FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Sistema Sanitario Regione Lombardia

XXXVII Corso di aggiornamento

Alterazioni congenite ed acquisite della coagulazione

Focus su:

Prove di emostasi "point-of-care": a che punto siamo?

Promosso da

FONDAZIONE
INTERNAZIONALE
MENARINI

ABSTRACT BOOK

Milano, 17-18 novembre 2011

Centro Congressi Fondazione Stelline
C.so Magenta, 61

INDICE

M. Bonaccio, A. Bonanni, A. Di Castelnuovo, F. De Lucia, M. B. Donati, L. Iacoviello e G. de Gaetano, a nome dei Ricercatori del Progetto MOLI-SANI
La Dieta mediterranea ai tempi della crisi pag. 1

F. Peyvandi
Role of von Willebrand factor in arterial and venous thrombosis pag. 5

I. Santimone, F. Gianfagna, M. B. Donati, C. Cerletti, G. de Gaetano, L. Iacoviello
Platelet indices: variability and predictive value of thrombotic events pag. 6

A. Tripodi
Controllo della terapia con farmaci anti-vitamina K pag. 12

B. Giusti, C. Saracini, A. Vestrini, S. Galora
La disponibilità di test genetici rapidi può cambiare la loro utilità clinica? pag. 14

R. Paniccia
Test di funzionalità piastrinica e tromboelastografia: ruolo dei test point-of-care pag. 19

F. Pappalardo
Nuovi anticoagulanti nel paziente cardiochirurgico: scelte farmacologiche e di monitoraggio pag. 24

C. Legnani
D-Dimeri pag. 28

R. Abbate, A. M. Palombella, A. Armillis, G. Cioni
Il rischio tromboembolico nella donna: differenze di genere ed implicazioni terapeutiche pag. 32

R. Marcucci, A. M. Gori
HIT: aspetti diagnostici e di laboratorio pag. 36

F. Gianfagna, C. Tamburrelli, M. B. Donati, G. de Gaetano, C. Cerletti, L. Iacoviello
Ereditabilità delle funzioni piastriniche e leucocitarie pag. 46

D. Prisco, C. Cenci, E. Grifoni, E. Silvestri, G. Emmi
Arteriopatia periferica: patologia solo del vaso? pag. 50

G. Bettoni
Diagnosi e terapia della porpora trombotica trombocitopenica (TTP) pag. 58

C. Cerletti
I test di funzionalità piastrinica e la "resistenza" all'aspirina: focus sul PFA-100 pag. 69

La Dieta mediterranea ai tempi della crisi

Marialaura Bonaccio, Americo Bonanni, Augusto Di Castelnuovo, Francesca De Lucia, Maria Benedetta Donati, Licia Iacoviello e Giovanni de Gaetano, a nome dei Ricercatori del Progetto MOLI-SANI
Laboratori di Ricerca, Fondazione di Ricerca e Cura "Giovanni Paolo II", Campobasso

Gli studi scientifici più recenti hanno dimostrato che la dieta mediterranea (Mediet) è il modello alimentare più efficace per ridurre il rischio cardiovascolare e quello connesso a molte patologie croniche, come ad esempio le malattie neurodegenerative (1).
Nonostante l'evidenza sia quindi concorde nel suggerire un approccio di tipo mediterraneo a tavola, quello che accade attualmente nella vita reale sembra andare in tutt'altra direzione.
La Mediet, "scoperta" dal medico americano Ancel Keys durante i suoi ripetuti soggiorni a Napoli e dintorni, continua a perdere terreno proprio nei Paesi dell'area mediterranea che fino a qualche decennio fa potevano definirsi i veri custodi di un modello alimentare salvavita.

L'abbandono della Dieta Mediterranea

I dati sull'obesità sono disarmanti, e lo sono soprattutto nelle aree a tradizione mediterranea, dove si registrano i tassi più alti di sovrappeso. Particolarmente preoccupanti sono quelli che riguardano i bambini, con l'Italia tristemente capofila di una generazione condannata ad avere seri problemi di salute proprio per via di un peso eccessivo.
Paradossalmente, i bambini più a rischio sono quelli campani, la terra che di fatto ha consacrato il modello alimentare mediterraneo recentemente riconosciuto dall'Unesco patrimonio mondiale dell'umanità.
L'obesità, un tempo cruccio esclusivo di americani e popoli nord europei, sta quindi interessando anche zone probabilmente impreparate a gestire un'epidemia di grosse dimensioni.
Ma il sovrappeso, unito ad abitudini malsane, non ultimo lo scarso livello di attività fisica della maggior parte delle persone, hanno di

fatto prodotto generazioni ad alto rischio cardiovascolare. Ipertensione, ipercolesterolemia e diabete sono solo alcuni esempi della lunga serie di condizioni patologiche che scaturiscono da stili di vita dannosi.

Un nuovo nemico

Negli ultimi anni la Mediet ha un nuovo nemico. Tra le cause di abbandono del modello alimentare, infatti, molti sospetti ricadono proprio sulla crisi economica che sembra avere un effetto negativo sulle abitudini alimentari delle persone. Come dimostrato da alcune recenti ricerche, la Mediet o comunque regimi alimentari di buona qualità sono generalmente seguiti da persone con livello socio-economico più alto, mentre i meno abbienti ripiegano sempre più su prodotti a basso costo e ad alta densità energetica, che li pone ad un più alto rischio in termini non solo di obesità ma anche per quanto riguarda le malattie cardiovascolari (2-3).

Uno studio condotto recentemente in Spagna ha dimostrato che per mangiare sano non basta solo la buona volontà ma serve anche un portafoglio in salute. Stando ai risultati, chi mangia mediterraneo spende più denaro di chi invece opta per cibi che rientrano nel modello alimentare occidentale (4). A conclusioni simili sono arrivati anche ricercatori di Barcellona secondo cui chi segue la dieta mediterranea spende di più ma ha anche una minore prevalenza di obesità e sovrappeso rispetto invece a chi riesce a risparmiare qualche euro sulla spesa (5). Anche il progetto Moli-sani, condotto su un campione rappresentativo della popolazione italiana, ha evidenziato che il modello mediterraneo è seguito maggiormente da persone con reddito più alto (6).

Un impegno di tutta la società

È chiaro quindi che per un ritorno da protagonista della Mediet nella vita delle persone non basta accumulare prove sui suoi effetti benefici per la salute. La strada è molto più in salita di quanto possiamo immaginare e richiede un coinvolgimento totale dell'intera società civile ad ogni livello.

Rendere più accessibili e fruibili i prodotti che fanno parte della piramide mediterranea è il primo passo per un recupero di un modello

non solo alimentare ma che anche investa ogni singolo aspetto della nostra vita. Perché se è vero che siamo quello che mangiamo, è altrettanto vero che è l'insieme dei comportamenti che mettiamo in atto quotidianamente a segnare in qualche modo la salute che verrà. E allora non basta seguire la piramide, ma serve anche abbandonare quelle cattive abitudini che ciascuno di noi si porta dietro, quasi inconsapevolmente. Fare più attività fisica, anche solo salire le scale con la busta della spesa o prendere l'autobus alla fermata più lontana da casa possono realmente apportare benefici a lungo termine. Anche questo significa vivere secondo la lezione mediterranea. E prima lo capiremo, prima potremo gettare le basi per un'inversione di marcia e lasciarci alle spalle una pandemia che rischia di mettere in ginocchio non solo il mondo occidentale, ma anche i Paesi in via di sviluppo, ai quali il fascino di cibi ad alta densità energetica e a buon mercato sta facendo imboccare un vicolo cieco.

Bibliografia

1) Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr. 2010;92:1189-96.

2) Drewnowski A, Specter SE. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. Am J Clin Nutr. 2004;79:6-16.

3) Heidemann C, Schulze MB, Franco OH, van Dam RM, Mantzoros CS, Hu FB. Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women. Circulation. 2008 Jul 15;118(3):230-7.

4) Lopez CN, Martinez-Gonzalez MA, Sanchez-Villegas A, Alonso A, Pimenta AM, Bes-Rastrollo M. Costs of Mediterranean and western dietary patterns in a Spanish cohort and their relationship with prospective weight change. J Epidemiol Community Health. 2009 Nov;63(11):920-7.

5) H Schroder, J Marrugat and MI Covas. High monetary costs of dietary patterns associated with lower body mass index: a population-based study. International Journal of Obesity (2006) 30, 1574–1579.

6) Bonaccio M, Bonanni A, Di Castelnuovo A, De Lucia F, Donati MB, de Gaetano G and Iacoviello L, on behalf of the MOLI-SANI Project Investigators. Mediterranean diet in a time of crisis: lower income, lower adherence. Eur J Nutr 2011; 50:489–498.

Role of von Willebrand factor in arterial and venous thrombosis

Flora Peyvandi
U.O.S. Dipartimentale per la Diagnosi e la Terapia delle Coagulopatie, A. Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Università degli Studi di Milano and Luigi Villa Foundation, Milan, Italy

Von Willebrand factor (VWF) is a multimeric glycoprotein that acts as a stabilizer of coagulation factor VIII (FVII) in the circulation and mediates the adhesion of platelets to sites of vascular damage by binding to the platelet membrane glycoprotein Ib (GPIb). The GPIb binding site on VWF has been localized on the A1 domain of the protein, and the largest VWF multimers secreted by activated endothelial cells are endowed with a higher density of A1 domains and thereby support multiple interactions with platelets, resulting in heightened adhesive and aggregation properties. Therefore, the largest VWF multimers are highly thrombogenic and potent triggers and inducers of occlusive platelet thrombi, particularly when high shear forces are applied to circulating blood as it occurs in the microcirculation and in large atherosclerotic and stenotic arteries. This VWF-mediated mechanism of thrombus formation is substantiated by the demonstration that high plasma concentrations of VWF are a predictor of clinical events of complex atherothrombotic diseases (myocardial infarction, stroke); and that the presence in plasma of an excess of large VWF multimers is the cause of the disease called thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) the clinical prototype of thrombus formation due to massive intravascular platelet aggregation. Moreover elevated plasma levels of FVIII and VWF are risk factors for venous thrombosis. However, although recently the role of VWF in platelet plug formation in injured venules was reported how VWF plays a role in platelet recruitment in venous thrombosis remains a challenge. During this presentation I will try to provide insight into the latest pathophysiologic findings on the role of VWF in arterial and venous thrombosis.

Platelet indices: variability and predictive value of thrombotic events

Iolanda Santimone, Francesco Gianfagna, Maria Benedetta Donati, Chiara Cerletti, Giovanni de Gaetano, Licia Iacoviello
Laboratori di Ricerca, Fondazione di Ricerca e Cura "Giovanni Paolo II", Università Cattolica, Campobasso

Platelets are essential for primary haemostasis and endothelium repair, but also play a key role in atherogenesis and thrombus formation.
Recent epidemiological studies suggest that platelet indices are involved in the risk of cardiovascular disease.
Platelet count has been associated with vascular and non-vascular death while a recent meta-analysis showed that **mean platelet volume** is a predictor of cardiovascular risk.
However, our understanding of the regulation of platelet indices at population level is limited.
Genetics may contribute to a certain variation in platelet count and mean platelet volume. Several studies reported that inherited components explain a large portion of such indices variability in normal persons. A recent meta-analysis identified 15 loci associated with variation in platelet count and mean platelet volume, but could only explain a minor portion of trait variance.
The understanding of the non genetic regulation of the platelet indices is even more limited. Few studies identified age, sex and ethnicity as variables influencing platelet count.
Bain first showed that platelet count varied according to gender and ethnicity, a finding confirmed by Segal. More recently, Biino et al. showed in a Sardinia geographic isolate population, including a large age range, that platelet count progressively decreased during aging, with a consequent increase of cases with thrombocytopenia and a decrease of thrombocytosis cases in the elderly.

Data from the Moli-sani Project

We took advantage from the Moli-sani project (*www.moli-sani.org*), a large adult population-based survey performed in the Molise region, to study the association of each of the four major platelet indices –

namely, platelet count, plateletcrit, mean platelet volume, and platelet distribution width – with the other three indices and with a number of biochemical, environmental and clinical variables.
The cohort of the Moli-Sani Project was recruited from 30 city hall registries by a multistage sampling. First, townships were sampled in major areas by cluster sampling; then, within each township, participants aged ≥35 years were selected by simple random sampling. Exclusion criteria were pregnancy at the time of recruitment, disturbances in understanding or willingness, current poly-traumas or coma, or refusal to sign the informed consent. Thirty percent of subjects refused to participate; these were generally older and had a higher prevalence of cardiovascular disease and cancer.
Subjects (24,318) aged ≥35 years, selected by simple random sampling from 30 Molise cities and villages of different size were studied.
A significant negative correlation between platelet count and mean platelet volume was found. This finding, in agreement with other studies, could be interpreted as a reaction to a higher consumption of smaller platelets in order to maintain a constant platelet functional mass.
Moreover, platelet count was negatively associated with platelet distribution width. Such index could be potentially related with increased production of reticulated platelets from the bone marrow in response to the consumption of smaller platelets. Platelet volume, however, did not show any relation with either plateletcrit or platelet distribution width.
By analyzing a large number of variables, we observed that the major determinants of both platelet count, plateletcrit and platelet distribution width was white blood cell count, that explained respectively 6.2 out of 16% and 9.0 out of 21% of their total variability.
Although our model explained a smaller part of mean platelet volume and platelet distribution width heterogeneity, white blood cell count was again a major associated variable.
These findings support the hypothesis of a common regulation of haematological cells as recently suggested by the presence of a common genetic component.

The platelet as an inflammatory cell

The link between platelets and inflammation, suggested by previous studies is supported by our present findings. Indeed platelet indices are not only associated with white blood cell count, but are also significantly and independently related to a soluble inflammatory marker such as C reactive protein.

Platelets are considered as inflammatory cells since their count increases in many inflammatory states and has been associated with the level of other acute-phase proteins. Moreover platelets are a source of inflammatory mediators and can be activated by several inflammatory triggers during the process of atherothrombosis. The positive significant association between platelet count and plateletcrit with D-dimer levels further stresses this concept underlying the link between inflammation, platelets and activation of blood coagulation.

Platelet indices and gender

Women had significantly higher platelet indices than men (except for platelet distribution width that was slightly higher in men), suggesting an hormonal influence in their regulation. The process by which megakaryocytes proceed to proplatelet formation and platelet production is reportedly under the influence of autocrine estrogen. Additionally, estrogen-receptor antagonists inhibited platelet production *in vivo*, supporting a role of estrogens in platelet production. Contraceptives and hormone therapy, used by only a relatively small proportion of women in our sample, did not significantly influence any platelet parameter.

Platelet indices at different ages

All platelet indices varied with age. In particular platelet count and plateletcrit decreased with age in both men and women. A similar trend was observed for the prevalence of thrombocytosis that progressively decreased with age and the prevalence of thrombocytopenia that in contrast increased, until the level of 9% in subjects over 80 yrs.

In a recent publication, Biino et al provided for the first time an estimate of the prevalence of thrombocytosis and thrombocytopenia in

the general population of the Ogliastra region, in Sardinia, clearly showing that the prevalence of a mild thrombocytopenia was higher in older people. The decline in platelet counts we observed in older age is difficult to interpret, due to the cross-sectional nature of our data: it may reflect a reduced hematopoietic stem-cell reserve during aging or a survival advantage in those subjects with lower platelet counts.

Platelet indices and common bio-medical variables

Many other biological and clinical variables were associated with platelet indices, such as BMI, cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, glucose, diastolic blood pressure and antiplatelet drug use; however, although statistically significant, each explained less than 0.5% of platelet indices variability. As the association of these variables was mainly directed towards a risk profile for cardiovascular disease, it is possible that such association could become stronger in pathological conditions, such as diabetes, obesity or hypertension.

Environmental variables, including dietary habits, did not show any relevant association with platelet indices.

Uneven distribution of platelet indices among the Molise villages

While platelet indices were comparable among the Moli-sani population divided according to the 12 signs of the zodiac, they appeared to be significantly different across Molise villages. In particular, average platelet count differed by over 50 ($x10^9$/L) between Gildone and Sant'Angelo Limosano. Correspondingly, the prevalence of thrombocytopenia differed from 0.7% to 6.8% between these two villages. Such variation could not be explained by differences in other platelet count determinants or in villages altitude above the sea or in their distance from the recruitment centre.

That platelet count might differ by ethnicity has already been reported; our findings in a large Caucasian population, together with recent Biino's data, indicate that there is a micro-heterogeneity in platelet parameters even in subjects apparently ethnically homogeneous, leaving in the same Country and even in the same region.

Conclusions

In conclusion, a large number of non genetic variables explain a small portion of platelet indices heterogeneity, suggesting that genetics factors might play a major role. That both platelet count and platelet volume are highly inherited traits is already known. A recent meta-analysis identified 12 loci linked to mean platelet volume or platelet count. These SNPs however only explain 8.6% of mean platelet volume variance upon 75% of heritability, suggesting that other genetic or epigenetic factors could be involved. The availability of DNA samples stored in the large Moli-sani biological research bank (Moli-bank) will help better understanding the genetic regulation of platelet in the near future.

References

1) Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. J Clin Pathol. 1996;49:664-6.

2) Biino G, Balduini CL, Casula L, Cavallo P, Vaccargiu S, Parracciani D, Serra D, Portas L, Murgia F, Pirastu M. Analysis of 12, 517 inhabitants of Sardinian geographic isolate reveals that propensity to develop mild thrombocytopenia during ageing and to present mild, transient thrombocytosis in youth are new genetic traits. Haematologica. 2011; 96:10-3.

3) Centritto F, Iacoviello L, di Giuseppe R, De Curtis A, Costanzo S, Zito F, et al. Dietary patterns, cardiovascular risk factors and C-reactive protein in a healthy Italian population. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009; 19:697-706.

4) Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B, Mohler ER, Reilly MP, Berger JS. Mean Platelet Volume as a Predictor of Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009; 8:148-56.

5) de Gaetano G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. Haematologica 2001;86:349-356.

6) de Gaetano G, Cerletti C, Nanni-Costa MP, Poggi A. The blood platelet as an inflammatory cell. Eur Respir J Suppl. 1989;6:441s-445s.

7) Santimone I, Di Castelnuovo AF, de Curtis A, Spinelli M, Cugino D, Gianfagna F, Zito F, Donati MB, Cerletti C, de Gaetano G, Iacoviello L. White blood cells count, sex and age are major determinants of platelet indices heterogeneity in an adult general population: results from the MOLI-SANI project. Haematologica. 2011;96:1180-8.

8) Segal JB, Moliterno AR. Platelet counts differ by sex, ethnicity, and age in the United States. Ann Epidemiol. 2006;16:123-30.

9) Soranzo N, Spector TD, Mangino M, et al. A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. Nature Genetics; 2009; 41: 1182-90.

10) Iacoviello L, Bonanni A, Costanzo S, De Curtis A, Di Castelnuovo A, Olivieri M, et al. The Moli-Sani Project, a randomized, prospective cohort study in the Molise region in Italy; design, rationale and objectives. Ital J Public Health. 2007; 4:110–8.

Controllo della terapia con farmaci anti-vitamina K

Armando Tripodi
Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, Dipartimento di Medicina Interna, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico e Università degli Studi di Milano

I farmaci antivitamina K (AVK) richiedono un controllo di laboratorio per aggiustare la dose. Il test di scelta per questo controllo è il tempo di protrombina (PT) con risultato espresso in rapporto internazionale normalizzato (INR). Negli ultimi 20 anni sono stati sviluppati coagulometri portatili capaci di misurare, mediante una striscia reattiva, il PT da sangue capillare non citratato e convertire poi il risultato in INR.
Numerosi studi hanno dimostrato l'affidabilità di questi sistemi quando vengono utilizzati dallo specialista del centro trombosi, dal medico di medicina generale o dal paziente medesimo (auto-test). L'affidabilità di questi strumenti, unitamente al loro corretto uso, ha contribuito a semplificare enormemente la gestione dei pazienti sottoposti a questa terapia, il cui numero sta crescendo negli ultimi anni con notevole velocità, a causa dell'elevato numero di soggetti anziani con fibrillazione atriale che si avvalgono della terapia con VKA.
Il requisito essenziale per l'affidabilità di queste macchine è la calibrazione delle loro strisce reattive, che il fabbricante deve assicurare in accordo con gli standard suggeriti dalla organizzazione mondiale della sanità. Compito del Centro trombosi è l'individuazione dei pazienti che si possono avvalere dell'auto-test, la loro istruzione all'uso delle macchine ed il controllo sulla qualità dei risultati prodotti.

Bibliografia essenziale

1) Tripodi A, Arbini AA, Chantarangkul V, Bettega D, Mannucci PM. Are capillary whole blood coagulation monitors suitable for control of oral anticoagulant treatment by the international normalized ratio ? Thromb Haemost 1993; 70: 921.

2) Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AMHP, Tripodi A, Jespersen J, Shiach C, Horellou MH, Dias D, Egberg N, Iriarte JA, Kontopoulou-Griva I, Ortridge B. European Concerted Action on Anticoagulation (ECAA): Multicentre international sensitivity index calibration of two types of point of care prothrombin time monitor systems. Br J Haematol 2002; 116: 844-50.

3) Tripodi A, Chantarangkul V, Bressi C, Mannucci PM. International sensitivity index (ISI) calibration of the near patient testing prothrombin time monitor ProTime. Am J Clin Pathol 2003; 119: 241-5.

La disponibilità di test genetici rapidi può cambiare la loro utilità clinica?

Betti Giusti, Claudia Saracini, Anna Vestrini, Silvia Galora
Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica, Università di Firenze - Centro per le Malattie Aterotrombotiche, AOU Careggi, Firenze

Numerosi studi hanno ormai dimostrato come i soggetti trattati con terapia antitrombotica, farmaci antipiastrinici o anticoagulanti, mostrino un'ampia variabilità di risposta. La terapia anticoagulante orale con warfarin viene utilizzata per la prevenzione dell'ictus in pazienti con fibrillazione atriale, per la profilassi del tromboembolismo venoso e dell'embolia polmonare in pazienti con protesi valvolari cardiache meccaniche ed infarto del miocardio, per il trattamento e la profilassi della trombosi venosa profonda e dell'embolia polmonare. Il Warfarin interferisce con la coagulazione inibendo la rigenerazione della forma ridotta della vitamina K, un cofattore nell'attivazione mediata dalla gamma glutammil carboxilasi dei fattori della coagulazione II, VII, IX, e X. La forma ossidata inattiva della vitamina K è convertita nella forma ridotta dall'enzima vitamina K epossido reduttasi (VKOR) [1]. Il warfarin inibisce VORK determinando una minore disponibilità della forma ridotta della vitamina K in grado di supportare la reazione di attivazione della cascata coagulativa. Alcune isoforme dell'enzima epatico citocromo P450 (CYP2C9, CYP1A2, CYP3A4, e CYP2C19) partecipano al metabolismo del farmaco convertendolo in metaboliti inattivi [1]. Polimorfismi nei geni che codificano per VORK (-1639 G/A VORKC1) e CYP2C9 (CYP2C9*2 e CYP2C9*3) sono stati associati ad una alterata risposta al warfarin [1]. Nel 2007, la Food and Drug Administration (FDA) ha aggiunto una nota informativa (boxed warning) relative alla farmacogenetica alle specifiche del warfarin.
Diversi studi hanno dimostrato che l'utilizzo di algoritmi farmacogenetici, algoritmi che aggiungono alle informazioni demografiche e cliniche classiche l'informazione genetica relativa ai precedenti polimorfismi, sono in grado di determinare le dosi di farmaco per il raggiungimento del dosaggio terapeutico in maniera più

accurata ed in tempi più rapidi (www.warfarindosing.org) rispetto agli attuali algoritmi [2], riducendo le gravi complicanze cliniche ischemiche ed emorragiche in questi pazienti ad alto rischio e conseguentemente la percentuale di riospedalizzazioni (riduzione del 28% delle ospedalizzazioni per cause emorragiche ed ischemiche) [3,4].

La duplice terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico (aspirina) e clopidogrel viene utilizzata per la prevenzione della trombosi arteriosa in pazienti a rischio di eventi cardiovascolari. In particolare, in questi ultimi anni, l'inadeguata risposta al trattamento con clopidogrel è stata dimostrata essere un predittore indipendente di eventi cardiovascolari avversi maggiori (MACE), compresa la trombosi intra-stent (ST), in pazienti ad alto rischio vascolare sottoposti a duplice trattamento antiaggregante [5].

Studi in soggetti sani in trattamento con clopidogrel [6,7] e in pazienti con sindrome coronarica acuta (ACS) sottoposti ad intervento coronarico percutaneo (PCI) in doppia terapia antiaggregante [8,9] hanno dimostrato che la variante allelica CYP2C19*2 è un predittore indipendente di variabilità di risposta al trattamento antiaggregante.

Recentemente, diversi gruppi contemporaneamente, in diversi ambiti clinici ed a diversi tempi di follow-up, hanno dimostrato che il polimorfismo CYP2C19*2 è un determinante indipendente nell'insorgenza di MACE [10-14], con un rischio stimato variabile da 1,5 a 6,00. Una recente meta-analisi collaborativa ha dimostrato che essere portatori anche di un solo allele *2 CYP2C19 si associa ad un significativo incremento del rischio di MACE ed in particolare di trombosi intrastent [15]. Nel 2010, la FDA ha aggiunto una nota informativa relativa alla farmacogenetica alle specifiche del clopidogrel.

Sia per la terapia anticoagulante orale con warfarin che per la terapia antiaggregante con clopidogrel sono già o si stanno rendendo disponibili farmaci alternativi che ampliando la possibilità di scelta pongono il clinico di fronte alla necessità di scegliere la miglior strategia terapeutica in termini di miglior rischio/beneficio e costo/beneficio ottimale per il singolo paziente e per il sistema sanitario.

Sia per quanto riguarda il warfarin che il clopidogrel, le principali criticità per l'utilizzo da parte dei clinici dell'informazione farmacogenetica è il costo del test genetico ed i tempi in cui l'informazione genetica viene fornita dal laboratorio. Infatti, per un efficace utilizzo della informazione farmacogenetica nella gestione di questi pazienti è necessario che i risultati del test genetico siano disponibili con tempistiche analoghe all'INR per il warfarin e alla valutazione della funzionalità piastrinica per il clopidogrel.
Diverse ditte stanno mettendo a punto o hanno già sviluppato delle tecnologie per l'esecuzione di test genetici rapidi (risultati disponibili in 1-3 ore dal prelievo del materiale biologico (Nanosphere, Spartan Bioscience). Nel nostro laboratorio abbiamo valutato due tecnologie per il test genetico rapido della farmacogenetica del clopidogrel e del warfarin: 1) una tecnologia costituita da una stazione per l'estrazione a partire da 1 ml di sangue venoso periferico anticoagulato in EDTA fresco e l'ibridazione del DNA a sonde presenti su specifici chip (cartucce) ed una stazione di lettura del chip in grado di fornire una risposta in 3 ore (Nanosphere), e 2) una tecnologia costituita da un termociclatore e supporti e reattivi per la genotipizzazione a partire da DNA di cellule della mucosa buccale in 1 ora (Spartan RX). Entrambe queste tecnologie hanno mostrato una concordanza del 100% con i risultati ottenuti su una stessa coorte di soggetti analizzati (n=100) con tecnologia tradizionale di riferimento: estrazione con metodica basata su biglie magnetiche e genotipizzazione mediante tecnologia TaqMan.
I costi di entrambe le tecnologie sono di circa 90 Euro che, tenendo conto della riduzione degli eventi avversi e quindi delle riospedalizzazioni e dei costi sociali, così come della possibilità di utilizzare il farmaco economicamente più vantaggioso in pazienti in cui questo comunque garantisca un beneficio ottimale, potrebbero rappresentare un vantaggio economico per il sistema sanitario nazionale.

Bibliografia

1) Moyer TP, O'Kane DJ, Baudhuin LM, et al. Warfarin sensitivity genotyping: a review of the literature and summary of patient experience. Mayo Clin Proc 2009;84:1079-94.

2) International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. N Engl J Med 2009;360:753-64.

3) Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE, et al. Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). J Am Coll Cardiol 2010;55:2804-12.

4) Gong IY, Tirona RG, Schwarz UI, et al. Prospective evaluation of a pharmacogenetics-guided warfarin loading and maintenance dose regimen for initiation of therapy. Blood 2011;118:3163-71.

5) Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, et al. Impact of platelet reactivity following clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. J. Am. Coll. Cardiol. 49, 2312-2317 (2007).

6) Hulot JS, Bura A, Villard E, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. Blood 108, 2244-2247 (2006).

7) Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. J Thromb Haemost 2007;5:2429-36.

8) Giusti B, Gori AM, Marcucci R, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. Pharmacogenet. Genomics 17, 1057-1064 (2007).

9) Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of

elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. J Am Coll Cardiol 2008;51:1925-34.

10) Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. N. Engl. J. Med. 360, :363-375 (2009).

11) Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. N. Engl. J. Med. 360, 354-362 (2009).

12) Collet JP, Hulot JS, Pena A, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. Lancet 373, 309-317 (2009).

13) Giusti B, Gori AM, Marcucci R, et al. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. Am. J. Cardiol. 103, 806-811 (2009).

14) Sibbing D, Stegherr J, Latz W, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. Eur. Heart J. 30, 916-922 (2009).

15) Mega JL, Simon T, Collet JP, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. JAMA 2010;304:1821-30.

Test di funzionalità piastrinica e tromboelastografia: ruolo dei test point-of-care

Rita Paniccia
Dip Area Critica Medico-Chirurgica, AOU Careggi, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Le piastrine funzionanti giocano un ruolo chiave nell'attivazione del sistema emostatico, mentre lo squilibrio della loro funzione può determinare uno stato emorragico o, di contro, trombotico (1). Se sono stati fatti progressi nel chiarire i meccanismi molecolari che portano alle varie fasi piastriniche dell'emostasi primaria - nell'adesione, nello shape change, nella aggregazione e secrezione dei granuli piastrinici - i test clinicamente utili per valutare la funzione piastrinica hanno, invece, subito una sosta forzata e la maggior parte di essi sono stati utilizzati per la diagnosi e gestione del paziente con problemi emorragici piuttosto che trombotici (2,3).

Attualmente, dato che le piastrine sono coinvolte nello sviluppo dell'aterotrombosi - una delle principali cause di morte nel mondo occidentale - si è diffuso l'uso di questi test per valutare l'efficacia dei farmaci antipiastrinici, usati per trattare questa condizione e/o per identificare i pazienti a rischio di eventi avversi trombo embolici (4,5). Di contro, proprio il numero crescente di pazienti trattati con antiaggreganti ha aumentato il rischio di sanguinamento, specialmente durante procedure chirurgiche o dopo trauma. Inoltre, si sono affermati i test funzionali piastrinici come un valido aiuto nello scenario clinico prechirurgico/perioperativo a) nell'individuare la predisposizione al sanguinamento e b) nel monitorare l'efficacia di vari tipi di terapie pro-emostatiche (6).

La necessità e la possibilità di intervenire sul paziente critico, che presenta un'inadeguata funzionalità piastrinica, ha accelerato lo sviluppo tecnologico-informatico di nuovi test piastrinici facilmente eseguibili. Attualmente, sono a disposizione test funzionali che si avvalgono di una particolare strumentazione, dalla tipologia

questi metodi sono la facilità e rapidità di effettuazione e di risposta del test, la richiesta di piccoli volumi di campione di sangue, l'uso del sangue intero senza alcuna manipolazione/preparazione del campione da saggiare, la presenza del test direttamente al letto del malato o nelle sue vicinanze. Nonostante il loro costo spesso elevato, negli ultimi anni alcuni strumenti sono entrati nell'uso della pratica clinica e sono utilizzati non solo per l'effettuazione di test di screening generale, ma anche per monitorare la terapia antiaggregante e valutare potenzialmente il rischio di sanguinamento e/o trombosi. Questi test piastrinici di tipo POC e gli strumenti pertinenti si basano fondamentalmente sull'adesione e aggregazione piastrinica e sul contributo piastrinico alla solidità del coagulo (8-9).

Riguardo l'aggregometria si possono individuare test versatili, capaci di indagare sia il versante emorragico che trombotico e che vengono eseguiti con aggregometri ad impedenza quali Multiplate (Dynabyte, Germania) (10,11), oppure sistemi chiusi dedicati esclusivamente al monitoraggio della terapia antipiastrinica, quali VerifyNow (Accumetrics, USA) e Platelet work (Helena Laboratories, USA) (12,13). I sistemi basati sull'attivazione e adesione piastrinica da shear stress offrono come opportunità sia PFA-100 (Siemens, USA), nato con l'intento di standardizzare il tempo di sanguinamento ed ora utilizzato per monitorare la terapia con aspirina, sia Impact (DiaMed, Svizzera), usato essenzialmente per la diagnosi di difetti piastrinico (14,15) Infine, i nuovi test POC che possono studiare il ruolo delle piastrine nella produzione della trombina, formazione del coagulo e sua retrazione comprendono le apparecchiature tromboelastografiche/metriche che registrano la formazione del coagulo e la sua consistenza misurandone i tempi (16). La validazione di alcuni di questi test sopraccitati è ancora in studio, mentre, per altri, è stata confermata anche clinicamente: ne è stata riconosciuta, infatti, la capacità di misurare in pazienti cardiovascolari sotto terapia antipiastrinica una residua reattività piastrinica associata ad eventi avversi cardiovascolari (12,17,18).

I nuovi test POC in emostasi hanno fatto sì che la valutazione della funzione piastrinica potesse essere effettuata non solo nei laboratori specialistici o di ricerca, dove è affiancata ancora dall'uso di metodologie più tradizionali e complesse, ma anche direttamente

nelle strutture ad alta intensità di cura o nei laboratori generali sia centralizzati che distaccati.

Bibliogafia

1) George JN. Platelets. Lancet. 2000;355:1531-1539.

2) Ferreiro JL, Sibbing D, Angiolillo DJ. Platelet function testing and risk of bleeding complications. Thromb Haemost. 2010;103:1128-1135.

3) Collet JP, Montalescot G. Platelet function testing and implications for clinical practice. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2009;14:157-169.

4) Puddu P, Muscari A, Puddu GM, Cravero E, Giannoni C, Zoli M. The complexity of platelet metabolism and its contribution to atherothrombosis. Acta Cardiol 2009;64:157–165.

5) Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest 2005;115:3378–3384.

6) Bracey AW, Grigore AM, Nussmeier NA. Impact of platelet testing on presurgical screening and implications for cardiac and noncardiac surgical procedures. Am J Cardiol. 2006;98:25N-32N.

7) Pakala R, Waksman R. Currently available methods for platelet function analysis: advantages and disadvantages. Cardiovasc Revasc Med. 2011;12:312-322.

8) Gibbs NM. Point-of-care assessment of antiplatelet agents in the perioperative period: a review. Anaesth Intensive Care. 2009;37:354-369.

9) Lippi G, Favaloro EJ, Salvagno GL, Franchini M. Laboratory assessment and perioperative management of patients on

antiplatelet therapy: from the bench to the bedside. Clin Chim Acta. 2009;405:8-16.

10) Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marcucci R, Prisco D, Abbate R. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. Am J Clin Pathol. 2009;131:834-842.

11) Sibbing D, Schulz S, Braun S, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A. Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. J Thromb Haemost. 2010;8:250-256.

12) Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, Giusti B, Valente S, Giglioli C, Buonamici P, Antoniucci D, Abbate R, Gensini GF. Cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by residual platelet reactivity to ADP detected by a point-of-care assay: a 12-month follow-up. Circulation. 2009;119:237-242.

13) Campbell J, Ridgway H, Carville D. Plateletworks: a novel point of care platelet function screen. Mol Diagn Ther. 2008;12:253-258.

14) Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, Giglioli C, Buonamici P, Antoniucci D, Gensini GF, Abbate R. Residual platelet reactivity is associated with clinical and laboratory characteristics in patients with ischemic heart disease undergoing PCI on dual antiplatelet therapy. Atherosclerosis. 2007;195:e217-223.

15) Horvath M, Eichelberger B, Koren D, Böhm A, Ay C, Jilma B, Panzer S, Jilma-Stohlawetz P. Function of platelets in apheresis platelet concentrates and in patient blood after transfusion as assessed by Impact-R. Transfusion. 2010;50:1036-1042.

16) Afshari A, Wikkelsø A, Brok J, Møller AM, Wetterslev J. Thrombelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemotherapy versus usual care in patients with massive transfusion. Cochrane Database Syst Rev. 2011;(3):CD007871.

17) Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehilli J, Vogt W, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N.. Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. J Am Coll Cardiol. 2009;53:849-856.

18) Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Vermylen J, Cerletti C, de Gaetano G. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review. Thromb Haemost. 2008;99:14-26.

Nuovi anticoagulanti nel paziente cardiochirurgico: scelte farmacologiche e di monitoraggio

Federico Pappalardo
Terapia intensiva Cardiochirurgia, Ospedale San Raffaele, Milano

Gli agenti antitrombotici sono entrati nell'uso clinico già a partire dalla II guerra Mondiale, benché in molti altri campi ci siano stati notevoli progressi (vd. antibiotici) i pilastri attuali della terapia antitrombotica, l'eparina con i suoi derivati e il warfarin, sono stati sviluppati per l'uso negli anni 40 del secolo scorso.
Nell'ultima decade si è assistito tuttavia a una grande spinta nel produrre farmaci antitrombotici più efficaci, più maneggevoli, con meno effetti collaterali e minori interazioni farmaco-farmaco, farmaco-alimento con l'obiettivo dichiarato di semplificare la gestione a lungo termine della terapia antitrombotica.
Queste nuove classi di farmaci includono gli inibitori diretti della trombina (DTI) e gli inibitori del fattore Xa. Le formulazioni orali del fattore Xasono il rivaroxaban, l'apixaban e l'edoxaban mentre l'unico DTI assumibile per via orale è il dabigatran exilato. La necessità di legarsi all'AT3 per svolgere la propria azione permette di separare il Fondaparinux dagli altri inibitori del fattore Xa. I DTI, invece, non sono dipendenti dall'AT3 e tra questi la lepirudina, l'argatroban e la bivalirudina sono disponibili per somministrazione endovenosa per l'uso nei pazienti con HIT.
La scelta di un nuovo anticoagulante dipende sempre più dalla disponibilità in commercio, dalle condizioni mediche del paziente e dalle preferenze del clinico.

Il fondaparinux è un pentasaccaride anticoagulante sintetico, analogo all'eparina. Aumenta l'inibizione del fattore Xa legandosi all'AT3. L'emivita è di 18 h, e andrebbe quindi somministrato una volta al giorno. [1] La curva dose risposta è lineare. Il fondaparinux viene escreto per via renale ed è pertanto controindicato nei pazienti con insufficienza renale terminale. L'effetto anticoagulante è più potente rispetto all'enoxaparina. [1] Il rischio di sanguinamento non è aumentato rispetto alle LMWH.[1] I pazienti trattati sviluppano anticorpi anti PF4/eparina con una frequenza analoga a quelli trattati

con LMWH ma lo sviluppo di HIT appare eccezionalmente rara e questo probabilmente a causa della sua corta catena polisaccaridica di 10-12 saccaridi. [2] L'uso del fondaparinux in pazienti in ICU con insufficienza renale o MOF non è raccomandato per il rischio di accumulo. [3]

La lepirudina è una hirudina ricombinante (trovata nella saliva della sanguisuga medicinale, *Hirudomedicinalis*) e deriva da un lievito geneticamente modificato. È approvata per il trattamento delle trombosi complicanti la HIT. [4] La lepirudina si lega alla trombina ed inibisce la sua attività protrombotica. Dopo somministrazione endovenosa, la lepirudina raggiunge il livello picco in circa 15 minuti e si mantiene allo "steady state" nel plasma per circa 1-2 ore. [35] Sono richiesti aggiustamenti del dosaggio nei pazienti con insufficienza renale, dal momento che il farmaco è sottoposto ad eliminazione renale. Nel 30% dei pazienti che sono trattati con lepirudina, potrebbero svilupparsi anticorpi IgG anti-irudina. Reazioni anafilattiche dovute a terapia con lepirudina sono raramente osservate. Il rischio di anafilassi può essere ridotto evitando la somministrazione di boli di farmaco.

L'argatrobanè un derivato sintetico della L-arginina. Inibisce reversibilmente sia la trombina solubile sia quella legata al trombo ed ha un'emivita di 50 minuti dopo somministrazione endovenosa. Nei pazienti con disfunzione epatica, l'emivita sale a più di 6 ore, dal momento che l'argatroban è sottoposto ad escrezione epatica. [3]Nei pazienti in ICU per scompenso cardiaco, MOF, anasarca severo e durante i primi giorni post chirurgia cardiaca è frequente riscontrare anormalità della perfusione epaticae quindi la velocità di infusione dovrebbe essere ridotta. [36] L'argatroban è invece controindicato nei pazienti con insufficienza cellulare epatica. [36]Con l'argatroban non si formano gli anticorpi che si sviluppano con la lepirudina. [7] L'incidenza di complicanze tromboemboliche è maggiore nei pazienti trattati con l'argatroban che in quelli trattati con la lepirudina. Questo è stato giustificato, dalla più corta durata della terapia con argatroban rispetto alla lepirudina. [8]

La bivalirudinaè un oligopeptide analogo all'hirudina che differisce nelle dimensioni poiché è un terzo del suo capostipite (20 vs 65 aminoacidi). La bivalirudina combina un segmento carbossi-

terminale di 12 aa (dodecapeptide) derivato dal sito di legame della hirudina nativa, a una sequenza tetrapeptidica, sito attivo di legame, all'estremità amino-terminale; quattro residui di glicina legano a ponte questi due segmenti. [910] Come l'hirudina, la bivalirudina è un DTI bivalente e si lega specificamente alla trombina su due siti, senza la necessità di cofattori. Laddove l'hirudina si lega irreversibilmente alla trombina, il legame della bivalirudina al sito attivo della trombina è transitorio. La bivalirudina inibisce la trombina indifferentemente se questa è libera in soluzione o se legata alla fibrina; in contrasto con l'eparina che si lega scarsamente alla trombina legata alla fibrina. Presenta un trascurabile potenziale immunogenico, e differisce rispetto agli altri DTI, hirudina e argatroban, per la via di eliminazione. La bivalirudina è eliminata preferenzialmente (80%) attraverso una via non organo-dipendente, proteolitica, e con il restante 20% dipendente dalla clearance renale. L'emivita della bivalirudina di circa 25 minuti è la più corta tra tutti i DTI. Dopo sospensione dell'infusione, l'effetto anticoagulante scompare rapidamente con ritorno alla normalità dell'aPTT entro 1-2 ore. L'emivita nell'insufficienza renale è allungata a circa 1 h e nel contesto della dialisi si allunga a circa 4 h. Non esistono antidoti specifici. L'emodialisi, l'emofiltrazione e la plasmaferesi possono rimuovere significative quantità di farmaco e potrebbero tornare utili in situazioni di sovradosaggio.

Bibliografia

1) Lobo B, Finch C, Howard A, Minhas S. Fondaparinux for the treatment of patients with acute heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost. 2008; 99(1):208-214.

2) Warkentin TE. Fondaparinux versus direct thrombin inhibitor therapy for the management of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) - bridging the river coumarin. Thromb Haemost. 2008; 99(1):2-3.

3) Selleng S, Selleng K, Wollert HG, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients requiring prolonged intensive care

unit treatment after cardiopulmonary bypass. J Thromb Haemost. 2008; 6(3):428-435.

4) Warkentin TE. Management of heparin-induced thrombocytopenia: A critical comparison of lepirudin and argatroban. Thromb Res. 2003; 110(2-3):73-82.

5) Greinacher A. Lepirudin: A bivalent direct thrombin inhibitor for anticoagulation therapy. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2004; 2(3):339-357.

6) Keegan SP, Gallagher EM, Ernst NE, Young EJ, Mueller EW. Effects of critical illness and organ failure on therapeutic argatroban dosage requirements in patients with suspected or confirmed heparin-induced thrombocytopenia. Ann Pharmacother. 2009; 43(1):19-27.

7) Lewis BE, Wallis DE, Berkowitz SD, et al. Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Circulation. 2001; 103(14):1838-1843.

8) Lubenow N, Eichler P, Lietz T, Greinacher A, Hit Investigators Group. Lepirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia - results of the third prospective study (HAT-3) and a combined analysis of HAT-1, HAT-2, and HAT-3. J Thromb Haemost. 2005; 3(11):2428-2436.

9) Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton JW,2nd. Design and characterization of hirulogs: A novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. Biochemistry. 1990; 29(30):7095-7101.

10) Warkentin TE, Koster A. Bivalirudin: A review. Expert Opin Pharmacother. 2005; 6(8):1349-1371.

D-Dimeri

Cristina Legnani
U.O. di Angiologia e Malattie della Coagulazione "Marino Golinelli", Bologna

Attualmente la diagnosi di tromboembolia venosa (TEV) si basa sull'uso di tre strumenti diagnostici: la valutazione della probabilità clinica (tramite l'uso di score validati), il dosaggio dei D-dimeri e l'esecuzione di un'indagine strumentale. La strategia diagnostica che viene maggiormente utilizzata prevedere come primo step la valutazione della probabilità clinica; nei pazienti con bassa probabilità clinica viene poi eseguito il dosaggio del D-dimero. Nel caso in cui il livello dei D-dimeri risulti al di sotto di un cut-off, che deve essere stato determinato in modo specifico, viene esclusa la presenza di TEV, senza necessità di ulteriori accertamenti. In tutti gli altri casi (pazienti con bassa probabilità e D-dimeri positivi e pazienti con alta probabilità, indipendentemente dal livello dei D-dimeri) è indicata una valutazione strumentale.

Poiché il dosaggio dei D-dimeri viene utilizzato per escludere la presenza di TEV in pazienti con bassa probabilità clinica senza sottoporre questi pazienti ad indagini strumentali è indispensabile che la sensibilità del metodo sia molto elevata [> del 98%, (1,2)], allo scopo di evitare false negatività. La specificità del test determina però il numero di indagini che dovranno essere eseguite: una bassa specificità comporta, infatti, l'esecuzione di una indagine strumentale in un numero elevato di soggetti. I dati che abbiamo a disposizione in questo momento evidenziano che la sensibilità e specificità dei metodi per il dosaggio dei D-dimeri hanno un andamento inverso in funzione del tipo di metodologia utilizzata: i metodi che si basano su tecnologia ELISA/ELFA e i metodi di agglutinazione quantitativi di seconda generazione presentano una più alta sensibilità (bassa probabilità di falsi negativi) ma una minore specificità (alta probabilità di falsi negativi), rispetto ai metodi che usano altra tecnologia (metodi di agglutinazione semi-quantitativi/qualitativi e metodi che impiegano sangue in-toto) (3).

Nel contesto delle strategie diagnostiche per la TEV, l'uso di metodi point-of-care (POC) per la determinazione dei D-dimeri sarebbe di grande utilità in quanto consentirebbe un risparmio di tempo per l'esecuzione del test stesso e quindi una riduzione della durata di permanenza dei pazienti con sospetta TEV in dipartimenti di emergenza, e aumento della percentuale di pazienti che possono essere dimessi in tempi rapidi. Un recente lavoro ha, infatti, dimostrato che con l'uso di un POC per il dosaggio dei D-dimeri si otteneva, come atteso, una riduzione significativa del tempo necessario per ottenere il risultato del test, che ha determinato una significativa conseguente riduzione del tempo di permanenza dei pazienti al pronto soccorso e una minore percentuale di ricoveri (4).

Esistono al momento attuale in commercio numerosi POC per il dosaggio dei D-dimeri, metodi basati però su tecnologie molto diverse: alcuni sono quantitativi o semi-quantitativi e quindi richiedono l'uso di piccoli strumenti portatili, altri sono qualitativi e possono essere eseguiti al letto del paziente senza l'uso di strumentazione. Questi metodi sono stati valutati in numerosi studi pubblicati (5-10). Una recente meta-analisi (5) ha valutato quattro diversi POC per il dosaggio dei D-dimeri (due metodi quantitativi e due qualitativi), concludendo che sia i test quantitativi che quelli qualitativi possono essere usati in sicurezza per escludere la presenza di TEV in pazienti ambulatoriali in associazione a bassa probabilità clinica. La sensibilità dei test è risultata compresa tra 85% e 96% e la specificità tra 33% e 74%. I due metodi quantitativi hanno però dimostrato una maggiore accuratezza diagnostica rispetto ai metodi qualitativi.

Benché gli autori di questa meta-analisi concludano che sia i metodi quantitativi che qualitativi possono essere usati in pazienti ambulatoriali con bassa probabilità clinica per escludere la presenza di TEV, vanno tenute presenti alcune criticità. 1) Per alcuni metodi valutati il numero di pazienti arruolati era piuttosto limitato. 2) Alcuni metodi sono stati valutati solo in pazienti con sospetta trombosi venosa profonda (TVP); è quindi necessaria una certa cautela nell'uso di questi metodi in pazienti con sospetta embolia polmonare (EP), perché, come è stato dimostrato per i metodi tradizionali, la sensibilità e specificità potrebbe essere diversa in caso di pazienti con sospetta

TVP o EP (3). 3) Un altro problema importante che non va sottovalutato riguarda il tipo di metodologia; molti di questi POC per il dosaggio dei D-dimeri sono metodi di tipo qualitativo che non richiedono alcuna strumentazione. Essendo però l'endpoint visivo, è stata segnalata per questi metodi una certa variabilità inter-osservatore. Benché questi metodi abbiamo mostrato una buona accuratezza diagnostica in alcuni ampi studi pubblicati (5), è ritenuto da molti che dovrebbero sempre essere preferiti metodi osservatori-indipendenti. I risultati ottenuti in studi clinici con metodi che si basano su una lettura visiva sono, infatti, difficilmente traslabili nella realtà quotidiana, dove le condizioni operative sono molto meno rigorose.

In conclusione, i metodi POC per il dosaggio dei D-dimeri hanno grosse potenzialità nell'ambito delle strategie diagnostiche per la TEV, ma i risultati che abbiamo a disposizione in questo momento suggeriscono una certa prudenza nel loro impiego nella pratica clinica, in attesa di avere ulteriori conferme.

Bibliografia

1) Heim SW, Schectman JM, Siadaty MS, et al. D-dimer testing for deep venous thrombosis: A metaanalysis. Clin Chem 2004; 50: 1136-47.

2) Keeling DM, Mackie IJ, Moody A, et al. The diagnosis of deep vein thrombosis in symptomatic outpatients and the potential for clinical assessment and D-dimer assays to reduce the need for diagnostic imaging. Br J Haematol 2004; 124: 15-25.

3) Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AW, et al. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. J Thromb Haemost 2007; 5: 296-304.

4) Lee-Lewandrowski E, Nichols J, Van Cott E, et al. Implementation of a rapid whole blood D-dimer test in the emergency department of an urban academic medical center:

impact on ED length of stay and ancillary test utilization. Am J Clin Pathol 2009; 132: 326-31.

5) Geersing GJ, Janssen KJ, Oudega R, et al. Excluding venous thromboembolism using point of care D-dimer tests in outpatients: a diagnostic meta-analysis. BMJ 2009; 339: b2990.

6) Baker PM, Howgate SJ, Atherton J, et al. Comparison of a point of care device against current laboratory methodology using citrated and EDTA samples for the determination of D-dimers in the exclusion of proximal deep vein thrombosis. Int J Lab Hematol 2010; 32: 477-82.

7) Bertsch T, Chapelle JP, Dempfle CE, et al. Multicentre analytical evaluation of a new point-of-care system for the determination of cardiac and thromboembolic markers. Clin Lab 2010; 56: 37-49.

8) Geersing GJ, Toll DB, Janssen KJ, et al. Diagnostic accuracy and user-friendliness of 5 point-of-care D-dimer tests for the exclusion of deep vein thrombosis. Clin Chem 2010; 56: 1758-66.

9) Sidelmann JJ, Gram J, Larsen A, et al. Analytical and clinical validation of a new point-of-care testing system for determination of D-Dimer in human blood. Thromb Res 2010; 126: 524-30.

10) Tomonaga Y, Gutzwiller F, Luscher TF, et al. Diagnostic accuracy of point-of-care testing for acute coronary syndromes, heart failure and thromboembolic events in primary care: a cluster-randomised controlled trial. BMC Fam Pract 2011; 12: 12-20.

Il rischio tromboembolico nella donna: differenze di genere ed implicazioni terapeutiche

Rosanna Abbate, Anna Maria Palombella, Alessandra Armillis, Gabriele Cioni
Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica, Università di Firenze - Centro per le Malattie Aterotrombotiche, AOU Careggi, Firenze

Lo studio dell'aterotrombosi è un campo in rapida evoluzione, e significativi progressi sono stati raggiunti nella comprensione dei vari aspetti della patologia proprio negli ultimi anni. Sono state ben dimostrate le differenze tra i due sessi sia nella presentazione dei sintomi, sia nella risposta al farmaco, che nella manifestazione delle complicazioni cliniche [1-10].
La gestione della patologia aterotrombotica, comunque, è generalmente dettata dall'evidenza di dati derivati da "trial" condotti soprattutto su uomini, mentre pochi sono gli studi che hanno focalizzato la loro attenzione esclusivamente sulle donne. Studi epidemiologici hanno dimostrato un'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari nelle donne [1-10]. Tutti questi studi hanno evidenziato l'urgenza di identificare ed applicare strategie preventive per il controllo e la riduzione dei fattori di rischio aterotrombotici attraverso la formulazione di carte del rischio in donne asintomatiche, e strategie terapeutiche per la correzione dell'esposizione ai fattori di rischio in donne sintomatiche e asintomatiche.
La differente "penetranza" dei fattori di rischio cardiovascolari nelle donne, unita all'interazione con le terapie ormonali gioca un ruolo importante nello sviluppo dei processi aterosclerotici alla base delle patologie cardiovascolari stesse. Nonostante molte strategie di prevenzione primaria e secondaria, le patologie correlate con il processo aterosclerotico rimangono le principali cause di mortalità e morbidità [1-10]. L'infiammazione e la disfunzione endoteliale hanno un ruolo chiave nella patogenesi dell'aterotrombosi e nei conseguenti eventi cardiovascolari. Il tabagismo, le errate abitudini alimentari, la tendenza alla sedentarietà, ed, in generale, un errato stile di vita associato a ipertensione e dislipidemia condizionano la soglia del

rischio. Tuttavia, la correzione dello stile di vita associato a specifiche strategie terapeutiche volte alla riduzione dei fattori di rischio cardiovascolare, potrebbe contrastare l'ambiente pro-aterogeno correggendo il processo infiammatorio e la disfunzione endoteliale.
La presenza di condizioni geneticamente determinate correlate ad alterazioni del profilo coagulativo e della funzione endoteliale potrebbe interagire con componenti ambientali nel determinare un fenotipo critico ad alto rischio trombotico nelle donne.
Evidenze cliniche sottolineano le differenze tra i sessi in relazione al peso dei singoli fattori di rischio tradizionali e quelli correlati con l'infiammazione (e.g. esercizio fisico, status metabolico, livelli di proteina C reattiva, citochine e chemochine infiammatorie). È stato ipotizzato che queste differenze possono essere la diretta conseguenza di differenze cromosomiche. Il cromosoma Y contiene il gene SRY che è implicato nello sviluppo dell'ipertensione, modulando la sintesi di norepinefrina [11], mentre il cromosoma X contiene il gene che codifica per il recettore degli androgeni. Inoltre, altri geni presenti sul cromosoma X codificano per enzimi implicati nello stress ossidativo, nella sopravvivenza cellulare, nell'apoptosi e nella distribuzione del grasso corporeo. [12-14]. Questi dati indicano che i cromosomi sessuali regolano una vasta gamma di risposte che influenzano lo sviluppo, la progressione e le complicanze cliniche della patologia aterotrombotica. Inoltre, le differenze di sesso nell'esposizione alle patologie aterotrombotiche e nella risposta alle strategie terapeutiche possono essere correlate alla completa espressione dei polimorfismi dei geni del cromosoma X nei maschi, avendo una sola copia del cromosoma X, mentre, attraverso l'inattivazione casuale di uno dei due cromosomi X nelle donne, i polimorfismi possono essere presenti con un fenotipo a mosaico nelle donne [15,16].
Studiando i profili di espressione genica del sangue venoso periferico, così come i polimorfismi dei geni implicati nella risposta alle terapie antipiastriniche, e la funzione piastrinica nei pazienti con sindrome coronarica acuta sottoposti ad intervento coronarico percutaneo, il nostro gruppo ha identificato nuovi meccanismi che caratterizzano le patologie aterotrombotiche nelle donne.
Per esempio, oltre ad alcuni geni sul cromosoma X e Y, come il gene XIST che regola l'inattivazione del cromosoma X, abbiamo trovato

differenti geni su cromosomi autosomici che erano espressi in maniera significativamente differente tra uomini e donne. Tra questi geni abbiamo trovato il gene ABHD2 (contenente il dominio abhydrolasico 2). Nel 2007, Miyata e coll. hanno dimostrato che questo gene era espresso nelle lesioni aterosclerotiche ed era associato alla stabilità della placca.

Bibliografia

1) Arain FA, Kuniyoshi FH, Abdalrhim AD, Miller VM. Circ J 2009;73:1774-82.

2) Blum A, Blum N. Gend Med 2009;6:410-8.

3) Evangelista O, McLaughlin MA. Gend Med 2009;6 Suppl 1:17-36.

4) Ostadal B. Pharmacol Rep 2009;61:3-12.

5) Sytkowski PA, D'Agostino RB, Belanger A, Kannel WB. Am J Epidemiol 1996;143:338–50.

6) Shaw LJ, Bairey Merz CN, Pepine CJ, et al. J Am Coll Cardiol 2006;47(Suppl):S4–S20.

7) Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Lancet 2004;364:937–52.

8) Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Ann Intern Med 1976;85:447–52.

9) Anand SA, Islam S, Rosengren A, et al. Eur Heart J 2008;29:932–40.

10) Kardys I, Vliegenthart R, Oudkerk M, et al. Am J Epidemiol 2007;166:403–12.

11) Turner ME, Farkas J, Dunmire J, et al. Hypertension 2009;53:430–5.

12) Resch U, Schichl YM, Sattler S, de Martin R. Biochem Biophys Research Commun 2008;375:156–61.

13) Bhuiyan MS, Fukunaga K. Cardiovasc Ther 2008;26:224–232.

14) Price RA, Li WD, Kilker R. Diabetes 2002;51:1989–91.

15) Avner P, Heard E. Nat Rev Genet 2001;2:59–67.

16) Singh ND, Petrov DA. Genome Dyn 2007;3:101–118.

HIT: aspetti diagnostici e di laboratorio

Rossella Marcucci, Anna Maria Gori
Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica, Università degli Studi di Firenze

La HIT rappresenta una grave reazione avversa alla somministrazione di eparina. La terapia eparinica si associa frequentemente ad una riduzione della conta piastrinica: nella maggior parte dei casi questo fenomeno è indipendente da ogni tipo di reazione immunitaria, e la trombocitopenia è lieve (conta piastrinica $>100X10^9$ cellule/l), non progressiva, e non si associa né con sanguinamenti né con trombosi. Questo tipo di trombocitopenia associata all'eparina e non immunomediata (precedentemente chiamata HIT di tipo I) si verifica durante i primi giorni della somministrazione di eparina. Il potenziale meccanismo patogenetico di questa condizione è il legame diretto dell'eparina alla membrana piastrinica e si risolve senza necessità di interrompere la terapia eparinica: le piastrine risalgono gradualmente fino ai livelli di pretrattamento, entro alcuni giorni, senza bisogno di nessun tipo di terapia.
Più raramente, la trombocitopenia che segue l'inizio della terapia eparinica può associarsi ad una risposta immunitaria eparino-indotta: questa forma, a cui ci riferiremo da ora in avanti, è indicata con il termine di HIT (precedentemente denominata HIT di Tipo II).
La HIT è un disordine protrombotico, che si manifesta nel 2-3% dei pazienti trattati con ENF; si presenta con una riduzione della conta piastrinica, generalmente moderata in gravità, che nella maggior parte dei casi si manifesta con una finestra temporale variabile da 5 a 14 giorni dopo l'inizio della somministrazione di eparina. Essa è caratterizzata dalla presenza nel siero dei pazienti di anticorpi diretti contro il complesso eparina-PF4 capaci di attivare le piastrine, cosa che, determinando la generazione di trombina, sta alla base delle manifestazioni trombotiche, principali complicanze della HIT. Gli anticorpi contro il complesso eparina-PF4, sono documentabili in circa il 20% dei pazienti trattati con ENF, e in circa l'8% di quelli trattati con EBPM. In questi pazienti, l'assenza di trombocitopenia o

di complicanze cliniche, ha dimostrato che oltre agli anticorpi, sono necessarie altre condizioni per determinare la comparsa di HIT, quali:

- presenza in circolo di concentrazioni ottimali di eparina e PF4 tali da permettere la formazione di complessi macromolecolari eparina-PF4;
- presenza di piastrine attivate, che presentano una aumentata capacità di legame ai complessi eparina-PF4;
- aumentata espressione di recettori Fc RIIA, o la presenza del loro fenotipo H131.

La frequenza di formazione di anticorpi è diversa nelle diverse condizioni cliniche: si verifica in circa il 20% dei pazienti che ricevono eparina a seguito di interventi chirurgici ortopedici, e in oltre il 70% dei pazienti che ricevono eparina in corso di intervento di rivascolarizzazione coronarica tramite bypass cardiopolmonare (CPB). Tuttavia la forma funzionalmente attiva di anticorpi eparina-dipendenti, capaci di attivare le piastrine e quindi di determinare la comparsa di HIT, si può ritrovare soltanto in un sottogruppo di pazienti (approssimativamente il 20% dei pazienti che presentano anticorpi contro il complesso eparina-PF4). Pertanto solo in un sottogruppo di pazienti con HIT, questi anticorpi sarebbero capaci di innescare la cascata trombotica e determinare conseguenze cliniche. Infatti, la sola comparsa in circolo di anticorpi anti eparina-PF4, non è clinicamente significativa e molti pazienti che li possiedono non presentano conseguenze cliniche.

I dati epidemiologici indicano che la HIT si verifica:

- in pazienti di qualunque età (sebbene sia rara in bambini piccoli e, probabilmente, non si verifichi nei neonati),
- con ogni tipo di eparina,
- con ogni tipo di dosaggio,
- con ogni tipo di somministrazione.

Tuttavia la HIT si verifica con maggior frequenza, a seguito dell'utilizzo di eparina bovina piuttosto che con l'uso di eparina suina; la HIT è inoltre più frequente nelle donne, nei pazienti post-chirurgici e sottoposti ad interventi cardiochirurgici, e in coloro che sono sottoposti a terapie di lunga durata. I pazienti medici o ostetrici, trattati con dosi profilattiche di EBPM, rappresentano il gruppo a rischio più basso di sviluppare la HIT.

Le caratteristiche temporali della HIT dovrebbero essere d'aiuto ai clinici per focalizzarsi sul monitoraggio della conta piastrinica, in modo tale da poter eseguire una diagnosi precoce.
La trombocitopenia o comunque una sostanziale riduzione del numero delle piastrine rappresenta la principale manifestazione della HIT: essa è definita come una riduzione della conta piastrinica ≥ 50%; la media del nadir della conta piastrinica è di circa 50-60 x 10^9/l ed è quindi una trombocitopenia di moderata gravità. In circa l'85-90% dei pazienti, la conta piastrinica scende al di sotto di 150 x 10^9/l; nel restante 15-10% dei pazienti la HIT è diagnosticata o per una riduzione della conta piastrinica (50% o più) o per la presenza di eventi clinici quali: trombosi o lesioni cutanee nel sito di iniezione dell'eparina, che inducono il sospetto clinico di HIT, in presenza di una riduzione moderata della conta piastrinica. Nei pazienti che sviluppano la HIT dopo un intervento chirurgico la conta piastrinica presenta un andamento caratteristico, detto a "V invertita": subito dopo l'intervento il numero di piastrine si riduce per l'emodiluizione imputabile all'intervento, riaumenta nei 2-3 giorni successivi all'intervento, ed infine, generalmente dopo alcuni giorni (5-10) dall'intervento, subisce una brusca riduzione. Tutto questo non si verifica in pazienti internistici od ostetrici, nei quali infatti la riduzione della conta piastrinica non è preceduta da un aumento.
I processi trombotici, sia sul versante arterioso che venoso, rappresentano la principale manifestazione clinica della HIT. Per tale motivo lo studio con ecocolordoppler venoso e arterioso dovrebbe essere eseguito in tutti i pazienti con trombocitopenia in corso di somministrazione di eparina, soprattutto in quelli che presentano comorbilità.
Lo sviluppo di nuovi trombi oppure l'estensione di trombi preesistenti mentre il paziente sta ricevendo dosi terapeutiche o profilattiche di eparina non frazionata o eparine a basso peso molecolare, rappresenta un elemento di forte sospetto clinico per la diagnosi di HIT. In pazienti con HIT, le trombosi possono manifestarsi sia durante il periodo in cui avviene la riduzione della conta piastrica sia (anche se più raramente) dopo l'interruzione del trattamento eparinico. Le trombosi venose sono più frequenti di quelle arteriose ed evolvono frequentemente in embolia polmonare. Le trombosi arteriose, invece,

sono più frequenti in pazienti con patologie cardiovascolari e riguardano frequentemente il tratto distale dell'aorta e le arterie profonde degli arti; segue, per frequenza, l'insorgenza di ictus e di infarto miocardico. Nei pazienti con HIT affetti da aterosclerosi avanzata, la trombosi arteriosa degli arti inferiori è comune e spesso evolve in gangrena con necessità di amputazioni. Possono verificarsi anche trombosi microvascolari (es: infarti digitali) o una CID.
Manifestazioni cutanee si verificano nel 10-20% dei pazienti. Le lesioni cutanee indotte dall'eparina sono caratterizzate dalla formazione di una o più placche eritematose dolorose e da lesioni necrotiche cutanee a livello dei siti di iniezione dell'eparina che generalmente si verificano dopo 5 giorni o più dall'inizio della somministrazione di eparina. In circa un quarto dei pazienti in cui è somministrato un bolo e.v. di eparina, contemporaneamente alla presenza in circolo di anticorpi contro il complesso eparina-fattore piastrinico 4, si manifestano sintomi e segni sistemici quali: febbre, brividi, distress respiratorio, ipertensione arteriosa, tachicardia, dolore toracico, amnesia globale transitoria, talvolta anche arresto respiratorio e cardiaco. Tali reazioni iniziano circa 5-30 minuti dopo l'iniezione del bolo di eparina e sono accompagnate da una brusca caduta nella conta piastrinica.
La patogenesi della HIT è legata alla formazione di un complesso tra eparina e PF4. L'eparina ha un'alta affinità per il fattore piastrinico 4 (PF4), una proteina carica positivamente che si trova negli -granuli delle piastrine o sulla superficie cellulare di alcune cellule, tra cui piastrine e cellule endoteliali. L'estensione del legame tra l'eparina e il fattore piastrinico 4 dipende:
- dalla lunghezza della catena di eparina,
- dal peso molecolare (ottimale, almeno 14-16 saccaridi, peso molecolare di circa 4500 Da)
- dal grado di solfatazione.

L'eparina libera non è immunogena ma il suo legame con il PF4 è molto immunogeno. Il PF4 è una chemochina, un membro della sottofamiglia dei CXC, prodotto dai megacariociti. Il PF4 è immagazzinato all'interno degli -granuli delle piastrine, e rilasciato in circolo a seguito di una lieve attivazione piastrinica; si lega ai glicosamminoglicani presenti sulla superficie cellulare (es l'eparan-

solfato presente sulla superficie delle cellule endoteliali), e all'eparina. La concentrazione plasmatica di PF4 è normalmente molto bassa, ma può aumentare in specifiche circostanze cliniche come interventi di protesi d'anca o di cardiochirurgia, dovuta alla concomitante attivazione piastrinica, aumentando così il rischio di formazione degli anticorpi HIT. Gli anticorpi diretti contro il complesso eparina-PF4 (chiamati anticorpi HIT), reagiscono contro il complesso eparina-PF4 per formare strutture macromolecolari che legano le piastrine e i monociti attraverso i recettori Fc RIIA, ed inducono una conseguente ed imponente attivazione e degranulazione piastrinica con il rilascio di sostanze procoagulanti (es: serotonina, istamina, adenosina difosfato), biosintesi di trombossano, flusso di calcio e generazione di particelle fosfolipidiche altamente protrombotiche. Inoltre i tetrameri di PF4 rilasciati si legano ai glicosamminoglicani presenti sulla superficie piastrinica, richiamando ulteriori molecole di anticorpi HIT a legarsi attraverso i loro domini Fab, stimolando ulteriormente, attraverso la formazione di legami crociati tra i recettori Fc RIIA, l'aggregazione e l'attivazione piastrinica. Gli anticorpi contro il complesso eparina-PF4, sono capaci di attivare i monociti e le cellule endoteliali determinando l'espressione di fattore tissutale e quindi accelerando la formazione di trombina. La trombina determina un'ulteriore attivazione piastrinica e il rilascio di altri agonisti, cosa che determina un ulteriore aumento dei recettori Fc IIA sulla superficie cellulare che, a sua volta, contribuisce ad incrementare l'attivazione piastrinica. Questo processo innesca la formazione di uno stato di ipercoagulabilità che in molti pazienti si manifesta con l'insorgenza di manifestazioni trombotiche e tromboemboliche.
La maggioranza dei pazienti con HIT presentano anticorpi contro il complesso eparina-PF4 di classe IgG, anche se talvolta è possibile rintracciare anche anticorpi di classe IgA e IgM, e in alcuni rari casi (<10%) si rintracciano solo anticorpi di tipo IgA o IgM. Almeno in vitro, gli anticorpi di classe IgA e IgM non attivano le piastrine in presenza di eparina, indicando che la loro presenza in circolo può semplicemente coincidere con altre cause di trombocitopenia. Il sistema reticolo endoteliale elimina dal circolo le piastrine ricoperte da anticorpi, prevenendo così, in molti pazienti, la comparsa delle manifestazioni cliniche della HIT. Dopo la sospensione della terapia

eparinica, gli anticorpi scompaiono gradualmente, e dopo 100 giorni, i test per la ricerca di anticorpi HIT danno risultati negativi o debolmente positivi. Se questi pazienti sono riesposti all'eparina dopo la scomparsa degli anticorpi, nella maggior parte dei casi la HIT non si risviluppa; la ricomparsa di HIT richiederebbe infatti la formazione di nuovi anticorpi che necessita di almeno 5 giorni. Non sono ancora state individuate caratteristiche cliniche o di laboratorio che permettano di capire quale individuo che presenta anticorpi anti eparina-PF4 svilupperà la HIT. Pazienti con elevati titoli di IgG anti eparina-PF4 più spesso, anche se non sempre, hanno la HIT: probabilmente ciò è associato al fatto che titoli e tipi diversi di anticorpi, presentano una diversa capacità di attivare le piastrine.
Una diagnosi provvisoria di HIT dovrebbe essere fatta principalmente in base ai criteri clinici. È stato proposto recentemente da Warkentin e Haddle un algoritmo, detto "4T-score", per la valutazione della probabilità clinica pretest di HIT: il 4T-score è formato da 4 punti, ciascuno dei quali è costituito da una caratteristica clinica della HIT. Il valore predittivo negativo del "4T-score" è elevato: ciò indica che il "4T-score" presenta la potenziale utilità clinica di predire quali pazienti non avranno anticorpi anti eparina-PF4; pertanto, in virtù dell'alto valore predittivo negativo, un basso punteggio pretest, sembra che possa permettere di escludere la diagnosi di HIT. Pertanto, la conferma con i test di laboratorio dovrebbe essere riservata soltanto a quei pazienti che hanno ottenuto un punteggio tale da indicare un probabilità intermedia o alta di HIT.
La diagnosi di laboratorio di HIT, si avvale di due tipi di test:
1) test immunologici,
2) test funzionali.
I test immunologici per la HIT, rilevano gli anticorpi capaci di legare il complesso antigenico costituito da eparina-PF4.
Esistono diversi tipi di test immunologici:
1.a) test immuno-enzimatico in fase solida (EIA),
1.b) test immuno-enzimatico con antigene PF4-polivinilsolfato,
1.c) test immuno-enzimatico in fase fluida,
1.d) test in particelle di gel.
I test funzionali più comunemente usati sono:
- test di rilascio della serotonina marcata con C^{14} (SRA)

- test di attivazione piastrinica indotta dall'eparina (HIPA)
- test di aggregazione piastrinica (PAT).
- test citofluorimetrico.

In mani esperte, i test che si basano sull'uso delle piastrine lavate sono più sensibili e più specifici. Sono tuttavia tecnicamente più laboriosi e difficili da eseguire e pertanto sono più adatti a laboratori specializzati e tecnicamente avanzati. Invece laboratori clinici non specializzati, possono non avere l'esperienza necessaria per eseguire in modo appropriato il lavaggio delle piastrine e, quindi in tali contesti, risulta più appropriato utilizzare il test basato sul PRP.

I Kit commerciali immunoenzimatici sono capaci di rivelare anticorpi HIT di tutte le classi: IgG, IgM e IgA. La rilevazione di anticorpi IgM o IgA, considerata da alcuni esperti clinicamente insignificante, può rappresentare uno svantaggio. D'altra parte, i test funzionali sono dipendenti dall'attivazione piastrinica che si verifica quando i complessi anticorpo (IgG)-antigene si legano ai recettori piastrinici Fc . Poiché le piastrine non possiedono recettori Fc per le IgA e IgM, i test funzionali non riescono a rilevare gli anticorpi anti-eparina PF4 appartenenti a queste due sottoclassi. Pertanto i test funzionali ed immunologici si completano tra loro nella diagnosi di laboratorio della HIT. In pazienti che presentano un'elevata probabilità di HIT, un test sensibile come un test immunologico è clinicamente più utile, mentre nei pazienti con una probabilità intermedia o bassa di HIT, un test più specifico è clinicamente più rilevante.

Quando si sospetta l'insorgenza della HIT, la prima cosa che bisogna fare è sospendere la somministrazione di eparina, sia frazionata che non frazionata. Tuttavia la sola sospensione del trattamento eparinico non è sufficiente per trattare i pazienti nei quali è stata diagnosticata la HIT: infatti nel 30%-50% dei pazienti con HIT, che al momento della diagnosi non hanno trombosi, la sola interruzione della somministrazione di eparina si associa alla comparsa entro un mese di eventi trombotici ed embolia. Quindi, dopo aver confermato la diagnosi di HIT, è necessario iniziare una terapia con anticoagulanti alternativi all'eparina; infatti se la somministrazione di anticoagulanti non eparinici è ritardata, l'incidenza di nuove trombosi aumenta di circa dieci volte rispetto ai casi in cui invece gli anticoagulanti alternativi vengono somministrati. Poiché anche le EBPM possono

indurre una HIT, anche se con una minore frequenza della ENF e per la cross-reattività tra l'ENF e le EBPM, non è indicato sostituire l'ENF con le EBPM per trattare la HIT. Il ruolo cruciale svolto dalla generazione di trombina nella patogenesi della HIT fornisce il razionale per usare gli inibitori diretti della trombina (es. Lepirudina, Argatroban, Bivalirudina,) e agenti contro il fattore Xa (es.il Danaparoide, che però non è disponibile in Italia) che agiscono inibendo direttamente la generazione della trombina. Gli inibitori diretti della trombina agiscono legandosi sia alla trombina libera sia legata al coagulo. I farmaci approvati dalla FDA per il trattamento della HIT sono:

- Lepirudina (CLASSE D'EVIDENZA 1C) e Bivalirudina (usata principalmente durante interventi di rivascolarizzazione coronarica percutanea in contesti clinici non correlati alla HIT; CLASSE 2C D'EVIDENZA).
- Argotroban (CLASSE 1 C D'EVIDENZA)
- Danaparoide (CLASSE 1B D'EVIDENZA)
- Fondaparinux (CLASSE 2C D'EVIDENZA)

Nei pazienti con HIT è preferibile posticipare la somministrazione di warfarin finchè la conta piastrinica non arriva almeno a $150x10^9$ cellule/L. La risalita della conta piastrinica indica che il processo trombotico che attiva e consuma le piastrine, associato alla HIT, è sotto controllo. Cominciare la somministrazione di warfarin prima che la trombosi sia ben controllata e mentre il paziente rimane trombocitopenico e con segni d'attivazione della coagulazione, aumenta il rischio di indurre una gangrena agli arti dovuta a una riduzione acuta dei livelli di proteina C ed S. La terapia con warfarin dovrebbe essere iniziata mentre il paziente sta ricevendo una terapia anticoagulante alternativa (inibitori diretti della trombina o danaparoide), con la quale il warfarin deve essere embricato per almeno 4-5 giorni: gli anticoagulanti alternativi non devono essere sospesi finché almeno due INR (ripetuti ad una distanza di almeno 24 ore) non sono in range terapeutico e la conta piastrinica non rimane stabilmente nei valori normali.

Bibliografia di riferimento

1) Eduard Shantsilla, Gregory Y. H. Lip and Beng H. Chong. Heparin-induced Thrombocytopenia. CHEST 2009; 135:1651-1664.

2) BH Chong. Heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost 2003; 1:1471–1478.

3) IK Jang, MJ Hursting. When heparins promote thrombosis: review of heparin-induced thrombocytopenia. Circulation2005; 11:2671–2683.

4) EM Ohman, CB Granger, L Rice, et al. Identification, diagnosis and treatment of heparin - induced thrombocytopenia and thrombosis: a registry of prolonged heparin use and thrombocytopenia among hospitalized patients with and without cardiovascular disease; the Complication After Thrombocytopenia Caused by Heparin (CATCH) registry steering committee. J Thromb Thrombolysis 2005; 9:11–19.

5) TE Warkentin, MN Levine, J Hirsh, P Horsewood, RS Roberts, M Gent, JG Kelton. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-moleular weight heparin or unfractioned heparin. N Engl J Med 332:1330-1335, 1995.

6) TE Warkentin, JI Sheppard, P Horsewood, PJ Simpson, JC Moore, JG Kelton. Impact of the patient population on the risk of heparin-induced thrombocytopenia. Blood 96: 1703-1708, 2000.

7) Theodore E. Warkentin Andreas Greinacher, Andreas Koster and A. Michael Lincoff. Treatment and prevention of heparin-induced trombocitopenia. Chest 2008;133;340S-380S.

8) Theodore E. Warkentin. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. British Journal of haematology, 2003, 121;535-555.

9) John G. Kelton and Theodore E. Warkentin. Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective. Blood 2008; 112: 2607-2616.

Ereditabilità delle funzioni piastriniche e leucocitarie

Francesco Gianfagna, Chiara Tamburrelli, Maria Benedetta Donati, Giovanni de Gaetano, Chiara Cerletti, Licia Iacoviello
Laboratori di Ricerca, Fondazione di Ricerca e Cura "Giovanni Paolo II", Università Cattolica, Campobasso

Il differente grado di rischio di sviluppare una patologia tra soggetti diversi e la variabilità dei livelli di espressione dei fenotipi intermedi è determinata da fattori genetici e ambientali. Studi sulle patologie cardiovascolari hanno mostrato un livello di ereditabilità per morte dovuta ad infarto del miocardio del 38-57% [1], indicando un forte impatto dei fattori genetici, che probabilmente agiscono anche mediando l'effetto dei fattori ambientali.

Tra gli attori del processo aterotrombotico le piastrine hanno un ruolo importante. Oltre che nelle fasi finali che conducono alla trombosi, le piastrine sono infatti coinvolte anche nei processi iniziali di infiammazione vascolare che conducono allo sviluppo della placca aterosclerotica. Le piastrine attivate da differenti stimoli interagiscono con le cellule endoteliali e i leucociti, rilasciando mediatori dell'infiammazione. In tal modo attivano i processi di infiammazione vascolare e favoriscono la migrazione delle cellule infiammatorie al di fuori del lume, contribuendo al processo aterogenico. Le piastrine attivate ma non adese all'endotelio interagiscono e attivano i leucociti circolanti, formando aggregati eterotipici facilmente identificabili con la citofluorimetria su campione ematico. Sia il livello di attivazione piastrinica sia i livelli di aggregati eterotipici piastrine-leucociti sono stati associati a molte patologie, sia cardiovascolari sia infiammatorie [2]. Nonostante il loro possibile ruolo come bio-marcatori, non è ancor nota tuttavia la funzione fisiologica degli aggregati eterotipici circolanti, né è stato ancora quantificato l'impatto genetico delle loro determinanti, per poter stimare l'importanza e la modificabilità di tali fenotipi [3]. Non sono disponibili tuttora studi genetici che associno tali fenotipi a specifici loci del DNA, che suggeriscano nuove "pathways" coinvolte e eventuali nuovi target per interventi preventivi e terapeutici.

Fenotipi piastrinici e fattori genetici

Nell'ambito di uno studio di linkage focalizzato sui fattori dell'emostasi attivata dall'infiammazione in rapporto al rischio cardiovascolare, è stato studiato l'impatto dei fattori di rischio genetici e il ruolo nella patogenesi dell'infarto miocardico giovanile dei seguenti fenotipi piastrinici: numero, volume, aggregazione (PFA-100), attivazione (P-selectina su membrana plasmatica piastrinica, CD11b e L-selectina su membrana dei leucociti) e interazione con i leucociti (identificati in citofluorimetria con marcatore piastrinico+leucocitario). Lo studio è stato effettuato su 750 persone appartenenti a 53 famiglie, 23 delle quali avevano familiarità per infarto giovanile (1 episodio in almeno 1 soggetto con <45 anni o almeno 2 episodi in parenti di primo grado con età <65 anni) [4].

L'impatto della componente ambientale sui fenotipi piastrinici è risultato basso rispetto a quanto atteso, con un forte impatto dei fattori condivisi all'interno del nucleo familiare limitato alla P-selectina, ben noto marcatore di attivazione piastrinica (39.6%).

Al contrario, tutti i tratti hanno mostrato un'importante, significativa componente genetica (17-69% della variabilità fenotipica), con valori di ereditabilità più alti riscontrati per il volume piastrinico medio.

Il "closure time" del PFA-100 ha mostrato un'ereditabilità del 45%, buona parte della quale è dovuta indirettamente all'impatto dei fattori genetici sul vonWillebrand Factor (48%), un noto determinante del tempo di occlusione misurato con tale test.

Un dato interessante è risultato il valore di ereditabilità degli aggregati misti, sia piastrine-PMN che piastrine-monociti, che hanno mostrato valori di ereditabilità molto elevati. Questi sono risultati maggiori per i valori ottenuti dopo stimolo *in vitro* con ADP e collagene (31 e 51%, vs 18 e 28% del basale, per piastrine-monociti e piastrine-PMN). Inoltre, un'analisi di linkage ha mostrato risultati significativi (LOD = 0.94 e 1.33, valore di p empirico = 0.01) per i livelli di aggregati eterotipici dopo stimolo e variabilità nella regione 9p21 del DNA, precedentemente associata con forte livello di evidenza a molte patologie cardiovascolari e infiammatorie.

I marcatori di attivazione dei PMN, inoltre, hanno mostrato un livello di determinazione genetica comune molto elevato (CD11b and L-selectina, coefficiente di correlazione genetica ρg = -0.65, p=0.00001), simile a quello ottenuto per i due parametri già noti per avere una forte determinazione genetica comune, come la conta e il volume piastrinico (ρg = -0.54, p<0.00001).

Piastrine, leucociti e infarto miocardico giovanile

L'analisi della distribuzione di tali parametri nelle famiglie con e senza familiarità per infarto miocardico giovanile ha mostrato un'associazione significativa tra infarto miocardico e livelli di aggregati eterotipici piastrine-PMN, sia in condizioni basali che dopo stimolo con ADP-collagene (p=0.0003 e p=0.008), la cui natura genetica è suggerita anche da un'altra analisi statistica peculiare: l'analisi sulla correlazione genetica (p<0.025 per entrambi).

Conclusione

In conclusione, i marcatori relativi all'attivazione e alle interazioni di piastrine e leucociti sembrano avere una forte regolazione genetica, maggiore per i valori registrati dopo stimolo del campione di sangue intero con ADP-collagene. In particolare, quelli relativi alle interazioni con i PMN sembrano essere anche coinvolti nella patogenesi dell'infarto miocardico giovanile. L'importanza di tali parametri è suggerita anche dal linkage tra i livelli di aggregati eterotipici stimolati e la regione 9p21 del DNA, una regione precedentemente associata a patologie cardiovascolari e infiammatorie, come anche all'aggregazione piastrinica e ad alcune funzioni infiammatorie dei leucociti. Il crescente ruolo attribuito alle piastrine nei processi infiammatori, coinvolti sia nello sviluppo di aterosclerosi sia negli eventi finali che conducono alla trombosi, rafforza il bisogno di testare nuovi farmaci diretti a tali pathway [5].

Bibliografia

1) Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. Heritability of death from coronary heart disease:

a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. J Intern Med 2002;252(3):247–54.

2) Cerletti C, de Gaetano G, Lorenzet R. Platelet - leukocyte interactions: multiple links between inflammation, blood coagulation and vascular risk. Mediterr J Hematol Infect Dis 2010;2(3):e2010023.

3) Gianfagna F, Cugino D, Santimone I, Iacoviello I. From candidate genes to genome-wide association studies in cardiovascular disease. Thromb Res, in press.

4) Vonhout B, Gianfagna F, Lorenzet R, Cerletti C, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L Genetic regulation of inflammation-mediated activation of haemostasis: family-based approaches in population studies. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2010 August 5, in press.

5) Passacquale G, Ferro A. Current concepts of platelet activation: possibilities for therapeutic modulation of heterotypic versus homotypic aggregation. Br J Clin Pharmacol 2011 Jan 11, in press.

Arteriopatia periferica: patologia solo del vaso?

D. Prisco, C. Cenci, E. Grifoni, E. Silvestri, G. Emmi
Dipartimento Area Critica Medico-Chirurgica, Università di Firenze

Epidemiologia e fattori di rischio

L'arteriopatia periferica (PAD) costituisce una delle manifestazioni sistemiche dell'aterosclerosi e viene definita come una sindrome clinica caratterizzata da progressiva stenosi, fino anche alla totale occlusione, a carico delle arterie che irrorano gli arti inferiori (1).
La PAD è una importante causa di disabilità, assenza dal lavoro e cambiamento dello stile di vita negli Stati Uniti, dove affligge circa 8 milioni di persone, di cui il 20% sono adulti di età maggiore di 55 anni (2). Secondo i dati riportati dal TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC) del 2000, la prevalenza di "claudicatio intermittens", principale manifestazione clinica di PAD, in Europa si attesta tra lo 0.6% ed il 9.2%, con un interessamento significativamente maggiore nei maschi ultrasessantenni (1).
Molti studi longitudinali hanno dimostrato che la PAD, sia sintomatica che asintomatica, è associata con un rischio significativamente aumentato di mortalità e morbilità cardiovascolare (3).
Sullo sviluppo di PAD incidono i classici fattori di rischio cardiovascolare, modificabili (diabete, fumo, ipertensione, dislipidemia) e non modificabili (età, sesso maschile, anamnesi familiare positiva) (4,5).
La prevalenza di PAD incrementa con l'età: lo studio Framingham ha dimostrato che i soggetti di età > 65 anni avevano un aumentato rischio di sviluppare PAD (6) e il NHANES rivela che nei settantenni la prevalenza di PAD era del 14.5% e scendeva al 4.3% nei soggetti di età inferiore ai 40 anni (7). Inoltre, nonostante la malattia colpisca in modo significativamente maggiore i soggetti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile, dopo i 70 anni questo gap sembra colmarsi (8).
Il fumo è il principale fattore di rischio modificabile per l'arteriopatia periferica, poiché determina non solo un aumento dell'incidenza della patologia ma accelera anche l'insorgenza dei sintomi tipici di almeno 10 anni, con un rischio maggiore di sviluppare ischemia critica

dell'arto e conseguente amputazione. Interessante notare come l'associazione tra fumo e PAD sia due volte maggiore di quella tra fumo e coronaropatia (CAD) (8).
Il diabete causa un incremento da 1.5 a 4 volte del rischio di sviluppare PAD sia per le modificazioni che gli alterati livelli glicemici provocano sull'endotelio vascolare sia perché i pazienti diabetici sono più spesso affetti da altre comorbilità cardiovascolari come ipertensione e dislipidemia (8).
L'ipertensione è significativamente correlata con lo sviluppo di PAD: lo studio Framingham riporta un aumento di 2.5-4 volte del rischio di sviluppare claudicatio in pazienti ipertesi rispetto ai normotesi (6). Stessa correlazione è stata dimostrata per la dislipidemia, in particolare per elevati valori di colesterolo: il PARTNERS evidenzia come la prevalenza di iperlipidemia in pazienti con PAD era del 77% e che ogni aumento di 10 mg/dL dei livelli di colesterolo totale incrementava il rischio di PAD del 10% (8). In particolare, nei pazienti con PAD si osserva un'associazione tra ridotti livelli di HDL e elevati livelli di trigliceridi.

Patogenesi

Dal momento che i meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo e della progressione della PAD sono l'aterosclerosi e la trombogenesi, le anormalità facenti parte della triade di Virchow, ovvero la stasi, l'ipercoagulabilità e le alterazioni della parete vasale, classicamente associate al tromboembolismo venoso, sono state messe in relazione anche con la PAD [(9).]
Tra queste, l'alterazione dell'endotelio è stata da sempre considerata come il fattore principale nella patogenesi dei trombi nel cuore e nelle arterie. Danni a livello endoteliale possono essere prodotti da una varietà di fattori: i) placche aterosclerotiche, in quanto sia la rottura localizzata che l'estesa ulcerazione della superficie luminale possono provocare l'esposizione di sostanze con proprietà altamente trombogene; ii) l'iperlipidemia, poiché determina un aumento della presenza di lipidi perossidati nel sotto-endotelio che costituiscono uno stimolo per l'adesione leucocitaria e la flogosi; iii) il diabete; iv) il fumo; v) le infezioni, tramite l'azione lesiva delle tossine batteriche; vi) i traumatismi.

La conseguenza comune della disfunzione endoteliale, perpetrata dai diversi insulti all'endotelio, è l'esposizione di molecole trombogene del tessuto sotto-endoteliale, che determinano adesione ed aggregazione piastrinica, e successiva attivazione della coagulazione fino alla formazione di un trombo. Inoltre, si verifica una ridotta biodisponibilità di vasodilatatori come l'ossido nitrico (NO), i cui livelli urinari risultano infatti diminuiti in questi pazienti (10), che conduce allo squilibrio in senso protrombotico della fisiologica bilancia endoteliale.
Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sullo studio del ruolo che un'altra componente della triade di Virchow, l'ipercoagulabilità, noto fattore di rischio per la trombosi venosa, potrebbe avere anche nella patogenesi delle trombosi arteriose. Alterazioni quali alti livelli di fibrinogeno, di omocisteina plasmatica, la presenza del fenomeno lupus anticoagulant (LAC) e la positività agli anticorpi anticardiolipina (ACA), elevati livelli plasmatici di fattore VIII, i polimorfismi Leiden del fattore V e G20210A del gene della protrombina, sono fattori di rischio per il tromboembolismo venoso, ma il loro ruolo nella patologia arteriosa non è ancora ben chiaro. Molti studi sono stati intrapresi per indagare le possibili associazioni tra trombofilia e ictus ischemico o infarto miocardico, mentre pochi sono i lavori condotti su pazienti con PAD.
A cavallo tra gli anni '90 e 2000, sono stati pubblicati 4 studi caso-controllo che valutavano la possibile associazione tra fattore V Leiden e PAD (11,12,13,14): i primi due (11,12) suggeriscono che tale alterazione può essere ragionevolmente considerata un fattore di rischio per patologia arteriosa, mentre i restanti due (13,14) smentiscono questa relazione. Analogamente, anche gli studi che si sono proposti di indagare una relazione tra la mutazione G20210 e lo sviluppo di PAD hanno condotto a risultati discordanti (13,14).
Lo studio caso-controllo LIPAD (Linz Peripheral Arterial Disease), condotto da Mueller e coll, (15) si è posto come obiettivo quello di trovare un'associazione tra il fattore V Leiden, la mutazione G20120 della protrombina ed il polimorfismo MTHFR C677T e l'insorgenza di PAD in un'ampia casistica di pazienti dato che i lavori precedenti non avevano portato a conclusioni univoche in merito. I risultati del LIPAD rilevano come non vi sia alcuna associazione significativa tra

la presenza delle alterazioni trombofiliche sopra citate e lo sviluppo di PAD poiché la loro prevalenza sia nel gruppo dei casi che in quello dei controlli era la medesima descritta in precedenti studi epidemiologici (16).
Sofi e coll. (17) si sono proposti di determinare il profilo trombofilico completo di un gruppo di 280 pazienti italiani con PAD sintomatica: i loro risultati confermano l'assenza di associazione tra il fattore V Leiden e lo sviluppo di PAD ma indicano una più alta prevalenza del polimorfismo G20210A del gene della protrombina nei pazienti rispetto ai controlli, senza però alcuna correlazione con il grado di malattia. Inoltre, i ricercatori pongono l'accento sul ruolo dell'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1) dimostrando una sua associazione con i sintomi di PAD indipendentemente dall'abitudine al fumo, dalla dislipidemia, e dal diabete mellito, condizioni che comportano di per sé un aumento dei livelli plasmatici di PAI-1. Infine, lo studio di Sofi e coll. conferma la relazione già nota tra livelli aumentati di lipoproteina(a) e di omocisteina e sintomi di PAD dimostrando chiaramente per la prima volta che la contemporanea presenza di queste alterazioni aumenta il rischio di PAD sintomatica (17).
Un recente studio condotto da Sartori e coll. (18) esclude nuovamente un ruolo del fattore V Leiden nella patogenesi di PAD mentre rivaluta quello del polimorfismo G20210A della protrombina. I risultati dello studio mostrano che la prevalenza di tale alterazione non è aumentata nei pazienti con PAD in stadio iniziale, ma nei soggetti che presentano ischemia critica dell'arto (10%): tale mutazione, quindi, potrebbe non avere un ruolo nella patogenesi della malattia ma nella sua progressione, forse incrementando il rischio di ischemia critica una volta che PAD si sia instaurata. Questa ipotesi è stata confermata da uno studio successivo (19) condotto dallo stesso gruppo di ricerca allo scopo di correlare la presenza dei classici fattori di rischio trombofilici con la progressione di PAD. Dai risultati si evince che i livelli plasmatici di fibrinogeno, la presenza di LAC e del polimorfismo G20210A della protrombina sono associati ad ischemia critica dell'arto in pazienti con pre-esistente PAD. Inoltre, la prevalenza di alti livelli di fattore VIII e di omocisteina era maggiore nei pazienti rispetto ai controlli, ma nessuna relazione è emersa con la

progressione della malattia. Tuttavia, sia il fibrinogeno che il fattore VIII sono reattivi di fase acuta quindi è difficile capire se il loro incremento nei pazienti con PAD avanzata costituisca un marker di rischio cardiovascolare o sia conseguente alla flogosi associata all'ischemia.
È noto che il LAC e gli ACA sono associati ad un più elevato rischio di trombosi arteriose e venose, sia nel contesto di una sindrome da anticorpi anti fosfolipidi (20), sia nei pazienti con aterosclerosi (21). Recentemente, alcuni studi hanno evidenziato una maggiore prevalenza della positività a LAC ed ACA in pazienti con PAD ed un'associazione con il rischio di eventi vascolari (22) e di progressione della malattia, dato confermato dallo studio di Sartori e coll. in cui il 24% dei pazienti con ischemia critica dell'arto erano LAC positivi (19).
Per quanto riguarda i deficit degli inibitori fisiologici della coagulazione, antitrombina, proteina C ed S, vi sono solamente casi aneddotici e piccoli studi che evidenziano una frequenza più elevata di tali deficit in pazienti con arteriopatia agli stadi più avanzati. Il deficit di proteina S sembra essere maggiormente associato con le trombosi arteriose, e questo sarebbe plausibile poiché essa è sintetizzata dalle cellule endoteliali di cui è un fattore protettivo e quindi la sua carenza potrebbe incrementare il danno endoteliale e dare il via al processo trombotico (23).

Conclusioni

Esistono evidenze che dimostrano che le classiche alterazioni trombofiliche, noti fattori di rischio per il tromboembolismo venoso, sono significativamente associate alla PAD che, di fatto, non deve essere considerata soltanto una malattia del vaso. Tuttavia, non è ancora chiaro quale sia il ruolo di tali alterazioni, se esse costituiscano fattori di rischio, in grado di condizionare la progressione della malattia, o se si tratti semplicemente di marcatori di rischio cardiovascolare. Del resto, un importante studio clinico randomizzato ha evidenziato come l'aggiunta della terapia anticoagulante alla sola antiaggregazione non migliori la prognosi del paziente con PAD, ma aumenti solamente gli eventi emorragici (24).

Pertanto, al momento attuale, lo screening dei fattori di rischio trombofilico nei pazienti arteriopatici non dovrebbe essere raccomandato di routine in tutti i soggetti (25), ma solo in determinati sottogruppi di pazienti in cui i fattori di rischio cardiovascolari tradizionali non spieghino l'evolversi della patologia periferica, come nei pazienti giovani, in soggetti in cui siano presenti trombosi arteriose in assenza di significative placche aterosclerotiche o in cui non siano presenti fattori di rischio tradizionali.

Bibliografia

1) TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC) Working Group. Management of peripheral arterial disease (PAD). J Vasc Surg 2000; 31: S1-S296.

2) Rejeski WJ, Tian L, Liao Y, et al. Social cognitive constructs and the promotion of phisical activity in patients with peripheral artery disease. J Cardiopulm Rehabil Prev 2008; 28: 65-72.

3) Ouriel K. Peripheral arterial disease Lancet 2001; 358: 1257-64.

4) Cimminiello C. PAD. Epidemiology and pathophysiology. Thromb Res 2002; 106: V295-301.

5) Lewis CD. Peripheral arterial disease of the lower extremity. J Cardiovasc Nurs 2001; 15: 45-63.

6) The Framingham Heart Study. Available at www.framinghamheartstudy.org.

7) NHANES report. Available at www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm.

8) Bartholomew JR, Olin JW. Pathophysiology of peripheral arterial disease and risk factors for its development. Cleve Clin J Med 2006; 73(Suppl).

9) Makin AJ, et al. Peripheral vascular disease and Virchow's triad for thrombogenesis. Q J Med 2002; 95: 199-210.

10) Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, et al. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. Circulation 1997; 95: 2068-74.

11) Foley PW, Irvine CD, Standen GR, et al. Activated protein C resistance, factor V Leiden and peripheral vascular disease. Cardiovasc Surg 1997; 5: 157-60.

12) Sampram ES, Lindblad B, Dahlback B. Activated protein C resistance in patients with peripheral vascular disease. J Vasc Surg 1998; 28: 624-9.

13) Renner W, Koppel H, Brodmann M, et al. Factor II G20210A and factor V G1691A gene mutation and peripheral arterial occlusive disease. Thromb Haemost 2000; 83: 20-2.

14) Reny JL, Alhenc-Gelas M, Fontana P, et al. The factor II G20210A gene polymorphism, but not factor V Arg506Gln, is associated with peripheral arterial disease: results of a case- control study. J Thromb Haemost 2004; 2: 1334-40.

15) Mueller T, Marschon R, Dieplinger B, et al. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylentetrahydrofolate reductase C677T mutations are not associated with chronic limb ischemia: The Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD) Study. J Vasc Surg 2005; 41:808-15.

16) Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. Ann Intern Med 2003; 138: 128-34.

17) Sofi F, Lari B, Rogolino A, et al. Thrombophilic risk factors for symptomatic peripheral arterial disease. J Vasc Surg 2005; 41: 255-60.

18) Sartori M, Favaretto E, Legnani C, et al. G20210A Prothrombin Mutation and Critical Limb Ischaemia in patients with peripheral arterial disease. Eur J Vasc Endovasc Surg 2009; 38: 113-7.

19) Sartori M, Favaretto E, Legnani C, et al. Thrombophilic risk factors and peripheral arterial disease severity. Thromb Haemost 2010; 104: 71-7.

20) Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW. Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. J Am Med Assoc 2006; 295: 1050-7.

21) Long BR, Leya F. The role of antiphospholipid syndrome in cardiovascular disease. Hematol Oncol Clin North Am 2008; 22: 79-94.

22) Neville C, Rauch J, Kassis J, et al. Antiphospholipid antibodies predict imminent vascular events independently from other risk factors in a prospective cohort. Thromb Haemost 2009; 101: 100-7.

23) Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. Blood 2004; 103: 1192-201.

24) Anand S, Yusuf S, Xie C, et al. Oral anticoagulant and antiplatelet therapy and peripheral arterial disease. N Engl Med 2007; 357: 217-27.

25) Lowe G. Can haemostatic factors predict athrothrombosis? Intern Emerg Med 2011; [Epub ahead of print].

Diagnosi e terapia della porpora trombotica trombocitopenica (TTP)

Giuseppe Bettoni
Azienda Ospedaliera Riguarda Ca' Granda, UOC di Medicina d'Urgenza e Pronto Soccorso, Milano

Generalità

La TTP è una patologia rara (5-10 casi per milione di persone per anno) ma potenzialmente fatale, caratterizzata dalla diffusa presenza di trombi ialini (composti soprattutto da piastrine e fattore di von Willebrand), nelle arteriole terminali e nei capillari. Gli organi più estesamente interessati sono il cuore, l'encefalo, i reni, il pancreas, la milza, l'intestino e i surreni[1,2]. Studi demografici riportano una maggior incidenza nel sesso femminile (con un rapporto di circa 2-3 a 1) e nella razza nera (con un rapporto di circa 9 a 1 rispetto ai bianchi)[3]. Prima della diffusione della terapia con plasma, la maggior parte dei pazienti con TTP acuta aveva scarse possibilità di sopravvivenza.

Ci sono due differenti forme di TTP: congenita ed acquisita. La TTP congenita, causata da mutazioni nel gene dell'ADAMTS13 (metallo proteasi coinvolta nel clivaggio dell'VWF, la cui assenza determina l'accumulo di VWF a altissimo peso molecolare il quale lega e attiva le piastrine portando alla formazioni dei trombi)[4-8], è una patologia autosomica recessiva estremamente rara (incidenza 1:1.000.000) che si manifesta spesso ma non esclusivamente alla nascita o durante l'infanzia. Le forme acquisite possono essere grossolanamente distinte in due tipi: le forme immunomediate, dovute alla presenza di autoanticorpi contro l'ADAMTS13[9-11], e quelle probabilmente secondarie ad una stimolazione endoteliale massiva, con conseguente rilascio di multimeri ad altissimo peso molecolare di VWF, in quantità eccedente le capacità di clivaggio del sistema, nonostante la presenza di livelli normali o solo moderatamente ridotti di ADAMTS13[12].

Le condizioni fisiologiche o patologiche più comunemente presenti nelle forme immunomediate, spesso associate ad un deficit severo (livelli inferiori al 10% del normale) di ADAMTS13, sono: la

gravidanza, le infezioni, le malattie autoimmuni e l'uso di farmaci quali la ticlopidina e il clopidogrel. Le più frequenti condizioni associate alle forme di TTP che si presentano con un livello normale o solo moderatamente ridotto di ADAMTS13 (maggiore del 10%) sono i tumori metastatici, il trapianto d'organo (particolarmente il trapianto allogenico di midollo osseo e il trapianto di organi solidi) e l'uso di farmaci come la ciclosporina, la mitomicina e l'interferon- [13]. Nella maggior parte dei casi la TTP si manifesta come un singolo episodio acuto, ma sono descritte forma croniche ricorrenti (20% - 30% dei casi) che spesso hanno una base genetica o sono associate alla formazione e alla persistenza di autoanticorpi.
L'esordio della TTP può essere drammaticamente acuto o insidioso, con progressione nell'arco di settimane. Circa un terzo dei pazienti presenta sintomi di anemia emolitica.[14,15] La trombocitopenia causa tipicamente petecchie e porpora; meno comunemente possono presentarsi anche sanguinamento orale, gastrointestinale o genitourinario.

La trombosi microvascolare sistemica può colpire qualsiasi organo con conseguenze variabili. Il coinvolgimento renale è comune, ma meno del 10% dei pazienti sviluppa insufficienza renale acuta.[15] Molti pazienti hanno febbre. I segni neurologici possono essere transitori o persistenti; possono includere: cefalea, alterazioni della vista, vertigini, cambiamenti di personalità, confusione, letargia, sincope, coma, convulsioni, afasia, emiparesi e altri deficit focali, sensitivi o motori[14,15]. Il coinvolgimento cardiaco può manifestarsi con un quadro di ischemia miocardica, scompenso cardiaco congestizio o aritmie.[15] Il coinvolgimento polmonare diretto è raro.[15] I sintomi gastrointestinali sono frequenti e possono includere dolore addominale, nausea, vomito e diarrea.[14,15]

Diagnosi

La definizione della patologia era inizialmente basata sulla seguente pentade di sintomi: febbre, anemia emolitica meccanica, trombocitopenia, alterazioni del sistema nervoso centrale e insufficienza renale[14]. Tuttavia la febbre, le alterazioni del sistema nervoso centrale e l'insufficienza renale non sono presenti costantemente, soprattutto nello stadio iniziale della malattia. La definizione condivisa di TTP, correntemente in uso consiste

nell'associazione di anemia emolitica meccanica (con presenza di emazie frammentate) e di trombocitopenia (numero di piastrine <100 x 10^9/L) in assenza di cause alternative.[16]
I sintomi e i segni della TTP non sono specifici, quindi la diagnosi è basata su esami di laboratorio che documentino anemia emolitica microangiopatica e trombocitopenia, in assenza di altre cause (quali per esempio la coagulazione intravascolare disseminata). Pressoché tutti i pazienti hanno anemia e un terzo ha valori di emoglobina inferiori a 6 g/dl.[14,15] La trombocitopenia è tipicamente grave e la metà dei pazienti ha un numero di piastrine inferiore a circa 20.000/mm^3.[14,15] L'emolisi è indicata da un incremento del numero di reticolociti e della lattico deidrogenasi sierica (LDH) e da una diminuizione dell'aptoglobina sierica. Il valore mediano di LDH è circa 1200 U/l. Il test di Coombs per la conferma della diagnosi deve essere negativo.[12] Il reperto morfologico tipico della TTP allo striscio di sangue periferico è l'incremento degli schistociti. Quasi tutti i pazienti hanno normali valori di fibrinogeno plasmatico, di tempo di protrombina (PT) e di tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT).[12]

La diagnosi di TTP deve essere considerata in tutti i pazienti con anemia emolitica microangiopatica e trombocitopenia, senza evidenza di coagulazione intravascolare disseminata e senza caratteristiche cliniche associate con la sindrome emolitico-uremica diarrea positiva (D+HUS), come per esempio la sintomatologia diarroica prodromica e l'insufficienza renale acuta oligurica o anurica. Numerose patologie associate a microangiopatia trombotica secondaria possono produrre segni clinici e laboratoristici sovrapponibili alla TTP. Di conseguenza formulare una diagnosi corretta e accurata di TTP può essere difficoltoso e spesso occorre considerare un largo spettro di diagnosi differenziali (DIC, sindrome catastrofica da anticorpi antifosfolipidi, sindrome di Evans. In gravidanza la diagnosi differenziale è ancora più complessa e comprende la preeclampsia, l'eclampsia e la sindrome HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count). La gravidanza può inoltre costituire un trigger per lo sviluppo della TTP in pazienti con deficit di ADAMTS13 congenito o acquisito[17].

Esistono numerosi saggi impiegati per determinare l'attività dell'ADAMTS13[6,8,18,19] e la presenza di anticorpi anti ADAMTS13.

Una carenza completa della proteasi suggerisce chiaramente la diagnosi di TTP, benché una carenza grave sia stata anche osservata nel 13% di casi di HUS atipiche[20] e nel 16% di casi di DIC[21]. Livelli plasmatici normali o ridotti ma dosabili non aiutano nella diagnosi differenziale, in quanto possono essere riscontrati, anche se raramente, nella TTP, nella HUS atipica, in altre microangiopatie e in molte condizioni cliniche non correlate. Il 70% di pazienti con TTP acuta idiopatica ha livelli molto bassi o indosabili di attività dell'ADAMTS13. Tuttavia anche pazienti che si presentano con attività normale o solo moderatamente ridotta dell'ADAMTS13 possono comunque ricevere una diagnosi appropriata di TTP. Nella fase acuta della malattia la diagnosi di TTP è ancora oggi basata sui segni e sintomi clinici. Benché la valutazione dell'attività dell'ADAMTS13 e degli autoanticorpi anti-ADAMTS13 possa aiutare il clinico a confermare la diagnosi ed a monitorare la risposta terapeutica, la decisione di iniziare la terapia con plasma non richiede la disponibilità dei valori dell'ADAMTS13 all'esordio.

La forma congenita della malattia dovrebbe essere sospettata nei pazienti che si presentino con TTP e carenza grave dell'ADAMTS13 in assenza di autoanticorpi specifici. La diagnosi è confermata tramite l'identificazione di mutazioni a carico del gene che determina la malattia.[22]

Terapia

La plasmaferesi (con impiego di plasma come liquido di rimpiazzo) costituisce l'unica terapia di cui è stata dimostrata l'efficacia in studi clinici randomizzati controllati[23]. La plasmaferesi offre una dose maggiore di ADAMTS13 senza sovraccarico circolatorio e rimuove gli anticorpi diretti contro l'ADAMTS13. Il trattamento deve essere iniziato il prima possibile dopo la diagnosi. Nel caso in cui la plasmaferesi non possa essere iniziata tempestivamente si dovrebbe procedere con l'infusione di 15–30 ml/kg di plasma. Il trattamento di attacco consiste nello scambio di 1-1,5 volumi di plasma quotidianamente fino alla completa risoluzione dei sintomi e alla normalizzazione del numero di piastrine (>150.000/ l). La Society for Hemostasis and Thrombosis (Londra), raccomanda di continuare le plasmaferesi per almeno 2 giorni dopo il raggiungimento della completa remissione[24]. Non sono state rilevate differenze, in termini

di frequenza di recidive precoci tra regimi di scalo delle plasmaferesi e brusca sospensione[25].

In considerazione della fisiopatogenesi della TTP, in cui l'aggregazione piastrinica è mediata dal legame dei recettori piastrinici 1b/IX/V e IIbß3 con i multimeri del WVF ad altissimo peso molecolare, l'impiego degli antiaggreganti tradizionali, che agiscono bloccando la cicloossigenasi piastrinica (ASA) o il recettore piastrinico per l'ADP (tienopiridine), non appare biologicamente plausibile. In effetti non è stato dimostrato alcun beneficio clinico dell'utilizzo dei farmaci antipiastrinici nel trattamento della TTP, a fronte di un possibile incremento del rischio emorragico, soprattutto nei pazienti con grave piastrinopenia.

I corticosteroidi sono diffusamente impiegati associati alla plasmaferesi nel trattamento della TTP. Ad oggi tuttavia, nonostante la scoperta di meccanismi autoimmuni alla base della maggior parte di casi di TTP idiopatica abbia fornito un substrato fisiopatologico al loro impiego, l'efficacia degli steroidi resta dubbia, con percentuali di risposta clinica comparabili con o senza impiego di corticosteroidi negli studi riportati in letteratura[26]. Nella pratica clinica si somministra prednisone o un equivalente, al dosaggio di 1 o 2 mg/kg die, in una o due dosi, per tutta la durata delle plasmaferesi, seguito da lento scalo. Un regime alternativo è rappresentato dal metilprednisolone e.v. al dosaggio di 1 g die per 3 giorni.[27]

In uno studio retrospettivo, sette pazienti su otto hanno risposto alla vincristina al dosaggio di 1,4 mg/m2 e.v. il primo giorno, seguito da 1 mg il quarto ed il settimo giorno[28]. È stato ipotizzato che il meccanismo iniziale sia costituto da un'interferenza con il legame tra VWF e piastrine.

Ulteriori evidenze che agire sulle basi immunologiche della TTP idiopatica possa risultare efficace riguardano il rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro l'antigene CD20 espresso sulla superficie dei linfociti B. Studi clinici retrospettivi, piccole serie e case report hanno descritto circa 150 pazienti con TTP idiopatica refrattaria o recidivante trattati con rituximab, di solito ad una dose di 375 mg/m^2 una volta alla settimana, in media per quattro settimane.[29,30] Circa il 95% dei pazienti riportati hanno raggiunto una risposta clinica e laboratoristica completa compreso un normale livello

dell'ADAMTS13 e la scomparsa degli autoanticorpi anti-ADAMTS13. Sono state segnalate reazioni moderate alle infusioni di rituximab, ben controllate dalla premedicazione con steroidi, antistaminici e analgesici. Complicanze più gravi si sono verificate raramente. Le recidive sono state piuttosto infrequenti.[29-32]

Altre terapie immunosoppressive impiegate con successo variabile comprendono ciclofosfamide, azatioprina, immunoglobuline endovena, ciclosporina A e/o splenectomia[14]. È stato riportato che la splenectomia è particolarmente efficace nei pazienti con una storia di frequenti recidive, riducendone la frequenza da 2,3 ± 2 episodi/anno a 0,1 ± 0,1 episodi/anno[33]. La ciclosporina (2-3 mg/kg/die) è stata confrontata con il prednisone in due coorti consecutive di pazienti con diagnosi clinica di TTP[34] dimostrandone l'efficacia.

Nei pazienti affetti da forma ereditaria di TTP, l'ADAMTS13 è costitutivamente carente e può essere rimpiazzato attraverso la semplice infusione di plasma[35]. Alcuni autori[36] raccomandano di iniziare regolari infusioni di plasma profilattiche nei pazienti con frequenti recidive. Questi pazienti dovrebbero ricevere 10–15 ml di plasma fresco congelato (FFP) pro chilo di peso corporeo o 1–3 unità di FFP per seduta ogni 2–3 settimane.

Bibliografia

1) Tsai HM. Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. J Am Soc Nephrol 2003; 14:1072-81.

2) Sadler JE, Moake JL, Miyata T, et al. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2004; 407-23.

3) George JN, Terrell DR, Swisher KK, Vesely SK. Lessons learned from the Oklahoma thrombotic thrombocytopenic purpura hemolytic uremic syndrome registry. J Clin Apher. 2008; 23:129–37.

4) Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing

thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1982; 307:1432-5.

5) Mannucci PM, Lavoretano S, Peyvandi S. The thrombotic microangiopathies. Blood Transf 2005; 3:120-35.

6) 6 Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. N Engl J Med 1998; 339:1578-84.

7) Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1998; 339:1585-94.

8) Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Biol Chem 2001; 276:41059-63.

9) Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 2004; 103:4514-9.

10) Scheiflinger F, Knöbl P, Trattner B, et al. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 2003; 102:3241-3.

11) Rieger M, Mannucci PM, Hovinga JA, et al. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. Blood 2005; 106:1262-7.

12) van der Plas RM, Schiphorst ME, Huizinga EG, et al. Von Willebrand factor proteolysis is deficient in classic but not in bone marrow transplantation-associated, thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1999; 93:3798-802.

13) Tsai HM. Current concepts in thrombotic thrombocytopenic purpura. Annu Rev Med 2006; 57:419-36.

14) Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 1966; 45:139-59.

15) Ridolfi RL, Bell WR. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. Medicine 1981; 60:413.

16) Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. N Engl J Med 1991; 325:393–397.

17) McMinn JR, George JN. Evaluation of women with clinically suspected thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome during pregnancy. J Clin Apheresis 2001; 16:202.

18) Rick ME, Moll S, Taylor MA, et al. Clinical use of a rapid collagen binding assay for von Willebrand factor cleaving protease in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 2002; 88:598–604.

19) Bohm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13). Ann Hematol 2002; 81:430–5.

20) Remuzzi G, Galbusera M, Noris M, et al. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. Blood 2002; 100:778–85.

21) Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, Soejima K, Kashiwakura Y, Ishiwata A, TakanoK, Ohmori T, SakataY. Severe secondary

deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. Blood 2006; 107:528–34.

22) Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Thromb Haemost 2010; 8(4):631-40.

23) Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. N Engl J Med 1991; 325:393–397.

24) Allford S, Hunt BJ, Rose P, Machinet SJ, On Behalf of the Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British TTP recognition and management Committee For Standards In Hematology. Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anemias. Br J Haem 2003; 120:556–73.

25) Bandarenko N, Members of the US TTP Apheresis Study Group. United States thrombotic thrombocytopenic purpura apheresis study group (US TTP ASG): multicenter survey and retrospective analysis of current efficacy of therapeutic plasma exchange. J Clin Apher 1998; 13:133–41.

26) George JN. Thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 2006; 354:1927–35.

27) Safdar N, Said A, Gangnon RE, Maki DG. Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of Escherichia coli O157:H7 enteritis: A meta-analysis. JAMA 2002; 288:996.

28) Ferrara F, Copia C, Annunziata M, Spasiano A, Di Grazia C, Palmieri S, et al. Vincristine as salvage treatment for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. Ann Hematol 1999; 78:521–3.

29) Franchini M, Veneri D, Lippi G, Stenner R. The efficacy of rituximab in the treatment of inhibitor-associated hemostatic disorders. Thromb Haemost 2006; 96:119–125.

30) Gutterman LA, Kloster B, Tsai H-M. Rituximab therapy for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood Cells Mol Dis 2002; 28:385–391.

31) Centers for Medicare & Medicaid Services Regulation number CMS-1392-P. Proposed Changes to the Hospital Outpatient Prospective Payment System and CY 2008 Payment Rates. [Accessed February 6, 2008]. Addendum A.

32) Scully M, McDonald V, Cavenagh J, Hunt BJ, Longair I, Cohen H, Machin SJ. A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2011 Aug 18;118(7):1746-53. Epub 2011 Jun 2.

33) Crowther MA, Heddle N, Hayward CP, Warkentin T, Kelton JG. Splenectomy done during hematologic remission to prevent relapse in subjects with thrombotic thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 1996; 125:294–6.

34) Cataland SR, Jin M, Ferketich AK, et al. An evaluation of cyclosporine and corticosteroids individually as adjuncts to plasma exchange in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 2006; 132:146–9.

35) Barbot J, Costa E, Guerra M, et al. Ten years of prophylactic treatment with fresh-frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factorcleaving protease. Br J Haematol 2001; 113:649–651.

36) Johanna A. Kremer Hovinga and Sara C. Meyer. Current management of thrombotic thrombocytopenic purpura. Current Opinion in Hematology 2008; 15:445–450.

I test di funzionalità piastrinica e la "resistenza" all'aspirina: focus sul PFA-100

Chiara Cerletti
Laboratori di Ricerca, Fondazione di Ricerca e Cura "Giovanni Paolo II", Università Cattolica, Campobasso

In principio l'aggregometro…

Nel 1962 lo sviluppo dell'aggregometro di Born migliorò in maniera significativa la misura della funzionalità piastrinica *in vitro*. Da allora i progressi della tecnica e la produzione di strumenti su scala commerciale hanno portato allo sviluppo di diversi test per studiare la funzionalità piastrinica. I test attualmente disponibili misurano: il tempo di emorragia, l'aggregazione (aggregazione ottica e a impedenza, Verify Now®, Plateletworks®), l'adesione piastrinica indotta da shear (IMPACT), il tempo di formazione di un tappo piastrinico (PFA-100), i markers di attivazione espressi sulla superficie piastrinica e lo stato di fosforilazione di proteine VASP intrapiastrinica (citofluorimetria), i livelli di trombossano sierico ed urinario, i livelli plasmatici di P-selettina, CD40 ligando solubile, glicoproteina V e dei costituenti degli -granuli. L'uso principale di queste metodiche è stato per anni la diagnosi dei disordini piastrinici di tipo emorragico sia ereditari (malattia di von Willebrand, trombastenia di Glanzmann, deficit della ciclo-ossigenasi, difetti piastrinici di storage e malattie mieloproliferative, etc) che acquisiti (uremia, malattie immuni o indotte da farmaci).

Dalle emorragie alle trombosi…

Queste tecniche sono attualmente sempre più impiegate anche per misurare l'effetto "trombotico" delle piastrine e l'efficacia *ex vivo* di farmaci antipiastrinici quali l'aspirina, le tienopiridine (ticlopidina, clopidogrel, prasugrel) o gli inibitori del recettore del fibrinogeno (abciximab, eptifibatide, tirofiban).
La risposta farmacologica e/o clinica alla terapia antitrombotica con antiaggreganti è variabile e numerosi pazienti presentano nuovi eventi vascolari nonostante il trattamento farmacologico; pertanto, se fosse disponibile una chiara dimostrazione della relazione tra test di

laboratorio e outcome clinici, il monitoraggio della risposta ai farmaci antipiastrinici con test di laboratorio potrebbe essere utile per predire e migliorare gli *out-come* clinici dei pazienti cardiovascolari. Ma in attesa di tale dimostrazione, e proprio per poterla eventualmente acquisire, questo approccio deve per ora essere limitato ad ambiti di ricerca.

Il PFA-100 e i test "point-of-care"

A tal proposito, notevole interesse si è sviluppato in questi ultimi anni intorno ai test "point-of-care", come il PFA-100, che hanno il vantaggio di essere semplici e rapidamente effettuabili.

Alcune meta-analisi hanno dimostrato, in diversi tipi di pazienti cardiologici, un'associazione significativa tra la variabilità di risposta all'aspirina, e in alcuni studi anche al clopidogrel o alla combinazione dei due farmaci, definita sulla base di test di laboratorio, e il rischio di nuovi eventi vascolari. In una meta-analisi pubblicata dal nostro gruppo, abbiamo preso in considerazione la risposta all'aspirina e un test di funzionalità piastrinica, il PFA-100, utilizzato con la cartuccia collageno/epinefrina, che è sensibile all'effetto inibente le piastrine dell'aspirina: sono stati analizzati i risultati di 53 studi, per un totale di 6,450 soggetti: la percentuale media di soggetti che non rispondevano all'effetto dell'aspirina misurato con questo test è risultata del 27 %, un valore simile a quello ottenuto in altre popolazioni e con altri test di funzione piastrinica. Da questa meta-analisi si è potuto anche valutare le maggiori variabili cliniche e metodologiche, che possono modificare la risposta all'aspirina con il PFA-100: in particolare si è potuto osservare che rispondono meno al farmaco i soggetti che hanno già avuto un evento vascolare, rispetto ai soggetti sani, i soggetti anziani, rispetto ai giovani, o quelli in trattamento da più lungo tempo, mentre tra i tradizionali fattori di rischio cardiovascolare solo il diabete sembra influenzare il test in modo significativo, non l'abitudine al fumo, l'ipertensione o la dislipidemia. Tra le variabili metodologiche invece, la più importante è risultata l'anticoagulante usato per il prelievo, con una maggior prevalenza di ridotta risposta all'aspirina negli studi che utilizzavano il citrato di sodio al 3.2% rispetto a quelli che utilizzavano il citrato di sodio al 3.8%.

Un risultato promettente

Il risultato più interessante di questo studio, perché nella linea di quanto accennato più sopra, è stata l'osservazione che il test PFA-100 era predittivo dell'*outcome* clinico della terapia antiaggregante con aspirina. Questa osservazione è stata poi estesa ad un'altra meta-analisi che includeva studi prospettici e non, per un totale di oltre 3,000 pazienti: il rischio di avere un secondo evento cardiovascolare era significativamente più alto, con un Odds Ratio medio di 2.35 (95% CI: 1.96-2.83) in pazienti in trattamento con aspirina (da sola o associata al clopidogrel) che apparivano "resistenti" al trattamento farmacologico, mediante il test del PFA-100.

Nello stesso periodo sono state pubblicate da altri gruppi alcune meta-analisi con l'obiettivo di ottimizzare la risposta alla terapia antiaggregante tramite una terapia personalizzata sulla base di test di laboratorio, anche diversi dal PFA-100.

Uno dei primi studi che è riuscito a dimostrare una relazione tra l'attività piastrinica residua e un aumentato rischio cardiovascolare, è stato quello di Eikelboom e coll, nel quale le concentrazioni urinarie di 11-deidro-trombossano B2 in pazienti trattati con aspirina erano predittive del rischio di infarto del miocardio o di morte cardiovascolare.

Il gruppo di Firenze ha contribuito con diversi studi clinici a questo concetto, utilizzando diversi test di funzionalità piastrinica, dall'aggregazione piastrinica in PRP o in sangue intero, a test "*point-of-care*", come il VerifyNow, il PFA-100 o il Multiplate, valutando l'attività piastrinica residua in pazienti in trattamento con aspirina o doppia terapia antiaggregante in rapporto all'*outcome* clinico. Citiamo soltanto un primo studio del 2006, in cui Marcucci e coll hanno osservato che i pazienti in trattamento con aspirina, che andavano incontro ad eventi coronarici avversi entro un anno dall'intervento di rivascolarizzazione, erano significativamente più "resistenti" al farmaco, come indicato dal PFA-100. In uno studio recentemente pubblicato, lo stesso gruppo ha mostrato che nei pazienti, che ricevevano una terapia con clopidogrel "guidata" dalla risposta ad un test di funzione piastrinica, una migliore risposta clinica era significativamente associata ad una minore attività piastrinica residua.

In uno studio recente condotto in collaborazione con l'Università di Perugia, abbiamo potuto osservare che tra i pazienti con eventi tromboembolici ricorrenti, quelli con una incompleta inibizione della funzione piastrinica secondio il test del PFA-100 avevano anche valori residui più alti di trombossano nel siero e aggregazione piastrinica indotta da vari agenti aggreganti. L'insieme dei risultati suggerisce che un'elevata attività piastrinica residua misurata da test che sono solo parzialmente dipendenti dall'attività della ciclo-ossigenasi piastrinica (COX-1, selettivamente inibita dall'aspirina) può permettere di identificare un sottogruppo di pazienti a più alto rischio di eventi ricorrenti sotto trattamento con aspirina.

Per quanto riguarda possibili varianti genetiche, rilevanti per la funzione piastrinica o per la risposta all'aspirina (o ad altri farmaci antiaggreganti piastrinici), i dati sono ancora scrasi e contrastanti. E' auspicabile che studi ulteriori possano contribuire a interpretare correttamente la variabilità di risposta ai farmaci antiaggreganti piastrinici in modo da migliorare significativamente l'efficacia della prevenzione delle malattie cardiovascolari su base trombotica.

Conclusione

Nonostante i risultati incoraggianti succitati, la misura con test di laboratorio della funzionalità piastrinica nella pratica clinica rimane ancora una prerogativa di studi in ambito di ricerca e di studi su larga scala che convalidino la predittività clinica di test identificati sulla base di casistiche significative ma limitate. Inoltre, la combinazione di diversi test di laboratorio e la comprensione di come i polimorfismi genetici influiscano sulla risposta ai farmaci antipiastrinici, potrebbero portare allo sviluppo di quegli approcci terapeutici *ad personam* oggi largamente auspicati.

Bibliografia

1) Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients

at high risk for cardiovascular events. Circulation. 2002;105:1650-5.

2) Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK; The Platelet Physiolog Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. J Thromb Haemost. 2006;4:312-9.

3) Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Fedi S, Giglioli C, Valente S, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. Am J Cardiol. 2006;98:1156-9.

4) de Gaetano G, Cerletti C. Platelet function, antiplatelet therapy and clinical outcomes: to test or not to test? J Thromb Haemost. 2007;5:1835-8.

5) Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Vermylen J, Cerletti C, de Gaetano G. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100®: a systematic review. Thromb Haemost 2008;99:14-26.

6) Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, de Gaetano G, Cerletti C. PFA-100 ® closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a meta-analysis of 19 studies comprising 3,003 patients. Thromb Haemost. 2008;99:1129-31.

7) Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF. Residual platelet reactivity on aspirin therapy and recurrent cardiovascular events—a meta-analysis. Int J Cardiol. 2008;128:166-71.

8) de Gaetano G, Crescente M, Cerletti C. Current concepts about inhibition of platelet aggregation. Platelets. 2008;19:565-70.

9) Crescente M, Mezzasoma AM, Del Pinto M, Palmerini F, Di Castelnuovo A, Cerletti C, de Gaetano G, Gresele P. Incomplete inhibition of platelet function as assessed by the platelet function analyzer (PFA-100) identifies a subset of cardiovascular patients with high residual platelet response while on aspirin. Platelets. 2011;22:179-187.

10) Fitzgerald R, Pirmohamed M. Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors. Pharmacol Ther. 2011;130:213-25.

11) Parodi G, Marcucci R, Valenti R, Gori AM, Migliorini A, Giusti B, Buonamici P, Gensini GF, Abbate R, Antoniucci D. High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term cardiovascular events among patients with acute coronary syndromes undergoing PCI. JAMA. 2011;306:1215-23.

N O T E

N O T E