

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
INDIRIZZO: SCIENZE CARDIOVASCOLARI
CICLO XXIII

**STUDIO DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA CON AGGREGOMETRO
AD ELETTRODI MULTIPLI (MULTIPLATE®) E DELLA DISFUNZIONE
ENDOTELIALE CON TECNICA ECOCOLORDOPPLER IN SOGGETTI
TROMBOFILICI.**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Supervisore: Ch.mo Prof. Antonio Pagnan

Dottorando : Fabio Dalla Valle

RIASSUNTO

Introduzione: La correlazione tra malattia trombo embolica venosa e patologia arteriosa è un dato che ormai affascina e riscuote l'interesse di molti studiosi. Già nel 2003 Prandoni et al misero in evidenza tale possibile correlazione; molti altri studi hanno successivamente consolidato tale dato dimostrando anche la condivisione di numerosi fattori di rischio (diabete, ipertensione arteriosa, dislipidemia, fumo di sigaretta). Il complesso meccanismo coagulativo è influenzato da molteplici attori: fattori della coagulazione, cellule ematiche (leucociti, piastrine) e dall'endotelio vascolare. Molte delle indagini tuttora utilizzate per la coagulazione valutano solo una parte di questa complessa cascata coagulativa, ma il ruolo svolto dalle piastrine e dall'endotelio non è ancora chiarito. In particolare, in uno specifico sottogruppo della popolazione, i soggetti trombofilici, i quali presentano un deficit degli inibitori naturali della coagulazione (proteina C, proteina S e antitrombina) e che manifestano una maggiore incidenza della malattia tromboembolica venosa e, anche se in misura differente, dell'aterotrombosi. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la funzione endoteliale, attraverso l'utilizzo di tecnica ecografica dell'arteria brachiale della dilatazione flusso mediata (FMD) e l'aggregazione piastrinica, attraverso l'uso di aggregometro basato sull'impedenziometria con elettrodi multipli (Multiplate®), in un gruppo di soggetti con difetto degli inibitori naturali della coagulazione rispetto ad un gruppo di volontari sani.

Materiali e metodi: nel gruppo dei casi sono stati arruolati, dopo consenso informato, 68 soggetti con difetto noto degli inibitori della coagulazione (deficit di Prot C, Prot S o antitrombina) e nel gruppo dei controlli 59 soggetti volontari sani confrontabili per sesso ed età (± 3 anni). Sono stati esclusi dallo studio soggetti con età inferiore ai 18 aa, che si sono rifiutati di firmare il consenso informato, che assumevano terapia anticoagulante o

antiaggregante piastrinica o con piastrinopenia (conta piastrinica $<150 \times 10^9/L$) o piastrinosi (conta piastrinica $>450 \times 10^9/L$).

Tutti i soggetti arruolati allo studio sono stati sottoposti a raccolta anamnestica dettagliata relativa a fattori di rischio e precedenti cardiovascolari o tromboembolici venosi; ciascuno di essi inoltre è stato sottoposto a prelievo di 18 ml di sangue venoso per esecuzione di test della coagulazione classica e studio ipercoagulabile (proteina C, proteina S, antitrombina, variante protrombinica, fattore V Leiden anticorpi antifosfolipidi). Su ogni campione di sangue veniva effettuato studio dell' aggregazione piastrinica con aggregometro ad impedenza ad elettrodi multipli (Multiplate®), che eseguiva contemporaneamente più test (ASPItest, ADPtest e TRAPtest). Infine su ogni soggetto è stata eseguita valutazione ecografica della disfunzione endoteliale mediante valutazione della dilatazione flusso mediata (FMD) con misurazione dell'arteria brachiale prima e dopo iperemia.

Risultati: i soggetti con difetto trombofilico presentavano caratteristiche demografiche sovrapponibili a quelle dei controlli sani. L'incidenza di eventi trombo embolici venosi è risultata ovviamente più elevata nel gruppo dei casi; mentre i soggetti trombofilici hanno mostrato di aver sviluppato in età più giovane eventi cardiovascolari. Nella valutazione dell'aggregazione piastrinica studiata con il Multiplate® , con differenti test di stimolazione (ASPI, ADP e TRAP) sono emerse differenze della AUC (area sotto la curva) che esprime in modo quantitativo l'aggregazione piastrinica che tuttavia non sono risultate statisticamente significative; il dato si è confermato anche nella valutazione dei casi, prendendo in considerazione singolarmente ogni difetto trombofilico. In relazione alla valutazione della disfunzione endoteliale mediante ecografia dell'arteria brachiale si è evidenziato un decremento statisticamente significativo della dilatazione flusso mediata (FMD) nei casi rispetto ai controlli ($3.7 \pm 0.5\%$ vs $5.2 \pm 0.6\%$, $p \text{ value} = 0.015$), mentre sono risultati di dimensioni sovrapponibili il diametro e il flusso basale del vaso.

Discussione: Per quanto riguarda la valutazione aggregometrica su sangue intero, i dati raccolti, non hanno evidenziato una differenza significativa dell'aggregazione piastrinica valutata con i test di induzione (TRAP, ADP, ASPI) nei soggetti trombofilici rispetto ai controlli. Tale dato potrebbe quindi essere interpretato come l'assenza di una "intrinseca" iperaggregabilità delle piastrine di questi soggetti che possa essere l'innescò della cascata trombotica a cui essi vanno più spesso incontro.

In relazione allo studio della funzione endoteliale i dati hanno mostrato che esiste una riduzione della dilatazione dell'arteria brachiale post fase iperemica che in valore percentuale è significativamente più bassa nei soggetti trombofilici rispetto ai controlli. Il dato quindi sembra confermare che nei soggetti con deficit degli inibitori della coagulazione, con noto incremento dell'incidenza di eventi tromboembolici, sia la disfunzione endoteliale a rappresentare il determinante capace di innescare tale processo.

SUMMARY

Background: the link between venous thromboembolism (VTE) and arterial thromboembolic events (ATE) is still uncertain. In 2003 Prandoni et al published the first study that reported a connection, in term of etiopathogenesis between VTE and atherosclerosis. During the last few years several other study confirm this association, that could be attributed to common risk factors for the two conditions. The contribution of thrombophilic defects to the link between VTE and ATE has yet to be defined. Thrombophilic conditions (hereditary deficiencies of protein S, protein C and antithrombin) have been recognized as most potent thrombophilic conditions for VTE. Whether hereditary protein S, Protein C or antithrombin deficiency also are involved in the development of ATE need to be confirmed and the evidence of a possible association has been showed mainly from case reports. Blood haemostasis is a complex mechanism influenced from coagulation factors, aggregation proteins, blood cells (platelets, leucocytes) and vascular endothelium. Most of biochemical tests focused on coagulation system asses only a part of this complex mechanism and, in particular, the laboratory tests analyze only the coagulations cascade. But the role of platelets and vascular endothelium is not clear. The contribution of thrombophilic defects as common risk factor between VTE and ATE has yet to be defined compared with nondeficient family members. Moreover in this study the endothelial dysfunction could be the real cause for both conditions VTE and ATE. There are no data concerning the role of platelets function or vascular endothelium function in this thrombophilic patients population.

The aim of the study is to define, in thrombophilic patients (Prot C, Prot S and antithrombin defects) compared with non-deficient family members. the role of platelets function using a new analyzer named Multiplate® whole blood aggregometry that evaluated platelets aggregations in whole blood and to define also the possible implication of endothelial

function, by the non-invasive assessment of flow mediated dilatation (FMD) of the brachial artery, by B-mode ultrasonography, using a standardized procedure

Material and Methods: after signing an informed consent, we enrolled patients with thrombophilic defects (cases) and create three subgroups (cases with deficit of protein C, protein S and antithrombin) with and without a history of thromboembolic disease, and subjects without thrombophilic defects (controls). We collected baseline data of all (cases and controls) on previous episodes of VTE and ATE, risk factors for atherosclerosis (i.e. hypertension, diabetes mellitus, cigarette smoking; hyperlipidemia) All patients were tested for thrombophilic defects in addition to their index deficiencies (FV Leiden, G20210 A prothrombin, lupus anticoagulant; PC and PS, AT). Moreover, we study platelets aggregations with a new analyzer named Multiplate® whole blood aggregometry that evaluated platelets aggregations in whole blood with thrombin inhibitor (irudin); this instrument identify the electrical impedance (as area under curve, AUC) caused from platelets aggregation. The platelets aggregation was triggered by different activators: adenosine-5 diphosphate (ADP test), arachidonic acid (ASPI test) and thrombin receptor activatin peptide (TRAP -6)

All cases and controls underwent evaluation of endothelial function by the non-invasive assessment of flow mediated dilatation (FMD) of the brachial artery, by B-mode ultrasonography, using a standardized procedure.

Results: patients with thromphilic defects versus controls have similar demographical charatistics. The valutation of the platelets aggregation by Multiplate® with different tests (ASPI, ADP and TRAP) show a different in the two groups but it is no statistically significant; we observed the same results if analyze the three subgroups (Protein C defects, Protein S and antithrombin deficiency) protein separately. The ultrasonography evaluation of endothelial function show that there is a reduction of the flow mediated dilatation (FMD) in patients with thrombophilic defects versus controls. The FMD calculated in thrombophilic

patients is statistically significant ($3.7 \pm 0.5\%$ vs $5.2 \pm 0.6\%$, p value = 0.015) compared the controls.

Discussion: Our preliminary data show that in patients with thrombophilic deficiency there is increased of platelets aggregation but it's no statically significant. This results is confirm also in all different subgroups of thromphilic deficiency (Prot C, S, and AT deficiency). However an endothelial dysfunction is showed in thrombophilic patients compared the controls. Although we speculated with this data, as other study have reported, that endothelial dysfunction rather than coagulation disorders is the main actor in the link between VTE and ATE in thrombophilic subjects. It is yet unclear the role of the different actors (endothelium dysfunction, platelet aggregation and coagulation factors) in the development on VTE and ATE, but this study can show that endothelium dysfunction can be one of the most important trigger factor in the thrombophilic patients.

INDICE	
RIASSUNTO	1
SUMMARY	5
INTRODUZIONE	11
<i>ENDOTELIO E DISFUNZIONE ENDOTELIALE</i>	14
<i>PIASTRINE: MEGACARIOPOIESI E FUNZIONALITA' PIASTRINICA.</i>	16
<i>PIASTRINE ED EMOSTASI</i>	18
<i>STUDIO DELLA FUNZIONE PIASTRINICA</i>	23
<i>SINDROMI TROMBOFILICHE E TROMBOSI ARTERIOSE</i>	29
<i>I DIFETTI DEGLI INIBITORI NATURALI</i>	30
SCOPO DELLO STUDIO	35
MATERIALE E METODI	37
<i>PAZIENTI</i>	37
<i>COAGULAZIONE CLASSICA E TROMBOFILIA</i>	38
<i>STUDIO DELLA FUNZIONE PIASTRINICA CON MULTIPLATE</i>	39
<i>DILATAZIONE FLUSSO MEDIATO (FMD)</i>	40
<i>ANALISI STATISTICA</i>	42
RISULTATI	43
<i>CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE ARRUOLATA</i>	43
<i>STUDIO DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA</i>	45
<i>VASODILATAZIONE FLUSSO MEDIATA</i>	46
DISCUSSIONE	49
BIBLIOGRAFIA	55
TABELLE E FIGURE	67

INTRODUZIONE

La malattia tromboembolica venosa e la malattia aterosclerotica costituiscono due condizioni con un evidente impatto sanitario e sociale; dati importanti infatti evidenziano come la prima causa di morte intraospedaliera sia rappresentata dall'embolia polmonare e la prima causa di morte nella popolazione generale sia tuttora rappresentata dalle patologie cardiovascolari. Queste due condizioni patologiche fino ad alcuni anni fa, per la loro fisiopatologia e le differenti manifestazioni cliniche, non venivano mai messe in correlazione, ma considerate come due entità separate. Tuttavia, soprattutto negli ultimi anni, ci sono elementi che suggeriscono che questa dicotomia potrebbe essere una semplificazione eccessiva¹.

La natura del trombo nelle due diverse patologie sembra mostrare sostanziali differenze: i trombi nel distretto arterioso sono formati prevalentemente da aggregati piastrinici tenuti assieme da piccole parti di fibrina che si formano sulla superficie della lesione aterosclerotica, mentre i trombi a livello venoso sono prevalentemente composti da fibrina e globuli rossi. E' pur vero, tuttavia, che trombi ricchi di fibrina si riscontrano nell'appendice del ventricolo sinistro in pazienti con fibrillazione atriale (FA) e nelle coronarie di pazienti con infarto miocardico. I farmaci anticoagulanti, infatti, sono molto efficaci nella prevenzione di embolia sistemica arteriosa, nella FA² e nel trattamento delle patologie coronariche³.

Le piastrine giocano un ruolo altrettanto fondamentale nella formazione del trombo a livello venoso e i farmaci antiaggreganti piastrinici sembrano essersi dimostrati efficaci nella prevenzione della patologia tromboembolica, benché in minor misura rispetto alla terapia anticoagulante^{4,5}. A dimostrazione di ciò un recente studio avrebbe evidenziato un ruolo dell'acido acetilsalicilico nella profilassi secondaria della malattia trombotica. Altro esempio è rappresentato da soggetti con fattori di rischio cardiovascolare noti che hanno presentato

come primo evento una trombosi venosa retinica⁶: nel follow-up le maggiori cause di mortalità sono state rappresentate, con maggior frequenza, da eventi vascolari arteriosi.

La potenziale associazione tra malattia trombo embolica (VTE) venosa e malattia aterosclerotica trova un suo primo riscontro già nel 1996 e 1997 quando due studi su pazienti al primo episodio di trombosi venosa profonda, seguiti nel follow-up per valutare l'incidenza di recidive di VTE e di patologia post trombotica^{7,8}, mettevano in luce l'elevata e inaspettata incidenza di mortalità per infarto miocardico, stroke ischemico o morte improvvisa. Dopo questi dati preliminari, lo sforzo di alcuni gruppi di lavoro fu indirizzato a definire l'associazione tra aterosclerosi e tromboembolismo venoso.

Prandoni e coll. nel 2003 pubblicarono sul *New England Journal Medicine* uno studio caso-controllo su pazienti con primo episodio di TVP senza aterosclerosi sintomatica e 150 controlli sani⁹. In tale studio si confrontò la presenza di placche a livello carotideo in pazienti con TVP idiopatica, in pazienti con TVP secondaria e nei controlli. Nei soggetti con TVP idiopatica la presenza di placche a livello carotideo fu del 47.1%, confrontata con il 27.4% nei pazienti con TVP secondaria e il 32.0% nei controlli. L'Odd Ratio (OR) nei pazienti con TVP idiopatica confrontata con i pazienti con TVP secondaria e i controlli fu rispettivamente del 2.3 (95% CI, da 1.4 a 3.7) e 1.8 (95% CI, da 1.1 a 2.9) e tale dato non si modificò anche nell'analisi multivariata. Questo straordinario risultato, che rappresentò la base di numerosi e successivi studi, confermò l'associazione tra la patologia aterosclerotica e la VTE idiopatica.

Numerosi trials clinici evidenziano come alcuni fattori di rischio risultino comuni ad entrambe le patologie; in primis, l'età, noto fattore di rischio per patologia cardiovascolare, è stato riconosciuto ormai anche come fattore di rischio per patologia trombotica venosa¹⁰. Altri studi caso-controllo hanno preso in considerazione l'associazione tra patologie trombotiche e arteriopatia agli arti inferiori^{11,12}.

In uno studio prospettico di *Goldhaber e coll.* emerse come nel gruppo di donne oggetto dello studio, come alcuni fattori di rischio noti per aterosclerosi, come il fumo di sigaretta, l'obesità e l'ipertensione arteriosa fossero predittori indipendenti per embolia polmonare¹³. Successivamente uno studio prospettico ha messo in luce l'associazione tra fumo di sigaretta, obesità ed embolia polmonare^{14,15,16}. *Hong e coll.* hanno messo evidenziato non solo che diabete ed ipertensione sono associati ad eventi tromboembolici idiopatici con maggiore incidenza rispetto a controlli sani, ma anche una maggiore prevalenza di calcificazioni coronariche nei soggetti con VTE idiopatica¹⁷. Si è dimostrato, inoltre che donne in terapia estroprogestinica e pazienti con presenza di lupus anticoagulant hanno un maggiore rischio, rispetto ad una popolazione sana, per aterosclerosi e trombosi venosa¹⁸. Più recentemente l'ipercolesterolemia e livelli particolarmente elevati di colesterolo LDL e di lipoproteina(a) sono stati dimostrati essere correlati, anche se con dati discordanti, con un alto rischio di VTE¹⁹⁻²². *Decensi e coll.* ha evidenziato un aumentato rischio di VTE correlata all'uso di tamoxifene in donne affette da carcinoma al seno e con fattori di rischio per aterosclerosi²³. Una interessante metanalisi di *Agno* pubblicata su *Circulation* ha preso in considerazione tutti gli studi pubblicati dal 1966 al 2006 sulla malattia tromboembolica venosa combinando i risultati ottenuti con una nuova ricerca ove venivano presi in considerazione anche i fattori di rischio cardiovascolare: il principale dato emerso è che la presenza dei fattori di rischio di patologia cardiovascolare si associa ad un incremento del rischio di VTE. Questa associazione tra VTE e aterotrombosi è clinicamente rilevante se si considerano lo screening individuale, la modificazione dei fattori di rischio e la prevenzione primaria o secondaria di VTE²⁴.

Da quanto sin qui esposto emerge quindi come l'età, l'obesità, il fumo di sigaretta, l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia e la sindrome metabolica²⁵⁻²⁸ sembrano suggerire un link tra la patologia arteriosa e quella venosa; i meccanismi di quest'associazione tuttavia non risultano ancora chiari. Da un lato, l'aterosclerosi può potenzialmente permettere lo

sviluppo di trombosi anche nel sistema venoso attraverso l'attivazione piastrinica e la cascata coagulativa. Infatti, in pazienti con arteriopatia periferica il riscontro di elevati valori di D-Dimero e fibrinogeno e l'incremento in pazienti con patologia coronarica di Fattore von Willebrand (vWF), antigene attivato del plasminogeno tissutale, D-Dimero e Fattore VII, evidenziano una spinta protrombotica verso eventi trombotici venosi.

Dall'altro lato, le due patologie possono essere scatenate contemporaneamente dagli stessi stimoli responsabili dell'attivazione della cascata coagulativa e del processo infiammatorio sia sul sistema venoso che arterioso.

Ad oggi non è possibile, quindi, sostenere una conclusione definitiva sul problema ma appare certo che, mentre l'aterosclerosi asintomatica non è predittiva per VTE, il contrario sembra essere vero. Molti studi, infatti, tendono ad evidenziare come vi sia un incremento di eventi cardiovascolari in pazienti con pregresso evento tromboembolico. Questo rischio sembra inoltre aumentare in pazienti con VTE idiopatica e con persistenza di residuo trombotico nel follow-up ecografico. Pertanto, pazienti con una storia di VTE idiopatica possono essere sottoposti ad indagini ulteriori per identificare aterosclerosi asintomatica, alla ricerca di eventuali fattori di rischio su cui si possa intervenire precocemente.

ENDOTELIO E DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Il trombo, che si formi sull'asse vascolare arterioso o venoso, riconosce tuttavia uno stesso scenario che può profondamente influenzare il processo trombotico stesso: la superficie endoteliale vascolare.

L'endotelio controlla la cascata coagulativa e media anche il processo opposto anticoagulativo, interviene nella vasodilatazione, previene l'adesione e l'attivazione piastrinica e controlla la proliferazione delle cellule muscolari lisce e l'aterogenesi. E' quindi

presumibile pensare che su tale palcoscenico cellulare si possa riconoscere la comune patogenesi tra tromboembolismo venoso ed aterosclerosi.

La disfunzione endoteliale è un marker precoce di aterosclerosi che deriva da un alterato rilascio di fattori vasodilatatori e antitrombotici dall'endotelio. Fumo, ipertensione, elevati livelli di colesterolo, patologie renali e obesità così come condizioni cliniche che comportino un incremento di marcatori dell'infiammazione, come la Proteina C, sono associate con una disfunzione endoteliale²⁹. Alcuni studi hanno mostrato una correlazione diretta tra la gravità della disfunzione endoteliale e il rischio di iniziali o recidive di eventi cardiovascolari.

La misurazione della vasodilatazione flusso-mediata (FMD, *flow-mediated vasodilation*) è un metodo non invasivo per la valutazione della disfunzione endoteliale, che riflette la capacità delle cellule endoteliali di indurre una vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico (NO) in risposta ad un incremento del flusso sanguigno e, conseguentemente, dello shear stress (iperemia reattiva) che costituisce a sua volta il principale stimolo per il rilascio di NO da parte delle cellule endoteliali. Nel 1992 *Celermajer et al* pubblicarono sul *Lancet* uno studio sulla valutazione non invasiva della funzionalità endoteliale basato sull'ultrasonografia B-mode, in soggetti con fattori di rischio per aterosclerosi³⁰. Successivamente, la tecnica ecografica di valutazione della disfunzione endoteliale fu rivista da *Corretti, Celermajer et al* e nel 2003 furono pubblicate sul *J. American College of Cardiology* le linee guida per la valutazione dell'FMD dell'arteria brachiale³¹. Tale metodica è largamente applicabile per identificare la disfunzione endoteliale in un gran numero di soggetti e può essere ripetuto più volte. L'FMD è ridotta in soggetti con aterosclerosi e fattori di rischio per aterosclerosi. In particolare uno studio di *Migliacci* del 1996 pubblicato sul *New England Journal Medicine* ha mostrato come il fumo di sigaretta sia associato con una disfunzione endoteliale NO-mediata³². Altri studi hanno inoltre evidenziato come ipertensione arteriosa³³, alti livelli di colesterolo³⁴, diabete³⁵ e insufficienza renale³⁶ si associno ad una riduzione della funzionalità

endoteliale NO-mediata. L'FMD inoltre è correlata anche con la vasodilatazione coronarica e con markers sierologici di alterazione dell'endotelio e proprio quest'aspetto ha dato seguito a numerosi studi anche in ambito cardiologico³⁷⁻⁴³.

Se l'endotelio è il palcoscenico comune ad entrambi gli eventi trombotici (arteriosi e venosi) gli attori coinvolti nel processo coagulativo sono molteplici; tale processo infatti è un complesso di eventi fisiopatologici indirizzati all'arresto degli eventi emorragici mediante la formazione del trombo emostatico e riconosce due fasi: l'emostasi primaria precoce che porta alla formazione del "tappo bianco" e la coagulazione più tardiva o secondaria che porta alla formazione del "tappo rosso". Le reazioni emocoagulative si svolgono per mezzo di proteine mantenute come proenzimi inattivi in modo concatenato, così che ciascuno di essi viene opportunamente trasformato in fattore attivato: questo realizza la cascata coagulativa che porta alla formazione del "tappo emostatico". Altre proteine partecipano successivamente alla formazione del coagulo; in particolare, il FV della coagulazione nella sua forma attivata (FVa) partecipa assieme al fattore X attivato (FXa), al Ca^{2+} e ai fosfolipidi di membrana alla formazione della protrombinasi, complesso enzimatico atto alla formazione successiva del fattore II nella sua forma attivata. Quest'ultimo converte il fibrinogeno in fibrina che permette la formazione delle maglie del coagulo fibrinico.

Oltre a questa complessa struttura e concatenata cascata proteica ed enzimatica non bisogna tuttavia dimenticare il fondamentale ruolo svolto da altri importanti elementi corpuscolati che da un lato rappresentano l'innescò della cascata e dall'altro ne vengono coinvolti: le piastrine.

PIASTRINE: MEGACARIOPOIESI E FUNZIONALITA' PIASTRINICA

Le piastrine sono piccoli frammenti subcellulari (2-5 μm di diametro, 0.5 μm di spessore e 6-10 fl di volume) con una emivita media di 7-10 giorni che presentano in una concentrazione compresa tra 150 e 450 $\times 10^9/\text{L}$.⁴⁴ Esse originano dal citoplasma dei

megacariociti, le uniche cellule ematologiche poliploidi. La megacariocitopoiesi ha inizio nel midollo osseo dall'emangioblasto e, passando per il progenitore megacariocitario comune, porta alla formazione dei primi elementi indirizzati in senso megacariocitario, il promegacariocitoblasto, che ha diametro di 7-10 μm e rappresenta uno dei primi elementi con una positività per la perossidasi piastrinica (marcatore precoce della serie piastrinica).

Proseguendo nella maturazione si ha la formazione del megacariocito maturo (diametro di circa 20-50 μm), che si caratterizza per un nucleo multilobulato e abbondante citoplasma acidofilo con numerosi granuli azzurrofilari. La proliferazione dei megacariociti avviene per replicazione del DNA non seguita da divisione mitotica, che porta alla formazione di grandi cellule poliploidi. Durante questi passaggi il citoplasma dei megacariociti sviluppa un ampio sistema di membrane chiamato "membrana di demarcazione"; tale sistema ha origine dall'invaginazione della membrana plasmatica e comunica con l'esterno⁴⁴

I megacariociti più maturi sono localizzati in prossimità dei sinusoidi midollari e sviluppano dei filopodi che penetrano all'interno dei capillari midollari; la frammentazione di queste proiezioni dà origine alle piastrine⁴⁵.

Nel midollo, in risposta allo stimolo di molte citochine, chemochine e interazioni con le cellule dello stroma midollare, ha completamento il processo di megacariocitopoiesi. Il fattore di crescita più importante è la trombopoietina (TPO), una glicoproteina prodotta nel fegato omologa all'eritropoietina per circa il 23% della sua struttura. La TPO agisce legandosi al recettore c-mpl espresso dall'emangioblasto, dalle cellule endoteliali, dalle cellule staminali, dai precursori megacariocitari e dalle piastrine⁴⁶. A seguito del legame con la TPO, mpl va incontro a un cambiamento conformazionale che porta all'attivazione della via delle Janus chinasi (JAK) che dà inizio a sua volta ad una serie di eventi che svolgono un ruolo chiave nel promuovere la sopravvivenza e la proliferazione megacariocitaria.⁴⁷⁻⁴⁹

Le piastrine nella loro condizione di riposo si presentano con una forma discoidale⁵⁰; la loro superficie è delimitata dalla membrana piastrinica che ha struttura stratificata rivestita da uno strato esterno, il glicocalice, contenente il glicocalicina, una frazione della glicoproteina Ib. Sotto la membrana piastrinica e in continuità con l'estremità interna delle glicoproteine si trova il citoscheletro, struttura contrattile deputata al mantenimento della forma ellissoidale delle piastrine a riposo, alla formazione degli pseudopodi e alla centralizzazione del granulomero nel corso dell'attivazione piastrinica. Non associato alla membrana sembra invece il sistema tubulare denso, coinvolto nel metabolismo dell'acido arachidonico.⁵¹

Da un punto di vista biochimico le piastrine contengono tutti i componenti cellulari delle altre cellule, eccetto il DNA.⁴⁶

Le piastrine, elemento chiave nella gestione e formazione del tappo emostatico, svolgono un ruolo cruciale in molti altri processi quali la guarigione delle ferite, l'infiammazione, la difesa antimicrobica, l'angiogenesi, la crescita tumorale e il processo di metastatizzazione.⁵² Esse sono in grado di reclutare leucociti nei siti di danno vascolare e trombosi, immagazzinano, producono e rilasciano fattori pro e anti-infiammatori, fattori angiogenetici e microparticelle. In modelli sperimentali queste funzioni sembrano poter contribuire allo sviluppo di complessi processi patologici quali l'aterosclerosi, la sepsi, l'epatite, la restenosi vascolare, il rigetto di organi trapiantati e l'edema polmonare acuto.

PIASTRINE ED EMOSTASI

Le piastrine svolgono nel processo emocoagulativo un ruolo sia meccanico che biochimico, attraverso diversi meccanismi: l'adesione e l'aggregazione.⁵¹

Le piastrine circolanti normalmente non aderiscono alla superficie endoteliale o alle altre cellule del sangue; quando, però, vengono esposte a una superficie vascolare danneggiata in un sistema reologicamente attivo queste aderiscono alla superficie subendoteliale. L'adesione,

definita quindi come legame delle piastrine a superfici non piastriniche, di per sé non causa alterazioni maggiori nella forma e struttura delle piastrine⁴⁸.

Le piastrine aderiscono rapidamente alle strutture subendoteliali (la membrana basale endoteliale non pare coinvolta nel processo) quali il collagene, le microfibrille e le fibre elastiche nei grossi vasi. Nel primo caso, tramite un processo energia dipendente; nel secondo, mediante il legame tra le glicoproteine di membrana Ib (recettore per il vWF) e Ia (recettore per il collagene) e con l'intervento del vWF e delle altre proteine adesive di origine endoteliale (fibronectina, vimentina, trombospondina e laminina)⁴⁹.

L'adesione piastrinica è misurabile *in vitro* mediante la differenza tra conteggio piastrinico prima e dopo il passaggio del sangue attraverso colonnine di vetro; risulta diminuita nella rara carenza congenita di GpIa, nella malattia di von Willebrand, per deficienza del fattore di von Willebrand e nella sindrome di Bernard Soulier⁵⁰.

Il primo cambiamento morfologico delle piastrine attivate osservato al microscopio è la rapida trasformazione della loro morfologia, normalmente discoidale in “sfere spinose” con numerose piccole protrusioni o filopodi. Questo cambiamento è associato all'attivazione dell'apparato contrattile delle piastrine ed è osservato prima e durante la reazione di rilascio. Il cambiamento morfologico avviene in assenza di calcio (come appare evidente dal fatto che avviene anche quando l'aggregazione è inibita dall'EDTA o manca, per altri motivi, come ad esempio nei pazienti con tromboastenia). Questo cambiamento è molto diverso dallo *sweeling* ossia il cambiamento morfologico conseguente al raffreddamento prolungato o all'incubazione con EDTA o cocaina, che presumibilmente è la conseguenza di un indebolimento dei processi metabolici richiesti per mantenere una normale configurazione cellulare e potrebbe riflettere una depolarizzazione reversibile dei microtubuli.

L'altro importante processo piastrinico è l'aggregazione, definita come il legame delle piastrine le une con le altre. Numerosi agenti biologici sono in grado di attivare le piastrine.

Alcuni attivano direttamente le piastrine (ADP, trombina, norepinefrina e epinefrina, serotonina, vasopressina, radicali dell'O₂); altri, detti agenti che promuovono una aggregazione secondaria, favoriscono la reazione di rilascio e/o la produzione di prostaglandine (endotossine batteriche, virus, PCR, plasmina, ristocetina, acetilcolina, acido arachidonico) che inducono un'aggregazione detta secondaria perché indotta appunto dalla reazione di rilascio⁵¹.

L'aggregazione determinata da agenti che inducono aggregazione primaria in alcune circostanze può essere bifasica: si ha una prima onda data dall'azione dell'agente, cui segue una seconda fase data dall'aggregazione successiva alla reazione di rilascio. La minima concentrazione di un agente capace di indurre aggregazione primaria è detta concentrazione soglia di quell'agente. Gli attivatori con importanza fisiologica si legano alla superficie delle piastrine tramite specifici recettori.

In vitro, in condizioni controllate, il cambiamento di forma e la fase iniziale dell'aggregazione precedono la reazione di rilascio; ma la sequenza esatta degli eventi *in vivo* tuttavia non è nota.

Il cambiamento morfologico delle piastrine è associato alla centralizzazione del sistema granulare piastrinico. La contrazione delle piastrine che porta alla centralizzazione di tale apparato è dovuta alla liberazione degli ioni calcio da parte del sistema tubulare denso, necessari per la funzione contrattile del sistema actina-miosina ATPasi dipendente. Per azione della fosfolipasi C, calcio-dipendente, si ha liberazione di acido arachidonico e di PAF piastrinico dai fosfolipidi di membrana^{53,54}.

Dall'acido arachidonico, per opera delle ciclossigenasi, si generano le prostaglandine G₂ e H₂; da queste, la trombossano-sintetasi genera trombossano A₂ e malonildialdeide. Quest'ultima, biologicamente inattiva sulle piastrine, viene eliminata con le urine e può essere considerata indice dell'attività trombino-sintetasi.

Il trombossano A2, con forti proprietà aggregante e vasocostrittiva, è instabile e viene subito convertito in trombossano B2, più stabile e responsabile della *release reaction*. Parallelamente le cellule endoteliali, per mezzo di una prostaciclina-sintetasi, sono in grado di produrre prostaciclina a partire dai loro fosfolipidi di membrana, con azioni opposte al trombossano B2.

Se lo stimolo di aggregazione è debole si ha una iniziale fase di aggregazione primaria che è ancora reversibile con ritorno alla normalità della morfologia piastrinica. Per stimoli più forti, invece, si ha l'aggregazione secondaria che è invece irreversibile, con conseguente secrezione piastrinica (*release reaction I*) e liberazione del contenuto dei corpi densi che restano svuotati nel citoplasma perdendo gradualmente la loro individualità. L'ADP liberata induce, a sua volta, la *release reaction II* con liberazione del contenuto degli alfa granuli; le piastrine vengono così svuotate del loro contenuto e l'amplificazione del processo porta alla formazione del trombo piastrinico emostatico⁴⁸. Quando il trombo piastrinico si è formato, tende a ridursi di volume per effetto di un processo che dipende dall'apparato contrattile delle piastrine e che coinvolge i filamenti di actina e di miosina: attraverso una fosforilazione vengono attivati i filamenti di actina legati alle glicoproteine di membrana Ib/IIIa che attraverso filamenti di fibrina all'esterno delle cellule creano una forza contrattile cui consegue la retrazione del coagulo.

Per quanto riguarda i rapporti tra emostasi primaria e coagulazione, le piastrine favoriscono l'attivazione dei fattori di contatto (FXII, FXI, HMWK). In seguito i fosfolipidi a carica negativa delle membrane piastriniche e, principalmente, la fosfatidilcolina, vanno a costituire insieme al FV, al FX e agli ioni calcio, la protrombinasi che attiva il FII.

Infine, esistono altre funzioni piastriniche non strettamente legate a quella coagulativa ma che rendono la piastrina un elemento molto interessante. Le piastrine possono secernere mediatori e/o modificare la loro membrana permettendo loro di interagire con altre cellule,

modulandone le funzioni: in particolare, per esempio, sono in grado di esprimere in superficie la P selectina che è modula l'interazioni piastrine-leucociti e il legame con la frazione C3b del complemento, dando così inizio all'attivazione del complemento sulla superficie piastrinica.

I leucociti possono infatti "rotolare" (rolling) su un tappeto di piastrine in modo fondamentalmente simile a quanto avviene con l'endotelio infiammato, possono aderirvi fermamente e passarvi attraverso.⁵⁵ Le piastrine, inoltre, producono alcune molecole sia pro che anti-infiammatorie e possiedono meccanismi extracellulari unici che traducono l'mRNA in modo segnale-dipendente con produzione di fattore tissutale implicato sia nell'emostasi che nella infiammazione.

Come precedentemente segnalato molte patologie sono associate con l'attivazione delle piastrine e con le interazioni piastrine-leucociti; per esempio nel rigetto del trapianto⁵⁶ mediato da alloanticorpi: le interazioni tra le piastrine, le cellule dendritiche, i linfociti T e B potrebbero contribuire alla vasculopatia nei trapianti. Le citochine secrete dalle piastrine attivate stimolerebbero le cellule T che a loro volta, tramite interazioni tra CD40 e CD154, spingerebbero le piastrine a produrre una quantità ancora maggiore di queste citochine⁵⁷⁻⁵⁹. Le piastrine inoltre sembrerebbero svolgere un ruolo anche nell'angiogenesi, esse contengono infatti sia stimolatori (Vascular Endothelial Grow Factor, VEGF) che inibitori di questo processo, regolandolo localmente grazie a un meccanismo legato alla segregazione dei fattori pro e anti-angiogenetici in due distinte popolazioni di α granuli⁶⁰⁻⁶⁴.

Altro interessante ruolo è legato all'aterosclerosi: in modelli murini il danno endoteliale all'arteria femorale causato dal contatto tra il filo dell'angioplastica con l'endotelio stesso, è seguito da una reazione stereotipata di deposizione di piastrine, reclutamento leucocitario e alterazione della composizione arteriosa che si traduce in un ispessimento fibrointimale di cui la P selectina rappresenta probabilmente una delle chiavi di tale processo.

STUDIO DELLA FUNZIONE PIASTRINICA

Nello studio della funzione piastrinica si possono utilizzare vari test: *in vivo* e *in vitro*, tra questi ultimi inoltre esistono indagini che si possono eseguire su sangue intero e su plasma ricco di piastrine.

Il primo test utilizzato per lo studio della funzione piastrinica *in vivo* è il tempo di sanguinamento, misurato praticando un taglietto di 10 mm di lunghezza e 1 mm di profondità sulla superficie volare dell'avambraccio e gonfiando il bracciale di uno sfigmomanometro fino a 40 mmHg⁶⁵; la ferita viene tamponata ogni 30 secondi fino a che il sanguinamento cessa. Il tempo di sanguinamento normale è inferiore a 10 minuti⁶⁶. Esso di sanguinamento può essere prolungato se la conta piastrinica è inferiore alle $100 \times 10^9/L$.

Tale test è semplice, rapido e non necessita di processare il campione; esso è però limitato dalla dipendenza dall'operatore, dalla temperatura e dallo spessore della cute ed è inoltre influenzato da molte condizioni patologiche, farmaci e fattori fisiologici, non tutti legati alle piastrine.

Il metodo *in vitro*, classicamente più usato per studiare l'aggregazione piastrinica è costituito dall'aggregometro a trasmissione luminosa di Born. Tale metodo misura l'aggregazione su plasma ricco di piastrine (PRP) ottenuto dalla centrifugazione per 15 minuti a 135 g di sangue anticoagulato con citrato o eparina.

Il PRP così ottenuto a 35°C viene posizionato in una cuvette contenente una barretta di metallo che ruota per effetto di un campo magnetico. Ciò che viene misurato è la luce trasmessa attraverso il PRP con un fotometro. Si registra quindi il decremento della trasmissione della luce dopo l'aggiunta di agonisti quali ADP, NA, collagene, acido arachidonico, U46619 (un mimetico del TXA₂), TRAP (ossia un peptide che lega il recettore della trombina). Successivamente, avvenuta l'aggregazione, si verifica un notevole aumento

della trasmissione della luce; lo strumento permette di fornire una misurazione dell'ampiezza e della velocità di tale aumento.

I fattori principali che influenzano i risultati ottenuti sono le modalità di prelievo, la preparazione del PRP e la temperatura di incubazione del sangue.⁶⁸

Altri fattori che sono noti influenzare i risultati del test sono il fumo⁶⁹, una dieta ricca di grassi prima del test⁷⁰, la caffeina⁷¹, l'attività fisica intensa⁷², il consumo di alcool⁷³ e il ritmo circadiano⁷⁴. L'effetto di questi fattori sarebbe più rilevante a concentrazioni submassimali di agonisti e si caratterizza per una importante variabilità inter-individuale⁷⁵.

Con il metodo di Born i valori di aggregazione si correlano in modo inversamente proporzionale alla conta leucocitaria, che potrebbe essere legata alla presenza di leucociti residui nel PRP; questa correlazione tuttavia non è stata evidenziata in tutti gli studi fatti a riguardo.

Questo metodo non è completamente attendibile se la concentrazione delle piastrine è inferiore alle $100 \times 10^9/L$, ed uno svantaggio di questa tecnica è la necessità di centrifugare il sangue per separare le piastrine dalle altre cellule ematiche che ne possono alterare la funzione; ma il limite maggiore consiste nel fatto che il PRP non contiene tutte le piastrine del sangue ma solo una quantità compresa tra il 61 e il 90%.

Per ovviare a questi limiti sono state messe a punto delle tecniche su sangue intero, che è la condizione in cui, fisiologicamente, avviene l'aggregazione

Un test che può essere condotto sia su PRP che su sangue intero anticoagulato è la citometria a flusso⁷⁶. Con questa tecnica le piastrine vengono marcate con due distinti anticorpi monoclonali legati a fluorofori con diversi spettri di emissione, il primo diretto contro GpIb, IIb o IIIa a una concentrazione prossima alla saturazione e il secondo diretto verso l'epitopo di interesse a concentrazione saturante. Dopo l'incubazione con gli anticorpi, il campione viene diluito e fatto passare attraverso un citometro a flusso alla velocità di 1000-

100000 cellule/min. Un fascio laser focalizzato attiva i fluorofori nel loro spettro di assorbimento. Le piastrine sono identificate dalla fluorescenza emessa dagli anticorpi monoclonali; la fluorescenza emessa dal secondo anticorpo è proporzionale alla densità dell'epitopo di interesse.

La citometria a flusso è una tecnica che necessita di attrezzature sofisticate ma ha il vantaggio di richiedere una piccolissima quantità di sangue (5 microlitri), di poter discriminare sottopopolazioni piastriniche e di poter essere usata anche in pazienti trombocitopenici, a differenza della gran parte degli altri test⁷⁷.

Oltre alla conta piastrinica sul sangue intero si possono eseguire principalmente altri due test: l'impedenziometria e il test con Multiplate⁷⁸.

Concepita, da Cardinal e Flower, l'impedenziometria si basa sulla presenza di due elettrodi immersi nel campione; viene fatta passare una corrente elettrica alternata, tra di loro che determina l'adesione delle piastrine agli elettrodi e con l'aggiunta di agonisti piastrinici, le piastrine aggregano attorno alle piastrine adese agli elettrodi e si registra un aumento della impedenza proporzionale al numero di piastrine aggregate⁷⁹.

Alcune variabili tipo l'attività fisica, il ritmo circadiano, il fumo di sigaretta, il gruppo sanguigno ABO e l'assunzione di contraccettivi orali non alterano l'aggregazione piastrinica misurata con questa tecnica⁸⁰.

L'impedenziometria e il metodo turbidimetrico sembrano quindi misurare aspetti diversi delle piastrine: i risultati dell'impedenziometria rifletterebero le interazioni delle piastrine con i globuli rossi e con i leucociti, mentre quelli del metodo turbidimetrico no. Tuttavia confrontato questa tecnica e quella di Born, alcuni studi⁸¹ hanno, mostrato che i due metodi sono comparabili per quanto riguarda l'aggregazione indotta dall'ADP e dal collagene, ma l'aggregometria su sangue intero risultava più sensibile di quella su PRP per quanto riguardava l'aggregazione stimolata dalla trombina e dall'acido arachidonico⁸².

La differenza principale tra l'impedenziometria e la SPC e la tecnica di Born consiste nel fatto che, in questa tecnica, l'aggregazione avviene su superfici e non su fase liquida.

Recentemente è stato messo a punto un nuovo strumento, il Multiplate, sempre basato sull'impedenziometria cioè sul principio che le piastrine non sono trombogeniche allo stato di riposo; ma, una volta attivate, espongono sulla loro superficie dei recettori che permettono loro di aderire alle sedi di danno endoteliale e a superfici artificiali.

Il Multiplate rispetto all'aggregometro di Cardinal e Flower, usa cinque canali e quattro elettrodi formanti due sensori indipendenti per ogni cuvetta.

Si ha perciò il vantaggio di una maggiore rapidità, potendo eseguire fino a cinque test in parallelo, ciascuno della durata di circa 10 min, e una maggiore affidabilità sia per il controllo interno al test consentito dalle due coppie di elettrodi indipendenti, sia per la presenza di cuvette monouso che consentono di bypassare l'errore legato al loro riutilizzo.

Il Multiplate è uno strumento computerizzato dotato di un software interno basato su Windows XP; l'operatore, mediante il mouse e la tastiera, trasmette i comandi per eseguire il test (Figura 1). Può essere usata anche la funzione di pipettaggio automatico in modo tale da semplificare la procedura eseguendo i vari passaggi in maniera assistita dal computer. In ognuno dei cinque canali del Multiplate viene posizionata una cuvetta monouso dotata di due unità di sensori e un magnete ruotante rivestito di teflon. (Figura 2)

La cuvetta ha un'imboccatura in cui vengono inseriti con la pipetta il sangue e gli altri reagenti e ha, inoltre, una porzione a coppa in cui sono inserite le due coppie di elettrodi lunghi circa 3.2 mm e rivestiti d'argento. Questi, da un lato protrudono nel sangue, dall'altro sono collegati allo strumento in modo tale che questo possa registrare la resistenza tra i due elettrodi di ciascuna unità sensore.

Una volta che la cuvetta è stata inserita in uno dei canali e collegata con il cavo allo strumento, vengono aggiunti 300 µl di soluzione diluente specifica per l'agonista che si vuole

testare e poi 300 µl di sangue. Affinchè il risultato sia attendibile è molto importante che il sangue sia analizzato dai 30 minuti alle 3 ore dopo il prelievo.

Dopo tre minuti di incubazione vengono aggiunti 20 µl dell'agonista desiderato. Gli agonisti di comune utilizzo sono l'analogo del recettore della trombina (TRAP test), l'acido arachidonico (ASPI test), il collagene (COLL test) e l'ADP (ADP test) o l'ADP con aggiunta di prostaglandina E (ADPHS test). Le piastrine attivate aderiscono ai fili sensori e la resistenza elettrica tra questi aumenta.

L'aumento di impedenza in ciascuna coppia di fili sensori viene registrato dalla macchina, viene trasformato in unità arbitrarie di aggregazione e posto in relazione al tempo. Si ottengono così due curve di aggregazione, una per ogni coppia di elettrodi, (AU)/tempo; da ciascuna di esse vengono ricavati tre parametri: l'aggregazione (data dall'altezza massima della curva), la velocità (data dalla massima pendenza della curva) e l'area sotto la curva.

L'area sotto la curva (AUC) è il parametro più completo in quanto è condizionato sia dalla massima altezza della curva che dalla pendenza e, pertanto, può essere considerata come il miglior indicatore dell'attività piastrinica totale. (Figura 3)

L'area sotto la curva può essere espressa in AU/min oppure in U dove 1U corrisponde a 10 AU/min.

L'analisi viene ritenuta attendibile se il coefficiente di correlazione di Pearson tra i valori delle due curve è inferiore a 0.98 e se la differenza tra l'AUC di ciascuna curva e l'AUC media tra le due è minore del 20%.

Infine devono essere messi in rilievo alcuni determinanti che possono influenzare i test *in vitro*; infatti si deve porre attenzione sia nel prelievo sia nel campionamento. Il paziente non deve aver assunto farmaci in grado di alterare la funzione piastrinica (a meno che non si voglia monitorare l'effetto di tali farmaci). Il prelievo deve essere fatto con un ago da 19-20 G avendo cura di evitare l'emolisi in quanto le cellule emolizzate liberano ADP. La provetta

nella quale il sangue viene raccolto deve essere di plastica o vetro siliconato per evitare che le piastrine aderiscano alle pareti; essa inoltre deve essere conservata alla temperatura di 37° C ed il sangue al suo interno deve essere anticoagulato.

Gli anticoagulanti utilizzati possono essere differenti: sodio-citrato, irudina o altri inibitori diretti della trombina oppure eparina non frazionata; quale sia l'anticoagulante ideale è ancora controverso. L'anticoagulante più usato è il sodio-citrato che riducendo la concentrazione di Ca^{2+} nella soluzione impedisce che avvenga l'aggregazione dopo che si è effettuato il prelievo di sangue. E' preferibile utilizzare il sodio-citrato rispetto all'eparina perché si è osservato che utilizzando l'eparina le piastrine aderiscono alle pareti della provetta e alcune formano aggregati e precipitano con i globuli rossi. L'eparina, tuttavia, sarebbe l'anticoagulante di scelta se il campione venisse processato a distanza dal prelievo in quanto preserva meglio le piastrine. Se il campione viene processato subito dopo il prelievo vi sono solo modeste differenze tra eparina e citrato, inoltre i due anticoagulanti si comportano in modo simile dopo centrifugazione⁸³.

Gli inibitori diretti della trombina come l'irudina hanno il vantaggio di non alterare la fisiologica concentrazione di calcio e di mantenere la risposta all'acido arachidonico e al collagene anche dopo due ore dal campionamento tuttavia l'irudina presenta un costo più elevato rispetto agli altri anticoagulanti fin qui descritti. Studi che confrontano l'aggregazione piastrinica a seconda dell'uso di irudina o di sodio citrato indicano che con il sodio citrato si otterrebbero valori di aggregazione spontanea maggiore.

SINDROMI TROMBOFILICHE E TROMBOSI ARTERIOSE

Il termine “trombofilia” indica una tendenza a sviluppare trombosi sulla base di un disordine ereditario o acquisito dell’emostasi o della fibrinolisi in senso pro trombotico. Le sindromi trombofiliche predispongono più frequentemente alla malattia tromboembolica venosa che all’aterotrombosi. Ciò nonostante, se il vaso arterioso presenta delle lesioni aterosclerotiche il rischio che si verifichi un evento trombotico, nei soggetti trombofilici, è aumentato. Si pensa che il meccanismo che aumenta il rischio trombotico nei soggetti trombofilici possa essere ricondotto all’aumento del potenziale di trombino generazione osservato nel sangue di questi soggetti rispetto al sangue di soggetti non trombofilici. Ovviamente, se oltre alla trombofilia sono presenti i fattori di rischio che più frequentemente si associano alla patologia aterosclerotica (ad esempio, diabete, obesità, fumo, ipertensione, etc) il rischio aumenta in maniera esponenziale.^{84,85} Alcuni lavori preliminari, ed in particolare un lavoro di *Bakhtawar* pubblicato su *Circulation*, mettono in evidenza che soggetti con età inferiore ai 55 anni e con deficit degli inibitori della cascata coagulativa presentano un aumento significativo del rischio di sviluppare eventi arteriosi.

Considerando la popolazione generale si stima che la prevalenza di trombofilia sia tra il 10 e il 15%. Le sindromi trombofiliche possono essere sia ereditarie che acquisite; la trombofilia ereditaria viene definita come “una tendenza geneticamente determinata verso il tromboembolismo venoso, in cui le anomalie principali o le associazioni multiple di difetti meno gravi possono evidenziarsi clinicamente con l’insorgenza precoce della sintomatologia, la ricorrenza degli episodi o la storia familiare, e in cui le anomalie meno gravi possono essere identificate anche solo su base laboratoristica”⁸⁶.

Le principali alterazioni congenite che determinano uno stato trombofilico sono: deficit di Antitrombina (AT), Proteina C (PC) o Proteina S (PS) e i polimorfismi genetici Fattore V Leiden e Variante Protrombinica G20210A⁸⁷⁻⁹¹.

I DIFETTI DEGLI INIBITORI NATURALI

Il difetto di Antitrombina (AT)

L'AT è il principale inibitore fisiologico della coagulazione; è sintetizzata a livello epatico ed agisce con effetto inibitorio contro i fattori della coagulazione appartenenti al gruppo delle serin-proteasi (trombina, FXa, FIXa, FXIa e il FXIIa). (Figura 4)

L'AT di per sé agisce lentamente nel processo di inattivazione di questi fattori ma l'interazione con l'eparina ne aumenta notevolmente la velocità, fino a tre ordini di grandezza.⁶³

La prevalenza del difetto di AT nella popolazione generale è circa 0,02-0,2% e si presenta nell'1% dei pazienti con un evento trombotico venoso⁹².

I difetti di antitrombina vengono comunemente divisi in:

- tipo I o quantitativo (difetto di sintesi);
- tipo II o “anomalia” qualitativa, caratterizzato da un normale livello di antigene e dalla riduzione dell'attività dell'AT;
- tipo III, o “ipo-dis”, in genere difetti combinati per presenza di doppie eterozigosi interessanti i due alleli che codificano la sintesi di AT⁹³.

Il difetto di Proteina C (PC)

La PC è una glicoproteina a doppia catena, di sintesi epatica e vitamina K-dipendente.⁶³ Una volta attivata sulla sua superficie endoteliale dal complesso trombina-trombomodulina, agisce coadiuvata dalla proteina S inattivando i fattori V e VIII attivati ed esplicando così il ruolo di anticoagulante fisiologico⁹⁴.

La prevalenza del deficit di PC risulta essere attorno allo 0,2% nella popolazione generale ma il valore cresce (circa 3%) se si considera la popolazione con un primo evento tromboembolico venoso⁹⁵.

Classicamente i difetti di PC si distinguono nei seguenti tipi:

- tipo I o difetto quantitativo di sintesi con riduzione dell'antigene e dell'attività della proteina che nel difetto eterozigote si assesta attorno al 50% del normale;
- tipo II o Proteina C disfunzionale in cui la sintesi non è ridotta ma sono presenti alterazioni di aminoacidi che compromettono la funzione della proteina stessa;
- tipo III o "ipo-dis" in cui sussiste una doppia eterozigosi che determina deficit di sintesi associato ad alterazione disfunzionale della PC ⁹⁶.

Il difetto di Proteina S (PS)

La PS è anch'essa vitamina K-dipendente, sintetizzata dal fegato, dall'endotelio e dai megacariociti midollari; circola nel plasma in parte libera (40%) funzionando da cofattore della PC, e in parte legata (60%) alla C4b-binding-protein. La presenza di PS nel complesso PC/PS aumenta fino a 10 volte l'efficienza di inattivazione dei FVa e FVIIIa ⁹².

I difetti di PS sono distinti in:

- tipo I, o di sintesi con riduzione dell'antigene della PS totale e della PS libera associato a riduzione dei livelli funzionali di PS;
- tipo II, o PS disfunzionale: sono presenti normali livelli antigenici ma riduzione di attività;
- tipo III è un difetto peculiare con normale livello di antigene totale ma riduzione dei livelli di antigene PS libera associati a riduzione dei livelli di attività di PS ⁹⁷.

La resistenza alla proteina C attivata ed il fattore V Leiden

L'aggiunta di PC attivata ad un plasma in esame determina usualmente il prolungamento del tempo di coagulazione per l'effetto di inattivazione dei fattori Va e VIIIa. La mutazione del Fattore V detto Leiden è caratterizzata da una mutazione nell'esone 10 del gene del Fattore V

(1691 G→A) che determina una sostituzione aminoacidica nel Fattore V in posizione Arg→506 Gln⁹⁸. Questa sede corrisponde ad uno dei tre siti di clivaggio del FVa da parte della PC attivata; per effetto di questa mutazione, il Fattore V Leiden è più resistente del Fattore V wild-type all'inattivazione da parte della PC determinando nel soggetto portatore della mutazione una tendenza trombofilica⁹⁹. (Figura 5)

La prevalenza di questa mutazione è molto eterogenea in quanto sembra essere pari a 15% della popolazione nativa d'Africa, America e Asia, 8-9% in quella della Turchia e 2-3 % in quella Europea¹⁰⁰.

La conferma diagnostica della presenza di difetto ereditario tipo FV Leiden in un determinato paziente si ottiene mediante:

- riscontro laboratoristico di resistenza alla PC attivata;
- identificazione della lesione genetica per il FV Leiden⁹⁴.

La variante protrombinica G20210A

Si tratta di una transizione GA a carico del nucleotide 20210 del gene della Protrombina in una regione non codificante che conferisce ai portatori eterozigoti ed omozigoti un aumentato rischio trombotico per incremento dei livelli di protrombina nel plasma. Livelli plasmatici al di sopra del 115% sono stati peraltro associati ad un incremento del rischio trombotico (OR 2,1)¹⁰¹.

Questa mutazione ha una prevalenza del 2% nella popolazione generale ma il valore aumenta al 6% in pazienti che presentano il primo episodio di trombosi venosa. Sembra che la variante protrombinica sia molto più rara nella popolazione africana ed asiatica rispetto alla popolazione caucasica¹⁰².

La conferma diagnostica della presenza di difetto ereditario tipo Variante Protrombinica G20210A in un determinato paziente si ottiene mediante:

- identificazione della suddetta lesione genetica caratteristica mediante analisi del DNA;
- non è possibile discriminare i portatori della Variante Protrombinica G20210A sulla base dei livelli plasmatici di Protrombina la cui determinazione non è pertanto utile ai fini diagnostici⁹⁴.

Le valutazioni dell'aggregazione e disfunzione endoteliale sembrano essere ancora più interessanti nei soggetti portatori di sindromi trombofiliche ereditarie. Si potrebbe infatti cercare di identificare in questa categoria di soggetti quale possa essere il contributo nello sviluppo di un evento trombotico arterioso, dei fattori "classici" dell'aterotrombosi (ad esempio dislipidemia, diabete, ipertensione, etc.) e della trombofilia.

SCOPO DELLO STUDIO

L'impulso allo sviluppo di questo studio è dato dall'importanza e dall'attualità del problema di riuscire ad identificare tra i vari determinanti della correlazione tra patologia tromboembolica venosa ed arteriosa, un possibile ruolo dell'aggregazione piastrinica e dell'endotelio, valutabile con metodica ecografica, nei soggetti portatori di difetti trombofilici noti.

Lo scopo del nostro studio infatti è stato quello di valutare sia la funzione endoteliale, mediante l'utilizzo di tecnica ecografica dell'arteria brachiale sia il ruolo dell'aggregazione piastrinica, attraverso l'uso di aggregometro a elettrodi multipli, in un gruppo di soggetti con difetto degli inibitori naturali della coagulazione rispetto ad un gruppo di volontari sani.

MATERIALI E METODI

PAZIENTI

Nel gruppo dei casi sono stati arruolati tutti i soggetti, giunti consecutivamente alla nostra osservazione dal marzo 2008 fino al marzo 2012 con difetto noto degli inibitori della coagulazione (deficit di Prot C, Prot S o antitrombina). Nel gruppo dei controlli sono stati arruolati soggetti volontari sani confrontabili con i casi per sesso ed età (± 3 anni). Sono stati esclusi dallo studio: a) soggetti con età inferiore ai 18 aa; b) soggetti che si sono rifiutati di firmare il consenso informato; c) soggetti che assumevano terapia anticoagulante o antiaggregante piastrinica; d) soggetti con piastrinopenia (conta piastrinica $<150 \times 10^9/L$) o piastrinosi (conta piastrinica $>450 \times 10^9/L$).

Dopo la firma del consenso informato, tutti i soggetti arruolati allo studio sono stati sottoposti a:

- a) raccolta anamnestica dettagliata relativa a fattori di rischio cardiovascolare (ad esempio ipertensione arteriosa, diabete, fumo di sigaretta, dislipidemia, etc), precedenti eventi cardiovascolari (infarto miocardico, stroke cerebrale o attacco ischemico transitorio) o tromboembolici (trombosi venosa profonda e/o embolia polmonare).
- b) prelievo di sangue venoso per: coagulazione classica (conta piastrinica, tempo di protrombina, PT e tempo di tromboplastina parziale attivato, aPTT); studio ipercoagulabile (proteina C, proteina S, antitrombina, variante protrombinica, fattore V Leiden, anticorpi antifosfolipidi); aggregazione piastrinica con aggregometro Multiplate (ASPItest, ADPtest e TRAPtest).
- c) valutazione ecografica della disfunzione endoteliale.

COAGULAZIONE CLASSICA E TROMBOFILIA

Da ciascun soggetto arruolato sono stati prelevati 18 ml di sangue intero da una vena antecubitale in una siringa preriempita con 2 ml di Na-Citrato 105 mMol. Il sangue è stato sottoposto a centrifugazione a 3000 gpm per 15 minuti in modo da separare il plasma povero di piastrine (PPP) dalla componente cellulare.

Su PPP sono stati misurati: tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), tempo di protrombina (PT), antitrombina attività (AT attività), Proteina C (PC Attività coagulometrica, Attività cromogenica e Antigene), Proteina S (PS Attività), anticorpi antifosfolipidi (aPL, lupus anticoagulant e anti-beta2-glicoproteina, anticardioplipina).

La componente cellulare è stata utilizzata per la ricerca, del polimorfismo G20210A della Protrombina e della mutazione G1691A del Fattore V (FV Leiden) tramite metodiche di biologia molecolare.

La determinazione di aPTT e PT è stata condotta con metodica automatizzata (Behring Coagulation Timer [BCT] Analyser; Date Behring, Marburg, Germany) secondo le specifiche del produttore.

La determinazione dell'AT è stata condotta mediante test "cromogenico o amidolitico" basato sulla liberazione del colore da parte di un substrato cromogenico sensibile all'attività della trombina o del fattore X attivato presenti a concentrazioni note nel sistema (Antitrombina-III anti Xa, Biopool, Umeå, Sweden).

Il dosaggio della PC e PS è stato ottenuto mediante test ELISA per quanto riguarda l'antigene e mediante test coagulometrico e cromogenico per la determinazione dell'attività.

Il dosaggio degli anticorpi antifosfolipidi è stato condotto mediante test ELISA.

Per la determinazione del Fattore V Leiden è stata valutata la presenza della resistenza alla proteina C attivata. Nei soggetti in cui si riscontrava un alterato rapporto APC ratio si è

proceduto all'analisi del DNA estratto da sangue periferico (da pellet leucocitario), amplificando la porzione dell'esone 10 contenente la mutazione.

Per la variante protrombinica G20210A ci siamo serviti dell'analisi del DNA estratto dal sangue periferico (da pellet leucocitario). Abbiamo poi proceduto con amplificazione mediante PCR e successiva digestione enzimatica del prodotto amplificato mediante enzima di restrizione. Una corsa elettroforetica su agarosio ci ha consentito di rilevare i prodotti di digestione enzimatica e di definire la presenza o l'assenza della mutazione in eterozigosi o omozigosi.

STUDIO DELLA FUNZIONE PIASTRINICA CON MULTIPLATE

Tutti i soggetti arruolati nello studio sono stati sottoposti a un prelievo di sangue da una vena anticubitale dell'avambraccio con un ago farfalla di 21 G. Il sangue così ottenuto è stato raccolto in due provette BD Vacutainer® sterili internamente, con vuoto precalibrato (3 ml) e contenenti sodio-citrato in rapporto 1:9 con il sangue per lo studio dell'aggregometria piastrinica e in una provetta BD Vacutainer® contenente EDTA per la determinazione della conta piastrinica.

Il sangue così ottenuto è stato analizzato entro tre ore dalla raccolta con il Multiplate (Multiplate® Dynabyte, Munich, Germany). Per ogni soggetto è stata misurata l'aggregazione in risposta al peptide che lega il recettore della trombina (TRAP test), all'ADP (ADP test) e all'acido arachidonico (ASPI test). Lo strumento è stato riscaldato fino a portare la temperatura nell'area di misura, superiore a 36°C. Dopo aver eseguito il controllo elettronico dei canali sono state inserite le cuvette e, una volta collegate allo strumento, sono stati eseguiti i test con la funzione di pipettaggio automatico secondo le istruzioni del produttore.

Nelle cuvette sono stati inseriti prima 300 µl di una soluzione diluente e poi 300 µl di sangue citratato del paziente a temperatura ambiente. La soluzione diluente era NaCl-CaCl₂ (ossia

NaCl allo 0.9% con 3 mM di CaCl₂) a 37°C per il TRAP test e l'ADP test; mentre per l'ASPI test la soluzione usata era soluzione salina fisiologica (NaCl allo 0.9%) a 37°C.

Dopo 3 minuti di incubazione sono stati aggiunti 20 µl di reagente a una concentrazione di 1 mM per il TRAP test, di 0.2 mM per l'ADP test, di 15 mM per l'ASPI test .

Dopo l'aggiunta del reagente lo strumento ha misurato automaticamente l'aggregazione per 6 minuti costruendo le curve AU/ tempo. Il parametro preso in esame per ciascun test è stato l'AUC (area sotto la curva) in quanto, riflettendo sia l'altezza massima della curva (ossia l'aggregazione), sia la pendenza della curva (ossia la velocità dell'aggregazione) rappresenta il parametro più importante e indicativo.

VASODILATAZIONE FLUSSO MEDIATA (FMD)

Tutti i pazienti e i controlli sono stati sottoposti a valutazione della funzione endoteliale attraverso la misurazione non invasiva della vasodilatazione flusso mediata (FMD) dell'arteria brachiale mediante ultrasonografia B-mode, usando una procedura standardizzata seguendo le Linee Guida pubblicate sul J. Am. Coll. Cardiology³¹. Tutti i soggetti sono stati esaminati al mattino (tra le 9 e le 11 a.m.) in una stanza climatizzata, in condizione di digiuno; sono stati proibiti l'assunzione di caffeina il mattino dell'esame, il fumo di sigaretta e l'attività fisica intensa nelle due ore precedenti l'esame.

L'ultrasonografia dell'arteria brachiale è stata eseguita da un operatore con una sonda lineare 10 MHz: utilizzando un'ecografo Philips IU 22. La valutazione ecografica prevedeva una scansione longitudinale eseguita sul braccio destro con paziente supino e tenuto a riposo per dieci minuti prima dell'indagine. La pressione sanguigna veniva misurata con uno sfigmomanometro prima della misura della FMD.

Il manicotto per la misurazione della pressione sanguigna veniva mantenuto posizionato sull'avambraccio e successivamente si acquisiva un'immagine ecografica basale a riposo.

E' stato dimostrato che la posizione del manicotto (prossimale o distale) rispetto alla sonda ecografica non è importante nel determinare la risposta vasodilatatoria dell'arteria brachiale, che invece viene influenzata in modo determinante dalla durata dell'occlusione^{103,104}. Un'occlusione per una durata inferiore ai 5 minuti non è in grado di causare una vasodilatazione massimale, mentre un'occlusione del vaso superiore ai 5 minuti non apporta alcun vantaggio in termini di vasodilatazione. L'arteria brachiale veniva visualizzata sopra la fossa antecubitale in un piano longitudinale; la visualizzazione di eventuali strutture anatomiche (tendini, ecc) è utile per identificare il segmento su cui successivamente effettuare le misurazioni. Si visualizzava un segmento chiaro, con interfaccia dell'intima anteriore e posteriore tra il lume del vaso; la parete del vaso veniva evidenziata con immagini 2D su una scala di grigi e registrata su formato digitale integrato, la velocità di flusso misurata con un segnale Doppler pulsato con un'angolazione di circa 70° rispetto al vaso con un range gate di 1.5 mm posto al centro del vaso. Il flusso sanguigno basale è stato calcolato moltiplicando la velocità-tempo, integrale del segnale Doppler, per la frequenza cardiaca (registrata dall'ECG continuo) per l'area trasversa del vaso.

Successivamente il manicotto veniva quindi gonfiato ad un valore superiore di 50 mmHg rispetto al valore basale della pressione sanguigna, al fine di occludere il flusso sanguigno per circa 5 minuti e poi sgonfiato rapidamente. L'immagine longitudinale dell'arteria veniva registrata in maniera continua da 30 sec prima a 2 minuti dopo aver sgonfiato il manicotto; il segnale Doppler veniva ottenuto immediatamente dopo il rilascio del manicotto per un massimo di 15 sec dopo averlo sgonfiato per valutare il flusso nella fase di iperemia.

L'incremento del flusso sanguigno in tale fase è stato calcolato dividendo il flusso massimo visualizzato nei primi 15 sec dopo aver sgonfiato la cuffia per il flusso nelle condizioni basali. (Figura 6)

Le immagini venivano registrate su supporto digitale e il diametro dell'arteria brachiale veniva misurato in un secondo momento, da un operatore a cui non erano note le caratteristiche cliniche dei pazienti nè gli esiti dello studio sulla loro funzionalità piastrinica. Il diametro dell'arteria brachiale (basale e iperemico) veniva misurato a fine diastole (all'inizio dell'onda R), mediante l'analisi di 4 cicli cardiaci sui quali poi calcolato il valore medio.

L' FMD veniva misurato come variazione del diametro nel post stimolo rispetto al diametro basale, espressa come valore percentuale ^{105,106}.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Statistica Vers. 5.0; Stat Soft, Tulsa, OK, USA. Abbiamo calcolato il valore medio e la deviazione standard (SD) per ciascuna delle variabili quantitative considerate.

Il confronto tra casi e controlli, per la determinazione della significatività statistica, è stato effettuato mediante il test parametrico per dati spaiati denominato "Student t-test". La significatività statistica è stata considerata come una probabilità a due code $<0,05$.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE ARRUOLATA

Nello studio sono stati arruolati 68 soggetti con difetto trombofilico (casi) e 59 soggetti senza difetto (controlli). La popolazione dei casi era composta da 24 soggetti con difetto di proteina C, 26 soggetti con difetto di proteina S e 18 soggetti con difetto di antitrombina. Le caratteristiche demografiche della popolazione arruolata nello studio, i precedenti eventi tromboembolici, i fattori di rischio per patologia cardiovascolare e l'età al momento dell'evento arterioso sono riportati nella Tabella 1. Dai dati emerge come il gruppo dei casi e dei controlli risultino confrontabili per età (media±SD rispettivamente di 45±17 vs 46±18 anni, p 0.18) e sesso (M/F 29/39 vs 28/31, p 0.93). In entrambe i gruppi abbiamo osservato una maggior prevalenza di femmine rispetto ai maschi.

Il gruppo dei soggetti con trombofilia nota presentava un'incidenza di eventi tromboembolici (trombosi venosa profonda e/o embolia polmonare) statisticamente superiore rispetto a quello della popolazione di controllo (34 vs 3, p<0.001).

I fattori di rischio "classici" per patologia cardiovascolare (diabete mellito, dislipidemia, ipertensione arteriosa e abitudine al fumo di sigaretta) risultavano omogeneamente distribuiti nei due gruppi. In particolare, non abbiamo osservato alcuna differenza statisticamente significativa nella prevalenza di diabete mellito, dislipidemia, ipertensione arteriosa e abitudine al fumo di sigaretta tra casi e controlli.

L'incidenza di eventi cardiovascolari totali (infarto miocardico, stroke e/o TIA) è stata maggiore nei soggetti trombofilici rispetto ai controlli (n. eventi 7 vs 4) ma la differenza non ha raggiunto la significatività statistica (p 0.06). Anche l'incidenza degli eventi cardiovascolari considerati separatamente non ha mostrato differenze significative tra casi e controlli.

Infine, abbiamo osservato che l'età al momento dell'evento cardiovascolare nei soggetti trombofilici era statisticamente inferiore rispetto all'età dei soggetti non trombofilici (52 ± 14 vs 58 ± 12 anni, $p 0.006$).

SOGGETTI CON DIFETTO DI PROTEINA C E PROTEINA S

Le caratteristiche demografiche della popolazione con difetto di proteina C e di proteina S, i precedenti eventi tromboembolici, i fattori di rischio per patologia cardiovascolare e l'età al momento dell'evento arterioso sono riportati rispettivamente nella Tabella 2 e nella Tabella 3.

Anche per quanto riguarda i soggetti con difetto di proteina C e quelli con difetto di proteina S non abbiamo osservato differenze statisticamente significative tra casi e controlli, sia per quanto riguarda l'età che per quanto riguarda la prevalenza di maschi e femmine. Anche in queste due sottopopolazioni dello studio abbiamo osservato una prevalenza maggiore di eventi anamnestici trombotici nei casi rispetto ai controlli. Tale differenza si dimostrava statisticamente significativa. Al contrario, non abbiamo osservato alcuna differenza statisticamente significativa in entrambe i sottogruppi per quanto riguarda la prevalenza dei fattori di rischio cardiovascolare. I casi, anche presi singolarmente per tipo di difetto, presentavano un aumento dell'incidenza di eventi cardiovascolari rispetto ai controlli. Tale differenza non raggiungeva la significatività statistica. L'incidenza degli eventi cardiovascolari considerati separatamente non ha mostrato differenze significative tra casi e controlli. Infine, per quanto riguarda l'età al momento dell'evento cardiovascolare si confermava il dato osservato anche nella popolazione generale dello studio ovvero che i soggetti trombofilici sviluppavano l'evento arterioso ad un'età più precoce rispetto ai controlli. Tale differenza era statisticamente significativa solo per i soggetti con difetto di proteina C mentre non raggiungeva la significatività statistica per i soggetti con difetto di proteina S.

SOGGETTI CON DIFETTO DI ANTITROMBINA

Le caratteristiche demografiche della popolazione con difetto di antitrombina, i precedenti eventi tromboembolici, i fattori di rischio per patologia cardiovascolare e l'età al momento dell'evento arterioso sono riportati nella Tabella 4. Questo sottogruppo di casi è risultato confrontabile al gruppo di controllo per sesso ed età; in particolare, non abbiamo osservato differenze statisticamente significative per quanto riguarda sesso ed età tra casi e controlli.

Si conferma, anche nei soggetti con difetto di antitrombina, una maggior incidenza di eventi tromboembolici anamnestici nei casi rispetto ai controlli con una differenza statisticamente significativa. Per quanto riguarda i “classici” fattori di rischio cardiovascolare non abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa tra casi e controlli. L'incidenza di eventi cardiovascolari totali (infarto miocardico, stroke e/o TIA) è stata maggiore nei soggetti trombofilici rispetto ai controlli ma la differenza non ha raggiunto la significatività statistica. L'incidenza degli eventi cardiovascolari considerati separatamente non ha mostrato differenze significative tra casi e controlli. Si conferma, anche nel sottogruppo di soggetti con difetto di antitrombina, come l'età al momento dell'evento cardiovascolare sia inferiore nei casi che nei controlli. Tale differenza tuttavia non raggiunge la significatività statistica.

STUDIO DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA

Nella Tabella 5 sono riportati i dati di AUC, espressi come media±deviazione standard, dei 3 test di aggregometria (TRAPtest, ADPtest e ASPItest) eseguiti nell'intera popolazione dei soggetti arruolati nello studio. I dati mostrano che i soggetti trombofilici, considerati nel loro insieme, avevano valori superiori di AUC in ciascun test preso in considerazione, rispetto ai controlli. Tale differenza non raggiunge la significatività statistica per nessuno dei tre test

effettuati. E' interessante notare come i valori che abbiamo osservato nei controlli ricadano all'interno del range di normalità così come riportato nel manuale delle istruzioni dell'aggregometro (TRAPtest 48-97 U, ADPtest 27-71 U e ASPItest 6-71 U).

Nelle Tabelle 6, 7 e 8 sono riportati i dati di AUC, espressi come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$, dei 3 test di aggregometria (TRAPtest, ADPtest e ASPItest) eseguiti rispettivamente nel sottogruppo di soggetti con difetto di proteina S, nel sottogruppo di soggetti con difetto di proteina C e nel sottogruppo di soggetti con difetto di antitrombina. Analizzando e confrontando i valori di aggregometria di ciascuno dei tre test considerati nei tre distinti sottogruppi di soggetti trombofilici (soggetti con difetto di proteina C, soggetti con difetto di proteina S e soggetti con difetto di antitrombina) abbiamo osservato come i casi presentano valori di AUC maggiori rispetto ai controlli. Tale differenza non raggiunge la significatività statistica in nessuno dei test considerati.

VASODILATAZIONE FLUSSO MEDIATA (FMD)

I soggetti trombofilici presentavano un diametro basale medio dell'arteria brachiale di 4.2 ± 0.1 mm, confrontabile con quello riscontrato nel gruppo dei controlli 4.1 ± 0.1 mm (p value 0.18).

Il flusso sanguigno basale registrato nei casi e nei controlli (84 ± 10 mL/min vs 95 ± 11.4 mL/min, p value 0.74) e il flusso sanguigno brachiale dopo iperemia (398.0 ± 45.3 mL/min vs 451 ± 54.9 mL/min, $p = 0.60$) si sono dimostrati inferiori nei casi rispetto ai controlli. Tali differenze non hanno raggiunto la significatività statistica in entrambe i casi (Tabella 9).

L'FMD dei casi, espressa come incremento del diametro in mm, è risultata di 0.173 ± 0.051 mm (95% CI: 0.055-0.0221) rispetto a 0.208 ± 0.030 mm (95% CI: 0.167-0.264) dei controlli, con una p value di 0.07 (Tabella 9).

L'FMD espressa in valore percentuale come media \pm deviazione standard è risultata minore (3.7 \pm 0.5%; 95% CI: da 3.0 a 4.9) nei pazienti con difetto trombofilico rispetto ai controlli (5.2 \pm 0.6%; 95% CI: da 4.3 a 6.1). Tale differenza si è dimostrata statisticamente significativa ($p = 0.015$).

DISCUSSIONE

Uno degli argomenti di maggior attualità e di maggior dibattito nell'ambito della patologia trombotica, sia essa venosa o arteriosa, riguarda i meccanismi eziopatogenetici che sottendono alla formazione del trombo. In un primo tempo si è pensato che patologia trombotica venosa e arteriosa fossero caratterizzate da meccanismi propri e distinti nella formazione del coagulo. Più di recente, anche grazie al notevole contributo portato in letteratura dai risultati delle ricerche condotte a Padova, si è maturata la consapevolezza che patologia trombotica venosa ed arteriosa possano condividere meccanismi comuni nella formazione del coagulo. A supporto di questa tesi esistono numerose segnalazioni pubblicate in letteratura che indicano come i soggetti affetti da sindromi trombofiliche, ovvero quelle alterazioni della coagulazione, sia di tipo ereditario che acquisito, caratterizzate da un aumentato rischio trombotico, siano a maggior rischio tanto di sviluppare eventi trombotici venosi quanto di sviluppare eventi trombotici arteriosi.

Scopo del nostro studio è stato quello di identificare, attraverso lo studio della funzione piastrinica mediante aggregometro ad impedenza e attraverso lo studio della funzione endoteliale mediante metodica eco-ColorDoppler, quali potessero essere i meccanismi coinvolti nello sviluppo di un evento trombotico arterioso in un gruppo di soggetti trombofilici. In particolare abbiamo considerato un gruppo di soggetti con difetto di proteina C, difetto di proteina S e difetto di antitrombina. La proteina C, la proteina S e l'antitrombina sono proteine note col nome di "inibitori naturali della coagulazione" ed un loro difetto si configura come sindrome trombofilica maggiore.

I risultati del nostro studio mostrano che il gruppo dei casi, ovvero i soggetti con difetto di proteina C, proteina S e antitrombina, presentava un'aumentata incidenza di eventi trombotici venosi anamnestici rispetto ad una popolazione di controllo identificata in un gruppo di

volontari sani. Abbiamo inoltre potuto osservare nei casi una maggior incidenza di eventi cardiovascolari (infarto miocardico, stroke e/o TIA) rispetto ai controlli. Seppur tale differenza non raggiungesse la significatività statistica, verosimilmente perché il numero di soggetti considerati non è sufficientemente numeroso, riteniamo comunque che i dati prodotti dalla nostra osservazione siano “consistenti”. Infatti, da una parte i nostri risultati sono in linea con le segnalazioni già pubblicate in letteratura su tale argomento e, in secondo luogo, perché pur considerando una numerosità del campione relativamente piccola, il gruppo dei casi è omogeneo rispetto al gruppo dei controlli. In particolare, non abbiamo osservato differenze statisticamente significative né per quanto riguarda le caratteristiche demografiche, come ad esempio età e sesso della popolazione arruolata, né per quanto riguarda la prevalenza dei fattori di rischio “classici” per patologia cardiovascolare, ad esempio diabete mellito, dislipidemia, ipertensione arteriosa e abitudine al fumo di sigaretta, che sono risultati equamente distribuiti tra casi e controlli. Inoltre, il dato si confermava anche considerando in maniera distinta i tre sottogruppi di pazienti trombofilici.

Un altro dato d’interesse rilevante è il contributo che la trombofilia svolge nel rischio trombotico arterioso nei soggetti con età giovane. Infatti, i soggetti trombofilici presentavano al momento dell’evento arterioso un’età significativamente più giovane rispetto ai controlli. Questo dato conferma quanto già pubblicato in letteratura ed è ampiamente in linea per quanto riguarda la relazione che esiste fra trombofilia e patologia trombotica venosa.

Lo studio dell’aggregazione piastrinica su sangue intero mediante aggregometro ad impedenza (Multiplate) ha permesso di evidenziare uno stato di iperaggregabilità piastrinica nei soggetti trombofilici rispetto alla popolazione di controllo. Pur non essendo risultata una differenza statisticamente significativa tra casi e controlli, verosimilmente per i motivi precedentemente riportati, riteniamo che anche in questo caso il dato ottenuto sia consistente.

Infatti, i risultati non solo si sono confermati in ciascuno dei tre test aggregometrici utilizzati (TRAPtest, ADPtest e ASPItest) ma è stato possibile osservare uno stato di iperaggregabilità piastrinica tra casi e controlli anche considerando separatamente i tre sottogruppi di pazienti trombofilici.

Lo studio dell'aggregazione piastrinica su sangue intero attraverso il Multiplate, e non su plasma ricco di piastrine come effettuato abitualmente, è stato suffragato dall'idea di voler ricreare le condizioni reali nelle quali si innesca la formazione del trombo. Infatti, nei test su plasma ricco di piastrine (PRP) è necessario centrifugare il sangue per separare le piastrine dalle altre cellule ematiche. Questa procedura pre-analitica da una parte allunga i tempi di esecuzione della metodica e rende l'esecuzione della stessa più complessa, dall'altra rappresenta un limite maggiore in quanto nel PRP non sono contenute tutte le piastrine del sangue ma solo una quantità compresa tra il 60 e il 90% delle piastrine totali. In particolare, vengono perse le piastrine più grandi che possono essere sia ipo- che iperattive.

Nel nostro studio abbiamo invece voluto sfruttare il principio che sta alla base degli aggregometri a impedenza, ovvero il principio secondo il quale le piastrine non sono trombogeniche allo stato di riposo ma, una volta attivate, espongono sulla superficie una serie di recettori che permettono loro di aderire alle sedi di danno endoteliale e/o a superfici artificiali. Con questi strumenti l'aggregazione viene dunque misurata su superfici, condizione quest'ultima più vicina a quella fisiologica, e non su fase liquida, condizione questa che si verifica solo in situazioni rare e molto gravi come per esempio la coagulazione intravascolare disseminata. Oltre ai vantaggi sopra riportati il Multiplate è uno strumento facile da usare che permette di avere una risposta affidabile in tempi molto rapidi. La semplicità dell'utilizzo è garantita dalla presenza di una modalità di utilizzo computer-assistita che oltre a ridurre la variabilità interoperatore rende l'utilizzo di questa metodica intuitivo anche per un operatore poco esperto. L'affidabilità è legata al fatto che le cuvette in cui vengono eseguiti i test sono

dotate di due coppie di elettrodi indipendenti che consentono di effettuare il test in doppio e quindi permettono a ciascun campione di avere un “controllo interno” di riferimento.

I due limiti principali all'utilizzo di questa apparecchiatura nella pratica clinica rimangono l'elevata variabilità inter-test e intra-test e il costo elevato di esecuzione per ciascun singolo test.

I dati che abbiamo ottenuto in relazione allo studio della funzione endoteliale hanno mostrato che esiste una riduzione della dilatazione dell'arteria brachiale post fase iperemica che in valore percentuale è significativamente più bassa nei soggetti trombofilici rispetto ai controlli. Il dato quindi sembra confermare che nei soggetti con deficit degli “inibitori naturali della coagulazione”, ovvero in soggetti portatori di una sindrome trombofilica maggiore che si caratterizza di per sé stessa per un aumentato rischio trombotico, la disfunzione endoteliale sia una caratteristica peculiare ed intrinseca di tali soggetti.

Dall'analisi dei dati inoltre emerge come sia il diametro basale che il flusso basale, non presentino differenze significative nei casi rispetto ai controlli; questo dimostrerebbe come la ridotta dilatazione vasale sia verosimilmente legata all'incapacità del vaso di adattarsi a condizioni di stress parietale come inadeguata risposta alla modulazione vasale da parte di mediatori plasmatici endoteliali^{107,108}. Lo studio della disfunzione endoteliale mediante ecografia dell'arteria brachiale che risulta estremamente accurata e correlabile con le alterazioni vascolari artero/venose è tuttavia di difficile applicazione nella pratica clinica quotidiana. Infatti, la valutazione della disfunzione endoteliale deve essere eseguita da ecografisti esperti poiché, viste le piccole dimensioni dei vasi considerati nel corso della procedura e l'esigua modificazione del diametro del vaso che deve essere registrata è indispensabile che l'immagine ecografica venga acquisita in maniera quanto più accurata possibili. Inoltre il paziente deve essere studiato a riposo, deve aver interrotto

preventivamente l'assunzione di determinati farmaci e/o alimenti (ad esempio caffeina) che di per sé potrebbero alterare il risultato della prova¹⁰⁹⁻¹¹⁶. Infine, i tempi relativamente lunghi che si rendono necessari per l'esecuzione della valutazione ecografica limitano l'utilizzo di questa metodica a soli scopi di ricerca.

I dati raccolti nel nostro studio ci permettono di formulare l'ipotesi che i soggetti con difetto di proteina C, proteina S e antitrombina siano esposti ad un maggior rischio di trombosi arteriose oltre che venose, e che questo rischio possa ricondursi in prima ipotesi ad uno stato di iperaggregabilità piastrinica e, concomitantemente, ad un grado più severo di disfunzione endoteliale. Tale ipotesi è quanto mai suggestiva ma riteniamo altresì che debba essere considerata con molta cautela. I limiti intrinseci al nostro studio e precedentemente esposti, ovvero da un lato una numerosità campionaria relativamente modesta e dall'altro l'utilizzo di metodiche caratterizzate da un'ampia variabilità inter- e intraindividuale e con un basso tasso di standardizzazione, ci devono indurre a considerare i nostri dati in maniera molto cauta. Tali aspetti sono ancora più importanti se si considerano i possibili risvolti clinici che potrebbero emergere dalle nostre osservazioni. Riteniamo pertanto che siano necessari studi prospettici su casistiche più ampie e che si avvalgano di esami ematochimici e/o di test strumentali complementari rispetto a quelli considerati in questo studio, al fine di chiarire in modo definitivo il rischio che un soggetto con sindrome trombofilica maggiore ha di sviluppare un evento trombotico arterioso e quali possono essere i meccanismi coinvolti nello sviluppo di questa patologia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Prandoni P. Venous Thromboembolism and atherosclerosis: is there a link? *J thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl 1): 270-5.
- 2) Singer DE, Albers GW, Dalen JE, Go AS, Halperin JL, Manning WJ Antithrombotic therapy in atrial fibrillation: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126: 429 56S.
- 3) Harrington RA, Becker RC, Ezekowitz M, Meade TW, O'Connor CM, Vorchheimer DA, Guyatt GH. Antithrombotic therapy for coronary artery disease: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126:513 48S.
- 4) Antithrombotic Trialist's Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high-risk patients. *Br Med J* 2002; 324: 71-86.
- 5) Hovens MM, Snoep JD, Tamsma JT, Huisman MV. Aspirin in the prevention and treatment of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1470-5.
- 6) Janssen MC, der Heijer M, Cruysemberg JR, Wollrheim H, Bredie SJ Retinal vein occlusion: a form of venous thrombosis or a complication of atherosclerosis? A meta-analysis of thrombophilic factors. *Thromb Haemost* 2005; 93:1021-6
- 7) Prandoni P, Lensing AWA, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, Cattelan AM, Polistena P, Bernardi E, Peins MH The long term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann inter Med* 1996; 125: 1 7.
- 8) Prandoni P, Villalta S, Bagatella P, Rossi L, Marchiori A, Piccioli A, Bernardi E, Girolami B, Simioni P, Girolami A The clinical course of deep-vein thrombosis. Prospective long term follow-up of 528 symptomatic patients. *Haematologica* 1997; 82: 423-8

- 9) Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AWA, Prins Mh, Girolami A. An association between atherosclerosis and venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2003; 348: 1435-41.
- 10) Heit J. Venous thromboembolism epidemiology: implications for prevention and management. *Semin Thromb Haemost* 2002; 28(suppl 2):3-13.
- 11) Cogo A, Bernardi E, Prandoni P. et al. Acquired risk factors for deep vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Arch Intern Med* 1994; 154: 164-8.
- 12) Libertiny G, Hands L. Deep venous thrombosis in peripheral vascular disease. *Br J Surg* 1999; 86: 907-10.
- 13) Goldhaber SZ, Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women. *JAMA* 1997; 277: 642-5.
- 14) Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence. *Arch Intern Med* 2002; 162:1182-9.
- 15) Hansson PO, Eriksson H, Welin L, Svardudd K, Wilhelmsen L. Smoking and abdominal obesity: risk factors for venous thromboembolism among middle-aged men "the study of men born in 1913" *Ann Intern Med* 1999; 159: 1886-90.
- 16) Stein PD, Beemath A, Olson RE. Obesity as a risk in venous thromboembolism *Am J Med* 2005; 118: 978-80.
- 17) Hong C, Zhu F, Du D, Pilgram TK, Sicard GA, Bae KT. Coronary artery calcification and risk factors for atherosclerosis in patients with venous thromboembolism. *Atherosclerosis* 2005; 183: 169-74.
- 18) Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:201-10.

- 19) Vormittag R, Vukovic T, Stain M, Lehr S, Minar E, Pabinger I. Lipoprotein (a) in patients with spontaneous venous Thromboembolism. *Thromb Res* 2006; epub ahead of print
- 20) Vaya a, Mira Y, Ferrando F, Contreras M, Estelles A, Espana F, Corella D, Aznar J. Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors. *Br J Haematol* 2002; 118: 255-9.
- 21) Marcucci R, Liotta AA, Cellai AP, Rogolino A, Gori AM, Giusti B, Poli D, Fedi S et al. Increased plasma levels of lipoprotein (a) and the risk of idiopathic and recurrent venous thromboembolism. *Am J Med* 2003; 115: 601-5.
- 22) Deguchi H, Pecheniunk NM, Elias DJ, Averell PM, Griffin JH. High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation* 2005; 112: 893-9.
- 23) Decensi A, Maisonneuve P, Rotmensz N, Bettega D, et al. Effect of tamoxifen on venous thromboembolic events in a breast cancer prevention trial. *Circulation* 2005; 111: 650-6.
- 24) Ageno W, Beccantini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism. A meta-analysis. *Circulation* 2008; 117: 93-102.
- 25) Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288:2015-22.
- 26) Ageno W, Prandoni P, Romualdi E, Ghiraduzzi A, Dentali F, Pesavento R, Crowther M, Grandi AM, Venco A. The metabolic syndrome and the risk of venous thrombosis. A prospective, case control study. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1914
- 27) Lijfering W.M., Veeger NJ, Brouwer JL, van der Meer J. The risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinemic subjects may be a result of elevated factor VIII levels. *Haematologica* 2007; 92:1703-1706.
- 28) Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos Gm. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 874-7.

- 29) Squizzato A, Romualdi E, Ageno W. Why should statins prevent venous thromboembolism? A systematic literature search and a call for action. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1925-7
- 30) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-15.
- 31) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Internal brachial artery reactivity task force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. A report of the International brachial artery reactivity task force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-67.
- 32) Migliacci R, Gresele P. Smoking and impaired endothelium-dependent dilatation. *N Engl J Med* 1996; 334:1674.
- 33) Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 518-23.
- 34) Felmeden DC, Spencer CGC, Blann AD, Beevers DG, Lip GYH. Low-density Lipoprotein Subfractions and cardiovascular risk in hypertension. relationship to endothelial dysfunction and effects of treatment. *Hypertension* 2003; 41:528-33.
- 35) Rodriguez CJ, Miyake Y, Grahame-Clarke C, Di Tullio MR, Sciacca RR, Boden-Albala B, et al. Relation of plasma glucose and endothelial function in a population-based multiethnic sample of subjects without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2005; 96: 1273-7.
- 36) Migliacci R, Falcinelli F, Imperiali P, Floridi A, Nenci GG, Gresele P. Endothelial dysfunction in patients with kidney failure and vascular risk factors: acute effects of haemodialysis. *Ital Heart J* 2004; 5: 371-7.
- 37) Davi G, Gresele P, Violi F, Basili S, Catalano M, Giammarresi C, et al. Diabetes mellitus, hypercholesterolemia and hypertension, but not vascular disease per se, are associated with

- persistent platelet activation in vivo: evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation* 1997; 96: 69-75.
- 38) Brevetti G, Silvestro A, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index. *Circulation* 2003; 108: 2093-8.
- 39) Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasani RS, Keaney JF Jr, et al. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004; 109: 613-9.
- 40) Khare A, Shetty S, Ghosh K, Mohanty D, Chatterjee S. Evaluation of markers of endothelial damage in cases of young myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2005; 180: 375-80.
- 41) Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of non-invasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1769-75.
- 42) Blann AD. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost* 2006; 95: 49-55.
- 43) Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005; 111: 363-8.
- 44) Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. "The biogenesis of platelet from megakaryocyte proplatelets" *J Clin Investigation* 115: 3348-54
- 45) G. M. Rigolin "Fisiopatologia piastrinica" In Liso "Malattie del sangue e degli organi ematopoietici" G. Castoldi, V. Liso eds McGraw Hill Publ, Milano, 5° ed, pp 450-66
- 46) Pallotta I, Lovett M, Rice W, Kaplan DL, Balduino A. "Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis" *PloS one* 2009 Dec 21; 4(12): e8359.

- 47) Deutsch VR Tomer A “Megakaryocyte development and platelet production” British journal of hematology 134:453-66
- 48) Italiano JE Jr Hartwig JH “ Megakaryocyte development and platelet formation” In Michelson D. (ed.), Platelets , Amsterdam: Elsevier, 2007, pp. 22-44
- 49) Bruno E, Hoffman R ”Human megakaryocyte progenitor cells” In Kaushansky K (ed) Megakaryocyte biology and pathophysiology, Sem Hematol, 35:181-191, 199
- 50) Kato T, Matsumoto A, Ogami K, Tahara T, Morita H, Miyzaki H “ Native. Thrombopoietin: structure and function “ Stem Cells 16: 322-28
- 51) White JG “Platelet Structure” In Michelson D. (ed.), Platelets, Amsterdam: Elsevier, 2007, pp.45-73
- 52) Thomas C Bithel “Platelets and megakaryocytes” and “The physiology of primary hemostasis” in G. R Lee, T. S. Bithel, J. Foerster, J.W. Athens, J.N. Lukens eds “ Wintrobe’s Clinical hematology”, Lea & Febiger publ, Philadelphia, 9^o edition, pp.511-65
- 53) Alan D. Michelson et. al. “Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease” Nat Rev Drug Discover 2010 Feb; 9 (2):154-69.
- 54) Cortin V, Pineault N, Garnier A “ Ex vivo megakaryocyte and platelet production from human cord blood stem cells “ Methods Mol Biol 2009; 482: 109-26
- 55) Ley K,, Laudanna C, Cybulansky MI, Nourshargh S. “Getting to the site inflammation: the leucocyte cascade updated” Nat. Rev Immunol 2007 Sep;7(9):678-89.
- 56) Morrel CN, Sun H, Swaim AM, Baldwin WM 3rd. “Platelets an inflammatory force in transplantation “ Am J Transplant 7: 2447-54
- 57) Frenette PS “ The vessel wall and its interaction “ Blood 111:5271-81
- 58) Gawaz M Launger H, May AE. “Platelet in inflammation and atherogenesis” J Clin Invest 115:3378-84

- 59) Ley K, Zarbok A, “The role of platelets in acute lung injury” *Front. Biosci* 2009 Jan 1;14:150-8
- 60) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Osugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. “In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue” *J Clin Invest* 2008; 118: 710-21
- 61) Zeller JA, Lindner V, Frahm K, Baron R, Deuschl G. “Platelet activation and platelet-leucocyte interaction in patients with migraine. Subtype differences and influence of triptans” *Cephalalgia* 2005;25: 536-41
- 62) Berrettini M, Parise P, Constantini V, Grasselli S, Nanci GG. “Platelet activation in psoriasis” *Thromb and Haemost* 53: 195-7
- 63) Levi M “Platelets in sepsis” *Haematology* 2005, 10: 129-31
- 64) Nagahama M, Nomura S, Ozaki Y, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. “Platelet activation markers and soluble adhesion molecules in patients with LES” *Autoimmunity* 2001, 33: 85-94
- 65) Rogers RP, Levin J, “A critical appraisal of the bleeding time” *Semin Thromb Haemostasis*, 16 (1):1-20.
- 66) Margaret L Rand, Roland Leung, Packham MA. “Platelet function assays” *Transfusion and Apheresis Science* 28, 307-317
- 67) Ulrich Theo Seyfert, Hannelore Haubelt “Variables influencing multiplate whole blood aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy subjects” *Platelets* 18(3): 199-206.
- 68) H.K. Breddin “Can platelet aggregometry be standardized?” *Platelets*, 16 (3/4): 151-158.
- 69) Hung, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. “Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery taking aspirin.” *Circulation* 92:2432-6.

- 70) Gjesdal K, Nordou A. effect of fasting on plasma and platelet-free fatty acids and platelet function in healthy males. *Thromb Haemostasis* 36: 325-33.
- 71) Varani K, Portaluppi F. Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A_{2A} receptors: functional and biochemical aspects. *Circulation* 102: 285-289.
- 72) Wang JS, Jen CJ, Kung HC, Lin L, Hsiue TR, Chen HI. Different effects of strenuous exercise on platelet function in men." *Circulation*; 90: 2877-85.
- 73) Metha P, Metha J, Lawson D, Patel S. "ethanol stimulates prostacyclin biosynthesis by human neutrophils and potentiates anti platelet aggregatory effects of prostacyclin". *Thromb Res*; 48: 653-61.
- 74) May JA, Fox S, Glenn J, Craxford S, Heptinstall S."Platelet function reduces significantly during the morning" *Platelets*; 19: 556-8.
- 75) J. Peace, K Egan, G.F. Kavanagh, A.F. Tedesco, D.P. Foley, P. Dicker, M.C. Berndt, D. Kenny "Reduction intra-individual variation in platelet aggregation: implication for platelet function testing" *J Thromb Haemost* 2009, 7, 1941-3
- 76) Michelson AD "Flow cytometry: a clinical test of platelet function". *Blood*; 87: 4925-4936.
- 77) Semple JW, Simionowitch KA "Flow cytometric analysis of platelets from children with the Wiskott-Aldrich syndrome reveals defects in platelet development, activation and structure" *Haematology*; 97: 747-754.
- 78) Orsolya Toth, A. Calatzis, Penz S, Losonczy H, Siess W. "Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood" *Thrombosis and Haemostasis*, 96: 781-788
- 79) Cardinal DC, Flower RJ "The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behaviour in blood" *J Pharmacol Methods*; 3(2): 135-58
- 80) Madeleine L Kalb, Lukasz Postura, Shalbert G, Kozek-Langenecker SA, "the effect of ex vivo anticoagulant on whole blood aggregation" *Platelets* 20 (1):7-11.

- 81) Riess H, Braun G, Brehm G., Hiller E. "Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood" *Am J Clinical Pathology*, 85:50-56
- 82) Truss NJ, Armstrong PC, Liverani E, Vojnovic I, Warner TD "Heparin but not citrate anticoagulation preserves platelet function for prolonged period". *Journal of thrombosis and Hemostasis*, 7: 1897-1905.
- 83) Hanke AA; Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CF, Rahe- Meyer N, Gorlinger K. Impact of platelet count on results obtained from multiplate electrode platelet aggregometry (Multiplate). *Eur J Med Res*.2010 May 18 ; 15 (5):214-9.
- 84) Haapaniemi E, Helenus J, Jakovljevic D et al; Ischemic stroke patients with heterozygous Factor V Leiden present with multiplate brain infarctions and widespread atherothrombotic disease. *Thromb Haemost* 2009, 1747-1750.
- 85) Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL: A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90: 1747-1750.
- 86) Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-62
- 87) Tripodi A, Negri B, Bertina RM, Mannucci PM, Creening for FV-Q506 mutation. Evaluation of thirteen plasma based methods for their diagnostic efficacy in comparison with DNA analysis. *Thromb Haemost* 1997; 77:436-8.
- 88) Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Secchi E, Mannucci PM A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood* 1997; 90:1552-7
- 89) Faioni EM, Castaman G, Asti D, Lussana F, Rodighiero F Association of factor V deficiency with factor V HR2. *Haematologica*, 2004; 89:195-200

- 90) Castaman G, Faioni EM, Toso A, Bernardi F The factor V Leiden haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta analysis. *Haematologica* 2003; 88:1182-9
- 91) Segers K, Dahlback B, Nicolaes GAF Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost* 2007; 98:530-42
- 92) Castoldi. *Malattie del sangue e degli organi eritropoietici*. McGraw-Hill Italia Editore, 2007.
- 93) Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med* 2003; 138: 128-134.
- 94) Prandoni P, *Il Tromboembolismo Venoso attualità e prospettive*. Piccin Editore, Padova, 2008.
- 95) Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. *Hemostasis and Thrombosis*. 4th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2001: 1497-1516
- 96) Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 73: 876-89.
- 97) Gandrille S, Borgel D, Ireland H, et al. Protein S deficiency: a database of mutations, For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1201-14
- 98) Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7
- 99) Zoller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994; 94: 2521-4
- 100) Lucotte G, Mercier G, Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 362-367.

- 101) Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin genes associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703
- 102) Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to a prothrombin variant. *Tromb Haemost* 1998; 79: 706-708
- 103) Leeson P, Thorne S, Donald A et al. non invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli *Heart* 1997; 78:22-27.
- 104) Saouaf R, Arora S, Smakowski P et al. Reactive hyperaemic response of the brachial artery: comparison of proximal and distal occlusion. *Acad Radiol* 1998; 5: 556-560.
- 105) Gresele P, Migliacci R, Procacci A, De Monte P, Bonizzoni E. Prevention by a nitric oxide donating aspirin, but not by aspirin, of the acute endothelial dysfunction induced by exercise in patients with intermittent claudication. *Thromb Haemost* 2007; 97:444-50.
- 106) Gresele P, Guglielmini G, De Angelis M, Ciferri S, Ciofetta M, Falcinelli E, et al. Acute, short-term hyperglycemia enhances shear stress-induced platelet activation in patients with type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:1013-20.
- 107) Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1467-71.
- 108) Gerdtsen K, Weber M, Langer F, Eifrig B, Lindhoff-Last E. Platelet activation markers in patients with venous thromboembolism without predisposing factors. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005; 34: 1-5.
- 109) Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: association with cardiovascular risk factors and diseases. *A*

statement by Working Group on Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23:233-46

- 110) Prandoni P. Risk factors of recurrent venous thromboembolism: the role of residual vein thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/2004; 33: 351-3.
- 111) Prandoni P, Ghirarduzzi A, Prins MH, Pengo V, Davidson BL, Sorensen H, et al. Venous thromboembolism and the risk of subsequent symptomatic atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1891-6.
- 112) Becattini C, Agnelli G, Prandoni P, Silingardi M, Salvi R, Taliani MR, et al. A prospective study on cardiovascular events after acute pulmonary embolism. *Eur Heart J* 2005; 26: 77-83
- 113) Steffen LM, Folsom AR, Cushman M, Jacobs DR, Rosamond WD. Greater fish, fruit and vegetable intakes are related to lower incidence of venous thromboembolism. *Circulation* 2007; 115: 188-95.
- 114) Blackman DJ, Morris-Thurgood JA, Atherton JJ, Ellis GR, Anderson RA, Cockcroft JR, et al. Endothelium-derived nitric oxide contributes to the regulation of venous tone in humans. *Circulation* 2000; 101: 165-70.
- 115) Ray JG, Mamdani M, Tsuyuki RT, Anderson DR, Yeo EL, Laupacis A. Use of statins and the subsequent development of deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1405-10.
- 116) Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104: 2649-52.

TABELLE E FIGURE

	Soggetti con difetto	Soggetti senza difetto	<i>P value</i>
Soggetti, n	68	59	-
Sesso femmine, n (%)	39 (57)	31 (53)	0.93
Età, anni: media \pm DS	45 \pm 17	46 \pm 18	0.18
Storia di TEV, n (%)	34 (50)	3 (5)	<0.001
Diabete mellito, n (%)	4 (6)	3 (5)	0.06
Dislipidemia, n (%)	8 (12)	5(8)	0.25
Ipertensione, n (%)	9 (13)	8 (13)	0.70
Fumo, n (%)	22 (33)	16 (27)	0.06
Eventi cardiovascolari totali, n (%)	7 (10)	4 (7)	0.06
IM	4 (6)	2 (3)	0.13
Stroke ischemico	2 (3)	1 (1)	0.20
TIA	1 (1)	1 (1)	0.56
Età all'evento: media \pm DS	52 \pm 14	58 \pm 12	0.006

Tabella 1. Caratteristiche demografiche della popolazione studiata.

TEV: Tromboembolismo Venoso; IM: Infarto Miocardico; TIA: Attacco Ischemico Transitorio; DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Soggetti senza difetto	<i>P value</i>
Soggetti, n	24	21	-
Sesso femmine, n (%)	14 (60)	12 (57)	1.00
Età, anni: media ± DS	48 ±17	50 ±18	0.54
Storia di TEV, n (%)	12 (50)	1 (4)	<0.001
Diabete mellito, n (%)	1 (4)	1 (5)	0.26
Dislipidemia, n (%)	3 (12)	1 (6)	1.00
Ipertensione, n (%)	4 (17)	2 (8)	0.08
Fumo, n (%)	8 (35)	6 (27)	0.03
Eventi cardiovascolari totali, n (%)	3 (12)	2 (8)	0.14
IM	1 (4)	2 (10)	0.69
Stroke ischemico	1 (4)	0 (0)	1.00
TIA	1 (0)	0 (0)	0.72
Età all'evento: media± DS	45 ± 18	58 ± 16	0.02

Tabella 2. Caratteristiche demografiche della coorte di pazienti con Deficit di Prot C.

TEV: Tromboembolismo Venoso; IM: Infarto Miocardico; TIA: Attacco Ischemico Transitorio; DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Soggetti senza difetto	<i>P value</i>
Soggetti, n	26	22	
Sesso femmine, n (%)	15 (58)	12 (54)	0.88
Età, anni: media ± DS	45±19	47±18	0.43
Storia di TEV, n (%)	13 (50)	1 (5)	<0.001
Diabete mellito, n (%)	2 (8)	1 (5)	0.78
Dislipidemia, n (%)	3 (12)	2 (9)	0.54
Ipertensione, n (%)	3 (12)	3 (12)	0.86
Fumo, n (%)	8 (31)	7 (32)	0.95
Eventi cardiovascolari totali, n (%)	2 (8)	1 (5)	0.19
IM	2 (8)	0 (0)	0.22
Stroke ischemico	0 (0)	1 (5)	1.00
TIA	0 (0)	0 (0)	-
Età all'evento: media± DS	51 ± 16	61 ± 15	0.47

Tabella 3. Caratteristiche demografiche della coorte di pazienti con deficit di Prot S.

TEV: Tromboembolismo Venoso; IM: Infarto Miocardico; TIA: Attacco Ischemico Transitorio; DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Soggetti senza difetto	<i>P value</i>
Soggetti, n	18	16	-
Sesso femmine, n (%)	10 (53)	8 (53)	0.86
Età, anni: media ± DS	42±17	47±19	0.45
Storia di TEV, n (%)	9 (50)	1 (6)	<0.001
Diabete mellito, n (%)	1 (6)	1 (6)	0.05
Dislipidemia, n (%)	2 (11)	2 (13)	0.36
Ipertensione, n (%)	2 (11)	3 (18)	0.89
Fumo, n (%)	6 (30)	5 (28)	0.32
Eventi cardiovascolari totali, n (%)	2 (11)	1 (6)	0.05
IM	1 (6)	0 (0)	1.13
Stroke ischemico	1 (6)	0 (0)	0.64
TIA	0 (0)	1 (6)	0.56
Età all'evento: media± DS	52 ± 14	58 ± 12	0.006

Tabella 4. Caratteristiche demografiche della coorte di pazienti con deficit di Antitrombina. TEV: Tromboembolismo Venoso; IM: Infarto Miocardico; TIA: Attacco Ischemico Transitorio; DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Controlli senza difetto	P value
TRAP (media±DS)	66.3 ± 12	54.9 ± 14	ns
ADP (media±DS)	52.3 ± 18	43 ± 20	ns
ASPI (media±DS)	40.6 ± 15	31.9 ± 17	ns

Tabella 5: Valori di AUC (area sotto la curva) ai vari test aggregometrici nella popolazione totale oggetto dello studio. DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Controlli senza difetto	p
TRAP (media ±DS)	63.7 ± 18	54.9 ± 17	ns
ADP (media±DS)	48.2 ± 19	43 ± 14	ns
ASPI (media±DS)	42.3 ± 13	31.9 ± 15	ns

Tabella 6: Valori di AUC (area sotto la curva) ai vari test aggregometrici nella coorte di soggetti con deficit di Prot C. DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Controlli senza difetto	p
TRAP (media \pm DS)	66.5 \pm 15	54.9 \pm 14	ns
ADP (media \pm DS)	49.1 \pm 17	43 \pm 18	ns
ASPI (media \pm DS)	41.2 \pm 20	31.9 \pm 14	ns

Tabella 7: Valori di AUC (area sotto la curva) nei vari test aggregometrici nella coorte di soggetti con deficit di Prot S. DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Controlli senza difetto	p
TRAP (media \pm DS)	60.6 \pm 15	54.9 \pm 12	ns
ADP (media \pm DS)	47 \pm 16	43 \pm 14	ns
ASPI (media \pm DS)	39.2 \pm 13	31.9 \pm 18	ns

Tabella 8: Valori di AUC (area sotto la curva) nei vari test aggregometrici nella coorte di soggetti con deficit di Antitrombina. DS: Deviazione Standard.

	Soggetti con difetto	Soggetti senza difetto	<i>P value</i>
Diametro basale arteria brachiale (mm)	4.2 ± 0.1 (95% CI 3.9 - 4.4)	4.1 ± 0.1 (95% CI : 3.9 – 4.2)	0.18
Flusso basale (mL/min)	84 ± 10 (95% CI: 68.9 -105.6)	95 ± 11.4 (95% CI: 74.3 – 123.4)	0.74
Flusso dopo iperemia (mL/min)	398 ± 45.3 (95% CI : 323.5 – 497.5)	451 ± 54.9 (95% CI : 374.2 – 55.2)	0.60
FMD incremento diametro assoluto (mm)	0.173 ± 0.051 (95% CI : 0.055 -0.221)	0.208 ± 0.030 (95% CI : 0.167 – 0.264)	0.07
FMD incremento diametro in %	3.7± 0.5 (95% CI :3.0 – 4.9)	5.2 ± 0.6 (95% CI : 4.3 – 6.1)	0.015

Tabella 9: Caratteristiche dell'arteria brachiale basali e dopo iperemia.

CI: intervallo di confidenza; FMD: *flow-mediated dilatation* (dilatazione flusso mediata)

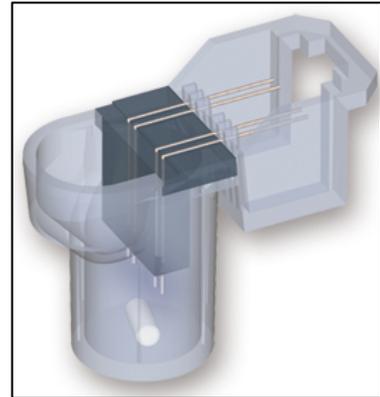


Figura 1: il multiplate. Figura 2: Cuvetta del Multiplate.

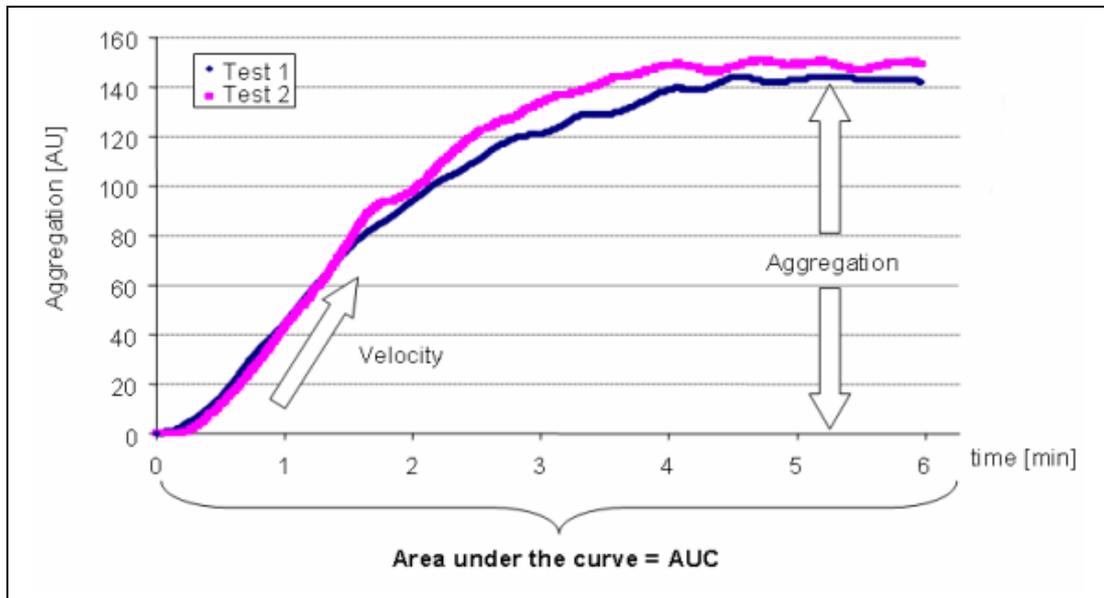


Figura 3: Curva di aggregazione

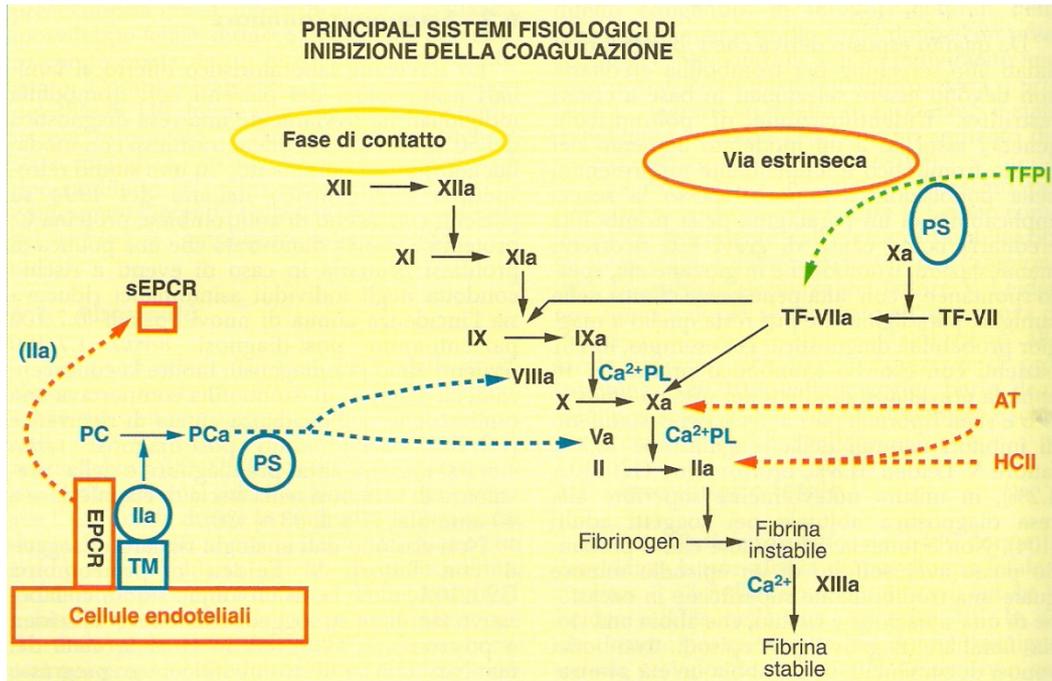


Figura 4: Principali sistemi di inibizione fisiologica della cascata coagulativa. Prandoni P, Il Tromboembolismo Venoso attualità e prospettive. Piccin Editore, Padova, 2008.

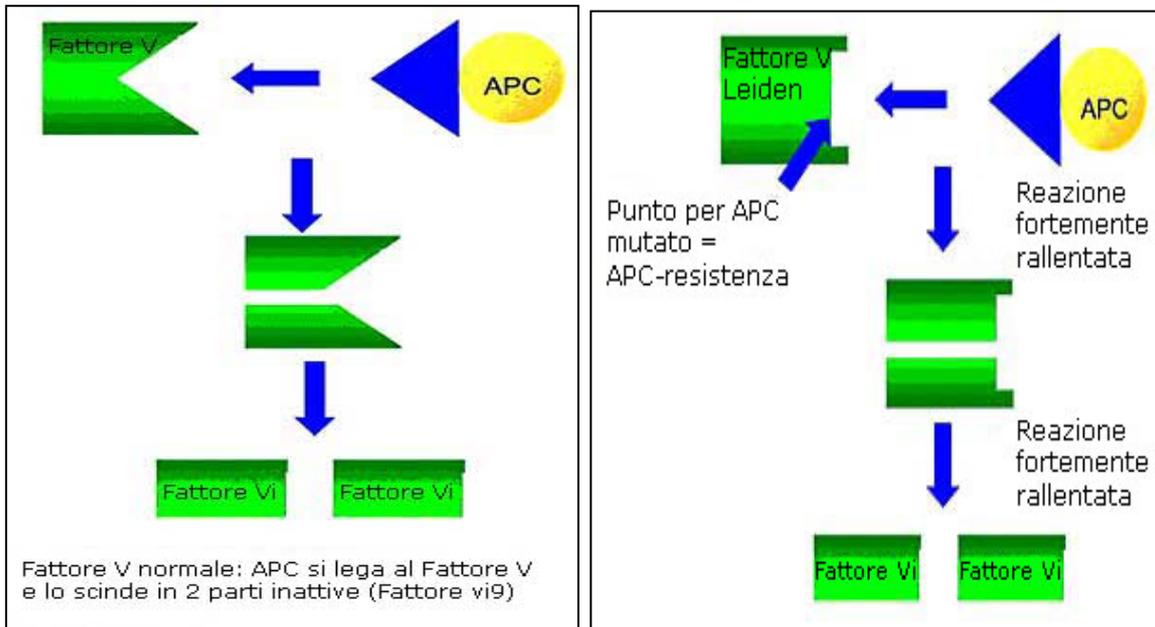


Figura 5: A) Fattore V normale. B) Fattore V di Leiden e resistenza alla PC attivata.



Figura 6: Studio della dilatazione flusso mediata (FMD) dell'arteria brachiale.