

XXVI Corso di aggiornamento
ALTERAZIONI CONGENITE ED ACQUISITE DELLA COAGULAZIONE
Focus su: **SCREENING DI LABORATORIO DELLA TROMBOFILIA**
GENETICA: QUALE, QUANDO, PERCHÈ
Milano, 22-23 novembre 2001

Centro Congressi Fondazione Stelline
C.so Magenta, 61

Giovedì - 22 novembre 2001

Mattino

Ore 9.00

G. de Gaetano (Campobasso),

C. Cerletti (S. Maria Imbaro)

Intervista a Giulio Bizzozero sulla scoperta delle piastrine

P.A. Merlini (Milano)

I markers genetici nell'infarto: tanto rumore per nulla?

M. Galbusera (Bergamo)

Le microangiopatie trombotiche: si possono distinguere con il dosaggio della proteasi?

F. Peyvandi (Milano)

Terapia genica dell'emofilia - Primi successi

Pomeriggio

Ore 14.00

G.F. Gensini (Firenze)

La terapia antiplastrinica nel 2001

Focus su:

Screening di laboratorio della trombofilia genetica: quale, quando, perché

A. Tripodi (Milano)

Screening di laboratorio della trombofilia genetica: quali test?

R. Abbate (Firenze)

Screening di laboratorio della trombofilia genetica: in quali pazienti?

I. Martinelli (Milano)

Utilità dello screening di trombofilia in individui asintomatici: quando?

J.M. Soria (Barcelona, Spagna)

Thrombophilia as a complex disease: results from the GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia) project

Vincitore Premio Internazionale Fondazione Bianchi Bonomi del 2000

Venerdì - 23 novembre 2001

Mattino

Ore 8.30

D. Prisco, R. Paniccia (Firenze)

Monitoraggio della terapia eparinica in cardiocirurgia

M.B. Donati (S. Maria Imbaro)

Le molecole di adesione: un ponte tra tumori e trombosi?

E.M. Faioni (Milano)

Il recettore endoteliale della proteina C: struttura, funzione e significato clinico

F. Zito (S. Maria Imbaro)

Il fattore XII della coagulazione: da Mr. Hageman al Northwick Park Heart Study-2

L. Iacoviello (S. Maria Imbaro)

L'emigrazione italiana in Belgio: un modello "naturale" di interazione gene-ambiente nel rischio cardiovascolare

Questo corso di aggiornamento si rivolge in modo particolare ai clinici, ai trasfuzionisti e ai tecnici di laboratorio.

Ai partecipanti verrà rilasciato un diploma di frequenza.

La quota di iscrizione è di Lit. 250.000 + IVA 20% e dovrà essere versata alla Fondazione Internazionale Menarini.

Tale quota comprende una colazione di lavoro.

Organizzato da

CENTRO EMOFILIA E TROMBOSI "ANGELO BIANCHI BONOMI"

(Scuola di Specializzazione in Ematologia dell'Università di Milano e Ospedale Maggiore)

FONDAZIONE INTERNAZIONALE MENARINI (Firenze)

CONSORZIO "MARIO NEGRI SUD" CENTRO DI RICERCHE BIOMEDICHE E

FARMACOLOGICHE (Santa Maria Imbaro, Chieti)

ISTITUTO DI CLINICA MEDICA GENERALE E CARDIOLOGIA (Università di Firenze)

Patrocinato da

SOCIETA' ITALIANA PER LO STUDIO DELL'EMOSTASI E DELLA TROMBOSI

COMITATO ITALIANO PER LA STANDARDIZZAZIONE DEI METODI IN EMATOLOGIA

E LABORATORIO (C.I.S.M.E.L.)

Comitato Scientifico

P.M. Mannucci (Segretario Scientifico) G. de Gaetano, M.B. Donati, G.F. Gensini, G.G. Neri Serneri, A. Tripodi

Segreteria Scientifica

P.M. Mannucci

Via Pace, 9

20122 Milano

Tel.: 02 55035421 - 22
Tel.: 02 5454425
Fax: 02 5516093
E-mail: piermannuccio.mannucci@unimi.it

Segreteria Organizzativa

Fondazione Internazionale Menarini

Piazza del Carmine, 4

20121 Milano

Tel.: 02 874932 / 866715

Fax: 02 804739

E-mail: milan@fondazione-menarini.it

florence@fondazione-menarini.it

Intervista a Giulio Bizzozero sulla scoperta delle piastrine

Giovanni de Gaetano* e Chiara Cerletti

**Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica, Campobasso e Laboratorio "G. Bizzozero" delle Interazioni di Cellule Ematiche e Vascolari, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Dipartimento di Medicina e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud S. Maria Imbaro (Chieti)*

Torino, Autunno 1883.

Incontriamo il Prof. Giulio Bizzozero presso il Laboratorio di Patologia Generale al n. 18 di Via Po. Bizzozero, 37 anni, ci riceve in una modesta stanzetta, appartenente al vecchio Convento di S. Francesco di Paola, dinanzi ad un microscopio di cui il giovane professore appare particolarmente fiero (fig. 1). "L'ho acquistato cinque anni fa - dice Bizzozero - per la somma di ben 1.677 lire ... Pensi che la dotazione annua assegnata al mio Laboratorio è di sole 1.000 lire!" Accenna a un breve sorriso, poi prende posto dietro ad una semplice scrivania, pronto a rispondere alle nostre domande .

• Professor Bizzozero, la sua scoperta di un nuovo elemento morfologico del sangue ha suscitato molto scalpore negli ambienti scientifici, all'estero forse ancora più che da noi. Come è arrivato a questa scoperta?

Benché sia da molto tempo che da parecchi osservatori si è cominciato a distinguere nel sangue un elemento morfologico costante diverso dai globuli bianchi e dai globuli rossi, i così detti ammassi granulari attirarono ben poco l'attenzione degli osservatori, sicché non solo noi non ne conosciamo l'ufficio, ma nemmeno sappiamo con sicurezza, se essi preesistano nel sangue circolante e qual forma essi vi abbiano.

• Tra tante opinioni diverse, Lei è giunto ad una descrizione precisa di queste cellule ...

La soluzione del quesito intorno alla esistenza ed alla natura del terzo elemento morfologico del sangue non poteva essere data che da un esperimento che è meraviglia nessuno degli antecedenti osservatori abbia fatto: lo studio del sangue circolante nell'animale vivo. Solo questo poteva permettere di determinare indiscutibilmente ciò che circoli nei vasi durante la vita.

• Come mai in tutti gli studi precedenti non si videro mai circolare che globuli rossi e globuli bianchi?

La domanda è legittima: ma le ragioni del fatto sono parecchie. Innanzi tutto, la più parte delle osservazioni sulla circolazione vennero fatte sugli animali a sangue freddo. Or bene, questi animali non servono al caso nostro, perché gli elementi morfologici del sangue sono ben diversi da quelli dei mammiferi. È ben vero che anche in questi ultimi venne studiata al microscopio la circolazione. Ma molti degli osservatori l'hanno studiata in parti poco trasparenti, per es. nelle ali dei pipistrelli. D'altra parte, essendo gli elementi incolori e trasparenti, ed essendo essi assai meno numerosi de'

globuli rossi e meno spiccati dei leucociti, è naturale che, quando non si è prevenuti, soltanto queste due ultime forme attraggano l'attenzione dell'osservatore; massime se questi non fa il suo esame con un buon obiettivo ad immersione che ingrandisca sufficientemente gli elementi pallidi ed incolori, e ne renda spiccati i contorni.

• **Come Le sono apparse al microscopio queste "piastrine"? È così mi pare che Lei abbia chiamato questo nuovo elemento del sangue ...**

Esaminando con un obiettivo ad immersione il contenuto di questi vasi (siano essi vene o capillari) si giunge a questo sorprendente risultato, che veramente a lato dei globuli rossi e dei bianchi circola un terzo elemento morfologico (fig. 2). Esso è rappresentato da piastrine pallidissime, a forma di disco a superficie parallele o, più di rado, di lente, ovali o rotonde; di diametro eguale ad un terzo od alla metà di quello dei globuli rossi. Esse sono sempre incolori, e circolano disperse irregolarmente fra gli altri globuli, non dimostrando preferenza piuttosto per la porzione assile che per la porzione periferica della corrente. Sono in regola isolate l'una dall'altra; il che non toglie però che non di rado si veggano riunite in ammassi più o meno grandi. Ciò però è già un indizio di una loro alterazione.

• **Qualcuno ha espresso il dubbio che le piastrine non siano pre-esistenti nel sangue, ma siano il prodotto di un'alterazione a cui soggiacquero i globuli bianchi o i rossi nei vasi a circolazione rallentata.**

Il dubbio vien tolto di mezzo facilmente coll'accertare la esistenza delle piastrine nel sangue che arriva direttamente e velocemente dai centri circolatori. Anche il sangue, che ha appena lasciato il cuore, è ricco di piastrine.

• **Le piastrine si possono riconoscere anche nel sangue appena estratto?**

Sì, se però il preparato si fa e si assoggetta rapidamente all'esame. Questa rapidità è necessaria, perché tanto nel sangue d'uomo che d'animali le piastrine si deformano ben tosto fino a diventar irriconoscibili in pochi istanti. Se invece di sangue d'uomo s'esamina sangue di cane, i cambiamenti si succedono con eguale rapidità (fig. 3) sicché dopo 2-3 m' le piastrine hanno già emesso i loro prolungamenti, e si sono già fuse in una massa granulosa, da cui partono numerosi i fili di fibrina (fig. 4).

• **Lei conferma dunque l'opinione del Professor Hayem a Parigi che gli "ammassi cellulari" osservati da diversi autori non derivano né dai globuli bianchi, né dalla fibrina?**

Sì, con i miei esperimenti è confermata l'opinione di Hayem. Questi, però, non avendo mai studiato o visto le piastrine nel sangue circolante, errò nel descriverle, ammettendole come dischi biconcavi, colorati più o meno in giallognolo, mentre di regola sono dischi a superficie parallele, e non contengono mai emoglobina.

• **A proposito, come ha chiamato Hayem i corpuscoli da lui descritti?**

Ematoblasti. E appunto da questo suo errore derivò la sua teoria della loro trasformazione in globuli rossi.

• **E come si dovrebbero chiamare le piastrine in francese?**

In un paio di comunicazioni (2, 3) le ho chiamate "petites plaques", mentre nei lavori in tedesco ho scelto il termine di "Blutplättchen" (4-6).

• **E in inglese? Come le ha chiamate il Lancet?**

In un editoriale intitolato "A new blood corpuscle" (7), apparso poche settimane dopo la mia prima comunicazione alla R. Accademia di Medicina qui a Torino nel 1881 (8), l'articolista del Lancet ha usato il mio termine tedesco. Non saprei come dire in inglese ...

• **Forse "blood platelets"?**

Mi sembra una buona traduzione!

• **Potrei vedere delle piastrine al microscopio?**

Le farò vedere le sue stesse piastrine! Dia qui, ora le pungo il dito, applico sulla ferita una goccia di una soluzione conservatrice e, comprimendo il dito, faccio uscire una piccola quantità di sangue, che si trova, così, direttamente a contatto del liquido conservatore; rimescolo il liquido sul dito stesso, e ne faccio un preparato microscopico. Per isorgere le piastrine bisogna aggiustare il fuoco del microscopio per gli strati superiori del liquido o addirittura per la superficie inferiore del coprogetti alla quale esse sogliono appiccicarsi. Di esse alcune si vedranno di piatto, altre di coltello; queste naturalmente avranno forma di bastoncino, e contorni più oscuri e marcati che quelle. Poiché il preparato venne fatto con tutta la cautela e si adoperò il primo sangue che esciva dalla puntura, le piastrine appaiono per buona parte isolate. Nel caso contrario si trovano in ammassi, e ciò dipende da una speciale viscosità che si manifesta col principiare della loro alterazione, e per la quale così si appiccicano ai corpi stranieri, p.es., ai vetri del preparato, come si saldano tenacemente fra loro.

• **Non sono riuscito a capire se le piastrine hanno un nucleo ...**

Colle diverse sostanze coloranti, io non riuscii mai a scoprire in esse un nucleo. Esaminate anche coi più forti ingrandimenti si mostrano costituite da una sostanza pallida in cui sono sparsi scarsi granuli.

• **Mi pare che mentre continuo a guardare al microscopio, le piastrine si modifichino ...**

Le piastrine sogliono alterarsi dopo un certo tempo anche nella soluzione sodo-metilica; i granuli della piastrina si raggruppano in una porzione limitata di questa, mentre la sostanza omogenea si gonfia e diventa più pallida e trasparente. In una soluzione di cloruro sodico al 10% le piastrine da principio appaiono assai belle.

• **Le piastrine hanno quindi la tendenza a scindersi in due sostanze differenti?**

Sì, ma da ciò però non è permesso di dedurre che esse siano costituite soltanto da queste due sostanze. E a supporre, anzi, che la loro costituzione sia assai più complessa. I fenomeni che hanno luogo durante la coagulazione rendono verosimile che durante questo processo esca dalle piastrine una sostanza che non è visibile col microscopio. È probabile che le piastrine risultino dall'unione di parecchie sostanze.

• **Ma quante piastrine ci sono nel sangue?**

Le piastrine sono relativamente numerose nel sangue. Secondo Hayem se ne contano 255.000 in un millimetro cubico; sono perciò 40 volte più numerose dei globuli bianchi, e 20 volte meno numerose dei globuli rossi.

• **Se non derivano da altre cellule del sangue, da dove vengono queste piastrine?**

Sarebbe assai interessante il conoscere l'origine delle piastrine, ma intorno a ciò i miei studi non mi hanno condotto a risultati definitivi. La prima idea che si presenta si è che esse si trovino in rapporto genetico cogli altri elementi morfologici del sangue, cioè coi globuli bianchi o coi globuli rossi.

• **Aver descritto così chiaramente un nuovo elemento morfologico del sangue è senza dubbio un risultato importante, ma quale è la funzione di questo elemento? Cosa dicono i Suoi esperimenti?**

Questi esperimenti vennero da me ripetuti moltissime volte, e sempre con identici risultati; posso quindi ritenere che essi abbiano un valore generale. Da essi noi possiamo dedurre che la parte essenziale nella formazione del trombo bianco spetta alle piastrine e non ai globuli bianchi e che la parte principale nella coagulazione del sangue spetta non ai globuli bianchi ma alle piastrine.

• **Può spiegarmi in poche parole che cosa è la trombosi?**

È noto come da molto tempo, sulla base delle classiche ricerche di Virchow del 1856 (9), si

considerasse la trombosi come la formazione di un coagulo nei vasi di un organismo vivente. Le ricerche di Mantegazza (10) sulla coagulazione della fibrina, fatte fino dal 1869, aprirono una nuova via per la spiegazione del modo di formarsi di quei trombi biancastri che sono i più frequenti, e vengono designati presentemente col nome di *trombi bianchi*.

Le ricerche di Mantegazza dimostravano che il trombo bianco non derivava da una lenta alterazione di un trombo rosso, ma si proveniva da un arrestarsi, nel punto alterato, dei globuli bianchi, i quali facevano precipitare a sé dintorno una materia finamente granulosa che Mantegazza considerava come giovane fibrina.

Secondo Zahn (11), devesi fare una netta distinzione fra trombi *rossi* ed i *bianchi*. I rossi sono più rari, e sia per la loro costituzione che pel loro modo di formazione si avvicinano ai coaguli che si formano spontaneamente nel sangue appena estratto dai vasi; la stasi è la condizione essenziale della loro formazione. I trombi bianchi, al contrario, non si sviluppano per una coagulazione della massa sanguigna nella sua totalità; in essi parte degli elementi morfologici, i globuli bianchi si separano dalla massa sanguigna, s'attaccano al punto leso delle pareti vascolari, e vi si accumulano in numero più o meno grande, circondandosi di fibrina finemente granulosa. Le condizioni indispensabili alla formazione del trombo bianco sono: un'alterazione della tonaca interna dei vasi e il rallentamento della corrente sanguigna.

• **Professor Bizzozero, Lei ha affermato che lo studio sperimentale della trombosi nei mammiferi dimostra come l'origine del trombo sia ben diversa da quella che venne creduta fino ad ora. Come è arrivato a questa conclusione?**

Un animale preparato al modo istesso che venne descritto per lo studio fisiologico delle piastrine serve assai bene anche per lo studio della formazione del trombo. Steso il mesenterio, lo si esamina a piccolo ingrandimento onde scegliere una piccola arteria che scorra libera e ben visibile per un certo tratto. Colla punta di un sottile ago si esercita un po' di pressione su di un punto limitato della tonaca dell'arteria. In pochi istanti si vedrà formarsi un trombo.

• **Ma come avviene esattamente il fenomeno?**

Le piastrine, che sono trascinate dalla corrente sanguigna, arrivando al punto in cui venne lesa la parete vascolare, vi si arrestano; dapprima sono 2-4-6, ben presto arrivano a delle centinaia (fig. 5). Generalmente vi si ferma anche qualche globulo bianco. Il trombo, aumentando di volume, riempie sempre più il lume vasale, ed ostacola sempre più la corrente sanguigna. Se questa è forte, arriva un momento in cui essa vince l'ostacolo e trasporta con sé una parte o la totalità del trombo (embolo di piastrine).

• **E il processo finisce così?**

Nello stesso punto leso le piastrine si fermano e si accumulano di nuovo; vi si forma un nuovo trombo, che, a sua volta, viene trascinato dalla corrente. In un quarto d'ora si può veder ripetersi il giuoco tre o quattro volte; e ciò può durare più ore, fino a che l'arrestarsi della circolazione dà fine all'esperienza.

• **È necessario ledere direttamente un vaso per ottenere la formazione di un trombo?**

Nello stendere il mesenterio sul portoggetti succede spesso di stirare dei tronchi vascolari, e, a questo modo, di rallentarvi la circolazione e di lederne le pareti; ciò dà origine a trombi ed emboli di varia grossezza, ora parietali, ora addirittura ostruenti, che vengono di solito trasportati dalla corrente, e che sono costituiti soltanto da piastrine con pochi leucociti.

• **Ha qualche altra figura da farmi vedere?**

La figura 6 rappresenta una piccola vena del mesenterio di cavia, nella quale, allo sbocco di un capillare, si produssero due trombi parietali costituiti di piastrine che restringevano di molto il lume del vaso, impedendo gravemente il progredire della corrente sanguigna. Dilacerando rapidamente la sostanza del trombo nella soluzione sodo-metilica, si scorge ch'essa è costituita da pochi leucociti immersi in potenti ammassi di piastrine (fig. 7).

• **Ogni volta che si forma un trombo sono coinvolte le piastrine?**

Data una lesione della parete vasale, o la penetrazione di un corpo straniero od un'altra causa qualunque che dia luogo a trombosi, il primo fatto che si osserva è il formarsi di un accumulo di piastrine. L'arrestarsi dei leucociti è fatto secondario, e forse dovuto alla vischiosità aumentata delle piastrine, le quali di tal modo arrestano i leucociti che, trasportati dalla corrente, le toccano. Perché una piastrina che scorre libera nel sangue, arrivando a contatto di altre piastrine, venga da queste trattenuta, è necessario che queste sian diventate più vischiose del normale.

• **Professor Bizzozero, come patologo generale, Lei mi sembra più interessato alla trombosi che non ai fenomeni emorragici ...**

È inutile che io qui ricordi il valore che la tenacità di questa sostanza trombotica, la quale di certo non si potrebbe avere se le piastrine rimanessero isolate, può avere in molti casi, p. es. quando essa debba arrestare una emorragia chiudendo una soluzione di continuità prodottasi nelle pareti di un vaso. Anche quando Zahn incideva le pareti di un vaso, l'emorragia che ne conseguiva veniva arrestata non già dalla coagulazione del sangue uscito, ma sì da un trombo bianco formatosi nel punto leso.

• **Quindi le piastrine contribuiscono all'emostasi partecipando al processo di coagulazione del sangue all'interno dei vasi ... Mi sembra un concetto veramente nuovo! Ma quale era il concetto della coagulazione prima dei suoi studi?**

Riassumendo in poche parole, la coagulazione avrebbe luogo per l'influenza di un fermento sul fibrinogeno e la fibrinoplastica poste in favorevoli condizioni; ed i globuli bianchi ci avrebbero parte essenziale, inquantoché forniscono il fermento, e porzione o forse la totalità della sostanza fibrinoplastica (12).

• **Perché Schmidt e altri hanno ritenuto che i globuli bianchi partecipassero alla coagulazione del sangue?**

Essendo necessario per spiegare la coagulazione l'intervento di un elemento morfologico del sangue, ed avendogli le sue esperienze dimostrato che questo elemento non poteva essere rappresentato dai globuli rossi, egli non aveva più che i globuli bianchi a cui ricorrere. È probabile che Schmidt sarebbe giunto a diverse conclusioni s'egli avesse conosciuto l'esistenza delle piastrine. Non supponendone l'esistenza, le piastrine gli hanno intralciata la via, poiché esse, accumulandosi generalmente in ammassi insieme ai globuli bianchi, gli hanno fatto attribuire a questi ultimi delle proprietà che le mie esperienze, di cui mi accingo a dar conto, mi fanno invece accordare alle piastrine.

• **E quali sono queste proprietà coagulanti delle piastrine?**

È facile in un preparato microscopico di sangue puro persuadersi come l'incominciare della precipitazione dei fili di fibrina sia preceduta dal cominciare della trasformazione granulosa delle piastrine, e continui col continuarsi di questa. La disaggregazione granulosa delle piastrine adunque è l'unica modificazione che si osservi negli elementi morfologici nel sangue durante la coagulazione, ed è la prima alterazione materiale che ci manifesti quella intima modificazione che succede nel sangue e che dà luogo alla precipitazione della fibrina.

• **Questi fatti, però, non possono essere che un criterio di probabilità per sostenere una dipendenza della coagulazione dalle piastrine; poiché potrebbe darsi che dipendessero semplicemente da una coincidenza fortuita.**

È ben vero! A escludere ciò io feci una serie di osservazioni in condizioni in cui il sangue non coagula, come subito dopo la morte di un animale o legando in modo aseptico e senza provocare traumi un tratto di vaso. Or bene, l'esame microscopico mi dimostrò in ogni caso che, fino a tanto che il sangue rimane liquido nel vaso, le piastrine vi si conservano nella loro forma normale. Se il sangue usciva dal vaso la sua rapida coagulazione era preceduta dalla disaggregazione granulare delle piastrine. Le piastrine sono l'unico elemento morfologico che dimostri di risentire l'azione conservatrice delle pareti del vaso. La più rapida coagulazione del sangue che esce da una vena

aperta già da un po' di tempo è dovuta probabilmente agli ammassi di piastrine che si sono raccolte già fin dal principio del salasso sulle pareti lese del vaso e sui bordi della ferita; infatti, esaminando al microscopio direttamente il sangue di uno degli ultimi salassi, vi si trovano frequenti i grandi ammassi di piastrine, mentre quello dei primi salassi ha piastrine isolate o raccolte in ammassi piccoli.

• Ho letto che quando si sbatte il sangue appena estratto con degli oggetti scabri, la fibrina si precipita esclusivamente su questi. Se le piastrine hanno veramente parte nel processo esse, col loro modo di comportarsi durante la sbattitura, ci dovrebbero dar la chiave per spiegare il fenomeno ...

Nella coagulazione per isbattitura noi dobbiamo distinguere due periodi: nel primo le piastrine sospese nel sangue, insieme ad un certo numero di leucociti, si appiccicano (per mezzo della vischiosità che acquistano) agli oggetti scabri che servono alla sbattitura; nel secondo, sullo strato di piastrine precipita lo strato fibrinoso. Io sono riuscito anche a tener dietro al microscopio ai fenomeni che si susseguono durante la coagulazione per isbattitura. Dapprincipio ben poche sono le piastrine che si attaccano al filo. Poi ad un tratto le piastrine vi si appiccicano numerose, formandovi grossi strati, assieme a piccolo numero di leucociti. Subito dopo, su questi strati precipita la fibrina. Alla loro volta questi fili fibrinosi agiscono da corpi stranieri, trattengono le piastrine (fig. 8) e diventano nuovi centri di coagulazione.

• Un oppositore potrebbe dichiararsi non ancora persuaso dell'importanza delle piastrine nella coagulazione ...

Benché questo accordarsi di coincidenze debba reputarsi ben singolare, tuttavia non è lecito, senza prova, dichiararlo impossibile. Epperò io mi studiai di trovare un metodo sperimentale che mi permettesse di decidere in modo più rigoroso la questione. Pensai di cimentare direttamente l'influenza delle piastrine su di un liquido proplastico; su di un liquido, cioè, che contenesse il substrato della coagulazione (sostanza fibrinoplastica e fibrinogena), ma mancasse di fermento, sicché non fosse atto a coagulare che coll'aggiunta di quest'ultimo. Ma l'impossibilità di ottenere completamente isolate le piastrine m'ha costretto a sviluppare più largamente gli esperimenti ed a farne molti di controllo. Per girare la difficoltà, ho pensato di sottoporre il liquido proplastico all'azione del tessuto di quegli organi che sono ricchissimi di leucociti, pezzetti di milza, ghiandole linfatiche e di midollo delle ossa.

• E quali sono stati i risultati? Il modo con cui Lei racconta i suoi esperimenti genera in chi l'ascolta una curiosità, quasi una tensione emotiva ... È veramente contagioso farsi prendere dal suo ragionamento!

Ebbene, i risultati non potevano essere più eloquenti: mentre i relativamente scarsi ammassi di piastrine che stanno aderenti ai fili sbattuti nel sangue danno coagulazioni relativamente copiose ed immancabili, gli ammassi assai più abbondanti di leucociti che stanno nella milza e nelle ghiandole linfatiche non mi hanno dato coagulo apprezzabile.

• A queste esperienze si potrebbe fare un'obiezione: gli organi linfoidi non danno estesa coagulazione forse perchè nella loro costituzione entrano delle sostanze che neutralizzano o paralizzano la facoltà coagulatrice dei globuli bianchi, o in qualsivoglia maniera impediscono il precipitare degli altri costituenti della fibrina.

Ma questa obiezione non regge contro il fatto, che se a del liquido protoplastico contenente un pezzetto di organo linfoide si aggiungono dei fili carichi di piastrine, la fibrina precipita in gran copia.

• Un'altra obiezione possibile sarebbe questa: che il protoplasma dei globuli bianchi del sangue sia diverso da quello dei diversi globuli bianchi degli organi linfoidi.

Ma quest'obiezione non potrà reggere se non quando questa differenza sarà dimostrata. Anzi abbiamo dei lavori sperimentali che ci dimostrano come i leucociti del sangue passino e possano soffermarsi nei parenchimi sia della milza che del midollo.

• **Benché lo studio delle piastrine del sangue sia appena cominciato, esso ha contribuito efficacemente a spiegare i fenomeni della trombosi e della coagulazione.**

Però noi non abbiamo acquistato nessuna nozione sulla funzione fisiologica delle piastrine, perché e trombosi e coagulazione non hanno luogo che in condizioni anormali; ed è difficile ammettere che elementi costanti e così numerosi nel sangue abbiano a servire soltanto in queste rare condizioni abnormi o patologiche.

• **Resta dunque da studiare la funzione fisiologica delle piastrine, la loro origine ed i loro rapporti cogli altri elementi del sangue?** Non c'è bisogno di dimostrare quanto tali quesiti sieno di difficile soluzione.

• **Anche nello studio dei processi patologici dell'organismo si dovrà per l'avvenire tener sempre calcolo di questo nuovo elemento morfologico del sangue.**

È probabile che, oltre alla trombosi, le piastrine partecipino ad altri sconcerati della vita del sangue e dei vasi. Il numero delle piastrine (o degli ammassi granulari) cresce in molti stati morbosi. In tali casi non è fuor di luogo il supporre che questo loro aumento modifichi il modo di compiersi della coagulazione; come non è improbabile l'immaginare come, in tali condizioni, per poco che si alterino le pareti vasali, possano aver luogo estese trombosi. È questo un nuovo campo di studio aperto agli investigatori.

Ringraziamenti

Una "intervista impossibile" a Giulio Bizzozero fu presentata come lettura inaugurale del 28° Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) a Bergamo, nel 1982, su invito del Prof. P.M. Mannucci, per celebrare il primo centenario della scoperta delle piastrine. Di quella lettura non è disponibile documentazione scritta. Il testo qui proposto è, quindi, un completo rifacimento dell' "intervista" precedente. Un articolo che inquadra la scoperta delle piastrine nell'opera scientifica e nell'attività sociale e politica di Giulio Bizzozero è stato recentemente pubblicato, anch'esso sotto forma di intervista, sul giornale ufficiale dell'ISTH (Thrombosis and Haemostasis) (13).

I Proff. Umberto Dianzani (Torino), Enrico Gravela (Torino), Pier Paolo Gazzaniga (Roma), Eugene Beck (Berna) e Marc Verstraete (Leuven) hanno messo a disposizione alcune pubblicazioni di o su Bizzozero (14-16).

Il Dr. Bruno Simini (Lucca) e il Prof. Paolo Mazzarello (Pavia) ci hanno incoraggiato e fornito preziosi consigli.

Maria Benedetta Donati e Vittorio Bertele' hanno seguito con l'affetto e la simpatia di sempre il nostro lavoro.

La Sig.ra Cleo Colombo non ci ha fatto mancare la sua esperta collaborazione.

A tutti loro esprimiamo il nostro ringraziamento e la nostra riconoscenza.

Un ringraziamento particolare va a tutti i ricercatori, italiani e stranieri, che hanno collaborato con noi presso il Laboratorio del Consorzio Mario Negri Sud intitolato a Giulio Bizzozero.

Il testo, completo di figure, è in corso di pubblicazione negli Atti del Convegno per il Centenario della morte di Giulio Bizzozero, Torino-Varese, 14-15 maggio 2001, Accademia di Medicina, Torino, 2001.

Alcune delle figure qui menzionate appaiono anche nella ref. 13.

Bibliografia

1) Bizzozero G. Di un nuovo elemento morfologico del sangue e della sua importanza nella trombosi. F. Vallardi, Milano, 1883.

2) Bizzozero G. Sur les petites plaques du sang des mammifères, deuxième note. Arch Ital Biol

1882;1:1-4.

- 3) Bizzozero G. Les petites plaques du sang et la coagulation. Arch Ital Biol 1882;1:276.
- 4) Bizzozero J. Über einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin 1882; 90: 261-332. Translated into English by Eugen A. Beck. On a new blood particle and its role in thrombosis and blood coagulation. Hans Huber, Bern, 1982.
- 5) Bizzozero J. Blutplättchen und Blutgerinnung. Zentralbl Med Wissensch 1882;20:353-55.
- 6) Bizzozero J. Die Blutplättchen der Säugethiere und die "invisible corpuscles" von Norris. Zentralbl Med Wissensch 1882;20:161-163.
- 7) Anonymous. A new blood corpuscle (Editorial). Lancet 1882;i:111-12.
- 8) Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. L'Osservatore-Gazzetta delle Cliniche 1881;17:785-87.
- 9) Virchow R. Gesammelte (ad) Handlungen zur wissenschaftlichen Medizin. Meidinger, Frankfurt a.M. 1856.
- 10) Mantegazza P. Sulla causa della coagulazione del sangue, della linfa e di altri liquidi fibrosi. Gazz Med Lomb 1869;2:157-60.
- 11) Zahn FW. De la formation des thrombus. Rev Méd Suisse Rom 1881;1:18-33.
- 12) Schmidt A. Die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen in eiweissartigen thierischen Flüssigkeiten. Mattiesen, Dorpat 1877.
- 13) de Gaetano G. A new blood corpuscle. An impossible interview with Giulio Bizzozero Thromb Haemost 2001;86:973-979.
- 14) Dianzani MU. Bizzozero and the discovery of platelets. Am J Nephrol 1994;14:330-336.
- 15) Gravela E. Giulio Bizzozero. Allemandi and Co., Torino, 1989.
- 16) Baserga A. L'oeuvre hématologique de Giulio Bizzozero. Scientia Medica Italica 1958;7:45-63.

I markers genetici nell'infarto: tanto rumore per nulla?

Marco L. Rossi, Piera A. Merlini

Dipartimento Cardio-Toraco-Vascolare "A. De Gasperis", Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Le ricerche scientifiche effettuate negli ultimi 40 anni hanno dimostrato con certezza che la trombosi coronarica è l'evento critico alla base di eventi quali infarto miocardico e angina instabile. È stato inoltre dimostrato che spesso un prolungato stato protrombotico precede l'evento trombotico e che sussistono significative associazioni tra concentrazioni plasmatiche di numerose variabili emostatiche e frequenza di infarto miocardico. Elevati livelli plasmatici di fibrinogeno, fattore VII/VIIa, attivatore tissutale del plasminogeno e inibitore dell'attivatore del plasminogeno sono stati associati ad un rischio maggiore di sviluppare infarto miocardico, re-infarto, morte improvvisa alla stregua di elevati valori di colesterolo nel plasma, soprattutto per quanto riguarda i soggetti più giovani. Tuttavia importanti difficoltà nella standardizzazione dei metodi di analisi di questi fattori

ha limitato la loro applicazione come fattori di rischio cardiovascolare nella pratica clinica. È noto che le piastrine giocano un ruolo centrale nella formazione del trombo (gli aggregati piastrinici sono i principali costituenti dei trombi arteriosi) poiché forniscono la superficie catalitica per le principali reazioni emostatiche; non è ancora del tutto chiaro, invece, se la formazione del trombo arterioso si verifica tramite l'interazione di piastrine normali o se, piuttosto, il processo trombotico è scatenato dall'attivazione di piastrine anormali. Infatti non c'è ancora consenso unanime su quali tecniche di laboratorio potrebbero essere usate per identificare con certezza piastrine iper-reattive che presentano diversi gradi di variabilità e per le quali, come già accennato, non esistono metodi di analisi standardizzati. Nonostante ciò i risultati di un gran numero di studi clinici suggeriscono l'esistenza di un'associazione tra aumentata attività piastrinica e cardiopatia ischemica. Un ricorrente problema relativo agli studi che si sono occupati dei marker della coagulazione come fattori di rischio cardiovascolare consiste nel fatto che i risultati ottenuti in uno studio spesso non vengono riprodotti in altri lavori analoghi. Questa apparente contraddizione potrebbe essere dovuta non solo alle differenze nelle metodiche laboratoristiche utilizzate ma anche nelle differenze genetiche delle popolazioni studiate; se tale ipotesi fosse vera i marker genetici influirebbero pesantemente sulla determinazione dei fattori implicati nella valutazione del rischio cardiovascolare.

Negli ultimi anni, per quanto riguarda le proteine della coagulazione, sono stati compiuti considerevoli progressi nell'identificazione delle anomalie genetiche in grado di spostare l'equilibrio esistente tra fattori procoagulanti e anticoagulanti; tali anomalie, tuttavia, sono con certezza implicate in un aumentato rischio di trombosi solo nel distretto circolatorio venoso. Nonostante numerosi studi abbiano evidenziato il ruolo di alcuni geni candidati per quanto riguarda un aumentato rischio di sviluppare infarto miocardico, tali dati si sono rivelati inconsistenti a causa dell'esigua numerosità delle popolazioni studiate che ha reso impossibile un'accurata valutazione dell'importanza di uno o più geni. Infatti complesse patologie cliniche come l'infarto miocardico sono l'epifenomeno dell'interazione di più geni con numerosi fattori ambientali e l'effetto di ogni singolo fattore di suscettibilità genetica per la patologia trombotica arteriosa è modesto qualora considerato singolarmente ma può assumere grande importanza in presenza di altri fattori genetici o di fattori ambientali. Di più, la maggior parte degli studi sono stati compiuti su popolazioni con cardiopatia ischemica, sia stabile che instabile, non selezionate per età sottovalutando così l'importanza degli effetti età-relati di una predisposizione genetica a sviluppare malattia ischemica coronarica.

Sebbene quindi sembri appurato che per, quanto riguarda la cardiopatia ischemica, i fattori genetici giocano un ruolo fondamentale, numerose limitazioni metodologiche sia per quanto riguarda la selezione e la esiguità delle popolazioni indagate, sia nell'analisi statistica dai dati ottenuti, non consentono allo stato attuale di identificare quali geni siano effettivamente implicati e quale peso ognuno abbia nel determinare la malattia coronarica. In tal senso lo scarso numero dei pazienti arruolati nei diversi studi sembra essere l'elemento più limitante. Tutti gli studi fino ad ora compiuti, infatti, hanno considerato un campione di poche centinaia di soggetti nei quali sono stati indagati numerosi geni candidati creando così errori statistici importanti caratterizzati dalla presenza di molti falsi positivi e falsi negativi. Poiché con maggiore probabilità piccoli studi vengono pubblicati da parte della letteratura scientifica se presentano dati eclatanti, il numero di falsi positivi che sono stati pubblicati risulta essere estremamente alto e altrettanto confondente. Per fare un esempio, peraltro piuttosto vicino alla realtà, se 1.000 ricercatori impegnati nell'individuazione di geni associati alla cardiopatia ischemica, studiano ognuno 25 geni candidati, 1.250 delle 25.000 associazioni testate è statisticamente significativa solo per caso ovvero per il gioco delle probabilità. Se ognuna delle 1.250 associazioni risultate positive viene pubblicata in letteratura si assiste ad un'inondazione di falsi positivi. Per prevenire tale problema sarebbe necessario disporre di un'ampissimo data-base dotato del peso statistico necessario per garantire che sia i risultati positivi che quelli negativi vengano considerati con la medesima importanza. Per fare ciò è inoltre necessario stabilire a priori, in base al gene indagato, quale deve essere la numerosità di un campione perché i risultati del lavoro siano significativi. In altre parole un numero diverso di soggetti dovrà essere arruolato in base alla frequenza allelica della mutazione ricercata, alla prevalenza della stessa nei casi rispetto ai controlli, alle caratteristiche del gene candidato

(dominante, recessivo o additivo), ecc.

Fibrinogeno

Studi di coorte hanno dimostrato che aumentati livelli plasmatici di fibrinogeno sono associati con un aumentato rischio di infarto miocardico (1-3). In relazione a ciò è stata presa in considerazione la sostituzione -455 G/A con la regione promoter della catena beta del fibrinogeno. L'allele -455 A è presente in circa il 20% della popolazione: tutti gli individui presentavano livelli di fibrinogeno più elevati di circa il 10% rispetto a quelli di soggetti con fenotipo GG (4). La relazione tra la variante 455 GA beta del fibrinogeno e il rischio di eventi trombotici arteriosi era controversa poiché in alcuni casi controllo si osservava una associazione (5-7) e in altri no (8,9).

Fattore VII

Studi preliminari (10) hanno dimostrato che elevati valori di fattore VII erano associati con un rischio maggiore di eventi ischemici fatali. I livelli plasmatici di fattore VII erano influenzati da multipli fattori come età, sesso, indice di massa corporea, oltre che da polimorfismi intragenici. Uno studio italiano ha evidenziato una associazione inversa tra omozigosi e possibilità di sviluppare infarto miocardico nei pazienti con familiarità per cardiopatia ischemica (11) ma altri studi non hanno confermato questa associazione (12-15).

La resistenza del fattore V di Leiden all'effetto anticoagulante mediato dalla proteina C è più comunemente dovuta alla mutazione del nucleotide G1691A nel gene codificante per il fattore V. Il fattore V di Leiden è il più comune fattore genetico associato con un elevato rischio di patologie tromboemboliche venose. Una relazione tra fattore V e infarto miocardico è stata riscontrata in particolari sottopopolazioni, come le donne, ma non è stata dimostrata nella popolazione generale (16-28).

Mutazione del gene della protrombina

Una transizione AG@A nel nucleotide 20210 all'interno della regione non tradotta 3' del gene della protrombina è associata ad elevati livelli circolanti di protrombina e rappresenta un fattore di rischio per eventi tromboembolici venosi. La relazione tra la mutazione G2'10A della protrombina e l'aumentato rischio di trombosi del distretto arterioso è invece controversa (29-33). I risultati contrastanti suggeriscono che questa mutazione protrombinica non rappresenta un fattore di rischio maggiore per cardiopatia ischemica; ma il potere statistico di molti di questi studi nel definire una chiara associazione tra rischio aumentato di cardiopatia ischemica e mutazione genetica è limitato dalla relativamente bassa incidenza della mutazione nella popolazione generale. Ancora una volta, i risultati suggeriscono che la mutazione 20210 della protrombina può essere associata con un modesto aumento del rischio di patologie trombotiche arteriose ma potrebbe assumere un'importanza particolare in certi sottogruppi come le giovani donne con infarto miocardico acuto.

Glicoproteina IIb/IIIa

Tale glicoproteina è un recettore piastrinico di superficie per il fibrinogeno, il fattore di von Willerbrand e di altri fattori del processo della coagulazione. La sub-unità IIIa consiste di due isoforme comuni, PIA1 e PIA2. Tale dimorfismo è dovuto alla sostituzione nucleotidica T con C interessante il nucleotide 1565 con esone 2 del gene della glicoproteina IIIa e comporta la sostituzione Leu33/Pro33 che è associata con un cambio conformazionale nell'avvolgimento del dominio N-terminale recante un ponte disolfuro della glicoproteina IIIa relativa al sito di legame del fibrinogeno (34). Alcuni studi hanno evidenziato che piastrine PIA2 positive presentano in vitro una maggiore reattività piastrinica rispetto a quelle PIA2 negative (35,36). L'associazione tra PIA2 ed una aumentata tendenza trombotica è inoltre suffragata da esperimenti che hanno utilizzato linee cellulari stabili con sovraespressione di PIA1 e forme polimorfiche di glicoproteina IIb/IIIa (37) come evidenziato da studi autoptici nei quali la presenza dell'allele PIA2 era associato con una aumentata frequenza di trombosi acuta coronarica e placche complicate in uomini con infarto miocardico fatale (38).

La frequenza dell'allele della variante PIA2 varia tra il 10% e il 18% nella popolazione caucasica ed è stata dimostrata l'associazione con un aumentato rischio di angina instabile o infarto miocardico

specialmente nella popolazione di soggetti giovani (39). Alcuni studi successivi hanno confermato l'associazione tra la variante PIA2 e il rischio di cardiopatia ischemica precoce (25,40-42) ma la maggioranza di essi non ha confermato questo dato. Alla luce di tali risultati contraddittori è necessario attendere che ulteriori indagini vengano effettuate possibilmente concentrando l'attenzione su specifici sottogruppi quali i soggetti giovani, le donne (42), i fumatori (25), individui con aterosclerosi preesistente (41) o con una predisposizione genetica addizionale (43).

Conclusioni

I progressi nel Progetto Genoma e le ricerche finalizzate all'individuazione di varianti genetiche interindividuali miglioreranno in un prossimo futuro le possibilità di valutare le relazioni tra varianti funzionali di geni candidati, fenotipi protrombotici associati e rischio di eventi trombotici arteriosi. Gli studi epidemiologici molecolari saranno così in grado di focalizzare la loro attenzione su mutazioni genetiche associate a chiari effetti sull'attività emostatica e su variazioni fenotipiche interindividuali. Inoltre, la valutazione di popolazioni ben definite (pazienti giovani, donne, ecc) e l'uso di precisi e ben definiti eventi clinici (infarto miocardico, angina instabile) potrebbero affinare l'abilità di scoprire le associazioni tra mutazioni genetiche ed aumentato rischio di patologie trombotiche. Da ultimo, studi condotti su ampie popolazioni forniranno la potenza statistica necessaria per valutare con accuratezza l'interazione tra marker genetici e fattori ambientali di rischio. L'integrazione tra le future conoscenze acquisite in campo genetico, biochimico e clinico-epidemiologico sui fattori emostatici, sicuramente potranno meglio chiarire i meccanismi fisiopatologici dell'infarto miocardico e saranno un prezioso strumento per la valutazione del rischio individuale oltre che per la sperimentazione di terapie specifiche antitrombotiche nei pazienti a rischio elevato.

Bibliografia

- 1) Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118:956-963.
- 2) Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: Meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1477-1482.
- 3) Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. An update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1368-1377.
- 4) Hebert PR, Ridker PM, Fuster V, Hennekens CH. Antithrombotic agents in the secondary and primary prevention of cardiovascular diseases in high and usual risk individuals. In: *Cardiovascular Thrombosis: Thrombocardiology and Thromboneurology*. Verstraete M, Fuster V, Topol EJ, eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher 1998;461-470.
- 5) Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou J-P, Scarabin P-Y, Bara L, Green F, Cambien F. b-fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction: the ECTIM study. *Circulation* 1996;93:440-449.
- 6) Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Gender-specific associations of the fibrinogen Bb 448 polymorphism, fibrinogen levels, and acute coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:589-594
- 7) Nishiuma S, Kario K, Yakushijin K, Maeda M, Murai R, Matsuo T, Ikeda U, Shimada K, Matsuo M. Genetic variation in the promoter region of the b-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinol* 1998;9:373-379.

- 8) Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455®A) in the b-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on The Copenhagen City Heart Study. *J Clin Invest* 1997;99:3034-3039.
- 9) Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W, Katz N, Weiss T, Tillmanns H, Hehrlein FW, Waas W, Eberbach A. Positive association of the b-fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1997;77:1120-1126.
- 10) Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabati R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1993;342:1076-1079.
- 11) Iacoviello L, Di Castelnuovo A, de Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, Klufft C, Donati MB. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;338:79-85
- 12) Moor E, Silveira A, van't Hooft F, Suontaka AM, Eriksson P, Blomback M, Hamsten A. Coagulation factor VII mass and activity in young men with myocardial infarction at a young age. Role of plasma lipoproteins and factor VII genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:655-664.
- 13) Lane A, Green F, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Humphries S, Evans A, Luc G, Cambou JP, Arveiler D, Cambien F. Factor VII Arg/Gln353 polymorphism determines factor VII coagulant activity in patients with myocardial infarction (MI) and control subjects in Belfast and France but is not a strong indicator of MI risk in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996;119:119-127.
- 14) Doggen CJM, Manger Cats V, Bertina RM, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. A genetic propensity to high factor VII is not associated with the risk of myocardial infarction in men. *Thromb Haemost* 1998;80:281-285.
- 15) Heywood DM, Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Polymorphisms of the factor VII gene and circulating FVIIc levels in relation to acute cerebrovascular disease and post stroke mortality. *Stroke* 1997;28:816-821
- 16) Holm J, Zöller B, Svensson PJ, Berntorp E, Erhardt L, Dahlbäck B. Myocardial infarction associated with homozygous resistance to activated protein C. *Lancet* 1994;344:952-953.
- 17) Emmerich J, Poirier O, Evans A, Marques-vidal P, Arveiler D, Luc G, Aiach M, Cambien F. Myocardial infarction, Arg506 to Gln factor V mutation, and activated protein C resistance. *Lancet* 1995;345:321.
- 18) Kontula K, Ylikorkala A, Miettinen H, Vuorio A, Kauppinen-Mäkelin R, Hämäläinen L, Palomäki H, Kaste M. Arg506Gln factor V mutation in patients with ischaemic cerebrovascular disease and survivors of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1995;73:558-560.
- 19) Prohaska W, Mannebach H, Schmidt M, Gleichmann U, Kleesiek K. Evidence against heterozygous coagulation factor V 1691 GA mutation for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Molec Med* 1995;73:521-524.
- 20) Cushman M, Rosendaal FR, Psaty BM, Cook EF, Valliere J, Kuller LH, Tracy RP. Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost* 1998;79:912-915.

- 21) Dunn ST, Roberts CR, Schechter E, Moore WE, Lee ET, Eichner JE. Role of factor V Leiden mutation in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Thromb Res* 1998;91:91-99.
- 22) Gardemann A, Arsic T, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The factor II G20210A and factor VG1691A gene transitions and coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1999;81:208-213.
- 23) Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995;332:912-917.
- 24) Van Bockxmeer FM, Baker RI, Taylor RR. Premature ischaemic heart disease and the gene for coagulation factor V. *Nat Med* 1995;1:185.
- 25) Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetichev R, Tagliabue L, Tubaro M, Galvani M, Ottani F, Ferrario M, Corral J, Margaglione M. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 1999;94:46-51.
- 26) Vargas M, Soto I, Pinto CR, Urgelles MF, Batalla A, Rodriguez-Reguero J, Cortina A, Alvarez V, Coto E. The prothrombin 20210A allele and the factor V Leiden are associated with venous thrombosis but not with early coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinol* 1999;10:39-41.
- 27) Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT, Jr, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997;89:2817-2821.
- 28) Doggen CJM, Manger Cats V, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998;97:1037-1041.
- 29) Corral J, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, River J, Heras I, Vicente V. The venous thrombosis risk factor 20210A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1997;99:304-307.
- 30) Eikelboom JW, Baker RI, Parsons R, Taylor RR, van Bockxmeer FM. No association between the 20210 G/A prothrombin gene mutation and premature coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998;80:878-880.
- 31) Prohaska W, Schmidt M, Mannebach H, Gleichmann U, Kleesiek K. The prevalence of the prothrombin 20210 G/A mutation is not increased in angiographically confirmed coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999;81:161-162.
- 32) Croft SA, Daly ME, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, Hampton KK. The prothrombin 20210A allele and its association with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999;81:861-864.
- 33) Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999;99:999-1004.
- 34) Honda S, Honda Y, Bauer B, Ruan C, Kunicki TJ. The impact of three-dimensional structure on the expression of P1A alloantigens on human integrin β 3. *Blood* 1995;86:234-242.

- 35) Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PL A2 polymorphism. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1142-1147.
- 36) Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli NU, Hendirx C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GPIIIA PL A polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000;101:1013-1018.
- 37) Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF. The PIA2 polymorphism of integrin b3 enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000;105:793-802.
- 38) Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Lalu Kaisa, Penttilä A, Karhunen PJ. Glycoprotein IIIa PIA polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2573-2578.
- 39) Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996;334:1090-1094.
- 40) Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet PI A polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bb 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 1997;96:1424-1431.
- 41) Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, März W, Scharf RE. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: Human platelet antigen Ib (HPA-1b/PI A2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998;79:731-735.
- 42) Pastinen T, Perola M, Niini P, Terwilliger J, Salomaa V, Vartiainen E, Peltonen L, Syvänen AC. Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. *Hum Molec Genet* 1998;7:1453-1462.
- 43) Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* 1999;116:880-886.

Le microangiopatie trombotiche: si possono distinguere con il dosaggio della proteasi?

M. Galbusera

Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Laboratori Negri Bergamo

Il termine microangiopatia trombotica (MAT) definisce una lesione che consiste in un ispessimento della parete dei piccoli vasi (capillari ed arteriole) con rigonfiamento e distacco delle cellule endoteliali dalla membrana basale e formazione di trombi piastrinici con la parziale o completa ostruzione del lume vascolare (1). Questa lesione è comune a varie malattie, tra le quali la porpora trombotica trombocitopenica (PTT) e la sindrome emolitico uremica (SEU), due entità indistinguibili patologicamente ma che a seconda che le lesioni prevalgano a livello cerebrale (PTT) o renale (SEU) sono state descritte come due sindromi diverse. Il termine SEU meglio descrive la malattia classica dei bambini con insufficienza renale (1).

In questa forma, generalmente sporadica, che è associata ad infezione da parte di alcuni ceppi di E.

coli che producono verotossina (1) rientra la maggior parte dei casi. Altre forme di PTT e SEU sono rare, si manifestano in età adulta e spesso colpiscono più individui della stessa famiglia. Queste forme recidivano frequentemente e possono essere geneticamente determinate (1). Il danno endoteliale è un evento cruciale in entrambe le sindromi, una volta stimulate le cellule endoteliali rilasciano il fattore di von Willebrand (vWF), una grossa glicoproteina multimerica che media l'adesione delle piastrine ai siti della lesione vascolare. Studi immunoistologici hanno dimostrato la presenza di vWF nei trombi di pazienti con MAT (2) ed inoltre in questi pazienti, a differenza dei soggetti normali, sono stati trovati in circolo dei multimeri del vWF ad altissimo peso molecolare (ULvWF) (3,4). La relazione tra ULvWF e MAT non è mai stata chiarita fino alla recente dimostrazione di una metalloproteasi plasmatica che taglia il legame peptidico tra i residui aminoacidici 842-843 della subunità del vWF (5). Questa proteasi è stata purificata e sequenziata (6, 7), classificata come ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloprotease, with Thrombospondin type 1 motif), il suo gene è stato localizzato sul cromosoma 9q34 e l'mRNA individuato nel fegato (7, 8, 9). In pazienti con PTT sono state identificate 12 mutazioni di ADAMTS 13 distribuite nei 29 esoni del gene (10). Nei primi due studi pubblicati nel 1998 (11, 12) è stato dimostrato che pazienti con diverse forme di PTT avevano una ridotta o assente attività di ADAMTS13 mentre i pazienti con SEU presentavano una normale attività. Da questi risultati è stata tratta la conclusione che l'assenza o la presenza di questa attività proteasica potesse essere usata per classificare i pazienti come affetti da PTT o da SEU (13). Quando l'attività di questa proteasi nella SEU è stata studiata più estensivamente, si è visto che l'attività è normale in molti, sebbene non in tutti, i bambini con SEU associata ad infezione da E. coli (D+ SEU) (14, 15), mentre molti bambini con SEU non associata a E. coli (D- SEU) hanno un'assenza completa di questa attività (16, 17). Studi più recenti (18, 19) condotti su una grande popolazione di pazienti con MAT hanno dimostrato la riduzione o assenza di attività di ADAMTS13 anche in pazienti con SEU. Questi dati, insieme all'evidenza di una ridotta attività di questa proteasi sia in condizioni fisiologiche (20) che in diverse condizioni patologiche (20, 21, 22), rendono comunque problematico l'uso di questo test per classificare i pazienti come affetti da PTT o SEU. Inoltre come recentemente puntualizzato da George (23) poiché le sindromi descritte come PTT e SEU negli adulti possono essere indistinguibili, eccetto per la presenza di insufficienza renale acuta nella SEU, ed entrambe rispondono al trattamento con plasma, non ci si può aspettare che il test dell'attività proteasica possa provvedere indicazioni terapeutiche.

Bibliografia

- 1) Ruggenenti P. et al. *Kidney Int* 2001;60:831-846.
- 2) Asada Y. et al. *Thromb Res* 1985;38:469-479.
- 3) Moake J.L. McPherson PD. *Am J Med* 1989;87:9N-15N.
- 4) Rose P.E. et al. *Arch Dis Child* 1984;59:1135-1140.
- 5) Furlan M. et al. *Blood* 1996;87:4223-4234.
- 6) Gerritsen H.E. et al. *Blood* 2001;98:1654-1661.
- 7) Fujikawa K. et al. *Blood* 2001;98:1662-1666.
- 8) Zheng X et al. *J Biol Chem* 2001; in press.
- 9) Soejima K. et al. *J Biol Chem* 2001;130:475-460.
- 10) Levy G.G. et al. 2001;413:488-494.

- 11) Furlan M. et al. N Engl J Med 1998;339:1578-1584.
 - 12) Tsai H.M. et al. N Engl J Med 1998;339:1585-1594.
 - 13) Moake J.L. et al. N Engl J Med 1998;339:1629-1631.
 - 14) Tsai H.M. et al. Pediatr Res 2001;49:653-659.
 - 15) Hunt B.J. et al. Thromb Haemost 2001;85:975-978.
 - 16) te Loo D.M.W. et al. Pediatr Nephrol 2000;14:762-765.
 - 17) Loirat C. et al. Pediatr Nephrol 2001; (Abstract).
 - 18) Veyrdier A. et al. Blood 2001;98:1765-1772.
 - 19) Remuzzi G. et al. submitted.
 - 20) Mannucci P.M. et al. Blood 2001; in press.
 - 21) Oleksowicz L. et al. Cancer Res 1999;59:2244-2250.
 - 22) Moore J.C. et al. Blood 2001;98:1842-1846.
 - 23) George JN. Blood 2000;96:1223-1229.
-

Gene Therapy in Hemophilia - First successes

Flora Peyvandi, M.D., Ph.D.

Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, Dipartimento di Medicina Interna, Università e Ospedale Maggiore, Milano

The inherited deficiency of blood coagulation factors leads to lifelong bleeding disorders commonly called hemophilias. The factors most frequently found deficient in persons with haemophilia are factors VIII and IX, whose genes being located on the X chromosome when mutated cause the X-linked recessive traits haemophilia A and B respectively. The prevalence of these conditions in the general population is approximately 1 in 5,000 males (haemophilia A) and 1 in 10,000 (haemophilia B). The hemophilias represent probably the best possible combination of features for a favourable response to gene replacement therapy in the whole of human genetic diseases. In the last two years the first experiments of somatic gene therapy have started in persons with haemophilia. Two of the three gene therapy trials in human with haemophilia A and B have been recently published in Nature Genet 2000 and NEGM 2001. The results of these studies are promising in terms of efficacy and safety but holds at the moment for novel trials promising higher and longer expression levels of FVIII and FIX with safe procedures. Two other ongoing FVIII and FIX gene therapy trials are based on infusion into the hepatic artery of recombinant AAV driving a FIX minigene and on a intravenous infusion of b-domains less FVIII cDNA in an adenoviral "gutted" vectors containing human albumin promoter. The details of these studies are not available yet. Attainment of therapeutic factor levels and maintenance of gene expression are the main problems of gene therapy in haemophilia patients. However, haemophilia is likely to be the first widespread genetic disease to be cured by gene therapy in the third millennium.

La terapia antiplastrinica nel 2001

Gian Franco Gensini e Beatrice Dilaghi

Dipartimento di Area Critica, Sezione di Clinica Medica e Cardiologia, Università degli Studi di Firenze, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze

Il concetto unificante di aterosclerosi identifica la coesistenza di aterosclerosi in diversi distretti e la formazione di trombosi sovrastante determinando i tipici quadri clinici della sofferenza ischemica dei tessuti (cardiopatía ischemica, malattia cerebrovascolare e arteriopatía periferica). Aspirina: l'aspirina è il primo agente antiplastrinico usato, e le sue dimostrazioni di efficacia derivano da studi assai ampi che hanno interessato complessivamente centinaia di migliaia di pazienti. L'aspirina è un agente clinicamente efficace, sicuro e relativamente ben tollerato nella prevenzione primaria e secondaria degli eventi ischemici cardiaci e cerebrali e riduce, in pazienti sottoposti a procedure interventistiche percutanee coronariche l'incidenza di complicanze precoci. La dose minima efficace è diversa per le differenti condizioni cliniche in cui l'aspirina viene utilizzata (tab 1).

Tabella 1. Dose minima efficace di aspirina (sulla base delle evidenze derivanti dai grandi studi clinici controllati)

Condizione clinica	Dose giornaliera (mg)
PREVENZIONE PRIMARIA	
Uomini ad alto rischio	75
Iperensione	75
Stenosi carotidea	75
Ictus ischemico acuto	160
PREVENZIONE SECONDARIA	
INFARTO MIOCARDICO	100
Angina instabile	160
TIA e ictus ischemico	50

La terapia a lungo termine con aspirina conferisce un beneficio netto sul rischio di successivo infarto miocardico, ictus o morte vascolare fra soggetti con rischio intermedio-elevato di complicanze vascolari, includendo pazienti con angina stabile, con angina instabile, con precedente infarto miocardico e con TIA o ictus ischemico o altre categorie ad alto rischio. In termini di beneficio assoluto l'effetto protettivo dell'aspirina si traduce nell'evitare 50 eventi vascolari maggiori su 1000 pazienti con angina instabile trattati per 6 mesi e in 35 su 1000 pazienti con precedente infarto miocardico, ictus o TIA trattati per 30 giorni. Per pazienti con diverse manifestazioni di cardiopatía ischemica esiste consenso nel definire la dose efficace terapeutica dell'aspirina ristretta per la prevenzione di IMA, ictus o morte vascolare, mentre nel caso della malattia cerebrovascolare la dose è variabile da 30 a 1300 mg. In alcuni studi è stato mostrato il beneficio dell'aspirina in prevenzione primaria in particolare in soggetti a rischio elevato (1,2). Gli studi clinici controllati volti a valutare l'efficacia dell'aspirina nell'angina instabile hanno mostrato un vantaggio significativo in termini di riduzione della mortalità e dell'incidenza di infarto miocardico fatale e non fatale. L'effetto favorevole è risultato indipendente dal dosaggio, dal momento di ingresso nello studio e dalla durata del follow-up (3-6). Il primo studio, il Veterans Administration Cooperative Study (3), condotto all'inizio degli anni '80 con una dose di 325 mg di aspirina al giorno contro placebo, ha mostrato una riduzione della mortalità generale ai limiti della significatività statistica (aspirina 1,6% vs placebo 3,3%; -51%; $p=0,054$), una riduzione significativa del rischio di infarto miocardico non fatale (aspirina 3,4% vs placebo 6,9%; -51%; $p=0,0005$) e dell'end-point primario rappresentato dalla combinazione di infarto miocardico e morte (aspirina 5,0% vs placebo 10,1%; -51%; $p=0,0005$). L'efficacia dell'aspirina è stata successivamente confermata in altri studi (4,5) e l'analisi per sottogruppi effettuata nel contesto dell'Antiplatelet Trialists' Collaboration (7) ha mostrato che su 4018 pazienti con angina instabile, il trattamento antiaggregante condotto per almeno un mese (per lo più con aspirina) riduceva del 35% l'incidenza

di eventi vascolari (morte per cause cardiovascolari, infarto miocardico e cerebrale non fatali) rispetto al gruppo non trattato, con una riduzione assoluta del 4,9% (aspirina 9,1% vs placebo 14%; $p < 0,00001$) e quindi un NNT (Number Need to Treat - numero di pazienti da trattare per ottenere un ulteriore esito favorevole, calcolato come l'inverso della riduzione di rischio assoluta approssimato per eccesso al numero intero più vicino) per evitare un evento vascolare di circa 20, quindi assai vantaggioso anche in considerazione del basso costo dell'aspirina. Uno studio retrospettivo su 300 pazienti mostrava che l'assenza di terapia antiplastrinica al tempo dell'angioplastica era un fattore predittivo per lo sviluppo di trombosi periprocedurale clinicamente significativa (8). Il dosaggio più appropriato per l'angioplastica non è stato ancora chiaramente stabilito, ma una dose empirica (80-325 mg) almeno 2 ore prima o un pretrattamento più lungo con più bassi dosaggi di aspirina (80-100 mg) possono essere adeguati.

Prevenzione dell'ictus: l'aspirina riduce del 25% l'incidenza di ictus e degli eventi vascolari maggiori nei pazienti con FA non valvolare (9-16). L'aspirina inoltre riduce l'incidenza di cardiopatia ischemica non fatale del 32% e l'end-point combinato di morte, ictus o embolia sistemica di circa il 28% (12). Per la prevenzione primaria fra i pazienti con fibrillazione atriale con un'incidenza media di ictus del 4,5%/anno circa 10 ictus su 1000 sarebbero prevenuti con l'aspirina (17). Pertanto gli antiaggreganti piastrinici hanno un ruolo nella prevenzione sia primaria che secondaria degli eventi tromboembolici nei pazienti affetti da FANV (fibrillazione atriale non valvolare). Tale ruolo assume rilevanza notevole in quei casi in cui sussistano controindicazioni alla conduzione della terapia anticoagulante orale, che allo stato attuale rappresenta senza dubbio la terapia di elezione in questo ambito, e in quella popolazione di pazienti in cui sussista un basso rischio e/o siano presenti problematiche che rendano difficoltoso il monitoraggio della terapia con warfarin, tanto da non giustificare l'impiego (18,19). Recentemente è stata pubblicata sul British Medical Journal una revisione sistematica quantitativa condotta con la metodologia del gruppo "Cochrane Heart" sugli effetti del trattamento anticoagulante a lungo termine e di quello antiaggregante in pazienti con fibrillazione atriale cronica non valvolare. Sono state prese in esame le casistiche dello studio AFASAK I (aspirina 75 mg versus warfarin) e II (300 mg di aspirina versus warfarin), dello SPAF II (325 mg aspirina versus warfarin), e dello SPAF III, del SIFA (Indobufene 400 mg versus warfarin) e PATAF (75 mg di aspirina versus warfarin) (20). I risultati della metaanalisi non mostravano nessuna differenza significativa di mortalità cardiovascolare (Odd Ratio di 0,74 CI al 95% 0,39-0,46), di incidenza di ictus non fatale (OR 0,68, 95% CI 0,46-0,99) e degli eventi combinati fatali e non (OR 0,79, 95% CI 0,61-1,02) fra le due strategie di trattamento. L'eterogeneità fra i diversi studi clinici e i dati limitati non consentono di stabilire con certezza il valore del trattamento a lungo termine con anticoagulanti orali in confronto al trattamento antiaggregante con aspirina. Il maggiore rischio emorragico (OR 1,45; 95% CI 0,93-2,27, anticoagulanti versus antiaggreganti) e i costi più elevati della terapia anticoagulante rendono quest'ultima una strategia di trattamento meno convincente. Anche se l'aspirina è risultata nel prevenire l'ictus in pazienti con fibrillazione striale un trattamento meno efficace del warfarin ma meno costoso, più sicuro ed indicato nei pazienti che presentano controindicazioni alla terapia anticoagulante orale o a basso rischio di ictus.

Indobufene: sempre per quanto riguarda la prevenzione degli eventi embolici in pazienti con fibrillazione atriale sia in prevenzione primaria che secondaria l'indobufene è stato valutato nello studio SIFA, ed è in corso di valutazione nello studio SIFA II. Lo studio SIFA, multicentrico, randomizzato, di prevenzione secondaria ha valutato l'efficacia della terapia con warfarin (INR 2-3,5) vs. l'antiaggregante piastrinico indobufene (100 o 200 mg x 2/die) in oltre 916 pazienti con fibrillazione striale non valvolare. Nel corso di 12 mesi di follow-up, l'incidenza di eventi primari (analoghi a quelli dello studio EAFT) è stata di circa il 10%, senza differenza significativa fra il braccio trattato con warfarin (9,0%) e quello con indobufene (10,6%) (21). Attualmente è in corso lo studio SIFA II, uno studio randomizzato a doppio cieco, in pazienti con fibrillazione striale non valvolare che non possono assumere warfarin della durata di 3 anni che confronterà l'efficacia dell'indobufene verso l'aspirina per quanto riguarda la riduzione degli end-point morte, ictus, infarto miocardico ed embolie sistemiche. Il campione dello studio è composto da 2200 pazienti stratificati in base al rischio, 900 in prevenzione secondaria e 1300 in prevenzione primaria. Questo studio, grazie anche al lungo periodo di arruolamento, potrà fornire dati solidi sul ruolo degli

antiaggreganti, e dell'indobufene in particolare, in prevenzione primaria e secondaria.

Triflusal: Il triflusal inibisce la sintesi piastrinica di prostaciclina mediata da COX 1, mentre inibisce solo scarsamente la sintesi di prostaciclina mediata da COX2 endoteliale; inattiva, insieme ad un suo metabolita, le fosfodiesterasi piastriniche. L'efficacia del triflusal è stata valutata in pazienti con cardiopatia ischemica, malattia cerebrovascolare, arteriopatia periferica e malattia tromboembolica; il triflusal ha mostrato un'efficacia simile all'aspirina nel ridurre le complicanze nei pazienti sottoposti ad angioplastica (22) e nei pazienti con angina instabile: in uno studio del 1993 l'incidenza di infarto miocardico non fatale si riduceva del 65,8% (4,2% triflusal versus 12,% gruppo placebo; $p < 0,013$) (23).

Lo studio TIM (Triflusal in Myocardial Infarction) recentemente pubblicato ha mostrato che il triflusal ha efficacia paragonabile a quella dell'aspirina (la riduzione di rischio relativo nel gruppo in trattamento era 11,8%, non statisticamente significativa), con un migliore profilo di sicurezza (ridotta incidenza di ictus emorragico nel gruppo trattato con triflusal, 0% rispetto al gruppo trattato con aspirina, 1,6%) (24).

I derivati tienopiridinici: la ticlopidina come singolo agente è stato valutato in pazienti con ictus, TIA, angina instabile e claudicatio intermittens e nei pazienti sottoposti ad intervento di rivascolarizzazione coronarica. La ticlopidina risulta significativamente più efficace dell'aspirina nel ridurre l'incidenza dell'ictus nei pazienti con TIA e ictus lieve; più efficace del placebo nel ridurre il rischio combinato di ictus, infarto miocardico o morte vascolare in pazienti con precedente ictus tromboembolico, efficace in associazione con la terapia antianginosa nel ridurre infarto miocardico o morte vascolare in pazienti con angina instabile; più efficace del placebo nel ridurre l'occlusione acuta dei bypass coronarici; più efficace del placebo nel ridurre le complicanze vascolari nei pazienti con arteriopatia periferica.

Alcuni studi hanno mostrato la superiorità dell'associazione ticlopidina+aspirina rispetto alla sola aspirina o aspirina+warfarin, nel prevenire le complicanze trombotiche dopo impianto di stent coronarico. La ticlopidina è stata usata in modo routinario in combinazione con l'aspirina in pazienti sottoposti ad impianto di stent, ma per la sicurezza maggiore in molti centri è stato sostituito con il clopidogrel.

L'impiego della ticlopidina nell'angina instabile è stato oggetto dello STAI (Studio della Ticlopidina nell'Angina Instabile) (25), uno studio italiano condotto in aperto in cui 314 pazienti su 652 assumevano ticlopidina al dosaggio di 500 mg al giorno entro 48 ore dal ricovero, in aggiunta al trattamento antianginoso convenzionale (senza aspirina). L'analisi "intention to treat" a 6 mesi, ha dimostrato una significativa riduzione dell'incidenza di infarto miocardico fatale e non fatale (-53,2%; $p=0,006$; NNT=17), e degli eventi vascolari totali (-46,3%; $p=0,009$; NNT=16), con un vantaggio che ha iniziato a manifestarsi dopo 15 giorni di trattamento, probabilmente in rapporto alla latenza iniziale caratteristica di questo farmaco prima del suo effetto pieno. Attualmente l'indicazione principale per la ticlopidina (e il clopidogrel) è la prevenzione delle complicanze ischemiche dopo impianto coronarico di stent. Prima che la ticlopidina fosse disponibile, la trombosi subacuta di stent, spesso provocando eventi cardiaci maggiori, era riportata in 3,5-8,6% dei pazienti. In pazienti ad alto rischio con impianto di stent Palmaz-Schatz, il trattamento con ticlopidina+aspirina riduceva gli endpoint cardiaci primari (end-point composito di morte cardiaca, infarto miocardico, bypass coronarico e angioplastica ripetuta) dal 6,2% (terapia anticoagulante standard) all'1,6% (26). L'occlusione degli stent si verificava nel 5,4% nel gruppo ricevente terapia anticoagulante e nello 0,8% del gruppo ricevente terapia antiaggregante. Gli effetti favorevoli della ticlopidina erano confermati dallo studio STARS (STent Antithrombotic Regimen Study) che ha confrontato l'effetto dell'aspirina (325 mg al dì), la combinazione di aspirina (325 mg al dì) più ticlopidina (500 mg al dì per un mese), e di aspirina (325 mg al dì) più warfarin sugli eventi ischemici precoci. Solo lo 0,5% dei pazienti assegnati alla terapia aspirina+ticlopidina raggiungeva l'endpoint composito primario a 30 giorni di morte, trombosi angiografica, rivascolarizzazione della lesione trattata, o infarto miocardico rispetto a 3,6% dei pazienti assegnati alla sola aspirina e il 2,7% dei pazienti assegnati a aspirina+warfarin. I risultati dello studio suggeriscono che il pretrattamento di 24 ore con ticlopidina permette una più efficace inibizione dell'attivazione piastrinica rispetto alle durate più brevi di trattamento (27). Una grave leucopenia spesso reversibile all'interruzione del trattamento, è la complicanza principale (circa dell'1% dei pazienti) del

trattamento con ticlopidina (28). Si può verificare anche la porpora trombotica trombocitopenica (29).

Nello studio CAPRIE il clopidogrel (75 mg) ha mostrato benefici lievemente maggiori rispetto all'aspirina (frequenza annuale di eventi 5,32 per il clopidogrel versus 5,83% per l'aspirina, riduzione di rischio relativo 8,7%, $p=0,043$) per la prevenzione secondaria dei pazienti con aterotrombosi offrendo una migliore sicurezza gastrointestinale e tollerabilità se confrontata all'aspirina (325 mg) (30). La maggioranza della differenza di efficacia si verificava nei pazienti con arteriopatía periferica sintomatica, infatti i pazienti con arteriopatía periferica trattati con clopidogrel mostravano una riduzione di rischio relativa del 23,8% ($p=0,0028$) rispetto all'aspirina, mentre una riduzione non significativa del 7,3% ($p=0,26$) e del 3,7% ($p=0,66$) rispettivamente in pazienti con ictus e con infarto miocardico. Il clopidogrel è generalmente associato a una più bassa incidenza di effetti collaterali gravi rispetto alla ticlopidina, e può essere usato in alternativa ad essa dopo l'impianto di stent, somministrato in aggiunta all'aspirina alla dose-carico di 300 mg e seguito da una dose giornaliera di 75 mg per 14 giorni dopo l'impianto. Questo regime rispetto alla combinazione aspirina-ticlopidina non mostra alcuna differenza nella frequenza di trombosi subacuta di stent o di eventi avversi cardiaci maggiori nei successivi 30 giorni. Effetti simili erano riportati nei tre grandi studi randomizzati e il clopidogrel si associava a minori effetti collaterali (31-33). Il trattamento con clopidogrel dovrebbe essere iniziato prima possibile dopo l'angioplastica (nessun dato riporta un beneficio maggiore del pretrattamento). I risultati degli studi clinici suggeriscono che la ticlopidina o il clopidogrel possono essere usati come trattamento alternativo dopo l'angioplastica in pazienti sensibili all'aspirina. Per raggiungere una inibizione piastrinica adeguata, la ticlopidina dovrebbe essere data per almeno 24 prima della procedura (34).

Recentemente lo studio CURE ha valutato l'efficacia del clopidogrel aggiunto alla terapia standard (ASA e eparina) in pazienti con angina instabile, mostrando una riduzione di rischio relativa per l'end-point primario (infarto miocardico, ictus e morte cardiovascolare) del 20%; il beneficio ottenuto iniziava entro poche ore e si manteneva oltre 12 mesi (35). Nel sottostudio PCI CURE la somministrazione a lungo termine di clopidogrel era associata ad una frequenza più bassa dell'end-point primario, e di morte cardiovascolare e infarto miocardico con un buon profilo di tolleranza (36).

Gli inibitori Anti GPIIb-IIIa: Sia l'aspirina che la ticlopidina interferiscono con specifici meccanismi di attivazione piastrinica: per l'aspirina la produzione del trombossano A₂, e per la ticlopidina il recettore piastrinico per l'ADP. Tuttavia la fase finale dell'attivazione delle piastrine, che rende possibile l'aggregazione, è rappresentata dall'attivazione di recettori presenti in forma inattiva sulle piastrine (il complesso glicoproteico I**IIb/IIIa** - GP I**IIb/IIIa**) che vengono esposti sulla superficie piastrinica in seguito alle reazioni di attivazione indotte dai diversi agenti aggreganti. La disponibilità di inibitori recettoriali specifici per il recettore I**IIb/IIIa** ha aperto nuove prospettive al trattamento antiaggregante, perchè efficace indipendentemente dall'agente aggregante in gioco. Oggi sono disponibili diversi inibitori diretti del recettore I**IIb/IIIa** attivi per via endovenosa: a) abciximab (anticorpo monoclonale), b) eptifibatide, lamifiban (Inibitori mimetici peptidici) e tirofiban (Inibitori mimetici non peptidici). Questi diversi agenti hanno importanti vantaggi clinici: il loro effetto antiaggregante è assai potente; sono molto efficaci indipendentemente dal tipo di stimolo e dall'azione contemporanea di più stimoli (ad esempio, trombina + collagene + ADP), e la loro azione inizia già qualche minuto dopo la somministrazione di un bolo per via endovenosa. Questi farmaci si sono mostrati efficaci in pazienti con sindrome coronarica acuta sia se sottoposti a intervento di rivascolarizzazione che alla sola terapia medica (tabella 2 e 3) (37-47).

Tabella 2. Casistiche di interventistica coronarica in cui è stata valutata l'efficacia degli inibitori della GP IIIb/IIIa** a 30 giorni**

	Studi	EPIC	EPILOG	CAPTURE	EPISTENT	RAPPORT	IMPACT-II	RESTORE
	N°	2099	2792	1265	2399	483	4010	2141
Eventi totali*	Placebo	12,8%	11,7%	15,9%	10,8%	11,2%	11,6%	10,5%

	Anti Iib/IIIa	8,3%	5,2%	11,3%	5,3%	5,8%	9,1%	8,0%
	NNT	22	15	22	18	19	40	40
Morte + IMA	Placebo	10,1%	9,1%	9,0%	10,2% ^o	17,6%	8,4%	6,3%
	Anti Iib/IIIa	7,0%	4,0%	4,8%	5,2% ^o	11,6%	7,1%	5,1%
	NNT	32	20	24	20	16	77	83
IMA	Placebo	8,6%	8,7%	8,2%	NV	4,1%	8,3%	5,7%
	Anti Iib/IIIa	5,2%	3,7%	4,1%	NV	3,3%	6,6%	4,2%
	NNT	29	20	24	NV	125	59	67

* morte + IMA + rivascolarizzazione d'urgenza, ^o infarti miocardici estesi

Tabella 3. Studi clinici condotti con l'impiego di antagonisti della GP Iib/IIIa in pazienti con angina instabile/IMA non Q: risultati a 30 giorni

	Studi	PRISM	PRISM-PLUS	PARAGON	PURSUIT
	N°	3231	1815	2282	10 498
Eventi totali	Placebo	5,9%	17,9%	11,7%	15,7%
	Anti Iib/IIIa	3,8%	12,9%	10,6%	14,2%
	NNT	48	20	91	67
Morte + IMA	Placebo	7,0%	11,9%	11,9%	15,7%
	Anti Iib/IIIa	5,7%	8,7	10,7%	14,2%
	NNT	77	31	83	67

L'introduzione degli antagonisti della GP Iib/IIIa ha rappresentato un miglioramento significativo nel trattamento antitrombotico delle sindromi coronariche acute. Indipendentemente dalla loro natura chimica, si sono mostrati in grado di prevenire efficacemente le complicanze ischemiche correlate alla PTCA in pazienti. L'uso aggiuntivo degli inibitori della GP Iib/IIIa durante impianto di stent coronarico si è anche dimostrato clinicamente efficace nel migliorare l'outcome clinico entro 30 giorni dopo l'angioplastica. L'effetto principale di questi agenti è mostrato sulla riduzione delle complicanze ischemiche, includendo l'infarto miocardico acuto e l'ischemia ricorrente. Gli inibitori della GP Iib/IIIa attivi per via intravenosa condividono un effetto di classe, anche se l'abciximab aggiunge all'effetto specifico degli inibitori peptidomimetici una meno specifica interferenza con il recettore per la vitronectina, una sostanza implicata nel danno vascolare. Solo uno studio comparativo è stato attualmente pubblicato per valutare l'efficacia relativa dell'abciximab e del tirofiban. Lo studio TARGET (do Tirofiban And Reo-pro Give similar Efficacy Trial) era disegnato per valutare la non inferiorità del tirofiban in confronto all'abciximab in pazienti sottoposti ad angioplastica + impianto di stent (48). L'incidenza di un end-point composito (morte, infarto miocardico non fatale e la rivascolarizzazione del vaso interessato) avveniva nel 6% dei pazienti trattati con abciximab e nel 7,6% pazienti trattati con tirofiban, suggerendo che il tirofiban offre una protezione minore dagli eventi ischemici rispetto all'abciximab.

Le piastrine giocano un ruolo chiave nell'aterotrombosi, ed è stato chiaramente dimostrato negli studi clinici che gli agenti antiplastrinici sono indispensabili nel trattamento dei pazienti con manifestazione clinica di aterotrombosi perché sono in grado di ridurre il rischio di eventi ischemici, come l'infarto miocardico (IMA) fatale e non, e l'ictus fatale e non. Fra gli agenti

antipiastrinici, l'aspirina rappresenta il capostipite e viene usata sistematicamente per raggiungere l'inibizione piastrinica in pazienti con aterotrombosi. Malgrado il vasto utilizzo nella pratica clinica e le chiare evidenze di efficacia, l'aspirina possiede limitazioni che hanno spinto la ricerca clinica negli anni verso farmaci di efficacia maggiore. In questo senso esistono evidenze significative a favore della ticlopidina e del clopidogrel, sia per l'impiego in rapporto alle procedure interventistiche in associazione alla stessa aspirina, in particolare nell'impiego degli stent. Per altri agenti, il triflusal e l'indobufene, stanno aumentando le evidenze di efficacia, e ulteriori ricerche sono in corso. Per quanto riguarda gli anti GP IIb/IIIa esistono evidenze assai favorevoli per l'impiego nelle sindromi coronariche acute dei preparati attivi per via endovenosa. Dati iniziali sull'ictus ischemico sembrano indicare, anche per questo settore, la possibilità di effetti favorevoli, con scarso rischio emorragico.

Bibliografia

- 1) The Medical Research Council's General Practice Research Thrombosis Randomized Trial of Thrombosis prevention trial of low intensity oral anticoagulation with warfarin and low dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *Lancet* 1998;353:233-241.
- 2) Collaborative Group of the Primary Prevention Project (PPP). Low dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. *Lancet* 2001;357:89-95.
- 3) Lewis Jr HD, Davis JV, Archibald DG, et al. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 1983;309:396-403.
- 4) Cairns JA, Gent M, Singer I, et al. Aspirin, sulfinpyrazone or both in unstable angina. *N Engl J Med* 1985;313:1369-1375.
- 5) Theroux P, Waters D, Qiu S, et al. Aspirin versus heparin to prevent myocardial infarction during the acute phase of unstable angina. *Circulation* 1993;88:2045-2048.
- 6) The RISC group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet* 1990;336:827-830.
- 7) Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various category of patients. *BMJ* 1994;308:81-106.
- 8) Barnathan E, Schwartz J, Taylor L, et al. Aspirin and dipyridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation* 1987;76:125-134.
- 9) Petersen P, Boysen G, Godtfredsen J, Andersen ED, Andersen B. Placebo controlled, randomised trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complication in atrial fibrillation: the Copenhagen AFASAK study. *Lancet* 1989;1:175-9.
- 10) The Boston Area Anticoagulation Trial for Atrial Fibrillation: the Copenhagen. The effect low dose warfarin on the risk of stroke in patients with non-rheumatic atrial fibrillation. *N Engl J Med* 1990;323:1505-1511.
- 11) Ezekowitz MD, Bridgers SL, James KE, et al. for the Veterans Affairs Stroke Prevention in Nonrheumatic Atrial Fibrillation Investigators. Warfarin in the prevention of stroke associated with nonrheumatic atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 1992;327:1406-1412.

- 12) Atrial Fibrillation Investigators. Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation. Analysis of pooled data from five randomised controlled trials. *Arch Intern Med* 1994;154:1449-1457.
- 13) The European Atrial Fibrillation Trial Study Group. Secondary prevention in non-rheumatic atrial fibrillation after transient ischaemic attack or minor stroke. *Lancet* 1993;342:1255-1262.
- 14) The EAFT (European in Atrial Fibrillation) Study Group. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with non-rheumatic atrial fibrillation and recent cerebral ischemia. *N Engl J Med* 1995;333:5-10.
- 15) Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European Stroke Prevention Study 2: dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neuro Sci* 1996;143:1-13.
- 16) Ezekowitz M, Hart B, James K, Singer D, Koudstaal P, Kistler P, Kronmal R, McBride R, Petersen P. The efficacy of aspirin in patients with atrial fibrillation: analysis of pooled data from 3 randomized trials. *Arch Intern Med* 1997;157:1237-1240.
- 17) Benavente O, Hrat R, Laupacis A, et al. Antiplatelet therapy for preventing stroke in patients with non valvular transient ischemic attacks. *Cochrane Database Syst Rev*; 2: CD001925.
- 18) Kalman JM, Tonkin AM. Atrial fibrillation: epidemiology and risk and the prevention of stroke. *PACE* 1992;15:1332-46.
- 19) Cairns JA, Connolly SJ. Nonrheumatic atrial fibrillation. Risk of stroke and role of antithrombotic therapy. *Circulation* 1991;84:469-81.
- 20) Dai trial clinici alla pratica clinica.
- 21) Morocutti C, Amabile G, Fattaposta F, et al, for the SIFA (Studio Italiano sulla Fibrillazione Atriale) Group. Indobufen versus warfarin in the secondary prevention of major vascular events in non-rheumatic atrial fibrillation. *Stroke* 1997;28:1015-1021.
- 22) Masotti M, Tura A, Crexels C, et al. Antiplatelet agents and their effect on complications during or soon after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Int Med Res* 1991;19:414-418.
- 23) Plaza L, Lopez-Bescos L, Martin-Jadraque L, et al. Protective effect of triflusal against acute myocardial infarction in patients with unstable angina: results of a Spanish multicentre trial Grupo de Estudio del Triflusal en la Angina Inestable. *Cardiology* 1993;82:388-392.
- 24) Cruz-Fernandez Jm, Lopez-Bescos L, Garcia-Dorado D, et al. Randomized comparative trial of triflusal and aspirin following in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000;21:457-465.
- 25) Balsano F, Rizzon P, Violi F, et al. Antiplatelet treatment with ticlopidine in unstable angina. *Circulation* 1990; 82: 17-26.
- 26) Veterans Administration Cooperative Study (6), Schomig A, Neumann FJ, Kastrati, A, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996;334:1084-1089.
- 27) Gregorini L, Marco J, Fajadet J, et al. Ticlopidine and aspirin pretreatment reduces coagulation and platelet activation during coronary dilation procedures. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:13-20.

- 28) Hass, W, Easton, J, Adams, H, et al. A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients: Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1989;321;501-507.
- 29) Page, Y, Tardy, B, Zeni, F, et al (1991) Thrombotic thrombocytopenic purpura related to ticlopidine. *Lancet* 1991;337;774-776.
- 30) CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996;348:1329-1339.
- 31) Muller, C, Buttner, H, Petersen, J, et al A randomized comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after the placement of coronary-artery stents. *Circulation* 2000;101:590-593.
- 32) Klein, LW, Calvin, JE Use of clopidogrel in coronary stenting: what was the question? *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1895-1898.
- 33) Taniuchi M, Kurz HI, Lasala JM. Randomized comparison of ticlopidine and clopidogrel after intracoronary stent implantation in a broad patient population. *Circulation* 2001;104:539-43.
- 34) Steinhubl S, Lauer M, Mukerjee D, et al. Pretreatment with ticlopidine reduces non-Q-wave myocardial infarctions following intracoronary stenting [abstract]. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:100A.
- 35) The CURE investigators *N Engl J Med* Aug 2001 (Data on file).
- 36) Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. For the Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001;358:527.
- 37) The EPIC Investigators Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994;330:956-61.
- 38) The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997;336:1689-96.
- 39) The CAPTURE Investigators. Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE study. *Lancet* 1997;349:1429-35.
- 40) The EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. *Lancet* 1998;352:87-92.
- 41) Brener SJ, Barr LA, Burchenal JEB, et al. Provisional stenting improves outcome of primary angioplasty independently of the use of abciximab: the RAPPORT trial. *Circulation* 1998;98:1-22.
- 42) The IMPACT-II Investigators. Randomized placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention IMPACT-II (Integrelin to Minimise Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis II) *Lancet* 1997;349:1422-8.
- 43) RESTORE Investigators. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on

adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1997;96:1445-53.

44) Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998;338:1498-1505.

45) Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;338:1488-1497.

46) The PURSUIT Trial Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa in Unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1998;339:436-44.

47) The PARAGON Investigators. Platelet IIb/IIIa Antagonism for the Reduction of Acute coronary syndrome events in a Global Organization Network. International, randomized, controlled trial of lamifiban (a platelet IIb/IIIa inhibitor), heparin, or both in unstable angina. *Circulation* 1998;97:2386-2395.

48) Topol E. TARGET (do Tirofiban And Reo-pro Give similar Efficacy outcomes Trial). *Clin Cardiol* 2001;24(1):85.

Screening di laboratorio della trombofilia genetica: quali test?

Armando Tripodi

Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, Dipartimento di Medicina Interna, Università e Ospedale Maggiore, Milano

Lo screening di laboratorio per la trombofilia genetica sta assumendo aspetti rilevanti, sia per l'importanza sia per l'impegno che questo comporta per il laboratorio. Il numero dei test possibili e conseguentemente il costo dello screening è cresciuto negli ultimi anni in misura tale da suggerire una seria riflessione su ciò che è utile eseguire. Le condizioni ragionevolmente associate a trombofilia ereditaria sono le carenze congenite di antitrombina, proteina C e proteina S, la resistenza alla proteina C attivata (dovuta in massima parte alla mutazione del fattore V Leiden), gli aumentati livelli di fattore VIII, la iperprotrombinemia dovuta alla mutazione della protrombina, e assai meno frequentemente la disfibrinogenemia. L'iperomocisteinemia genetica è un fenomeno molto raro, anche perché la mutazione più frequente, a carico di uno dei componenti della via metabolica dell'omocisteina (la presenza della forma termolabile della MTHFR), non sempre si accompagna ad aumentati livelli di omocisteina plasmatica e non è con certezza associata ad un aumentato rischio trombotico.

In linea generale i test per le indagini di laboratorio dovrebbero essere funzionali alla misura dell'attività. Le misure antigeniche dovrebbero essere usate solo per caratterizzare ulteriormente il difetto funzionale. L'analisi del DNA per l'identificazione delle mutazioni non è sempre strettamente indispensabile. In questa breve rassegna suggerirò i test più idonei sulla base dell'esperienza personale e dei dati della letteratura.

Antitrombina. Si consiglia il metodo funzionale cromogenico in presenza di eparina. Tale metodo (cofattore eparinico) è semplice ed è capace di depistare tutte le carenze congenite di interesse clinico. L'utilizzo del fattore Xa (invece della trombina) come enzima target, consente una più agevole discriminazione fra i portatori e i non-portatori del difetto.

Proteina C. Si consiglia il metodo funzionale con attivazione della proteina C mediante veleno di rettile (Protac) e rilevazione della proteina C attivata con substrato cromogenico. Il metodo anticoagulante, che in teoria sarebbe più idoneo a depistare tutti i difetti di interesse clinico, è

soggetto a molti artefatti e l'interpretazione dei risultati non è sempre agevole.

Proteina S. Si consiglia la misura dell'antigene della proteina S libera. È questa una eccezione alla regola generale, condizionata dal fatto che i metodi funzionali attualmente proposti sono scarsamente specifici e soggetti a molti artefatti.

Resistenza alla proteina C attivata. Si consiglia il metodo APTT-derivato proposto originariamente da Dahlback, con e senza prediluizione del plasma test in plasma carente di fattore V. L'uso combinato dei due test consente di depistare le resistenze acquisite (metodo senza prediluizione) e le resistenze dovute alla mutazione Leiden, per la quale il metodo con prediluizione è specifico al 100%. I casi positivi e quelli dubbi dovranno poi essere sottoposti alla analisi del DNA per la ricerca della mutazione.

Iperprotrombinemia. La misura della protrombina nel plasma non è da sola capace di identificare tutti i soggetti portatori della mutazione nel gene della protrombina. Pertanto, in questo caso l'analisi del DNA sembra essere la più appropriata.

Livelli alti di fattore VIII. L'attività funzionale coagulante (o l'antigene), è il modo più appropriato per la misura del fattore VIII.

Disfibrinogenemia. Anche se l'esecuzione del tempo di trombina (unitamente al tempo di reptilase) consente di depistare quasi tutti i casi, si consiglia di cercare la disfibrinogenemia misurando direttamente il fibrinogeno con metodo funzionale (secondo Clauss) e di completare l'indagine nei casi positivi (ridotti livelli di fibrinogeno) con la determinazione del fibrinogeno antigenico. Le disfibrinogenemie sono caratterizzate da una discrepanza fra i livelli funzionali (ridotti) e i livelli antigenici (normali, o aumentati).

Iperomocisteinemia. La ricerca delle mutazioni non sembra essere indispensabile, visto che l'espressione fenotipica (l'iperomocisteinemia) è di per se associata ad un aumentato rischio trombotico. In particolare, la ricerca della mutazione MTHFR è inutile e dannosa. Inutile, perchè la sua frequenza nella popolazione generale è molto elevata e non è stata associata con certezza ad un aumentato rischio trombotico. Dannosa, perchè l'identificazione dei (molti) soggetti portatori non si traduce in alcun beneficio per il singolo paziente, anzi lo espone ad una situazione ansiogena senza un giustificato motivo. Per lo screening si consiglia quindi la misura dell'omocisteina plasmatica ed eventualmente della misura dei folati. Per la misura dell'omocisteina, il metodo HPLC, finora scelta obbligata per la mancanza di altri metodi, può essere sostituito vantaggiosamente con nuovi metodi immunochimici (fluorescence polarization immunoassay, FPIA). Il test dopo carico con metionina, anche se da taluni non è considerato utile, consente di aumentare la resa diagnostica.

Test globali. Una possibilità, finora solo parzialmente esplorata, potrebbe essere l'esecuzione dello screening con uno o più test globali, capaci di identificare i soggetti portatori di ipercoagulabilità generica e identificare poi gli eventuali difetti specifici mediante test più mirati. Questo modo di procedere consentirebbe un risparmio di mezzi e risorse economiche. Fra i test globali finora proposti, due meritano di essere menzionati. Il test globale per il sistema proteina C ed il test per la misura del potenziale di trombina. Il primo prevede l'attivazione della proteina C endogena mediante veleno di rettile (Protac) e la determinazione della "resistenza" con metodo APTT-derivato. In teoria questo metodo dovrebbe identificare le carenze isolate di proteina C ed S e la resistenza alla proteina C attivata dovuta (e non) al fattore V Leiden. Numerosi studi della letteratura documentano una scarsa resa diagnostica del test, in quanto esso non riesce ad identificare una buona metà dei carenti di proteina S. Il secondo sarebbe in teoria un test ancora più "globale" del precedente, perché prevede l'attivazione della coagulazione in vitro mediante un agente scatenante (trigger) quale il fattore tissutale e il monitoraggio della trombina generata. Questo test è ancora in fase di sviluppo e non esistono ancora prove certe a favore o a sfavore del suo utilizzo nello studio della trombofilia.

Bibliografia

1) Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. Clin Chem 2001;47:1597-606.

Screening di laboratorio della trombofilia genetica: in quali pazienti?

Rosanna Abbate

Dip. Area Critica Medico Chirurgica, Università di Firenze, Centro di Riferimento Regionale per la Trombosi, Az. Osp. Careggi

L'enorme sviluppo delle conoscenze e l'ampia diffusione delle indagini genetiche nella patologia cardiovascolare hanno sollevato ed alimentato il dibattito sull'opportunità dell'uso dei test genetici per trombofilia nell'applicazione clinica.

In questo ambito il risultato dell'indagine genetica non è applicabile alla diagnosi di malattie ma piuttosto alla predizione del rischio-malattia; infatti l'alterazione in un gene associato a trombofilia rappresenta **uno dei possibili fattori** implicati nella comparsa della manifestazione clinica ed evidenzia quindi **solo** una **predisposizione** alla malattia. I test consentono infatti l'individuazione di genotipi che non sono causa di malattia di per sé stessi, ma comportano una suscettibilità a sviluppare una patologia trombotica, quando il soggetto si trovi esposto a fattori ambientali favorevoli.

In linea generale il risultato del test genetico, per essere di utilità clinica, dovrebbe consentire di ridurre morbilità e/o mortalità qualora siano disponibili forme di prevenzione secondaria o adeguate terapie, ma spesso la disponibilità del test non si accompagna ad una migliore capacità di gestione clinica. Tuttavia, anche in questi casi, la disponibilità di un test genetico potrebbe per l'individuo a rischio fornire informazioni utili nell'effettuare scelte su alcuni importanti aspetti della vita.

Nell'ambito della **patologia cardiovascolare** di possibile rilievo clinico è la determinazione di alterazioni del metabolismo dell'omocisteina, in cui è chiaramente dimostrata l'interazione fra il genotipo e le abitudini di vita (dieta, fumo etc) e per le quali è prevedibile ottenere in tempi rapidi, da studi clinici in corso, indicazioni per interventi terapeutici. Bisogna però tener presente che in questo caso è il fenotipo, iperomocisteinemia basale e dopo carico di metionina, piuttosto che il genotipo (ricerca della mutazione C677T nel gene che codifica la metilentetraidrofolatoreduttasi o di altri geni per enzimi coinvolti nella stessa via metabolica) che può essere utile considerare in soggetti con malattia coronarica o eventi cerebrali ischemici comparsi in età giovanile (8).

Nei **pazienti con progressiva malattia tromboembolica venosa** la valutazione del rischio del ripetersi di nuovi eventi trombotici venosi in rapporto alla condizione di trombofilia genetica è stata affrontata in numerosi studi. Da tempo è noto il rischio di ricorrenze degli eventi trombotici venosi associato a deficit di antitrombina e, in accordo alla Sixth American College Chest Physicians Consensus Conference on Antithrombotic Therapy (9), si raccomanda (grado di raccomandazione 1C) un trattamento anticoagulante orale di almeno 12 mesi dopo un primo evento. Per i polimorfismi genetici di trombofilia a prevalenza più alta nella popolazione generale, alcuni studi prospettici riportano un aumento del rischio di oltre due volte nei pazienti con mutazione del gene della protrombina o del fattore V (14,16,19,20), mentre altri studi documentano un aumento del rischio di trombosi venose ricorrenti solo quando le due mutazioni sono associate (3-5,11).

I risultati di questi studi indicano la possibilità che la documentazione di trombofilia genetica in pazienti con un pregresso evento trombotico venoso non associato a interventi chirurgici, traumi, immobilizzazione, neoplasie o deficit di antitrombina, potrà consentire una valutazione più precisa per la scelta della durata della terapia anticoagulante orale adattata al rischio del paziente.

Quando saranno disponibili i risultati di studi ad hoc, quale lo studio PREVENT (17), che valutino il rapporto rischio beneficio della terapia anticoagulante orale a lungo termine nei pazienti con o senza trombofilia ereditaria, potremo avere una indicazione della necessità dello screening genetico per la scelta della terapia a lungo termine. Al momento attuale, tuttavia, l'utilizzazione di questi test non è vincolante per la decisione terapeutica.

Per l'indicazione della profilassi antitrombotica durante la gravidanza nelle donne con pregresso evento trombotico, lo screening genetico della trombofilia **può** dare indicazioni, poiché il rischio assoluto di ricorrenza di eventi tromboembolici in donne senza trombofilia e in quelle in cui l'evento trombotico venoso era associato a fattori di rischio transitori (2) è basso; l'indicazione alla profilassi antitrombotica ante partum è raccomandata solo per pazienti con deficit di antitrombina (6) (grado 1C) ed è lasciata alla scelta del medico e viene limitata a 6 settimane post partum per le altre condizioni. Numerosi studi hanno documentato una associazione fra condizioni di trombofilia

congenita e **gravidanze patologiche**, morti fetali, poliabortività, preeclampsia, ritardo di crescita intrauterino, ipertensione gestazionale (7,10,12,13,15), ma è disponibile un solo studio di intervento che riporta una netta riduzione delle gravidanze ad esito negativo in donne con storia di gravidanze patologiche ripetute affette da trombofilia congenita trattate con eparina a basso peso molecolare (1). A questo proposito la Sixth American College Chest Physicians Consensus Conference on Antithrombotic Therapy **prospetta**, senza raccomandarla, l'applicazione dello screening per trombofilia congenita per le donne con storie di perdite fetali ripetute, almeno una perdita al secondo trimestre o storia di morte intrauterina, preeclampsia o ridotta crescita fetale. Lo screening dei polimorfismi genetici in donne con storia di gravidanza patologica non è quindi, al momento, una indicazione **assoluta**.

In una valutazione complessiva dell'uso dei test genetici, al di là di consentire una diagnosi etiopatogenetica più precisa, l'utilità dello screening genetico va considerato anche alla luce dell'eventuale negatività del risultato che non esclude una condizione congenita di una maggiore suscettibilità alla trombosi. Questo è di particolare rilievo, nel momento in cui il risultato negativo viene fornito al paziente, il quale deve essere informato, **prima dell'esecuzione del test**, del suo significato ed al quale deve essere chiarito che l'eventuale negatività non deve implicare una riduzione dell'attenzione al possibile ripetersi di eventi.

In conclusione, al momento attuale, non sono disponibili raccomandazioni basate su evidenze per la **necessità** di documentare la presenza di trombofilia su base genetica come strumento per attuare interventi di prevenzione secondaria diversi da quelli indicati, sulla base di evidenze da studi clinici di intervento randomizzati, per i pazienti con pregresso evento trombotico o patologia correlata. Per alcune condizioni lo screening genetico di trombofilia, se ben interpretato, **può** fornire informazioni utili al medico ed al paziente non solo in senso di approfondimento dei meccanismi responsabili, o meglio co-responsabili, ma di comprensione delle condizioni predisponenti e di guida nelle scelte terapeutiche laddove la mancanza di evidenze lascia al medico la valutazione del trattamento adeguato al paziente. Come indicato nelle **Linee Guida per i Test Genetici del Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie**, l'utilità di un test genetico non può essere valutata con il solo criterio delle sue implicazioni mediche, ma devono essere anche considerate attentamente le implicazioni più ampie che coinvolgono le scelte e le abitudini di vita del paziente, il quale dovrà perciò ricevere informazioni complete sul significato delle indagini ed avere lo spazio per un'autonoma valutazione.

I test genetici in generale sono fonte di complessi problemi psicologici, sociali ed etici. La crescente consapevolezza delle loro implicazioni ha concorso a sviluppare un ampio dibattito in campo bioetico a livello nazionale ed internazionale circa le finalità, i mezzi e le modalità di uso dei test genetici.

I soggetti che hanno ricevuto il risultato di un test genetico possono andare incontro a disagio psicologico di vario genere. Frequente è ad esempio l'autosvalutazione in caso di risultato sfavorevole in quanto il soggetto si percepisce come "imperfetto" e/o "dannoso" nei confronti della prole. In conseguenza dei risultati dei test genetici possono inoltre verificarsi discriminazioni sociali, difficoltà di inserimento nel lavoro o nella vita di relazione o nell'erogazione di beni o servizi (ad es. assicurazioni).

Infine i risultati di un test genetico possono rivelare informazioni importanti per la salute futura di parenti i quali potrebbero non voler sapere o far sapere tali informazioni, ponendo così numerosi problemi etici e di riservatezza. Tutte le problematiche di questo tipo richiedono, sia nell'offerta di un test genetico che nella comunicazione del risultato, quelle particolari procedure che sono generalmente comprese nella consulenza genetica che deve essere parte integrante dei test genetici. Se si considera in particolare la rilevanza che, sia nel campo clinico che nella mente del cittadino è rivestita dai problemi connessi con la trombosi, che anche nei non esperti si associa al rischio di grave infermità, le considerazioni di cui sopra possono e devono rendere assai prudenti non solo nella scelta dei test genetici da eseguire, ma soprattutto nella valutazione e nella comunicazione dei loro risultati.

Bibliografia

- 1) Brenner B, Hoffman R, Blumenfeld Z, Weiner Z, Younis JS. Gestational Outcome in Thrombophilic Women with Recurrent Pregnancy Loss Treated by Enoxaparin. *Thromb Haemostas* 2000;83:693-7.
- 2) Brill-Edwards PB, Ginsberg JS, Gent M, Hirsh J, Burrows R, Kearon C, Geerts W, Kovacs M, Weitz JI, Robinson SK, Whittom R, Couture G. Safety of withholding heparin in pregnant woman with a history of venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000;343:1439-44.
- 3) De Stefano V, Martinelli I, Mannucci P et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both Factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999;341:801-6.
- 4) Eichinger S, Minar E, Hirschl M et al. The risk of early recurrent venous thromboembolism after oral anticoagulant therapy in patients with the G20210A transition in the prothrombin gene. *Thromb Haemostas* 1999;81:14-7.
- 5) Eichinger S, Pabinger I, Stumpflen A et al. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with and without Factor V Leiden. *Thromb Haemostas* 1997;77:624-8.
- 6) Ginsberg JS, Greer I, Hirsh J. Use of Antithrombotic Agents During Pregnancy. *CHEST* 2001;119:122S-131S.
- 7) Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, d'Addetta M, Cappucci G, Vecchione G, Sciannone N, Pavone G, Di Minno G. Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemostas* 1997;77:822-4.
- 8) Grundy sM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. *Circulation* 1999;100:1481-92.
- 9) Hyers TM, Agnelli G, Hull Russell D, Morris Timothy A, Samama M, Tapson V, Weg JG. Antithrombotic Teraphy for Venous Thromboembolic Disease. *CHEST* 2001;119:176S-193S.
- 10) Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:9-13.
- 11) Lindmarker P, Schulman S, Sten-Linder M, Wiman B, Egberg N, Johnsson H and the DURAC Trial Study Group. The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and noncarriers of the G1691A allele in the coagulation Factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene. *Thromb Haemostas* 1999;81:684-9.
- 12) Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa MV, Bozzo M, Mannucci PM. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med* 2000;343:1015-8.
- 13) Mello G, Parretti E, Martini E, Mecacci F, La Torre P, Cioni R, Lucchetti R, Fedi S, Gori AM, Pepe G, Prisco D, Abbate R. Usefulness of Screening for congenital or Acquired Hemostatic Abnormalities in Women with Previous Complicated Pregnancies. *Haemostasis* 1999;29:197-201.
- 14) Miles JS, Miletich JP, Goldhaber SZ, Hennekens CH, Ridker PM. G20210A mutation in the prothrombin gene and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:215-8.
- 15) Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briet E, Berntorp E, Conard J, Fontcuberta J, Makris M,

Mariani G, Noteboom W, Pabinger I, Legnani C, Scharrer I, Schulman S, van der Meer FJ. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996;348:913-6.

16) Ridker PM, Miletich J, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Lindpaintner K, Kennekens CH. Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous thromboembolism. *Circulation* 1995;92:2800-02.

17) Ridker PM for the PREVENT Investigators. Long-term, low-dose warfarin among venous thrombosis patients with and without Factor V Leiden mutation: rationale and design for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism (PREVENT) trial. *Vasc Med* 1998;3:67-72.

18) Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001;344:1222-31.

19) Simioni P, Prandoni P, Lensing AW et al. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with as Arg506 to Gln mutation in the gene for Factor V (Factor V Leiden). *N Engl J Med* 1997;336:339-403.

20) Simioni P, Prandoni P, Lensing AW, Manfrin D, Tormene D, Gavasso S, Girolami B, Sardella C, Prins M, Girolami A. Risk of subsequent venous thromboembolic complications in carriers of the prothrombin or the factor V gene mutation with a first episode of deep-vein thrombosis. *Blood* 2000;96:3329-3333.

Utilità dello screening di trombofilia in individui asintomatici: quando?

Ida Martinelli

Centro Emofilia e Trombosi "A. Bianchi Bonomi", Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

Le cause di trombofilia ereditaria note a tutt'oggi sono i deficit degli anticoagulanti naturali antitrombina, proteina C e proteina S, note il primo dagli anni '60 e gli altri dagli anni '80, e le mutazioni a carico del gene che codifica per il fattore V della coagulazione (fattore V Leiden) e per il fattore II o protrombina (protrombina G20210A) (1). La scoperta di questi ultimi due determinanti genetici risale all'ultimo decennio ed ha notevolmente ampliato le conoscenze eziopatogenetiche della malattia tromboembolica. Il loro riscontro è frequente nelle popolazioni di origine caucasica. Infatti, nei pazienti con tromboembolismo venoso la prevalenza del fattore V Leiden è del 15-20% e quella della mutazione G20210A della protrombina di circa il 10%, mentre nella popolazione generale ciascuna delle due mutazioni è presente in circa il 3% (1). Questa insolita elevata frequenza (i deficit degli anticoagulanti naturali sono presenti in meno dell'1% della popolazione generale) ha portato ad un largo utilizzo della metodica di ricerca delle due mutazioni, che è una semplice tecnica di amplificazione del DNA tramite PCR (Polymerase Chain Reaction), disponibile in molti laboratori. Spesso la ricerca delle mutazioni viene richiesta non solo a pazienti con tromboembolismo venoso, ma anche a molti individui che non hanno mai avuto eventi trombotici. Perché? Il motivo più frequente è la richiesta dei test da parte degli specialisti ginecologi prima di prescrivere la pillola estroprogestinica anticoncezionale. È noto da alcuni decenni che la pillola aumenta il rischio di tromboembolismo venoso (2); il primo caso riportato in letteratura di embolia polmonare insorto durante l'uso della pillola risale al 1961 (3). Oggi, non solo si conosce l'entità del rischio relativo (aumentato di circa 5 volte in donne che usano la pillola a confronto di quelle che non la usano) (4), ma si sa anche che le pillole di ultima e cioè di terza generazione, quelle contenenti il più basso dosaggio di estrogeni, inducono un rischio trombotico maggiore rispetto a quelle più vecchie di seconda generazione (5). Questa differenza è da imputare al tipo di progestinico del prodotto. Sta di fatto che, prima di prescrivere a tappeto la ricerca delle due mutazioni in queste donne, andrebbe dimostrato un reale beneficio in termini di prevenzione della malattia e in termini di costi. È necessario affrontare il problema del tromboembolismo venoso in termini assoluti; si conosce l'incidenza della malattia, che è stimata 1 caso ogni 10.000 donne in età fertile; si conosce che l'uso della pillola aumenta il rischio di tromboembolismo venoso

di circa 5 volte, la presenza del fattore V Leiden di circa 7 volte, e l'associazione di pillola e fattore V Leiden di 20-30 volte (4,6). Si calcola quindi facilmente che l'incidenza della malattia diventa di 5 casi ogni 10.000 donne che assumono la pillola ma non hanno il fattore V Leiden, e di 3 casi ogni 1.000 donne che assumono la pillola e hanno il fattore V Leiden in forma eterozigote. Affrontando il problema a partire dalla frequenza del fattore V Leiden nella popolazione generale, è stato osservato che per prevenire un episodio di tromboembolismo venoso dovremmo togliere la pillola a 400 donne con fattore V Leiden; per trovare queste 400 donne dovremmo testarne almeno 10.000 (7). Da questi semplici calcoli epidemiologici si evince che, valutando il rischio relativo ed il rischio assoluto di malattia che si associa all'assunzione della pillola e all'essere portatrice di una comune anomalia trombofilica, lo screening pre-pillola non è di alcun beneficio perché i) non ci consente di sconsigliare l'uso della pillola in quelle positive ii) i costi non sono supportati dai benefici e iii) si rischia di creare falsi timori al momento dell'informazione dello stato di portatrice. Se valga la pena riservare lo screening pre-pillola a donne che hanno una storia familiare positiva per tromboembolismo venoso è materia di discussione molto attuale (8,9).

Un'altra categoria di individui a cui viene riservato comunemente lo screening di trombofilia nonostante l'assenza di sintomi tromboembolici, è quella dei famigliari consanguinei di pazienti con trombosi risultati portatori di una anomalia trombofilica. Dal momento che le anomalie trombofiliche ereditarie sono trasmesse come carattere autosomico dominante, la probabilità di riscontrare individui portatori nell'ambito dei famigliari è del 50% (10). L'indicazione allo screening nei famigliari vale a partire dall'età adolescenziale e consente di attuare una profilassi primaria del tromboembolismo venoso nelle situazioni ad alto rischio, quali gli interventi chirurgici, le fratture agli arti inferiori, le condizioni di immobilizzazione prolungata e, nelle donne, il puerperio. Inoltre consente di attuare un adeguato counseling alle donne che volessero o necessitassero assumere terapie estroprogestiniche.

Bibliografia

- 1) Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:395-403.
- 2) Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:112-23.
- 3) Jordan WM. Pulmonary embolism. *Lancet* 1961;i:1146-7.
- 4) Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Achavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1999;19:700-3.
- 5) Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Helmerhorst FR, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995;346:1593-6.
- 6) Vandenbroucke JP, Koster T, Briët E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994;344:1453-7.
- 7) Vandenbroucke JP, van der Meer FJM, Helmerhorst FM, Rosendaal FR. Factor V Leiden: should we screen oral contraceptive users and pregnant women? *Br Med J* 1996;313:1127-30.
- 8) Cosmi B, Legnani C, Bernardi F, Coccheri S, Palareti G. Value of family history in identifying women at risk of venous thromboembolism during oral contraception: observational study. *Br Med J* 2001;322:1024-5.
- 9) Vandenbroucke JP, van der Meer FJM, Helmerhorst FM, Rosendaal FR. Family history and risk

of venous thromboembolism with oral contraception. *Br Med J* 2001;323:752.

10) Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F, Paciaroni K, Leone G, Faioni E. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998;92:2353-8.

Thrombophilia as a complex disease: results from the GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia) project

José Manuel Soria, PhD

Unitat d'Hemostasia i Trombosi, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Venous thrombosis is a multifactorial disease. Multiple interactions between genetic and environmental factors contribute to the development of the disease. Presently, we know of six or seven genetic risk factors for venous thrombosis (1). However, together these genetic defects can explain the clustering of thrombotic events in only a small subset of families with thrombophilia (2). Moreover, it is unlikely that these known mutations, with their comparatively low frequencies, constitute the primary genetic influences on risk of common late-onset thrombosis. As to the identification of new genetic risk factor for thrombosis, we seem to have arrived at the end of a practicable road with the classical approach of thrombophilia. We thought that the identification of new genetic risk factors for thrombosis, as a complex disease, needs special methods of Genetic Epidemiology. That is Linkage Analysis in extended pedigrees.

To reach this goal, The GAIT Project was born in 1995 in collaboration with the Southwest Foundation for Biomedical Research (San Antonio, TX). This project included 397 individuals from 21 Spanish families. Information about the design of this project has been previously reported (3-5).

From the plasma samples a total of 43 quantitative phenotypes were measured, and from the DNA samples a total of 500 genetic makers were genotyped, including Candidate Genes and Full Genome Scan approaches. The statistical genetic analysis has been performed using a variance component model included in the software package SOLAR (6).

Our results clearly demonstrate the importance of genetic factors in determining variation in hemostasis-related phenotypes that are components of the coagulation and fibrinolysis pathways and which have been implicated in risk for thrombosis. For most of the traits, genes appear to be the largest identifiable determinant of quantitative variation (5). Most importantly, over 60% of the variation in susceptibility to common thrombosis is attributable to genetic factors and several quantitative risk factors exhibited significant genetic correlation with thrombosis, indicating that some of the genes that influence quantitative variation in these physiological correlates also influence the risk of thrombosis (4). Traits that exhibited significant genetic correlations with thrombosis included levels of several coagulation factors (factors VII, VIII, IX, XI, XII, and vWF), t-PA, homocysteine, and the APC ratio (4). The presence of such strong genetic effects suggests that it will be possible to localize previously unknown genes that influence quantitative variation in these hemostasis-related phenotypes which may contribute to risk for thrombosis. In this way, whole genome approaches to localizing and characterizing QTLs (Quantitative Trait Locus) that underlie thrombosis susceptibility will be feasible.

To our knowledge, our study represents the first genome-wide scan undertaken to identify regions containing genes influencing variation in susceptibility to thrombotic disease and its intermediate phenotypes. Subjects were genotyped for an autosomal genome-wide scan with 363 highly informative DNA markers, plus an extra number of DNA markers close to or near to candidate genes. This strategy gave us a genetic map with an average of 9.5 cM resolution. Multipoint variance-component methods (1) were used to assess linkage between autosomal markers and quantitative hemostatic phenotypes, including the liability to thrombosis disease.

Our results showed that the G20210A mutation is functional in relation to prothrombin plasma levels and the risk of thrombosis (3), and the polymorphism responsible for the ABO blood group is functional in relation to plasma levels of factor VIII and factor von Willebrand (7).

Moreover, our analyses revealed two regions, one on chromosomes 5 and another on chromosome 10 (LOD scores of 4.73 and 3.53, respectively), showing strong evidence of linkage with quantitative levels of plasma FXII, an important intermediate phenotype correlated with thrombosis (8). In the region of linkage signal on chromosome 10 there are no obvious candidate hemostasis-related genes. In contrast, in this study we have documented the close linkage between a QTL influencing FXII levels and the FXII gene (specifically the 46C/T FXII DNA variant). The observed LOD score (10.21), when we added this genetic variant as a marker, is highly significant and provides strong evidence for the existence of a QTL influencing FXII activity (8). In addition, a region on chromosome 1q32 showed strong evidence of linkage with free PS levels (LOD = 4.07) (9). This region contains two positional candidate genes, the complement component 4-binding protein alpha and beta chains, which encode the principal binding protein for PS. Another interesting result from our genome-wide screen suggests that multiple loci are influencing the normal variation in APCR, and FV DNA variants, including FVL mutation or HR2 haplotype polymorphisms, play a relatively minor role in this normal variation in APCR (10). The current results confirm the valuable potential of this approach as a basic tool for mapping the genes of complex diseases.

References

- 1) Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U (1996). Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 76:651-62.
- 2) Bertina RM (2001). Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 86:92-103.
- 3) Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borrell M, Mateo J, Slifer S, Stone W, Blangero J and Fontcuberta J. Linkage analysis demonstrated that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000;95:2780-2785.
- 4) Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: The GAIT study. *Am J Hum Genet* 2000;67:1452-1459.
- 5) Souto JC, Almasy L, Borrell M, Garí M, Martínez E, Mateo J, Stone WH, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in spanish families. *Circulation* 2000;101:1546-1551.
- 6) Almasy L, Blangero JC (1998). Multipoint quantitative trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet* 62:1198-1211.
- 7) Souto JC, Almasy L, Muñoz-Díaz E, Soria JM, Borrell M, Bayén L, Mateo J, Madoz P, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J (2000). Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand Factor, Factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2024-2028.
- 8) Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Faure A, Mateo J, Borrell M, Stone WH, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J (2001). Two quantitative trait loci influencing human factor XII levels and susceptibility to thrombosis: genome-wide linkage results from the GAIT project. *Thromb Haemost Supp Abst* SY124.
- 9) Almasy L, Soria JM, Souto JC, Coll I, Mateo J, Bacq D, Faure A, Borrell M, Sala N, Stone WH, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J (2001). A genome scan reveals a gene influencing free plasma Protein S on human chromosome 1q: results from the GAIT project. *Thromb Haemost Supp Abst* OC163.

10) Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Faure A, Mateo J, Borrell M, Stone WH, Lathrop M., Fontcuberta J, Blangero J (2001). Evidence that multiple genes influence activated Protein C resistance phenotype: genome-wide linkage analysis from GAIT project. *Thromb Haemost Supp Abst* OC973.

Monitoraggio della terapia eparinica in cardiocirurgia

Domenico Prisco e Rita Paniccia

Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica, Sezione di Clinica Medica Generale e Cliniche Specialistiche, Università degli Studi di Firenze

Nei pazienti cardiocirurgici è necessario eseguire un appropriato monitoraggio del grado di anticoagulazione durante terapia eparinica e conseguire una rapida informazione del risultato ottenuto.

Il tempo di coagulazione attivata (ACT), già descritto da Hattersley nel 1966 (1), è stato il primo sistema "bedside" di valutazione della coagulazione. L'ACT misura il tempo che il sangue intero impiega a coagulare dopo attivazione da contatto con celite (sostanza ottenuta da alghe diatomee fossili) mediante strumentazione automatizzata portatile ed è il sistema più comunemente utilizzato per monitorizzare la terapia eparinica sia in cardiocirurgia che durante rivascolarizzazione percutanea coronaria.

A causa della complessità della procedura e della durata dell'intervento, nei pazienti sottoposti a bypass cardiopolmonare (CPB) si possono evidenziare alterazioni marcate del sistema emostatico, quali attivazione e consumo dei fattori coagulativi (2), una iperfibrinolisi primaria, un consumo piastrinico e una disfunzione piastrinica transitoria (3). Inoltre, già prima dell'intervento il paziente presenta spesso alterazioni dell'emostasi dovute alla patologia di fondo e/o ad eventuali trattamenti farmacologici (anticoagulanti orali, eparina a basso peso molecolare, antiaggreganti piastrinici, antinfiammatori).

Alterazioni Emostatiche durante CPB

I principali fattori che determinano alterazioni dell'emostasi durante CPB sono:

- 1) L'impiego della circolazione extracorporea (CEC), che indipendentemente dal fatto che richiede un'anticoagulazione con eparina, di per sé innesca un'attivazione da contatto e una risposta infiammatoria sistemica (4).
- 2) La somministrazione di elevate quantità di eparina durante la CEC e di solfato di protamina alla fine dell'intervento che interferiscono con la coagulazione, la fibrinolisi e la funzionalità piastrinica (5,6).
- 3) L'attivazione delle varie componenti del sistema emostatico indotta dall'intervento chirurgico, che porta ad un'ulteriore consumo dei fattori coagulativi e delle piastrine (7).
- 4) L'ipotermia indotta durante l'intervento che attiva la fibrinolisi indotta e causa disfunzione piastrinica (8,9).
- 5) L'emodiluzione determinata dalla somministrazione di cristalloidi sia nei circuiti della CEC che come componente della soluzione cardioplegica, che può essere causa almeno in parte del consumo dei fattori coagulativi e del diminuito numero delle piastrine (2,10).

È necessaria dunque un'adeguata eparinizzazione per impedire l'occlusione del circuito extracorporeo ed eventi tromboembolici intraoperatori. Poiché durante l'intervento chirurgico il sistema emostatico subisce numerose modificazioni, risulta necessario monitorizzare l'effetto dell'eparina in tempi ravvicinati. Comunque, il monitoraggio della coagulazione prosegue anche dopo la neutralizzazione dell'eparina con protamina sia nell'immediato periodo postchirurgico che a distanza di ore per verificare che si sia ristabilita un'appropriata coagulabilità (11).

D'altra parte nell'immediato periodo postoperatorio la trombocitopenia e la disfunzione piastrinica transitoria, indotte sia dalla eparina che dalla ipotermia e dalla attivazione da contatto con le pareti dei circuiti della CEC, risultando in una attivazione/degranolazione/desensibilizzazione delle piastrine, possono giocare un ruolo importante nel rischio emorragico. Sebbene nel passato lo studio della funzione piastrinica con le metodiche classiche non si sia dimostrato di utilità nella

gestione di questi pazienti, recentemente sono stati proposti nuovi sistemi al momento in valutazione.

Attualmente sono in rapida evoluzione le strategie e le diverse strumentazioni per ottimizzare la somministrazione di eparina e sono stati introdotti nuovi sistemi automatizzati per la misura dell'ACT. Inoltre stanno emergendo anche altre strumentazioni "bedside" che valutano la viscoelasticità del sangue e/o la funzionalità piastrinica, che permettono di ottenere informazioni anche sullo stato funzionale delle piastrine e della fibrinolisi.

Principali Sistemi Automatizzati che valutano l'ACT

1) La serie Hemochron (International Technidyne - ITC) è costituita due tipi di strumento: un primo tipo che utilizza provette (Hemochron 401/801/8000), un secondo che impiega cartucce (Hemochron Junior II). In entrambi i casi il sangue viene attivato da celite. Nel primo caso le provette, contenenti un magnete, vengono fatte ruotare in un alloggiamento attorno al quale viene creato un campo magnetico: quando il sangue coagula, il magnete si blocca e questo viene rilevato da un sensore. Nei più recenti strumenti che impiegano cartucce invece il sangue viene fatto scorrere in capillari e il blocco di tale scorrimento, espressione dell'avvenuta formazione del coagulo, viene registrato otticamente.

2) Lo strumento i-STAT (ABBOTT) è un apparecchio "bedside" (inizialmente messo a punto come emogas-analizzatore), che esegue un ACT impiegando cartucce con celite. La sua specificità consiste nel metodo di rilevazione del tempo di coagulazione. Infatti il sistema utilizza un metodo in cui l'endpoint viene indicato dalla modificazione, da parte della trombina che si forma nel campione, di un substrato sintetico, il cui prodotto di conversione viene rivelato elettrochimicamente.

3) Sia l'Automated Coagulation Timer II (ACT II) che il sistema Hepcon Hemostasis Management System (HMS) (Medtronic Hemotec) sono apparecchi che eseguono un ACT modificato, poiché utilizzano come attivatore il caolino, ma la rivelazione foto-ottica del rallentamento del sangue aspirato nei capillari è essenzialmente simile a quella dell'Hemochron Junior II.

4) L'Heparin Management Test (HMT) eseguito con strumentazione TAS (Thrombolytic Assessment System - Cardiovascular Diagnostic) utilizza cartucce con particelle paramagnetiche di ferro che si risospendono una volta depositata una goccia di sangue: queste particelle vengono fatte oscillare da un campo elettrico, ma nel momento in cui il sangue coagula queste cessano di oscillare. Un sistema ottico rileva la perdita di movimento e segnala il tempo impiegato per la formazione del coagulo.

5) Il CoaguCheck Pro (ROCHE), inizialmente messo a punto solo per la valutazione del PT e dell'aPTT, è un sistema che recentemente è stato modificato per eseguire anche l'ACT utilizzando cartucce già predisposte. Un detector ottico registra il passaggio di un raggio laser attraverso il sangue non coagulato. Nel momento in cui il sangue coagula il raggio laser viene bloccato e il sistema ottico registra così la formazione del coagulo.

Sistemi Automatizzati che valutano la formazione del coagulo e/o la funzionalità piastrinica .

Esistono strumenti vecchi e nuovi. Il tromboelastografo, ormai da anni abbandonato dai laboratori di emostasi, ha mantenuto un qualche utilizzo in certi ambienti chirurgici (cardiochirurgia, trapianto di fegato, etc.). Gli attuali apparecchi sono computerizzati e più compatti rispetto ai vecchi anche se si basano sullo stesso principio (12,13). Recentemente poi sono state sviluppate nuove metodiche e nuove strumentazioni per lo studio della funzionalità piastrinica (14).

1) Il tromboelastografo (TEG®, Medicell Ltd.) dà una rappresentazione grafica della formazione del coagulo e delle sue lisi. Il sangue posto in cuvetta a 37°C viene fatto oscillare mentre una sonda aghiforme legata ad un filo metallico di torsione viene immersa in esso. La rivelazione meccanica o elettrica registra su carta le modificazioni della torsione che la sonda subisce nel momento in cui il sangue coagula. Fintantoché non avviene nessuna modificazione della viscosità del sangue si registra una linea retta, ma nel momento in cui si creano modificazioni viene registrato il movimento della torsione. Il tromboelastogramma fornisce fundamentalmente 4 parametri: 1) tempo r; 2) tempo K; 3) massima ampiezza (MA) del tracciato; 4) l'angolo α . Questi parametri danno indicazioni sulla funzione dei fattori della coagulazione, dei loro inibitori, delle piastrine e della fibrinolisi.

2) Anche il Sonoclot Analyzer (Sienco Inc) si basa sulla valutazione delle modificazioni della

viscosità del coagulo. Il sangue intero viene inserito in cuvette con celite poste a 37°C e una sonda che vibra a frequenze ultrasoniche viene immersa in questa miscela. Il sistema misura le modificazioni all'impedimento del movimento della sonda dovute alla formazione e alla retrazione del coagulo. Con un unico test si ottiene la misura dell'ACT e viene registrata l'evoluzione del coagulo in un grafico (cosiddetta "signature") dove appare la formazione del gel di fibrina (Clot RATE). Sebbene manchino ancora valutazioni adeguate, questo strumento potrebbe dare da solo tutta una serie di informazioni utili per la gestione di terapie antitrombotiche e la valutazione di eventi emorragici.

3) Il Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100, Dade Behring) valuta la funzione piastrinica nel sangue intero misurando il tempo necessario che il sangue impiega a chiudere una membrana sintetica rivestita di collagene. Il campione di sangue viene cimentato con adrenalina o ADP presenti in cartucce monouso già predisposte, fatto scorrere in un capillare sintetico e infine nei fori della membrana. Le piastrine aderiscono alla membrana, si attivano e aggregano producendo un trombo piastrinico che infine blocca il flusso di sangue. Questo strumento determina il tempo dall'inizio del test fino all'occlusione della membrana. Tale intervallo risulterà più o meno lungo a seconda dell'attività delle piastrine. L'impiego di due cartucce con agonisti diversi consente di distinguere le alterazioni della funzione piastrinica dovute a difetti intrinseci o ad esposizione a farmaci antiplastrinici. L'automazione del test consente un'ottima ripetibilità dei risultati.

Conclusioni

Gli strumenti "bedside", in particolare l'ACT, sono utilizzati nel monitoraggio della terapia eparinica durante CEC e della sua neutralizzazione dopo CPB. L'impiego nei prossimi anni di nuovi strumenti "bedside" in grado di valutare anche il numero e la funzione piastrinica, nonché la fibrinolisi potrà facilitare una somministrazione ottimale e mirata di farmaci ed emocomponenti in pazienti con eccessivo sanguinamento dopo CPB.

Bibliografia

- 1) Hattersley P. Activated coagulation time of whole blood. JAMA 1966;136:436-9.
- 2) Despotis GJ, Santoro SA, Spitznagel E, Kater KM, Cox JL, Barnes P et al. Prospective evaluation and clinical utility of on-site monitoring of coagulation in patients undergoing cardiac operation. J Thorac Cardiovasc Surg 1994;107:271-9.
- 3) Holloway DS, Summari L, Sandesara J, Vagher JP, Alexander HC, Caprini JA. Decreased platelet number and function and increased fibrinolysis contribute to postoperative bleeding in cardiopulmonary bypass patients. Thromb Haemost 1988;59:62-7.
- 4) Wachtfogel YT, Kucich U, Greenplate J, Gluszko P, Abrams W, Weibaum G et al. Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation. Blood 1987;69:324-30.
- 5) Khuri SF, Valeri CR, Loscalzo J, Weinstein MJ, Healy NA, et al. Heparin causes platelet dysfunction and induces fibrinolysis before cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg 1995;60:1008-14.
- 6) Cobel-Gerard RJ, Hassouna HI. Interaction of protamine sulfate with thrombin. Am J Hematol 1983;14:227-33.
- 7) Slaughter TF, LeBleu TH, Douglas JM Jr, Leslie JB, Parker JK, Greenberg CS. Characterization of prothrombin activation during cardiac surgery by hemostatic molecular markers. Anesthesiology 1994;80:520-6.
- 8) Yoshihara H, Yamamoto T, Mihara H. Changes in coagulation and fibrinolysis occurring in dogs during hypothermia. Thromb Res 1985;37:505-12.

9) Valeri CR, Cassidy G, Khuri S et al. Hypothermia-induced reversible platelet dysfunction. *Ann Surg* 1987;204:175-81.

10) Kalter RD, Saul CM, Wetstein L, Soriano C, Reiss RF. Cardiopulmonary bypass. Associated hemostatic abnormalities. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979;77:427-60.

11) Despotis GJ, Joist JH, Goodnough LT. Monitoring of hemostasis in cardiac surgical patients: impact of point-of-care testing on blood loss and transfusion outcomes. *Clin Chem* 1997;43:1684-96.

12) Salooja N, Perry DJ. Thromboelastography. *Blood Coag Fibrinolysis* 2001;12:237-37.

13) Hett DA, Walker D, Pilkington SN, Smith DC. Sonoclot analysis. *Br J Anaesth* 1995;75:771-6.

14) Berkowitz SD, Frelinger AL III, Hillman RS. Progress in point-of-care laboratory testing for assessing platelet function. *Am Heart J* 1998;136:S51-S65.

Le molecole di adesione: un ponte tra tumori e trombosi?

Maria Benedetta Donati

Dipartimento di Medicina e Farmacologia Vascolare, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Consorzio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro

Il processo della formazione di metastasi da un tumore primario, specialmente per la via ematogena, comprende una serie di interazioni tra le cellule tumorali e le cellule del sangue e della parete vascolare, tradizionalmente considerate cruciali nei processi di aterogenesi e di trombogenesi.

In particolare, da molti anni è stato riconosciuto un ruolo importante alle interazioni cellule tumorali-piastrine nella disseminazione tumorale.

Farmaci antiplastrine e tumori

Sono a supporto di tale ipotesi sia dati sperimentali di aggregazione delle piastrine indotta da cellule tumorali o loro prodotti o derivati (quali vescicole e "microparticles") sia dati sperimentali e clinici sul ruolo della piastrinopenia e del trattamento con farmaci antiplastrinici nel prevenire la disseminazione metastatica.

Tra questi ultimi tipi di farmaco, sono stati impiegati non solo antiinfiammatori non steroidei, inibitori della sintesi di trombossano e farmaci inibitori delle fosfodiesterasi (dipiridamolo e simili) ma anche, negli ultimi 10-15 anni, inibitori e/o antagonisti di molecole di adesione importanti per il legame fibrinogeno/piastrine. In particolare, gli studi sono stati diretti su anticorpi contro la glicoproteina IIb IIIa, che nelle piastrine è il recettore per il fibrinogeno e su peptidi sintetici o polipeptidi naturali (disintegrine) contenenti la sequenza RGD (arginina-glicina-acido aspartico) capace di antagonizzare per competizione il legame del fibrinogeno alle piastrine. Il nostro gruppo ha dimostrato che il trattamento con disintegrine di topi portatori di melanoma B16 altamente metastatico preveniva la formazione di metastasi polmonari, riducendo l'accumulo di piastrine a livello polmonare e prolungando il tempo di circolazione delle cellule tumorali stesse, fenomeno che ne favoriva la distruzione da parte del sistema reticolo-endoteliale.

Integrine

La presenza di alcune integrine, quali la glicoproteina IIb IIIa summenzionata, non è stata solo riscontrata sulle piastrine, ma anche sulla membrana di vari tipi di cellule tumorali.

In molti studi, l'espressione di queste integrine sulle cellule tumorali correlava con la loro capacità di indurre l'aggregazione delle piastrine e con il loro potenziale metastatico. In particolare, sembrava cruciale il grado di attivazione delle integrine, come dimostrato da esperimenti condotti su cellule di tumore della mammella isolate da metastasi umane: solo le cellule che avevano

l'integrina avb3 nella condizione attivata erano in grado di indurre aggregazione delle piastrine e di favorire la formazione di metastasi in un modello murino. Queste osservazioni suggeriscono che il potenziale metastatico di alcune cellule tumorali può dipendere dal controllo delle loro funzioni integriniche, particolarmente a livello delle integrine b3.

Selettine

Le selettine, in particolare la P-selettina di origine piastrinica ed endoteliale, e la E-selettina di origine endoteliale, rappresentano una famiglia di molecole di adesione che rivestono un ruolo molto importante nel processo che porta al richiamo di leucociti circolanti verso i tessuti durante i processi infiammatori. Le selettine mediano, infatti, l'adesione e il "rolling" dei leucociti circolanti che, in presenza di uno stimolo infiammatorio, vengono poi bloccati sulla parete vascolare grazie all'intervento di integrine attivate. Il nostro gruppo ha recentemente proposto un modello integrato di interazione tra la P-selettina e il suo recettore PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) e integrine del tipo b3 per fornire una base biochimica al processo di blocco dei leucociti polimorfonucleati sulla parete vascolare con il contributo delle piastrine. L'interazione cellulare basata sul coinvolgimento selettine/integrine comporta una fase intermedia intracellulare di trasmissione del messaggio tramite la fosforilazione in tirosina di un substrato proteico attualmente oggetto di studio.

Appare ormai sempre più chiaro che durante il processo della metastatizzazione le cellule tumorali ripercorrono la stessa cascata di eventi di adesione usata dalle cellule circolanti normali (quali piastrine e leucociti) per entrare in contatto con le cellule endoteliali e iniziare il processo della extravasazione. In particolare, alla P-selettina è stato ripetutamente assegnato un ruolo importante nell'adesione tra piastrine e cellule tumorali sulla base di esperimenti in vitro ed in vivo. Per quanto riguarda questi ultimi, sono di particolare interesse gli studi condotti su topi knock-out per la P-selettina nei quali la crescita di cellule di carcinoma del colon umano era fortemente diminuita; questo dato si accompagnava alla riduzione del numero di aggregati di piastrine/cellule tumorali riscontrabili nel tessuto vascolare-polmonare.

Sono stati anche riscontrati diversi recettori della P-selettina in diversi tipi di cellule tumorali: questo suggerisce la possibilità di disegnare in futuro interventi farmacologici selettivi per bloccare le interazioni cellula-cellula importanti per la crescita metastatica.

Conclusioni

Molecole di adesione studiate già da alcuni anni per il loro possibile ruolo nella trombogenesi (P-selettina, integrine b3) appaiono sempre più importanti nei processi di adesione cellulare che mediano la formazione di metastasi e potrebbero rappresentare nuovi bersagli per il controllo della disseminazione tumorale.

Bibliografia di approfondimento

- 1) Donati M.B. Cancer and thrombosis: from phlegmasia alba dolens to transgenic mice. *Thromb. Haemost.* 1995;74:278-281.
- 2) Poggi A., Rossi C., Beviglia L., Calabrese R., Donati M.B. Platelet-tumor cell interactions, in Joseph M (ed): *The Handbook of Immuno-Pharmacology-Immunopharmacology of Platelets.* London Academic Press, 1995, pp. 151-165.
- 3) Falanga A., Donati M.B. Pathogenesis of thrombosis in patients with malignancy. *Int. J. Hematol.*, 2001;73:137-144.
- 4) Donati M.B., Evangelista V. Platelets and tumors. IN: *Platelets in thrombotic and non thrombotic disorders.* Gresele P., Page C., Vermeylen J., Fuster V., Cambridge University Press, 2001, in press.
- 5) Felding-Habermann B. O'Toole TE., Smith JW. Fransvea E., Ruggeri ZM., Ginsberg MH.,

Hughes PE., Pampori N., Shattil SJ., Saven A., Mueller BM. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001;98:1853-1858.

6) Cerletti C., Evangelista V., de Gaetano G. P-selectin-beta2 integrin cross-talk: a molecular mechanism for polymorphonuclear leukocyte recruitment at the site of vascular damage. *Thromb. Haemost.*, 1999;82:787-793.

7) Piccardoni P., Sideri R., Manarini S., Piccoli A., Martelli N., de Gaetano G., Cerletti C., Evangelista V. Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for src kinases in MAC-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood*, 2001;98:108-116.

8) Kim Y.J., Borsig L., Varki N.M., Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998;95:9325-9330.

Il recettore endoteliale della proteina C: struttura, funzione e significato clinico

Elena M. Faioni

Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore Policlinico e Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Milano

La via anticoagulante della proteina C ha un ruolo chiave sia nella regolazione della formazione di trombina, sia nell'infiammazione, anche se i meccanismi sottesi a quest'ultima funzione sono meno noti nei dettagli. Della via anticoagulante della proteina C fanno parte la proteina C stessa, uno zimogeno che viene attivato a proteina C attivata (APC) sulla superficie endoteliale; la proteina S, cofattore della APC, una proteina non enzimatica ad alta affinità per i fosfolipidi; la trombomodulina, un recettore di membrana coinvolto nella attivazione della PC ad APC; e il recettore endoteliale per la proteina C o EPCR.

In condizioni fisiologiche non perturbate, le piccole quantità di trombina che vengono prodotte dall'attivazione della cascata coagulativa si legano con alta affinità alla trombomodulina espressa sulla superficie endoteliale. Il legame della trombina alla trombomodulina modifica la specificità per i substrati della trombina, convertendola da un enzima pro-coagulante ad un enzima anti-coagulante, in grado di attivare per proteolisi limitata la proteina C. In tal modo la trombomodulina funziona da "scavenger" della trombina e promuove le funzioni anticoagulanti della proteina C. La trombomodulina è espressa dall'endotelio, in condizioni fisiologiche, ed è distribuita su tutto il sistema vascolare. Per ragioni geometriche, ossia perché il rapporto fra superficie endoteliale e volume di sangue è a favore della prima nei capillari e nei piccoli vasi piuttosto che nelle grosse arterie e vene, la concentrazione relativa di trombomodulina è maggiore. Si stima una concentrazione di trombomodulina di 200 nmol/L nei capillari, mentre nei grossi vasi la concentrazione non supera 2 nmol/L e sarebbe insufficiente a garantire una efficace attivazione del sistema della proteina C. La recente identificazione di un altro recettore, l'EPCR, ha permesso di capire come questo non irrilevante problema è superato fisiologicamente. L'EPCR ha elevata affinità per la proteina C (30 nmol/l), a cui si complessa, concentrandola quindi sulla membrana endoteliale, e sostituendosi ai fosfolipidi. L'EPCR "presenta" la proteina C al complesso trombina-trombomodulina, presumibilmente traslocando lateralmente nella membrana. Tale meccanismo aumenta di cinque volte circa l'efficienza di attivazione della proteina C. L'EPCR è distribuito prevalentemente nei grossi vasi, arteriosi e venosi, e quasi per niente nei capillari (il letto capillare epatico costituisce una notevole eccezione). Che l'EPCR sia importante in vivo nell'attivazione della proteina C è indicato da uno studio recente condotto su babbuini in cui si dimostra che bloccando l'interazione fra proteina C ed EPCR mediante anticorpi si ha una riduzione di circa 88% dei livelli di APC dopo infusione di trombina in confronto ad animali senza tale blocco.

Dato il ruolo centrale dell'EPCR nella via della proteina C e l'associazione dei difetti degli altri componenti, proteina C, proteina S e, anche se in via aneddotica, trombomodulina, con un aumentato rischio di tromboembolismo venoso (e forse arterioso), si sono cercati difetti dell'EPCR associati a trombosi venosa profonda o infarto del miocardio. In assenza di un fenotipo misurabile

(l'EPCR è un recettore endoteliale, come detto) si è dovuto cercare le mutazioni in tutto il gene dell'EPCR analizzando pazienti selezionati. Si sono studiati 210 soggetti con infarto del miocardio, 198 pazienti con trombosi venosa profonda, e i relativi controlli. Sono state identificate quattro mutazioni nel promotore, una inserzione di 23 bp nell'esone 3, una mutazione missense nell'esone 3, e tre polimorfismi. L'inserzione di 23bp è risultata essere la più frequente, e la sua prevalenza (% fra parentesi) nei casi e nei controlli è riportata in tabella:

	pazienti	controlli
Infarto del miocardio	4/198 (2,02)	1/177 (0.56)
Trombosi venosa profonda	3/194 (1.03)	3/398 (0.75)

L'inserzione di 23bp è stata espressa transitoriamente. L'EPCR con l'inserzione risulta troncato dopo l'esone 3 e di conseguenza manca dell'esone 4, corrispondente alla regione transmembrana e alla coda intracitoplasmatica. Non è quindi in grado di legarsi alla membrana, di essere esposto sull'endotelio, di legare la proteina C e quindi di agevolarne l'attivazione. Le mutazioni del promotore, invece, non sembrano essere associate a diminuzioni nella espressione dell'EPCR. In conclusione, è impossibile per ora stabilire una relazione causale fra mutazioni destruenti (come l'inserzione di 23bp) nel gene dell'EPCR e il tromboembolismo venoso. Uno studio più vasto potrebbe stabilire se esiste un rischio statisticamente significativo associato alla presenza dell'inserzione. Alcune segnalazioni della letteratura indicherebbero che tale inserzione è rarissima o assente negli altri paesi europei, come ad indicare un effetto fondatore in Italia.

È necessario infine ricordare, come accennato sopra, che sono sempre di più i dati a sostegno del fondamentale ruolo della via della proteina C nell'infiammazione. Sia studi su animali, che trials clinici in varie fasi, hanno dimostrato che la APC è in grado di limitare alcuni aspetti della risposta infiammatoria il che ha importanti implicazioni terapeutiche, per esempio per la sepsi. L'EPCR, come le altre componenti della via della proteina C, ha funzioni extracoagulatorie per ora solo in parte note. L'EPCR da solo o in complesso con l'APC viene internalizzato e traslocato nel nucleo cellulare dove modifica l'espressione genica. Una forma solubile dell'EPCR, prodotta per proteolisi indotta da vari stimoli (fra cui la trombina e le citochine) si lega al complesso MAC-1/proteinasi 3, l'autoantigene della granulomatosi di Wegener. La stessa forma solubile lega la APC e, forse, ne modifica la specificità per i substrati. È presumibile che parte delle azioni anti-infiammatorie della APC siano mediate dall'EPCR, che probabilmente ne possiede anche di dirette. È possibile che alterazioni di questa importante via anticoagulante partecipino anche allo sviluppo di patologie su base infiammatoria oltre che trombotica.

Bibliografia essenziale

- 1) Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning and regulation of a novel Endothelial Cell Protein C/Activated Protein C Receptor. *J Biol Chem* 1994;269:26486-26491.
- 2) Simmonds RE, Lane DA. Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human Endothelial Cell Protein C/activated Protein C Receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/Major Histocompatibility Complex a1 and a2 domains. *Blood* 1999;94:632-641.
- 3) Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: Implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 1997;96:3633-3640.
- 4) Esmon CT, Gu J-M, Xu J, Qu D, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica* 1999;84:363-368.
- 5) Esmon CT. The protein C pathway. *Crit Care Med* 2000;28 (suppl) S44-S48.

- 6) Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001;97:1685-1688.
- 7) Bernard G, Vincent J-L, Laterre P-F, LaRosa SP, Dhainaut J-F, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Heltebrand JD, Ely EW, Fisher CJ. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl J Med* 2001;344:699-709.
- 8) Biguzzi E, Merati G, Liaw PCY, Bucciarelli P, Oganessian N, Qu D, Gu J-M, Fetichev R, Esmon CT, Mannucci PM, Faioni EM. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb Haemost* 2001;86:945-948.
-

Il Fattore XII della Coagulazione: da Mr. Hageman al Northwick Park Heart Study-2

Francesco Zito

Dipartimento di Medicina Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro (Ch)

La cascata coagulativa prevede l'interazione di numerose molecole che hanno come evento finale la formazione di un aggregato di piastrine e fibrinogeno, noto come coagulo. È chiara l'associazione causale di una sbilanciata produzione di proteine della coagulazione (fibrinogeno o fattore VII) con la patologia aterotrombotica.

Al signor Hageman si devono i primi studi su patologie di difetto coagulativo legate all'assenza di un altro fattore della coagulazione. Tale elemento prese il nome di Fattore di Hageman o di Fattore XII (FXII, per la sequenzialità cronologica con la quale è stato identificato rispetto agli altri fattori della coagulazione) e i cui livelli circolanti sono espressi in ng/ml.

I primi studi clinici sul FXII risalgono al 1959, quando McCain dimostrò che la deficienza totale di FXII circolante veniva riscontrata solo casualmente sulla base di esami di routine antecedenti ad operazioni chirurgiche (nessun sintomo emorragico in atto o pregresso). Solo Braulke, nel 1993, dimostrò che l'assenza di FXII circolante aveva un ruolo pro-emorragico: ridotti livelli di FXII (espressi come attività) rappresentavano un fattore di rischio di aborto spontaneo ripetuto. Gordon nel 1981 dimostrò una differenza razziale nella attività coagulo-formativa e antigenica del FXII, più bassa negli orientali che nei bianchi americani, che correla con la differente incidenza di patologie cardiovascolari nelle due razze, sollevando nuovo interesse intorno al FXII.

La domanda sul possibile ruolo del FXII nei processi fisiopatologici è andato così evolvendo, dimostrando che il FXII, oltre che un chiaro attivatore del Fattore XI della coagulazione, è anche un elemento chiave del sistema di attivazione da contatto. La frazione attivata del FXII, chiamata FXII-attivato (FXIIa), è infatti in grado di attivare la precalicreina in callicreina. Tale sistema è regolato dall'attivazione da parte di superfici cariche negative (come i trigliceridi), derivando come risultato finale reazioni di rimaneggiamento tissutale e la conversione di plasminogeno in plasmina (con conseguente possibile attivazione della fibrinolisi).

Come detto in precedenza, il vero problema era legato alla misurazione dei livelli di FXIIa (che rappresentano di per sé una piccolissima percentuale -2%- della proteina originaria, o zimogeno), non misurabili praticamente sia in condizioni ereditarie che in una varietà di condizioni cliniche. Come recente acquisizione, era emersa dunque la necessità di un test che discriminasse tra basse quantità di proteina "realmente" attivata e proteina originaria circolante. Nello scorso decennio un test estremamente sensibile al dosaggio di seppur minime frazioni di FXIIa è stato messo in commercio. Sulla base di questo, negli ultimi anni i dati epidemiologici mostrano più consistenza, dando peso ai livelli di FXIIa. Infatti, ad esempio, livelli di FXIIa significativamente più alti si sono dimostrati in soggetti con infarto acuto del miocardio comparandoli a controlli sani.

Recentemente, nello studio noto come Northwick Park Heart Study-2 (NPHS2), abbiamo dimostrato un'associazione positiva e indipendente del FXIIa coi fattori di rischio convenzionali per patologia coronarica arteriosa. L'associazione coi fattori di rischio cardiovascolare si è dimostrata superiore di quella legata al fibrinogeno e al Fattore VII (FVII). I costi del test, tuttavia, restano alti. Nel NPHS2 abbiamo anche cercato un'influenza genetica sulla variabilità plasmatica dei livelli di

FXIIa. In passato il gene del FXII è stato ben studiato, ma solo Citarella nel 1987, mediante esperimenti di southern analysis su cellule ibride, dimostrò l'appartenenza del gene del FXII al cromosoma 5 (5q33-qter). Tale gene è quantificabile in 12kb ed è composto da 13 introni e 14 esoni. Un polimorfismo, recentemente scoperto e localizzato nella posizione +46C>T della regione 5'UTR, si è dimostrato il candidato ideale per tale studi di associazione col rischio di patologia coronarica, in quanto legato ad alterazione della trascrizione proteica.

Nel NPHS2, in breve, si erano reclutati 4600 uomini sani, di età compresa tra 50 e 61 anni, in 9 centri entro i confini della Gran Bretagna. Criteri di elegibilità prevedevano che i soggetti fossero sani e non avessero mai manifestato segni, sintomi o diagnosi di angina instabile, malattia trombotica arteriosa cerebrovascolare, patologie tumorali o croniche. Soltanto 2951 vennero inclusi nello studio e misure di FXIIa si sono rese disponibili al primo controllo, dopo un anno dal reclutamento. Soltanto in 1745 soggetti la misurazione della variante genetica +46C>T è stata possibile. I valori di FXIIa (mediane) erano rispettivamente: Soggetti Omozigoti CC 2.0ng/ml, Soggetti CT 1.4ng/ml e Omozigoti TT 0,8 (p<0.0001). Durante il periodo di follow-up di 16131 persons-year (p-y), l'incidenza di patologia coronarica arteriosa non era significativamente diversa in base al genotipo, dove i rates (per 1000 p-y) per terzili di FXIIa erano: < 1.5ng/ml, 7.2; 1.5 - 2.0ng/ml, 7.2; >2.0ng/ml, 13.6. Le rispettive Hazard Ratios (HR), con il gruppo di livelli più bassi come gruppo di riferimento, erano: 1.01 e 1.97 (p=0.007, vedi Tabella 1). Il NPHS2 ha dunque fornito chiare indicazioni del coinvolgimento del polimorfismo della modulazione dei livelli di FXIIa, oltre che della rilevanza dei livelli di FXIIa come affidabile marker di rischio cardiovascolare. Tuttavia, sia lo studio NPHS2 che una serie di studi caso-controllo sembrano ridimensionare il ruolo di tale variazione genetica nella patologia trombotica. Un ruolo pro-aterosclerotico può attribuirsi al FXIIa per l'associazione accertata coi fattori di rischi aterotrombotico (correlazione coi livelli di trigliceridi, ad esempio). In uno studio su 192 soggetti randomly selected reclutati nella popolazione generale inglese e 190 diabetici di tipo-1 (età media 38±4), abbiamo recentemente valutato la progressione dell'aterosclerosi in base a un indice di calcificazione parietale (CAC) tramite la tecnica electron bean CT scanning (EBCT). (Tabella 2). Alti livelli di FXIIa erano associati con livelli di trigliceridi, BMI, consumo di alcohol e con alti livelli di vWF nei soggetti sani (p<0.001), mentre nei soggetti diabetici con la dose di insulina (p=0.009), colesterolo totale e dosi di alcohol. Inoltre, alti livelli di FXIIa sono stati associati positivamente con l'indice CAC (Odds Ratios 1.57 per ogni incremento di 1ng/ml, p=0.005), ma non indipendentemente dopo correzione per fattori di rischio. La variante 46C>T era responsabile del 18% della variazione dei livelli di FXIIa, ma non correlava con l'indice CAC.

Per questa serie di ragioni, alti livelli plasmatici di FXIIa sembrano giocare il ruolo più di marker di attivazione di fattori di rischio aterosclerotico che non un reale e causale fattore di rischio della patologia trombotica. In altre parole, potrebbe il FXIIa, pur non essendo direttamente trombogenico, rappresentare un utile strumento di valutazione di aterosclerosi coronarica per la sua correlazione coi fattori di rischio? Studi epidemiologici più vasti potranno in futuro rispondere a questi interrogativi.

Concludendo, per le sue peculiari caratteristiche di molecola in grado di attivare sia processi procoagulativi (studi in vitro hanno dimostrato attivazione di FXII e FXI) che profibrinolitici (attivazione del plasminogeno in plasmina e similarità genetica tra il gene del FXII e t-PA), il FXIIa ha tenuto e terrà sempre vigile l'attenzione dei ricercatori, seguendo l'esempio del signor Hageman. E altri studi necessiteranno per chiarire i misteri di una molecola che ancora è lungi dall'essere stata compresa in tutto il suo potenziale.

Tabella 1. Associazioni indipendenti del FXIIa e del genotipo 46G>C col rischio di patologia coronarica, nel NPHS2

Variabile	Hazard ratio (95% intervalli di confidenza)	p (likelihood ratio test)
factor XIIa*		
terzile medio	1.15 (0.63 - 2.08)	
tertile alto	2.45 (1.39 - 4.32)	0.002

Genotipo FXII		
CT	1.05 (0.40 - 2.77)	
CC	0.70 (0.25 - 1.91)	0.23

Il gruppo di riferimento era quello nel più basso terzile di distribuzione di FXIIa e con il genotipo TT.

Tabella 2. Fattori di rischio sociodemografici per patologia coronarica e indici socio-demografici in relazione a diabete e sesso, nell'EBCT study.

	Uomini		Donne	
	Non-diabetici 87	Diabetici 100	Non- diabetiche 105	Diabetiche 90
n				
	Media (SE)			
Età (yrs)	37.8 (0.4)	38.2 (0.4)	37.9 (0.3)	37.5 (0.5)
Durata del Diabete (yrs)	-	23.1 (0.8)	-	23.7 (0.8)
HbA1c % †	5.3 (0.6)	8.4 (1.9)***	5.3 (0.4)	8.9 (2.5)***
Dose Insulina (per unità di BMI / dì)		2.3 (0.07)		1.7 (0.05)
BMI kg/m ²	25.0 (0.3)	25.4 (0.3)	25.6 (0.5)	25.3 (0.4)
WHR	0.92 (0.01)	0.91 (0.01)	0.81 (0.01)	0.82 (0.01)
HDL mmol/l	1.6 (0.04)	1.7 (0.04)**	1.8 (0.04)	2.0 (0.05)*
LDL mmol/l	3.3 (0.11)	3.0 (0.1)*	3.0 (0.08)	2.8 (0.09)
Tot Colesterolo:HDL ratio	3.8 (0.13)	3.2 (0.1)***	3.0 (0.09)	2.9 (0.09)
Trigliceridi mmol/L †	1.3 (0.78)	1.2 (0.6)*	0.96 (0.56)	0.97 (0.51)
Sistolica PA mmHg	124 (1.3)	129 (1.1)*	111 (1.2)	120 (1.5)***
Diastolica PA mmHg	76 (1.0)	77 (0.8)	69 (0.8)	72 (0.9)*
FXIIa ng/mL	1.96 (0.08)	1.6 (0.07)**	1.89 (0.07)	1.48 (0.07)***
vWF (% attività)	84 (44)	101 (49)	**87 (43)	97(55)*
	% (SE)			
% obesi				
% ipertesi ‡	6 (2)	8 (3)	21 (4)	8 (3)**
% fumatori	20 (4)	27(4)	6 (2)	16 (4)*
% bassa istruzione <19y	56 (5)	50 (5)	48 (5)	45 (5)
% esercizio fisico score<10	63 (5)	44 (5)**	65 (5)	54 (5)
% bere piu' di 21 unità/wk	73 (5)	82 (4)	86 (4)	85 (4)
	40 (5)	24 (4)*	7 (3)	11 (3)
*p<0.05 ** p<0.01 ***p<0.001 per differenze tra lo stesso sesso con e senza corretta per età mediante regression analysis † Media geometrica. (GM) e range interquartili mostrati in quanto i dati skewed SE: standard error.				

Bibliografia essenziale

- 1) Kaplan AP, Meier HL, Mandle RJ. The role of Hageman factor, prekallikrein, and high molecular weight kininogen in the generation of bradykinin and the initiation of coagulation and fibrinolysis. Monogr Allergy 1977;12:120-30.
- 2) Seligsohn U, Osterud B, Brown SF, Griffin JH, Rapaport SI. Activation of human factor VII in plasma and in purified systems: roles of activated factor IX, kallikrein, and activated factor XII. J. Clin. Invest 1979;64:1056-65.
- 3) Miles LA, Greengard JS, Griffin JH. A comparison of the abilities of plasma kallikrein, beta-Factor XIIa, Factor XIa and urokinase to activate plasminogen. Thromb. Res. 1983;29:407-17.

- 4) Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N et al. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5' - untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood* 1998;91:2010-4.
 - 5) Zito F, Drummond F, Bujac SR, Esnouf MP, Morrissey JH, Humphries SE et al. Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in Men. *Circulation* 2000;102:2058-62.
 - 6) Kelleher CC, Mitropoulos KA, Imeson J, Meade TW, Martin JC, Reeves BE et al. Hageman factor and risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1992;97:67-73.
 - 7) Kohler HP, Carter AM, Stickland MH, Grant PJ. Levels of activated FXII in survivors of myocardial infarction-- association with circulating risk factors and extent of coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* 1998;79:14-8.
 - 8) Ford RP, Esnouf MP, Burgess AI, Sarphe A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of activated factor XII (Hageman factor) in human plasma. *J. Immunoassay* 1996;17:119-31.
 - 9) Jones DW, Gallimore MJ, Winter M. An automated chromogenic peptide substrate assay for coagulation factor XII. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1998;9:183-7.
 - 10) Miller GJ, Esnouf MP, Burgess AI, Cooper JA, Mitchell JP. Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle-aged men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:2103-6.
 - 11) Rumberger JA, Sheedy PF, Breen JF, Fitzpatrick LA, Schwartz RS. Electron beam computed tomography and coronary artery disease: scanning for coronary artery calcification. *Mayo. Clin. Proc.* 1996;71:369-77.
-

L'emigrazione Italiana in Belgio: un modello "naturale" di interazione gene-ambiente nel rischio cardiovascolare

L. Iacoviello, M. Vischetti, M.B. Donati

Laboratorio "Angela Valenti" of Fattori di Rischio Genetici e Ambientali per le Malattie Trombotiche, Dipartimento di Medicina e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro, Italy

Introduzione

Il rischio di ischemia coronarica (CAD) è distribuito in maniera eterogenea in Europa: il tasso di eventi coronarici standardizzati per età, sia negli uomini che nelle donne, è più basso nei paesi del Mediterraneo che in quelli del Nord Europa. Secondo i dati del MONICA, tale tasso è tre volte più alto nelle popolazioni Inglesi e due volte più alto in quelle Belge rispetto alla popolazione Italiana (1).

La dieta mediterranea

Le popolazioni Europee mostrano differenze non solo nella prevalenza delle malattie, ma anche nelle loro abitudini alimentari.

Il ridotto tasso di IM nelle popolazioni dell'Europa Mediterranea ha stimolato un crescente interesse per un potenziale ruolo della loro dieta tradizionale nella protezione da CAD. Secondo una definizione operativa di dieta mediterranea come "lo stile dietetico delle popolazioni del Sud Italia negli anni sessanta", il profilo dietetico delle regioni mediterranee è sensibilmente diverso rispetto a

quello adottato nei paesi occidentali, specialmente per quanto riguarda l'uso dei grassi, cibi derivati dai cereali, verdure e tipo di bevande alcoliche. Nella dieta mediterranea, l'olio d'oliva è il principale grasso visibile, l'assunzione di grassi saturi di origine animale è relativamente bassa, mentre il pesce garantisce un sostanziale apporto di grassi polinsaturi.

Studi ecologici hanno mostrato che il ridotto tasso di CAD, nelle popolazioni mediterranee, era associato ad un basso consumo di grassi saturi di origine animale (2) e ad un moderato consumo di vino rosso durante i pasti (3). Sebbene alcuni effetti cardioprotettivi del vino possano essere dovuti al suo contenuto di alcool, di sicuro giocano un ruolo importante i composti antiossidanti in esso naturalmente presenti. Queste osservazioni sono state confermate da studi farmacologici e nutrizionali, i quali dimostrano che, modificando il rapporto grassi saturi/polinsaturi, ed aumentando il potenziale antiossidante, è possibile ridurre l'incidenza di CAD (4-5).

Purtroppo negli ultimi 20 anni anche nelle regioni del Sud Europa si è accresciuta la tendenza ad adottare abitudini dietetiche dei paesi occidentali (6), e ciò ha portato ad un aumento dell'obesità e dell'ipertensione (7-8). Pertanto è necessario considerare sia i pattern dietetici sia i profili di rischio di CAD tra i popoli Europei. A questo proposito, saranno valutate le differenze nelle abitudini dietetiche, i biomarcatori dell'assunzione di cibo, e il profilo di rischio per IM, insieme al loro background genetico, in campioni di Italiani, Inglesi e Belgi, considerati a diverso rischio di CAD.

Genetica e rischio cardiovascolare

Sebbene, tradizionalmente, nella cardiologia preventiva si sia sempre posta enfasi sui fattori di rischio ambientali, recentemente anche i fattori di rischio genetici sono stati implicati nello sviluppo di CAD. Ciò in seguito sia al fatto che i livelli ematici di parametri considerati come fattori di rischio per CAD vengono modulati geneticamente e sia in seguito all'osservazione che in alcune famiglie si riscontra una prevalenza particolarmente alta di malattia.

Quest'ultimo concetto ha permesso di fare associazioni dirette tra polimorfismi e rischio di malattia. L'allele Q del polimorfismo 353Q del gene del fattore VII della coagulazione, è associato con bassi livelli di fattore VII. La presenza di questo allele può ridurre il rischio IM di circa il 50% (9).

In Europa esiste un gradiente nella frequenza dell'allele Q, che va di pari passo con il gradiente Nord-Sud di mortalità per CAD: la frequenza dell'allele protettivo è più alta nel Sud Europa, dove la mortalità per CAD è inferiore, e più bassa tra le popolazioni del Nord dove invece la mortalità per CAD è più alta (10).

In effetti, i geni interagiscono costantemente con l'ambiente nella patogenesi del CAD. Gli effetti nocivi del fumo sul rischio di IM, per esempio, dipendono anche dai polimorfismi del fattore VII, dal momento che essi sono ridotti nei portatori dell'allele protettivo. In oltre gli effetti di un gene, misurati in un dato ambiente, differiscono da quelli dello stesso misurati in un altro ambiente. Differenze nei fattori dietetici, come ad esempio quantità e tipo di acidi grassi consumati, e nell'assunzione delle vitamine, possono interagire con i polimorfismi funzionali nel determinare differenze nel fenotipo.

Alti livelli di trigliceridi sono associati con un aumento di attività del fattore VII negli omozigoti per l'allele R, ma non nei portatori dell'allele Q. I livelli di omocisteina sono influenzati sia dai polimorfismi genetici che da fattori nutrizionali. Il Metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR) è un enzima che catalizza il processo di remetilazione dell'omocisteina ed è anche determinante dei suoi livelli nel sangue.

La presenza dell'allele T677 del gene MTHFR è associata con una diminuzione dell'attività enzimatica e quindi con un aumento dei livelli ematici di omocisteina, soprattutto in presenza di bassi livelli plasmatici di acido folico (11). Le Vitamine B6, B12 e l'Acido Folico sono importanti micronutrienti, presenti soprattutto nella frutta e nella verdura e sono cofattori essenziali della reazione catalizzata dell'enzima MTHFR. Può quindi essere ipotizzato che fattori nutritivi interagiscano con difetti molecolari del gene nel determinare l'iperomocisteinemia.

Uno screening di popolazione per la presenza del polimorfismo C677T MTHFR ha mostrato una eterogeneità mondiale relativamente alta (12). Anche tra le popolazioni Europee è stata osservata una macroeterogeneità, essendo il genotipo omozigote T677 MTHFR più frequente in Italia rispetto alle popolazioni Olandesi e Britanniche. La mancanza di associazione tra il polimorfismo MTHFR ed il gradiente Europeo di mortalità per CAD suggerisce che, nei paesi del Sud, l'apporto dietetico

di folato e altre vitamine è sufficiente a coprire il fabbisogno addizionale nei soggetti omozigoti per l'allele T667.

È necessaria una valutazione simultanea delle complesse interazioni tra geni e stile di vita (in particolare con la nutrizione) per valutare il loro effettivo coinvolgimento nel determinare differenze nella prevalenza di IM tra i paesi Europei. Lo scopo principale del progetto IMMIDIET è, infatti, studiare come le abitudini dietetiche interagiscano con il background genetico delle popolazioni nel determinare cambiamenti nei fattori di rischio per CAD. A tal proposito, l'emigrazione degli Italiani in Belgio e la loro conseguente integrazione attraverso matrimoni misti è stata scelta come modello di interazione geni-ambiente.

L'Emigrazione come modello di interazione geni-ambiente

Studi su popolazioni di emigranti sono stati spesso usati per definire gli effetti relativi dell'esposizione ambientale e della predisposizione genetica sulle malattie.

In generale, se gli immigrati cambiano il loro tasso di malattia verso quello del nuovo paese, questo suggerisce un ruolo preponderante dell'ambiente. Se, al contrario, gli immigrati mantengono lo stesso tasso di malattia del loro paese d'origine, questo può significare sia che la malattia è geneticamente determinata sia che essi non hanno cambiato sostanzialmente le loro abitudini di vita. Più spesso sono stati osservati cambiamenti nel rischio di malattia delle popolazioni emigranti verso quelle del paese ospite, questo è indice di un graduale adattamento culturale alle abitudini alimentari e dello stile di vita della popolazione ospite. Tali studi sono stati effettuati in Australia, tra immigrati Italiani e Greci, negli Stati Uniti, dove differenti generazioni di immigrati Giapponesi sono state paragonate sia con Giapponesi che vivono in Giappone sia col resto dei cittadini degli Stati Uniti e nel Regno Unito, dove popolazioni Indiane e Africane sono state paragonate con quelle residenti nel loro paese d'origine (13-15). Altri esempi vengono dai popoli Canadesi: gli Oji-Cree del Nord Ontario hanno un'alta prevalenza di patologie cardiovascolari e diabete mellito, mentre gli Inuit dal Nunavut ce l'hanno bassa. Ci sono differenze significative, tra i soggetti Oji-Cree e Inuit, rispetto alla frequenza degli ipotetici "alleati deleteri" di diversi geni candidati nel diabete e nell'aterosclerosi.

Queste differenze nell'architettura genetica sono comunque insufficienti a dar conto completamente della grande disparità nella prevalenza di tali patologie tra i due gruppi aborigeni. È possibile che fattori ambientali di stile di vita, come il mantenimento delle diete tradizionali, possano superare un apparente background di suscettibilità genetica alla popolazione nativa. Comunque, la valutazione delle interazioni geni-ambiente non è stata possibile in questi studi perché le comunità di popolazioni immigrate, ospiti e originali erano usualmente considerate come entità separate. Noi abbiamo disegnato un modello originale per meglio capire l'interazione geni-ambiente. Infatti abbiamo considerato l'emigrazione storica degli Italiani in Belgio nel secondo dopoguerra come modello "naturale" per valutare i cambiamenti (sia nella dieta che nei fattori di rischio per CAD) probabilmente indotti dall'emigrazione e dal conseguente scambio culturale.

I soggetti emigrati in Belgio (Limburgo) dal Sud Italia e integrati nella cultura Belga (attraverso il matrimonio) potrebbero non solo aver cambiato il loro rischio di IM in relazione all'ambiente, ma, a loro volta, indotto un cambiamento in quello del loro consorte Belga.

Essi hanno generato e condiviso un nuovo stile di vita diverso sia da quello delle coppie italiane che vivono in Italia, sia da quello delle coppie Belghe che vivono in Belgio. Pertanto, saranno confrontati tra loro soggetti con diverso background genetico che condividono lo stesso ambiente. In più, ciascun membro della coppia mista sarà confrontato con soggetti dei rispettivi paesi d'origine, che condividono lo stesso ambiente e la stessa genetica. L'ultimo gruppo ci permetterà di investigare le differenze nei fattori di rischio per CAD probabilmente determinate dall'interazione dei background genetici comparabili con fattori dietetici e di stile di vita modificati.

Metodi di studio

Verranno studiati specifici fattori di rischio per CAD, che sono sotto l'influenza combinata sia di fattori dietetici che di polimorfismi genetici. Abbiamo pertanto selezionato il fattore VII della coagulazione, il metabolismo dell'omocisteina e un numero di fattori metabolici associati alla cosiddetta "sindrome metabolica" del rischio cardiovascolare (pressione alta, accumulo di grasso

addominale, iperinsulinemia/insulinoreistenza, anormalità lipidiche e lipoproteiche, sensibilità individuale al sale). Per ognuno di questi fattori di rischio saranno investigati sia componenti ambientali che genetiche. Questionari di frequenza alimentare, usati per valutare i fattori dietetici, ci permetteranno di raccogliere dati riguardo l'assunzione di cibo nel passato.

Nella prima fase di studio, partendo da questionari già validati in Italia e in Belgio, sarà sviluppato un questionario di frequenza alimentare integrato multilingua, che sarà utilizzato specificatamente nel contesto cross-culturale. Il nuovo questionario sarà validato contro un questionario dietetico standard per la popolazione Italiana e Belga rispettivamente.

Conseguentemente, sarà sviluppato uno specifico supporto analitico da allegare al questionario integrato sulla base di un programma statistico "ad hoc" per questionari alimentari.

Per valutare il reale effetto delle abitudini dietetiche sul rischio di IM, verranno anche valutati biomarkers di assunzione di cibo. Infatti, modifiche nella composizione in grassi saturi/polinsaturi delle membrane sono indice di incorporazione di grasso proveniente dal pesce o dall'olio d'oliva ed un marker del potenziale antitrombotico delle cellule. Allo stesso modo, l'aumento nella capacità antiossidante del sangue dopo assunzione di frutta o vino rosso, modula la funzione vascolare per esempio attraverso il rilascio di ossido nitrico. I livelli di selenio e zinco, che variano con l'assunzione di cibo, sono marcatori attendibili dello stress ossidativo e sono stati associati col rischio di malattie cardiovascolari.

Lo studio dei marcatori biochimici del metabolismo renale di sodio associato con lo studio degli indici metabolici sistemici dovrebbero portare ad interpretare meglio le interazioni tra abitudini dietetiche, e, in particolare il cambiamento nelle abitudini dietetiche, e i complessi disordini metabolici e renali associati con alterazioni nella regolazione della pressione sanguigna.

Impatto del progetto

Il progetto è stato concepito per avere un impatto educativo diretto sul sistema sanitario e sulla popolazione generale. Infatti includerà una popolazione adulta sana, reclutata attraverso la collaborazione dei Medici di Medicina Generale (MMG). Gli MMG sono persone chiave attraverso le quali la prevenzione primaria può essere migliorata con successo, dal momento che possono dare consigli integrativi e personalizzati traducendo la conoscenza scientifica in un modo facilmente comprensibile.

Dall'altra parte, ottenere il consenso della gente semplicemente dando buoni consigli non è sufficiente.

È necessario identificare le idee preconcepite sulla nutrizione prima di modificarle.

Incoraggiare la gente a proporre cibo e stili di vita alternativi fa sentire gli individui responsabili della loro stessa salute. Molta attenzione sarà posta in questo progetto nell'informare e addestrare regolarmente gli MMG che aderiranno. In questo modo essi daranno un'immediata e qualificata diffusione dei risultati dello studio per la prevenzione della patologia cardiovascolare nella pratica quotidiana.

Bibliografia

- 1) Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-events rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-years results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353:1547-57.
- 2) Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol*. 1986;124:903-15.
- 3) Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
- 4) De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Memelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction:

final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999;99:779-85.

5) Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M, Yusuf S. The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann Intern Med* 1995;123:860-72.

6) Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr* 1995;61(6 Suppl):1321S-1323S.

7) De Vito E, La Torre G, Langiano E, Berardi D, Ricciardi G. Overweight and Obesity among secondary school children in Central Italy. *Eur J Epidemiol* 1999;15:649-54.

8) Strazzullo P, Ferro-Luzzi A, Siani A, Scaccini C, Sette S, Catasta G, Mancini M. Changing the Mediterranean diet: effects on blood pressure. *J Hypertens* 1986;4:407-12.

9) Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, Kluff C, Donati MB. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;338:79-85.

10) Iacoviello L, Zito F, Di Castelnuovo A, de Maat M, Kluff C, Donati MB. The contribution of Factor VII, fibrinogen and fibrinolytic components to the risk of ischaemic cardiovascular disease: their genetic determinants. *Fibrinolysis & Proteolysis* 1998;12:259-276.

11) Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, Faccini G, Pignatti PF, Mazzucco A, Corrocher R. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood* 1998;91:4158-63.

12) Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998;62:1258-60.

13) Hopkins S, Margetts BM, Cohen J, Armstrong BK. Dietary changes among italians and Australians in Perth. *Comm Hilth Stud* 1980;4:67-75.

14) Marmot MG, Smith GD. Why are the Japanese living longer? *BMJ* 1989;299:1547-51.

15) Cappuccio FP. Ethnicity and cardiovascular risk: variations in people of African ancestry and South Asian origin. *J Hum Hypertens* 1997;11:571-6.
