.
19. Andreoli, L., et al., *Estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: a critical review of the literature*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2013. **65**(11): p. 1869-73.
20. Zuily, S., et al., *Antiphospholipid antibodies can identify lupus patients at risk of pulmonary hypertension: A systematic review and meta-analysis*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(6): p. 576-586.

21. Aletaha, D., et al., *2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(9): p. 1580-8.
22. Tedeschi, S.K., et al., *Developing and Refining New Candidate Criteria for Systemic Lupus Erythematosus Classification: An International Collaboration*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2018. **70**(4): p. 571-581.
23. Aggarwal, R., et al., *Distinctions between diagnostic and classification criteria?* Arthritis Care Res (Hoboken), 2015. **67**(7): p. 891-7.
24. Garcia, D. and D. Erkan, *Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome*. N Engl J Med, 2018. **379**(13): p. 1290.
25. Otomo, K., et al., *Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(2): p. 504-12.
26. Sciascia, S., et al., *Thrombotic risk assessment in systemic lupus erythematosus: validation of the global antiphospholipid syndrome score in a prospective cohort*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2014. **66**(12): p. 1915-20.
27. Giron-Gonzalez, J.A., et al., *Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals*. J Rheumatol, 2004. **31**(8): p. 1560-7.
28. Pengo, V., et al., *Incidence of a first thromboembolic event in carriers of isolated lupus anticoagulant*. Thromb Res, 2015. **135**(1): p. 46-9.
29. Rosendaal, F.R., *Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 1-6.
30. Erkan, D., et al., *A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(8): p. 924-9.
31. Vaarala, O., et al., *Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men*. Circulation, 1995. **91**(1): p. 23-7.
32. Urbanus, R.T., et al., *Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study*. Lancet Neurol, 2009. **8**(11): p. 998-1005.
33. Pengo, V., et al., *Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study*. Blood, 2011. **118**(17): p. 4714-8.
34. Arnaud, L., et al., *Efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: an international and collaborative meta-analysis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(3): p. 281-91.
35. Tektonidou, M.G., et al., *Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies*. Arthritis Rheum, 2009. **61**(1): p. 29-36.
36. Rand, J.H., et al., *Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2292-9.
37. Khamashta, M.A., et al., *The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome*. N Engl J Med, 1995. **332**(15): p. 993-7.
38. Rosove, M.H. and P.M. Brewer, *Antiphospholipid thrombosis: clinical course after the first thrombotic event in 70 patients*. Ann Intern Med, 1992. **117**(4): p. 303-8.
39. Crowther, M.A., et al., *A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome*. N Engl J Med, 2003. **349**(12): p. 1133-8.

40. Finazzi, G., et al., *A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS)*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(5): p. 848-53.
41. Garcia, D., et al., *Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review*. *Blood*, 2013. **122**(5): p. 817-24.
42. Levine, S.R., et al., *Antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke*. *JAMA*, 2004. **291**(5): p. 576-84.
43. Amory, C.F., et al., *Antiphospholipid Antibodies and Recurrent Thrombotic Events: Persistence and Portfolio*. *Cerebrovasc Dis*, 2015. **40**(5-6): p. 293-300.
44. Keeling, D., et al., *Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome*. *Br J Haematol*, 2012. **157**(1): p. 47-58.
45. Crowther, M.A. and A. Cuker, *Reduced-Intensity Rivaroxaban for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(13): p. 1279-1280.
46. Ruiz-Irastorza, G., et al., *Bleeding and recurrent thrombosis in definite antiphospholipid syndrome: analysis of a series of 66 patients treated with oral anticoagulation to a target international normalized ratio of 3.5*. *Arch Intern Med*, 2002. **162**(10): p. 1164-9.
47. Tripodi, A., et al., *Laboratory control of oral anticoagulant treatment by the INR system in patients with the antiphospholipid syndrome and lupus anticoagulant. Results of a collaborative study involving nine commercial thromboplastins*. *Br J Haematol*, 2001. **115**(3): p. 672-8.
48. Cohen, H., et al., *Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial*. *Lancet Haematol*, 2016. **3**(9): p. e426-36.
49. Lopes, M.R.U., et al., *Update on antiphospholipid antibody syndrome*. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 2017. **63**(11): p. 994-999.
50. Ortel, T.L., D. Erkan, and C.S. Kitchens, *How I treat catastrophic thrombotic syndromes*. *Blood*, 2015. **126**(11): p. 1285-93.
51. Empson, M., et al., *Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(2): p. CD002859.
52. Cervera, R., et al., *Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients*. *Ann Rheum Dis*, 2009. **68**(9): p. 1428-32.
53. Alijotas-Reig, J., et al., *The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): A survey of 247 consecutive cases*. *Autoimmun Rev*, 2015. **14**(5): p. 387-95.
54. Gris, J.C., et al., *Comparative incidence of a first thrombotic event in purely obstetric antiphospholipid syndrome with pregnancy loss: the NOH-APS observational study*. *Blood*, 2012. **119**(11): p. 2624-32.
55. Kahn, P., et al., *Prevention of murine antiphospholipid syndrome by BAFF blockade*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(9): p. 2824-34.
56. Erkan, D., et al., *A pilot open-label phase II trial of rituximab for non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome*. *Arthritis Rheum*, 2013. **65**(2): p. 464-71.
57. Pierangeli, S.S., et al., *Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo*. *Circulation*, 1999. **99**(15): p. 1997-2002.
58. Shapira, I., et al., *Brief report: induction of sustained remission in recurrent catastrophic antiphospholipid syndrome via inhibition of terminal complement with eculizumab*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(8): p. 2719-23.
59. Erkan, D., et al., *A prospective open-label pilot study of fluvastatin on proinflammatory and prothrombotic biomarkers in antiphospholipid antibody positive patients*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(6): p. 1176-80.

60. Lopez-Pedrerera, C., et al., *Global effects of fluvastatin on the prothrombotic status of patients with antiphospholipid syndrome*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(4): p. 675-82.
61. Burcoglu-O'Ral, A., D. Erkan, and R. Asherson, *Treatment of catastrophic antiphospholipid syndrome with defibrotide, a proposed vascular endothelial cell modulator*. J Rheumatol, 2002. **29**(9): p. 2006-11.
62. World Health Organization. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2017 [cited 2017 17 May]; Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
63. American Stroke Association. *Types of Stroke* Available from: <https://www.strokeassociation.org/en/about-stroke>.
64. Baccarelli, A. and S. Ghosh, *Environmental exposures, epigenetics and cardiovascular disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. **15**(4): p. 323-9.
65. Whayne, T.F., *Epigenetics in the development, modification, and prevention of cardiovascular disease*. Mol Biol Rep, 2015. **42**(4): p. 765-76.
66. Allis, C.D. and T. Jenuwein, *The molecular hallmarks of epigenetic control*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(8): p. 487-500.
67. Ramchandani, S., et al., *DNA methylation is a reversible biological signal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6107-12.
68. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
69. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
70. Clouaire, T. and I. Stancheva, *Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(10): p. 1509-22.
71. Eom, G.H. and H. Kook, *Posttranslational modifications of histone deacetylases: implications for cardiovascular diseases*. Pharmacol Ther, 2014. **143**(2): p. 168-80.
72. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
73. Pons, D., et al., *Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease*. Eur Heart J, 2009. **30**(3): p. 266-77.
74. Clocchiatti, A., C. Florean, and C. Brancolini, *Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumourigenesis*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(9): p. 1833-46.
75. Brown, P.J. and S. Muller, *Open access chemical probes for epigenetic targets*. Future Med Chem, 2015. **7**(14): p. 1901-17.
76. Rossetto, D., N. Avvakumov, and J. Cote, *Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events*. Epigenetics, 2012. **7**(10): p. 1098-108.
77. Rothbart, S.B. and B.D. Strahl, *Interpreting the language of histone and DNA modifications*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(8): p. 627-43.
78. Castillo, J., G. Lopez-Rodas, and L. Franco, *Histone Post-Translational Modifications and Nucleosome Organisation in Transcriptional Regulation: Some Open Questions*. Adv Exp Med Biol, 2017. **966**: p. 65-92.
79. Rask-Andersen, M., et al., *Epigenome-wide association study reveals differential DNA methylation in individuals with a history of myocardial infarction*. Human molecular genetics, 2016. **25**(21): p. 4739-4748.
80. Li, J., et al., *Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Acute Coronary Syndrome*. Circulation research, 2017. **120**(11): p. 1754-1767.
81. Friso, S., et al., *Promoter methylation in coagulation F7 gene influences plasma FVII concentrations and relates to coronary artery disease*. Vol. 49. 2012. 192-9.
82. Junker, R., et al., *Coagulation factor VII and the risk of coronary heart disease in healthy men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(8): p. 1539-44.

83. Yang, J., et al., *Chronic Kidney Disease Induces Inflammatory CD40+ Monocyte Differentiation via Homocysteine Elevation and DNA Hypomethylation*. *Circ Res*, 2016. **119**(11): p. 1226-1241.
84. Garlachs, C.D., et al., *Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia*. *Circulation*, 2001. **104**(20): p. 2395-400.
85. Pamukcu, B., et al., *The CD40-CD40L system in cardiovascular disease*. *Ann Med*, 2011. **43**(5): p. 331-40.
86. Li, Z., et al., *Promoter hypomethylation of microRNA223 gene is associated with atherosclerotic cerebral infarction*. *Atherosclerosis*, 2017. **263**: p. 237-243.
87. Rangrez, A., M. Kumari, and N. Frey, *An emerging role of microRNA miR-223 in cardiovascular pathophysiology*. Vol. 1. 2013. 23.
88. Yang, Z., et al., *Plasma homocysteine involved in methylation and expression of thrombomodulin in cerebral infarction*. Vol. 473. 2016. 1218-1222.
89. Zhang, S., et al., *Association between thrombomodulin polymorphisms and coronary artery disease risk: a meta-analysis*. *Med Sci Monit*, 2014. **20**: p. 1407-12.
90. Mohan Rao, L.V., C.T. Esmon, and U.R. Pendurthi, *Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor*. *Blood*, 2014. **124**(10): p. 1553-62.
91. Martin, F.A., R.P. Murphy, and P.M. Cummins, *Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2013. **304**(12): p. H1585-H1597.
92. Martin, F.A., R.P. Murphy, and P.M. Cummins, *Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. **304**(12): p. H1585-97.
93. Patsouras, M.D., et al., *Differential CpG methylation of the promoter of interleukin 8 and the first intron of tissue factor in Antiphospholipid syndrome*. *J Autoimmun*, 2019.
94. Mackman, N., *The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis*. *Anesth Analg*, 2009. **108**(5): p. 1447-52.
95. Owens, A.P., 3rd and N. Mackman, *Tissue factor and thrombosis: The clot starts here*. *Thromb Haemost*, 2010. **104**(3): p. 432-9.
96. Apostolakis, S., et al., *Interleukin 8 and cardiovascular disease*. *Cardiovasc Res*, 2009. **84**(3): p. 353-60.
97. Weeding, E., et al., *Genome-wide DNA methylation analysis in primary antiphospholipid syndrome neutrophils*. *Clin Immunol*, 2018. **196**: p. 110-116.
98. Nathan, H.L., et al., *Maternal and perinatal adverse outcomes in women with pre-eclampsia cared for at facility-level in South Africa: a prospective cohort study*. *J Glob Health*, 2018. **8**(2): p. 020401.
99. Perry, K.G., Jr. and J.N. Martin, Jr., *Abnormal hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia*. *Clin Obstet Gynecol*, 1992. **35**(2): p. 338-50.
100. Mousa, A.A., et al., *DNA methylation is altered in maternal blood vessels of women with preeclampsia*. Vol. 19. 2012. 1332-42.
101. Mousa, A.A., J.F. Strauss, and S.W. Walsh, *Reduced methylation of the thromboxane synthase gene is correlated with its increased vascular expression in preeclampsia*. Vol. 59. 2012. 1249-55.
102. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. *Indian J Anaesth*, 2014. **58**(5): p. 515-23.
103. De Candia, E., et al., *Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4692-8.
104. Weiss, H.J., Sussman, II, and L.W. Hoyer, *Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease*. *J Clin Invest*, 1977. **60**(2): p. 390-404.

105. White, W.M., et al., *Preeclampsia/Eclampsia candidate genes show altered methylation in maternal leukocytes of preeclamptic women at the time of delivery*. *Hypertens Pregnancy*, 2016. **35**(3): p. 394-404.
106. Kanaide, H., et al., *Cellular mechanism of vasoconstriction induced by angiotensin II: it remains to be determined*. *Circ Res*, 2003. **93**(11): p. 1015-7.
107. Skurk, T., Y.M. Lee, and H. Hauner, *Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture*. *Hypertension*, 2001. **37**(5): p. 1336-40.
108. Kokkoris, S., P. Andrews, and D.J. Webb, *Role of calcitonin gene-related peptide in cerebral vasospasm, and as a therapeutic approach to subarachnoid hemorrhage*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. **3**: p. 135.
109. Kumagai, H., et al., *Association of homocysteine and asymmetric dimethylarginine with atherosclerosis and cardiovascular events in maintenance hemodialysis patients*. *Am J Kidney Dis*, 2006. **48**(5): p. 797-805.
110. Elyamany, G., A.M. Alzahrani, and E. Bukhary, *Cancer-associated thrombosis: an overview*. *Clin Med Insights Oncol*, 2014. **8**: p. 129-37.
111. Cuff, J., et al., *Integrative bioinformatics links HNF1B with clear cell carcinoma and tumor-associated thrombosis*. Vol. 8. 2013. e74562.
112. Koizume, S., et al., *HIF2 α -Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells*. Vol. 40. 2012. 5389-401.
113. Liu, X., et al., *F10 gene hypomethylation, a putative biomarker for glioma prognosis*. Vol. 107. 2012. 479-85.
114. Unruh, D., et al., *Mutant IDH1 and thrombosis in gliomas*. *Acta neuropathologica*, 2016. **132**(6): p. 917-930.
115. Reitman, Z.J. and H. Yan, *Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. **102**(13): p. 932-41.
116. Liu, X. and Z.Q. Ling, *Role of isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH 1/2) gene mutations in human tumors*. *Histol Histopathol*, 2015. **30**(10): p. 1155-60.
117. Unruh, D., et al., *Methylation-dependent Tissue Factor Suppression Contributes to the Reduced Malignancy of IDH1-mutant Gliomas*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(2): p. 747-759.
118. Magnus, N., et al., *Tissue factor expression provokes escape from tumor dormancy and leads to genomic alterations*. Vol. 111. 2014. 3544-9.
119. Augello, C., et al., *CD18 promoter methylation is associated with a higher risk of thrombotic complications in primary myelofibrosis*. *Annals of hematology*, 2016. **95**(12): p. 1965-1969.
120. Hirahashi, J., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury*. *Circulation*, 2009. **120**(13): p. 1255-65.
121. World Health Organization. *Mortality and burden of disease from ambient air pollution*. 2016; Available from: https://www.who.int/gho/phe/outdoor_air_pollution/burden/en/.
122. Brook, R.D., et al., *Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2010. **121**(21): p. 2331-78.
123. Bollati, V., et al., *Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes*. *Environ Health Perspect*, 2010. **118**(6): p. 763-8.
124. Tarantini, L., et al., *Blood hypomethylation of inflammatory genes mediates the effects of metal-rich airborne pollutants on blood coagulation*. Vol. 70. 2013. 418-25.
125. Cantone, L., et al., *Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers*. *Environ Health Perspect*, 2011. **119**(7): p. 964-9.
126. Hossain, M.B., et al., *Exposure to welding fumes is associated with hypomethylation of the F2RL3 gene: a cardiovascular disease marker*. Vol. 72. 2015. 845-51.

127. Engström, K., et al., *Prenatal lead exposure is associated with decreased cord blood DNA methylation of the glycoprotein VI gene involved in platelet activation and thrombus formation*. Environmental epigenetics, 2015. **1**(1): p. dvv007.
128. Bind, M.-A., et al., *Air pollution and gene-specific methylation in the Normative Aging Study: association, effect modification, and mediation analysis*. Vol. 9. 2014. 448-58.
129. Bind, M.-A., et al., *Air pollution and markers of coagulation, inflammation, and endothelial function: associations and epigene-environment interactions in an elderly cohort*. Vol. 23. 2012. 332-40.
130. Bind, M.-A.C., et al., *Beyond the Mean: Quantile Regression to Explore the Association of Air Pollution with Gene-Specific Methylation in the Normative Aging Study*. Vol. 123. 2015. 759-65.
131. Bind, M.-A., et al., *Effects of temperature and relative humidity on DNA methylation*. Vol. 25. 2014. 561-9.
132. Kim, D., et al., *Psychological factors and DNA methylation of genes related to immune/inflammatory system markers: the VA Normative Aging Study*. BMJ open, 2016. **6**(1): p. e009790.
133. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
134. Park, Y.M., *CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis*. Exp Mol Med, 2014. **46**: p. e99.
135. Yang, M., et al., *Platelet CD36 promotes thrombosis by activating redox sensor ERK5 in hyperlipidemic conditions*. Blood, 2017. **129**(21): p. 2917-2927.
136. Kuijpers, M.J., et al., *Supporting roles of platelet thrombospondin-1 and CD36 in thrombus formation on collagen*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(6): p. 1187-92.
137. Roebuck, K.A. and A. Finnegan, *Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 876-88.
138. Obi, A.T., et al., *Endotoxaemia-augmented murine venous thrombosis is dependent on TLR-4 and ICAM-1, and potentiated by neutropenia*. Thromb Haemost, 2017. **117**(2): p. 339-348.
139. Chai, S.B., et al., *Increased plasma levels of endothelin-1 and urotensin-II in patients with coronary heart disease*. Heart Vessels, 2010. **25**(2): p. 138-43.
140. Fukuchi, M. and A. Giaid, *Expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 mRNAs and proteins in failing human hearts*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **31 Suppl 1**: p. S421-3.
141. Abraham, D. and M. Dashwood, *Endothelin--role in vascular disease*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47 Suppl 5**: p. v23-4.
142. Fish, J.E. and P.A. Marsden, *Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(2): p. 144-62.
143. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
144. Freedman, J.E. and J. Loscalzo, *Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): p. 1183-8.
145. Biswas, S., et al., *TLR2 Plays a Key Role in Platelet Hyperreactivity and Accelerated Thrombosis Associated With Hyperlipidemia*. Circ Res, 2017. **121**(8): p. 951-962.
146. Kato, J., et al., *Interferon-gamma-mediated tissue factor expression contributes to T-cell-mediated hepatitis through induction of hypercoagulation in mice*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 362-72.
147. Luther, N., et al., *Innate Effector-Memory T-Cell Activation Regulates Post-Thrombotic Vein Wall Inflammation and Thrombus Resolution*. Circ Res, 2016. **119**(12): p. 1286-1295.
148. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 515-81.

149. Huiart, L., P. Ernst, and S. Suissa, *Cardiovascular morbidity and mortality in COPD*. Chest, 2005. **128**(4): p. 2640-6.
150. Dogan, M.V., et al., *The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women*. Vol. 15. 2014. 151.
151. Jhun, M.A., et al., *Modeling the Causal Role of DNA Methylation in the Association Between Cigarette Smoking and Inflammation in African Americans: A 2-Step Epigenetic Mendelian Randomization Study*. American journal of epidemiology, 2017. **186**(10): p. 1149-1158.
152. Shenker, N.S., et al., *Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking*. Vol. 22. 2013. 843-51.
153. Chatziioannou, A., et al., *Blood-based omic profiling supports female susceptibility to tobacco smoke-induced cardiovascular diseases*. Scientific reports, 2017. **7**: p. 42870.
154. Blankenberg, S., et al., *Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME)*. Circulation, 2003. **108**(20): p. 2453-9.
155. Mallat, Z., et al., *Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability*. Circulation, 2001. **104**(14): p. 1598-603.
156. Qiu, W., et al., *Variable DNA methylation is associated with chronic obstructive pulmonary disease and lung function*. Vol. 185. 2012. 373-81.
157. Wan, E.S., et al., *Systemic steroid exposure is associated with differential methylation in chronic obstructive pulmonary disease*. Vol. 186. 2012. 1248-55.
158. Abdel-Latif, A. and S.S. Smyth, *Preventing platelet thrombosis with a PAR1 peptiducin*. Circulation, 2012. **126**(1): p. 13-5.
159. Covic, L., A.L. Gresser, and A. Kuliopulos, *Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets*. Biochemistry, 2000. **39**(18): p. 5458-67.
160. Joo, S.J., *Mechanisms of Platelet Activation and Integrin alphabeta3*. Korean Circ J, 2012. **42**(5): p. 295-301.
161. Minami, T., et al., *Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 41-53.
162. Nakanishi-Matsui, M., et al., *PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 609-613.
163. Chen, S.S.H., A.J. Jenkins, and H. Majewski, *Elevated plasma prostaglandins and acetylated histone in monocytes in Type 1 diabetes patients*. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association, 2009. **26**(2): p. 182-6.
164. Eriksson, P., et al., *Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(1): p. 20-6.
165. Vaughan, D.E., *PAI-1 and atherothrombosis*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1879-83.
166. Rijken, D.C. and H.R. Lijnen, *New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(1): p. 4-13.
167. Cesari, M., M. Pahor, and R.A. Incalzi, *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions*. Cardiovasc Ther, 2010. **28**(5): p. e72-91.
168. Collen, D. and H.R. Lijnen, *The tissue-type plasminogen activator story*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(8): p. 1151-5.
169. Hollan, I., et al., *Cardiovascular disease in autoimmune rheumatic diseases*. Autoimmun Rev, 2013. **12**(10): p. 1004-15.
170. Whitaker, J.W., et al., *An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype*. Genome medicine, 2013. **5**(4): p. 40.
171. Chang, D., et al., *Comprehensive analyses of DNA methylation and gene expression profiles of Kawasaki disease*. J Cell Biochem, 2019.

172. Bonfanti, R., et al., *PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. *Blood*, 1989. **73**(5): p. 1109-12.
173. Wagner, D.D. and P.C. Burger, *Platelets in inflammation and thrombosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(12): p. 2131-7.
174. Frenette, P.S., et al., *Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules*. *Blood*, 1998. **91**(4): p. 1318-24.
175. Hillis, G.S., et al., *Elevated soluble P-selectin levels are associated with an increased risk of early adverse events in patients with presumed myocardial ischemia*. *Am Heart J*, 2002. **143**(2): p. 235-41.
176. Ridker, P.M., J.E. Buring, and N. Rifai, *Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events*. *Circulation*, 2001. **103**(4): p. 491-5.
177. Rezaie, A.R., et al., *Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(43): p. 25336-9.
178. Shi, P., et al., *Platelet-Specific p38alpha Deficiency Improved Cardiac Function After Myocardial Infarction in Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(12): p. e185-e196.
179. Ren, J., et al., *Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. **38**(4): p. 617-23.
180. Gansevoort, R.T., et al., *Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention*. *Lancet*, 2013. **382**(9889): p. 339-52.
181. Nicholls, S.J., et al., *Selective BET Protein Inhibition with Apabetalone and Cardiovascular Events: A Pooled Analysis of Trials in Patients with Coronary Artery Disease*. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2018. **18**(2): p. 109-115.
182. Wasiak, S., et al., *Benefit of Apabetalone on Plasma Proteins in Renal Disease*. *Kidney Int Rep*, 2018. **3**(3): p. 711-721.
183. Kumar, A., et al., *Histone and DNA methylation-mediated epigenetic downregulation of endothelial Kruppel-like factor 2 by low-density lipoprotein cholesterol*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(8): p. 1936-42.
184. Kim, Y.-R., et al., *Epigenetic upregulation of p66shc mediates low-density lipoprotein cholesterol-induced endothelial cell dysfunction*. Vol. 303. 2012. H189-96.
185. Gimbrone, M.A., Jr. and G. Garcia-Cardena, *Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis*. *Cardiovasc Pathol*, 2013. **22**(1): p. 9-15.
186. Li, Z., et al., *The histone methyltransferase SETD1A regulates thrombomodulin transcription in vascular endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2018. **1861**(8): p. 752-761.
187. Stearns-Kurosawa, D.J., et al., *The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(19): p. 10212-6.
188. Rance, J.B., et al., *Regulation of the human endothelial cell protein C receptor gene promoter by multiple Sp1 binding sites*. *Blood*, 2003. **101**(11): p. 4393-401.
189. Larsson, P., et al., *Role of histone acetylation in the stimulatory effect of valproic acid on vascular endothelial tissue-type plasminogen activator expression*. Vol. 7. 2012. e31573.
190. Cheli, Y., et al., *Transcriptional and epigenetic regulation of the integrin collagen receptor locus ITGA1-PELO-ITGA2*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1769**(9-10): p. 546-58.
191. Mazzone, R., et al., *The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders*. *Clin Epigenetics*, 2019. **11**(1): p. 34.
192. Ciferska, H., et al., *The levels of sCD30 and of sCD40L in a group of patients with systemic lupus erythematoses and their diagnostic value*. *Clin Rheumatol*, 2007. **26**(5): p. 852.
193. Lu, Q., et al., *Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(5): p. 1282-91.
194. Zhou, Y., et al., *T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus*. *Clin Immunol*, 2009. **132**(3): p. 362-70.

195. Liu, Y., et al., *Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(2): p. 142-7.
196. Nakano, K., et al., *DNA methylome signature in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(1): p. 110-7.
197. Cucnik, S., et al., *Concomitant isolation of protein C inhibitor and unnicked beta2-glycoprotein I*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(2): p. 171-4.
198. Galli, M., et al., *Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1827-32.
199. Gebhart, J., et al., *Increased mortality in patients with the lupus anticoagulant: the Vienna Lupus Anticoagulant and Thrombosis Study (LATS)*. Blood, 2015. **125**(22): p. 3477-83.
200. Drenkard, C., J. Sanchez-Guerrero, and D. Alarcon-Segovia, *Fall in antiphospholipid antibody at time of thromboocclusive episodes in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 1989. **16**(5): p. 614-7.
201. Dobado-Berrios, P.M., et al., *Increased levels of tissue factor mRNA in mononuclear blood cells of patients with primary antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost, 1999. **82**(6): p. 1578-82.
202. Reverter, J.C., et al., *Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein s*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(11): p. 1319-26.
203. Anastasiadi, D., A. Esteve-Codina, and F. Piferrer, *Consistent inverse correlation between DNA methylation of the first intron and gene expression across tissues and species*. Epigenetics Chromatin, 2018. **11**(1): p. 37.
204. Unoki, M. and Y. Nakamura, *Methylation at CpG islands in intron 1 of EGR2 confers enhancer-like activity*. FEBS Lett, 2003. **554**(1-2): p. 67-72.
205. Wan, J., et al., *Characterization of tissue-specific differential DNA methylation suggests distinct modes of positive and negative gene expression regulation*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 49.
206. Ito, S., et al., *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1300-3.
207. Guo, J.U., et al., *Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond*. Cell Cycle, 2011. **10**(16): p. 2662-8.
208. Li, J., et al., *Decoding the dynamic DNA methylation and hydroxymethylation landscapes in endodermal lineage intermediates during pancreatic differentiation of hESC*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(6): p. 2883-2900.
209. Horvath, P.M. and L.M. Monteggia, *MeCP2 as an Activator of Gene Expression*. Trends Neurosci, 2018. **41**(2): p. 72-74.
210. Koelsch, K.A., et al., *Functional characterization of the MECP2/IRAK1 lupus risk haplotype in human T cells and a human MECP2 transgenic mouse*. J Autoimmun, 2013. **41**: p. 168-74.
211. Chatterjee, T.K., et al., *Role of histone deacetylase 9 in regulating adipogenic differentiation and high fat diet-induced metabolic disease*. Adipocyte, 2014. **3**(4): p. 333-8.
212. Smith, J.D., *New role for histone deacetylase 9 in atherosclerosis and inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(9): p. 1798-9.
213. Liu, Y., et al., *Blood monocyte transcriptome and epigenome analyses reveal loci associated with human atherosclerosis*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 393.
214. Meroni, P.L., et al., *Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers*. Arthritis Res Ther, 2014. **16**(2): p. 209.
215. Ma, K., et al., *High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15541-8.
216. Del Papa, N., et al., *Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III: beta 2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes*

- and induces the expression of adhesion molecules.* Clin Exp Rheumatol, 1995. **13**(2): p. 179-85.
217. Simantov, R., et al., *Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies.* J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2211-9.
 218. Kaplanski, G., et al., *Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 55-64.
 219. Nakamura, N., et al., *Lupus anticoagulant autoantibody induces apoptosis in umbilical vein endothelial cells: involvement of annexin V.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(2): p. 1488-93.
 220. Kobayashi, T., et al., *A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function.* Nature, 1998. **392**(6672): p. 193-7.
 221. Velayuthaprabhu, S., et al., *Expression of apoptosis in placenta of experimental antiphospholipid syndrome mouse.* Am J Reprod Immunol, 2013. **69**(5): p. 486-94.
 222. Di Simone, N., et al., *Antiphospholipid antibodies affect human endometrial angiogenesis.* Biol Reprod, 2010. **83**(2): p. 212-9.
 223. Soltész, P., et al., *Immunological features of primary anti-phospholipid syndrome in connection with endothelial dysfunction.* Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(11): p. 1628-34.
 224. Forastiero, R.R., M.E. Martinuzzo, and G.F. de Larranaga, *Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy related antiphospholipid antibodies.* Lupus, 2005. **14**(2): p. 129-36.
 225. Alard, J.E., et al., *TLR2 is one of the endothelial receptors for beta 2-glycoprotein I.* J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1550-7.
 226. Allen, K.L., et al., *A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies.* Blood, 2012. **119**(3): p. 884-93.
 227. Raschi, E., et al., *Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies.* Blood, 2003. **101**(9): p. 3495-500.
 228. Sorice, M., et al., *Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(8): p. 2687-97.
 229. Satta, N., et al., *Toll-like receptor 2 mediates the activation of human monocytes and endothelial cells by antiphospholipid antibodies.* Blood, 2011. **117**(20): p. 5523-31.
 230. Brandt, K.J., et al., *NF-kappaB is activated from endosomal compartments in antiphospholipid antibodies-treated human monocytes.* J Thromb Haemost, 2014. **12**(5): p. 779-91.
 231. Patsouras, M.D., et al., *Elevated expression of platelet-derived chemokines in patients with antiphospholipid syndrome.* J Autoimmun, 2015. **65**: p. 30-7.
 232. Shi, T., et al., *Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(8): p. 2558-67.
 233. Hunt, J.E., R.J. Simpson, and S.A. Krilis, *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**(6): p. 2141-5.
 234. Lutters, B.C., et al., *Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'.* J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33831-8.
 235. Lawler, J.W., H.S. Slayter, and J.E. Coligan, *Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets.* J Biol Chem, 1978. **253**(23): p. 8609-16.
 236. Starlinger, P., et al., *Thrombospondin-1: a unique marker to identify in vitro platelet activation when monitoring in vivo processes.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(8): p. 1809-19.

237. Isenberg, J.S., et al., *Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide/cGMP signaling*. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 613-23.
238. Roberts, W., et al., *Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade*. *Blood*, 2010. **116**(20): p. 4297-306.
239. Sheedy, F.J., et al., *CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(8): p. 812-20.
240. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(2): p. 155-61.
241. Kato, M., et al., *The involvement of CD36 in monocyte activation by antiphospholipid antibodies*. *Lupus*, 2013. **22**(8): p. 761-71.
242. Chu, L.Y., D.P. Ramakrishnan, and R.L. Silverstein, *Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells*. *Blood*, 2013. **122**(10): p. 1822-32.
243. Greenaway, J., et al., *Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1)*. *J Cell Physiol*, 2007. **210**(3): p. 807-18.
244. Margosio, B., et al., *Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(4): p. 700-9.
245. Guo, N., et al., *Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells*. *Cancer Res*, 1997. **57**(9): p. 1735-42.
246. Iruela-Arispe, M.L., et al., *Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats*. *Circulation*, 1999. **100**(13): p. 1423-31.
247. Nor, J.E., et al., *Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway*. *J Vasc Res*, 2000. **37**(3): p. 209-18.
248. Murphy-Ullrich, J.E. and M. Poczatek, *Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. **11**(1-2): p. 59-69.
249. Schultz-Cherry, S., et al., *Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(13): p. 7304-10.
250. Schultz-Cherry, S., J. Lawler, and J.E. Murphy-Ullrich, *The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(43): p. 26783-8.
251. Schultz-Cherry, S., et al., *Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(43): p. 26775-82.
252. Yee, K.O., et al., *Expression of the type-1 repeats of thrombospondin-1 inhibits tumor growth through activation of transforming growth factor-beta*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(2): p. 541-52.
253. Dawson, D.W., et al., *CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells*. *J Cell Biol*, 1997. **138**(3): p. 707-17.
254. Jimenez, B., et al., *Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1*. *Nat Med*, 2000. **6**(1): p. 41-8.
255. Tandon, N.N., U. Kralisz, and G.A. Jamieson, *Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(13): p. 7576-83.
256. Silverstein, R.L., et al., *Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(23): p. 16607-12.
257. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
258. Nicholson, A.C., et al., *Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(2): p. 269-75.

259. Calvo, D., et al., *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. J Lipid Res, 1998. **39**(4): p. 777-88.
260. Baillie, A.G., C.T. Coburn, and N.A. Abumrad, *Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog*. J Membr Biol, 1996. **153**(1): p. 75-81.
261. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
262. Frieda, S., et al., *Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 2981-6.
263. Klenotic, P.A., et al., *Molecular basis of antiangiogenic thrombospondin-1 type 1 repeat domain interactions with CD36*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(7): p. 1655-62.
264. Gandhi, N.B., et al., *Dendritic cell-derived thrombospondin-1 is critical for the generation of the ocular surface Th17 response to desiccating stress*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(6): p. 1293-301.
265. Yang, K., et al., *Deficiency of thrombospondin-1 reduces Th17 differentiation and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Autoimmun, 2009. **32**(2): p. 94-103.
266. van Bon, L., et al., *Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 433-43.
267. Delaleu, N., et al., *Sjogren's syndrome patients with ectopic germinal centers present with a distinct salivary proteome*. Rheumatology (Oxford), 2016. **55**(6): p. 1127-37.
268. Touma, Z., et al., *SLEDAI-2K 10 days versus SLEDAI-2K 30 days in a longitudinal evaluation*. Lupus, 2011. **20**(1): p. 67-70.
269. Grika, E.P., et al., *Morbidity, mortality, and organ damage in patients with antiphospholipid syndrome*. J Rheumatol, 2012. **39**(3): p. 516-23.
270. Cervera, R., et al., *Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(6): p. 1011-8.
271. Steele, P.P., H.S. Weily, and E. Genton, *Platelet survival and adhesiveness in recurrent venous thrombosis*. N Engl J Med, 1973. **288**(22): p. 1148-52.
272. Bernat, A., et al., *The role of platelets and ADP in experimental thrombosis induced by venous stasis in the rat*. Thromb Res, 1988. **52**(1): p. 65-70.
273. Montoro-Garcia, S., et al., *The Role of Platelets in Venous Thromboembolism*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 242-51.
274. Isordia-Salas, I., et al., *Thrombospondin-1 binds to the heavy chain of elastase activated coagulation factor V (FVaHNE) and enhances thrombin generation on the surface of a promyelocytic cell line*. Thromb Res, 2005. **116**(6): p. 533-43.
275. Stachowicz, A., et al., *Differences in plasma fibrin clot composition in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome compared with venous thromboembolism*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17301.
276. Miossec, P., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Interleukin-17 and type 17 helper T cells*. N Engl J Med, 2009. **361**(9): p. 888-98.
277. Gao, J.B., et al., *Predictive value of thrombospondin-1 for outcomes in patients with acute ischemic stroke*. Clin Chim Acta, 2015. **450**: p. 176-80.
278. Olliver, M., et al., *Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2011. **79**(10): p. 4210-7.
279. Smadja, D.M., et al., *Thrombospondin-1 is a plasmatic marker of peripheral arterial disease that modulates endothelial progenitor cell angiogenic properties*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 551-9.
280. Song, J., et al., *Novel biomarkers for early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation in a mouse cecal ligation and puncture model*. J Inflamm (Lond), 2013. **10**(1): p. 7.

281. Lakhan, S.E., A. Kirchgessner, and M. Hofer, *Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 97.
282. Thakar, C.V., et al., *Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3451-9.
283. Lin, T.N., et al., *Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion*. Stroke, 2003. **34**(1): p. 177-86.
284. Boutin, H., et al., *Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage*. J Neurosci, 2001. **21**(15): p. 5528-34.
285. Gelderblom, M., et al., *Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke*. Blood, 2012. **120**(18): p. 3793-802.
286. Lehrmann, E., et al., *Cytokines in cerebral ischemia: expression of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) mRNA in the postischemic adult rat hippocampus*. Exp Neurol, 1995. **131**(1): p. 114-23.
287. Barry, S.P., et al., *Enhanced IL-17 signalling following myocardial ischaemia/reperfusion injury*. Int J Cardiol, 2013. **163**(3): p. 326-34.
288. Geha, M., et al., *IL-17A Produced by Innate Lymphoid Cells Is Essential for Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury*. J Immunol, 2017. **199**(8): p. 2921-2929.
289. Zhang, J., et al., *IL-17A contributes to brain ischemia reperfusion injury through calcpain-TRPC6 pathway in mice*. Neuroscience, 2014. **274**: p. 419-28.
290. Sharma, A.K., et al., *Natural killer T cell-derived IL-17 mediates lung ischemia-reperfusion injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(11): p. 1539-49.
291. Stein, E.V., et al., *Secreted Thrombospondin-1 Regulates Macrophage Interleukin-1beta Production and Activation through CD47*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19684.
292. Besnard, A.G., et al., *Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation*. J Mol Cell Biol, 2012. **4**(1): p. 3-10.
293. Ioannou, Y., et al., *In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(5): p. 833-42.
294. McNeil, H.P., C.N. Chesterman, and S.A. Krilis, *Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies*. Adv Immunol, 1991. **49**: p. 193-280.
295. Bevers, E.M., et al., *Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin*. Thromb Haemost, 1991. **66**(6): p. 629-32.
296. Cervera, R., et al., *Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(4): p. 1019-27.
297. Mehdi, A.A., I. Uthman, and M. Khamashta, *Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future*. Eur J Clin Invest, 2010. **40**(5): p. 451-64.
298. Pierangeli, S.S., M.E. Vega-Ostertag, and E.B. Gonzalez, *New targeted therapies for treatment of thrombosis in antiphospholipid syndrome*. Expert Rev Mol Med, 2007. **9**(30): p. 1-15.
299. Petri, M., *Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome*. J Autoimmun, 2000. **15**(2): p. 145-51.
300. Sangle, S., et al., *The point prevalence of an abnormal ankle-brachial index in antiphospholipid antibody negative patients with livedo reticularis: a controlled study*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(2): p. 276-7.
301. Roubey, R.A., *Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome*. J Autoimmun, 2000. **15**(2): p. 217-20.
302. Vega-Ostertag, M., et al., *Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(5): p. 1545-54.

303. Patsouras, M.D., et al., *Differential CpG methylation of the promoter of interleukin 8 and the first intron of tissue factor in Antiphospholipid syndrome*. J Autoimmun, 2019. **102**: p. 159-166.
304. Dunoyer-Geindre, S., et al., *NFkappaB is an essential intermediate in the activation of endothelial cells by anti-beta(2)-glycoprotein 1 antibodies*. Thromb Haemost, 2002. **88**(5): p. 851-7.
305. Hanly, J.G., C. Hong, and A. Issekutz, *Beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibody binding to resting and activated cultured human endothelial cells*. J Rheumatol, 1996. **23**(9): p. 1543-9.
306. Curtis, A.M., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(4): p. 701-9.
307. Raschi, E., et al., *beta2-glycoprotein I, lipopolysaccharide and endothelial TLR4: three players in the two hit theory for anti-phospholipid-mediated thrombosis*. J Autoimmun, 2014. **55**: p. 42-50.
308. Sikara, M.P., et al., *{beta}2 Glycoprotein I ({beta}2GPI) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome*. Blood, 2010. **115**(3): p. 713-23.
309. Vlachoyiannopoulos, P.G. and J.G. Routsias, *A novel mechanism of thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome*. J Autoimmun, 2010. **35**(3): p. 248-55.
310. Pierangeli, S.S., et al., *Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin*. Circ Res, 2001. **88**(2): p. 245-50.
311. Zhang, J. and K.R. McCrae, *Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1964-9.
312. Sacharidou, A., et al., *Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium*. Blood, 2018. **131**(19): p. 2097-2110.
313. Holers, V.M., et al., *Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss*. J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 211-20.
314. Kim, M.Y., et al., *Complement activation predicts adverse pregnancy outcome in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid antibodies*. Ann Rheum Dis, 2018. **77**(4): p. 549-555.
315. Erkan, D. and J.E. Salmon, *The Role of Complement Inhibition in Thrombotic Angiopathies and Antiphospholipid Syndrome*. Turk J Haematol, 2016. **33**(1): p. 1-7.
316. Hamid, C., et al., *Anti-beta2GPI-antibody-induced endothelial cell gene expression profiling reveals induction of novel pro-inflammatory genes potentially involved in primary antiphospholipid syndrome*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(8): p. 1000-7.
317. Jin, F., et al., *A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells*. Nature, 2013. **503**(7475): p. 290-4.
318. Morikawa, M., et al., *ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(20): p. 8712-27.
319. Baudin, B., et al., *A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 481-5.
320. Andrews, S. *FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data*. 2010; Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
321. Afgan, E., et al., *The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(W1): p. W537-W544.
322. Trapnell, C., L. Pachter, and S.L. Salzberg, *TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq*. Bioinformatics, 2009. **25**(9): p. 1105-11.
323. Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber, *HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data*. Bioinformatics, 2015. **31**(2): p. 166-9.

324. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. **15**(12): p. 550.
325. Ramirez, F., et al., *deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(Web Server issue): p. W187-91.
326. *Morpheus*. Available from: <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>.
327. Kuleshov, M.V., et al., *Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(W1): p. W90-7.
328. Zheng, R., et al., *Cistrome Data Browser: expanded datasets and new tools for gene regulatory analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(D1): p. D729-D735.
329. McLean, C.Y., et al., *GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(5): p. 495-501.
330. Siddique, S., et al., *Vascular Manifestations in Antiphospholipid Syndrome (APS): Is APS a Thrombophilia or a Vasculopathy?* *Curr Rheumatol Rep*, 2017. **19**(10): p. 64.
331. Engel, B., et al., *Serum of patients with antiphospholipid syndrome induces adhesion molecules in endothelial cells*. *Atheroscler Suppl*, 2017. **30**: p. 141-148.
332. Velasquez, M., et al., *Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association With Clinical Manifestations*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 1840.
333. Espinosa, G., H. Berman, and R. Cervera, *Management of refractory cases of catastrophic antiphospholipid syndrome*. *Autoimmun Rev*, 2011. **10**(11): p. 664-8.
334. Scoble, T., S. Wijetilleka, and M.A. Khamashta, *Management of refractory anti-phospholipid syndrome*. *Autoimmun Rev*, 2011. **10**(11): p. 669-73.
335. Mekinian, A., et al., *Obstetrical APS: is there a place for hydroxychloroquine to improve the pregnancy outcome?* *Autoimmun Rev*, 2015. **14**(1): p. 23-9.
336. Pericleous, C., et al., *Endothelial microparticle release is stimulated in vitro by purified IgG from patients with the antiphospholipid syndrome*. *Thromb Haemost*, 2013. **109**(1): p. 72-8.
337. Velásquez B, M., Á.M. Álvarez G, and Á.P. Cadavid J, *Cuantificación sistematizada de la remodelación vascular in vitro en la morbilidad gestacional asociada al síndrome antifosfolípido*. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 2016. **81**: p. 455-464.