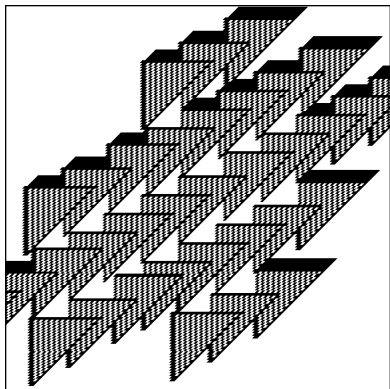


Caleidoscopio

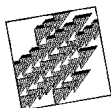
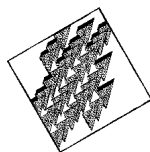
Italiano

Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 44 - Luglio 1989 - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova A.T.A. Genova



Giuseppe Fanetti

Emostasi: fisiopatologia e diagnostica

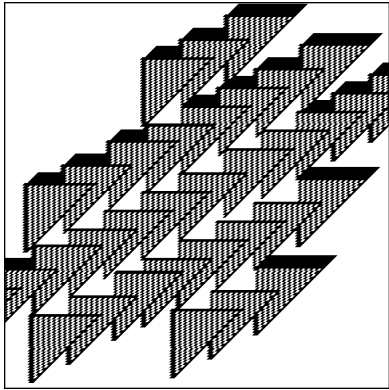


**Direttore Responsabile
Sergio Rassu**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1989

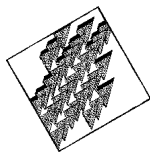
Caleidoscopio

Italiano

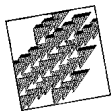


Giuseppe Fanetti

Servizio di Immunoematologia e Trasmfusionale
Ospedale "Le Scotte" Siena



Emostasi: fisiopatologia e diagnostica



Direttore Responsabile
Sergio Rassu



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1989

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41). Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

Come per qualsiasi altra patologia un corretto approccio terapeutico, delle alterazioni dell'emostasi, non può prescindere da una diagnosi che deve essere precisa.

Questo volume del dottor Giuseppe Fanetti, vuol analizzare in modo chiaro ed aggiornato questa prima e necessaria tappa fornendo, oltre ad un inquadramento metodologico, anche la spiegazione fisiopatologica del complesso processo emostatico sia dei suoi meccanismi iniziali che in quelli successivi.

Per sottolineare l'importanza di questo volume vorrei solo dire che, ad esempio, l'incidenza annua di episodi piastrinopenici che hanno una importanza clinica è di circa 1 su 100 abitanti. A questi vanno aggiunti i casi in cui si verificano dei difetti di numero o di funzione delle piatrine che non raggiungono un rilievo clinico. Questo dato risulta ancor più rilevante se si tiene conto che l'incidenza di questa patologia è in costante aumento a causa di un aumentato uso di farmaci e tossici che hanno effetti negativi.

Il dottor Fanetti, che abbiamo già avuto modo di conoscere ed apprezzare, è specialista in Immunoematologia, in Igiene e Tecnica Ospedaliera ed Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia. Presta la Sua opera in qualità di Aiuto presso il Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale del Policlinico "Le Scotte" di Siena, ed è ovviamente un testimone diretto di queste problematiche sulle quali ha pubblicato numerosissimi lavori e che sono state oggetto di relazioni nell'ambito di Congressi Nazionali ed Internazionali.

Sergio Rassa

Generalità

L'emostasi fisiologica richiede l'interazione di numerose glicoproteine plasmatiche con le piastrine circolanti e con le cellule dell'endotelio vascolare. La distinzione in varie fasi: vascolare, piastrinica, plasmatica e fibrinolitica che si è soliti fare, deve essere considerata solo come strumento esplicativo in quanto tutte le varie fasi dei processi emostatici e fibrinolitici sono strettamente interdipendenti: così la distinzione in via estrinseca ed intrinseca è esclusivamente un artificio didattico in quanto esistono una serie di feedback tra le due vie ed anche la coagulazione plasmatica e la fibrinolisi non sono due eventi sequenziali, ma in realtà iniziano contemporaneamente allorché avviene l'attivazione da contatto (FXII) e si integrano continuamente. Schematicamente l'emostasi normale si attua tramite *meccanismi immediati*: vasocostrizione attiva ed adesione delle piastrine alla "breccia" vascolare; *meccanismi intermedi*: aggregazione piastrinica, formazione del trombo piastrinico e del coagulo di fibrina; *meccanismi ritardati*: lisi del coagulo e reazione cellulare riparativa.

Questi tre meccanismi che hanno lo scopo di arrestare l'emorragia devono tuttavia assicurare una funzione coordinata e limitata nel tempo e nello spazio. Infatti, se l'emostasi è squilibrata in senso difettivo si verificherà un sanguinamento; se, viceversa, è squilibrata in senso eccessivo si verificherà una condizione trombofilica o francamente trombotica. La perdita di tale equilibrio può portare alla paradossale coesistenza di emorragia e trombosi: coagulazione intravascolare disseminata (CID). Si deve tenere inoltre presente che le possibilità di arresto dell'emorragia sono limitate nel tempo in quanto i vari fattori od elementi coinvolti vengono consumati durante le loro funzioni ed i meccanismi che partecipano al processo emostatico variano anche in funzione del tipo e della sede della lesione. Così in un piccolo caso o in caso di piccole lesioni endoteliali l'adesione e, la successiva aggregazione piastrinica, consolidate dall'azione della trombina e dalla formazione di fibrina, convertono il trombo piastrinico, inizialmente lasso, in una salda chiusura della ferita. In altre ferite che coinvolgono dei vasi più grandi le piastrine svolgono un ruolo di minor importanza: gli aggregati piastrinici infatti possono rappresentare una chiusura insufficiente per saldare soluzioni di continuità; in tali casi il sistema emocoagulativo plasmatico svolge una parte più importante.

Fisiologia dell'emostasi

I precursori emostatici vedono coinvolti, oltre le cellule endoteliali ed il subendotelio, le piastrine con i loro prodotti intra e peripiastrinici, il complemento, i fattori della coagulazione e della fibrinolisi con i loro inibitori. Sono coinvolti anche i sistemi macrofagico-monocitario e dei polimorfonucleati.

La parete vascolare

Dal punto di vista funzionale la parete vascolare può considerarsi costituita da due strati: lo strato endoteliale, tromboresistente e le strutture sottoendoteliali, dotate invece di "trombogenicità" (fig. 1). Merita inoltre ricordare che le proteine plasmatiche costituiscono un sottile strato aderente all'endotelio in virtù di un meccanismo fisico rappresentato dall'effetto "squimming" e da forze di adesione di tipo elettrostatico per cui un'alterazione proteica quantitativa e/o qualitativa oppure la presenza di metaboliti

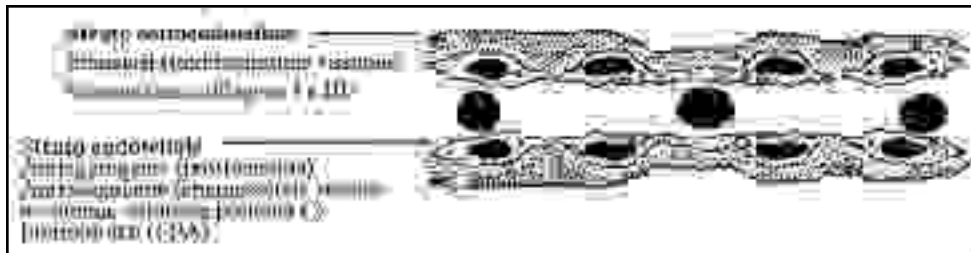


Figura 1. Strati funzionali della parete vascolare nei processi emostatici.

tossici possono in qualche modo turbare questo delicato equilibrio. La parete endoteliale ed il subendotelio quindi rivestono particolare importanza nel mantenimento dell'equilibrio emodinamico ma non si deve dimenticare che questa visione "statica" non rispecchia che parzialmente quelli che sono i fenomeni in vivo in quanto le cellule endoteliali vengono costantemente rimosse e, solo allorché il perturbamento delle cellule endoteliali è eccessivo o prolungato, predominano i meccanismi procoagulanti con il risultato che si genera trombina, il coagulo di fibrina e, in conseguenza, l'adesione e l'aggregazione piastrinica. Contemporaneamente i processi fibrinolitici e l'attivazione della proteina C subiscono un rallentamento a differenza dei mediatori procoagulanti e protrombotici la cui sintesi viene accelerata. Questa visione "dinamica" dell'endotelio implica quindi che durante il continuo ricambio delle cellule endoteliali vi sia una costante sorveglianza al fine di evitare uno stato francamente trombofilico od emorragico (tab. 1 e 2).

Polarità delle membrane:	inibisce l'adesività e l'aggregazione delle piastrine
Prostaciclina:	inibisce l'adesività e l'aggregazione delle piastrine
Interleuchina 1;	produzione di prostaciclina
AD Pasi:	inattivazione ADP (aggregante piastrinico)
Metaboliti della lipoossigenasi:	inibizione della aggregazione piastrinica
Sostanze eparinosimili:	inattivazione della trombina
Attivazione proteina C:	inattivazione dei fattori V e VIII
t-PA:	favorisce i processi fibrinolitici

Tabella 1. Fattori endoteliali con azione antitrombogena.

Fattore di tipo tromboplastinico:	attività procoagulante,
ATP:	attività piastrinica
Platelet aggregating factor (PAF):	attivazione piastrinica
Recettori per VW e/o fibrinogeno:	adesione piastrinica
PAI:	inibitrice sulla fibrinolisi

Tabella 2. Fattori endoteliali con azione procoagulante.

Le piastrine

Le piastrine sono frammenti citoplasmatici dei megacariociti, presenti nell'organismo in numero variabile da 130.000 a 400.000/mm³, 2/3 delle quali circolanti ed 1/3 sequestrate in un "pool" splenico. Il tempo medio di sopravvivenza in circolo è di 7-10 giorni e vengono rimosse dal sistema reticolo-endoteliale della milza, del fegato e del midollo osseo. La produzione delle piastrine è controllata da un ormone con caratteristiche biochimiche non ancora ben definite chiamato trombopoietina.

Morfologia ed ultrastruttura

Le piastrine (fig. 2) non attivate presentano forma discoidale (discociti). Quando vengono a contatto con stimoli adeguati modificano la loro forma divenendo sferoidali (sferociti) fino alla costituzione di un piccolo corpo cellulare da cui si diramano numerosi pseudopodi (echinociti). Si presentano come piccole spugne in quanto alla superficie sono presenti dei pori attraverso i quali fuoriescono i componenti biochimici interni prodotti durante l'attivazione. La piastrina è racchiusa da una membrana plasmatica trilaminare formata da fosfolipidi e proteine che è di importanza fondamentale nella fisiologia dell'emostasi e presenta adsorbiti alla superficie molti fattori della coagulazione (atmosfera peripiastrinica). Nelle piastrine attivate

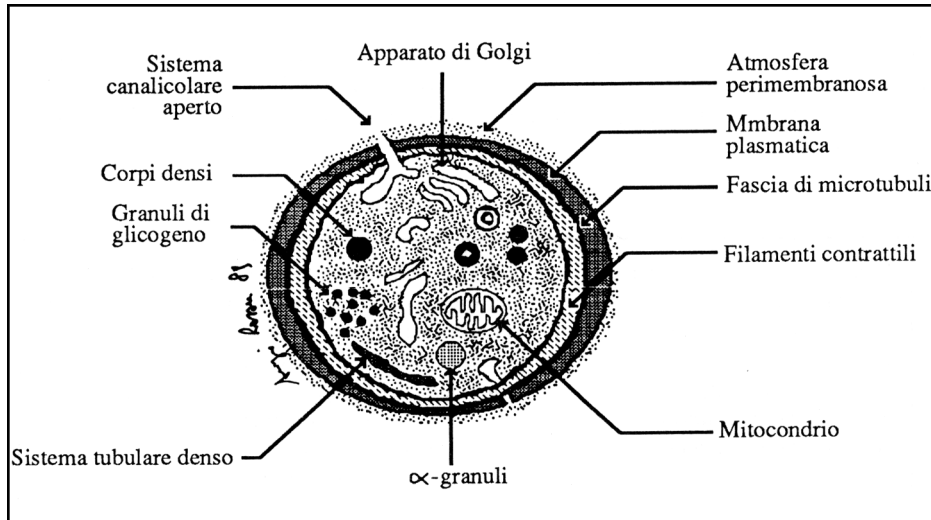


Figura 2. Sezione equatoriale di una piastrina in fase di riposo (forma discoidale).

si assiste ad un riorientamento di particolari fosfolipidi di membrana (fosfatidilserina) che, dallo strato lipidico profondo, si dispongono in superficie dove catalizzano l'interazione tra fattori e cofattori plasmatici coinvolti nell'attivazione del FX e della protrombina. Lo strato esterno della membrana plasmatica (glicocalice) contiene le glicoproteine (GP) che hanno proprietà recettoriali e mediano numerose ed importanti attività (tab. 3). La membrana piastrinica si invagina profondamente all'interno costituendo il sistema canalicolare aperto per cui la superficie di contatto con l'ambiente esterno è notevolmente aumentata. Il sistema canalicolare aperto presenta delle zone di stretta associazione con un altro complesso di membrane che formano dei canalicoli chiusi, non in contatto con l'esterno, originati dal reticolo plasmatico dei megacariociti: il sistema tubulare denso. A livello di questo sistema si svolgono alcuni importanti meccanismi biochimici quali il metabolismo dell'acido arachidonico, dell'AMP ciclico e del trasporto del Ca^{++} . Al mantenimento della forma discoidale, tipica dello stato di riposo, così come la sua modificazione in seguito a stimolazione contribuiscono i microtubuli ed i filamenti contrattili, sistemi proteici altamente organizzati e finemente regolati. I primi sono un fascio di tubuli che, se si osserva la regione equatoriale della piastrina, ne percorrono tutta la circonferenza appena sotto la parete cellulare mentre, in sezione trasversa, si presentano come un gruppo di tubuli a profilo circolare in numero da 8 a 24. La perdita della forma della piastrina dopo stimolazione è collegata alla scomparsa dell'anello dei microtubuli che sono costituiti principalmente da tubulina. I filamenti contrattili si trovano, nella piastrina a riposo, in parte dispersi nel citoplasma, in parte associati ai microtubuli, interconnessi tra questi e la membrana plasmatica. I componenti principali dei filamenti sono l'actina, la

GP Ia/IIa	- interazione con il collageno
GP Ib	- è uno dei due recettori per il F. Von Willebrand: permette l'adesione piastrinica al suberdotelio
	- recettore per trombina
GP IIb/IIIa	- recettore per le proteine "adesive":fibrinogeno, fibrinectina-F vW
GP IIIa	- determinante dell'antigene "proprio" Pl A1
GP IV	- recettore per trombospodina
GP V	- recettore per trombina

Tabella 3. Glicoproteine (GP) piastriniche che intervengono nei meccanismi emostatici e trombotici.

miosina e la tropomiosina, sostanze cioè simili ad altri sistemi presenti in altre cellule come le cellule muscolari (anche se differenti per alcune caratteristiche chimico fisiche e di regolazione). L'interazione dell'actina e della miosina per generare forza contrattile dipende dalla fosforilazione di una parte della miosina, la fosforilazione avviene solo in presenza di elevate concentrazioni di calcio ioni e di una proteina a funzione regolatrice Ca-dipendente: la calmodulina. All'interno del citoplasma piastrinico si trovano: i corpi densi, gli alfa granuli e i lisosomi, organuli morfologicamente abbastanza omogenei, pressoché sferici e circondati da una membrana semplice. Sono distinguibili gli uni dagli altri per il loro contenuto che ne determina le caratteristiche chimico fisiche. I delta-granuli (corpi densi) sono costituiti da ADP, ATP, scrotonina, calcio e fosforo ed hanno un'attività aggregante. Gli alfa-granuli contengono il FV e FVa, albumina, -trombo-globulina, fattore di crescita, di permeabilità e chemiotattico, trombospodina, fibrinogeno, F VIII:Ag, fibronectina e PAT-1 che svolgono numerose funzioni: antieparinica, stimolo della crescita cellulare, procoagulante, proaggregante, adesione delle piastrine, controllo della fibrinolisi. Infine i lambda-granuli (lisosomi) contengono idrolasi, proteasi e catepsine che hanno una funzione degradativa. Il contenuto dei granuli è liberato nel plasma attraverso il sistema canalicolare aperto durante la reazione di secrezione.

Biochimica delle piastrine

La piastrina, pur essendo priva di nucleo, è in grado, seppur parzialmente, di sintetizzare proteine. Essa inoltre contiene un certo numero di organuli quali i mitocondri ed granuli che le consentono un metabolismo attivo. La piastrina possiede poi capacità adsorbenti, infatti in essa si possono trovare proteine di origine plasmatica. Essa è inoltre in grado di secernere le proteine che contiene tramite un meccanismo di contrazione actomiosinica. Per quanto riguarda il metabolismo energetico, di primaria importanza sono i processi collegati alle funzioni contrattili. Gli enzimi della via glicolitica forniscono l'energia necessaria al metabolismo a riposo ed alla contrazione ed

utilizzano come substrato il glicogeno. Nelle piastrine sono contenute anche notevoli quantità di nucleotidi pirimidinici (ATP, ADP, AMP) i quali fanno parte di un unico compartimento ma si trovano divisi in due porzioni distinte: la prima, circa 1/3, localizzata nel citoplasma in rapporto con il metabolismo a riposo, costituisce il pool metabolico, la seconda, circa 2/3, localizzata nei corpi densi è in rapporto con la fase di attivazione e secrezione.

Fisiologia delle piastrine

Entro pochi minuti da un danno vascolare le piastrine ricoprono il collagene subendotemale esposto e vi aderiscono. L'ADP liberato dalle superfici induce un mutamento della loro morfologia che facilita la formazione di microaggregati, mentre il tromboxano A_2 , prodotto dalle piastrine, stimola ulteriormente l'aggregazione. Attraverso interazioni tra piastrine e proteine della coagulazione si verifica una produzione di trombina alla superficie delle piastrine tramite i meccanismi intrinseco ed estrinseco della cascata emocoagulativa che dà inizio alla formazione di fibrina ed alla stabilizzazione dei coaguli fibrinici. La prostaciclina e la proteina C attivata, prodotte quando la trombina interagisce con le cellule endoteliali, si oppongono a questi effetti, limitando le dimensioni del coagulo di fibrina. La prostaciclina inibisce l'aggregazione piastrinica mentre la proteina C attivata inibisce la formazione di fibrina. Gli attivatori del plasminogeno, anch'essi liberati dalle cellule endoteliali, promuovono la formazione di plasmina e la lisi del coagulo (fig. 3). In sintesi la fisiologia piastrinica comprende le seguenti funzioni: adesione, reazione di secrezione, aggregazione, retrazione del coagulo, partecipazione alla coagulazione.

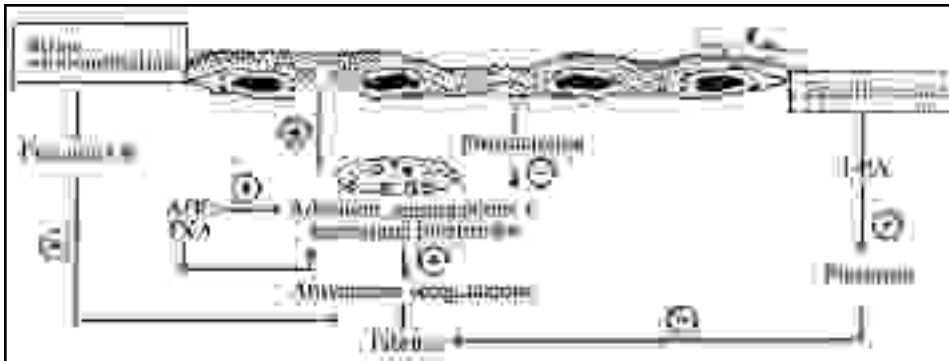


Figura 3. Fasi iniziali del processo coagulativo.

Adesione. È la proprietà che hanno le piastrine di aderire a superfici “non piastriniche”. Le piastrine normalmente non aderiscono all’endotelio. Quando però si verifica una lesione od un distacco endoteliale, esse aderiscono in maniera rapida alle strutture sottoendoteliali. Dopo l’adesione si manife-

sta un aumento della superficie piastrinica correlato alle modificazioni della forma da discoidale a sferica ed alla contrazione actino-miosinica dei filamenti presenti sulla membrana e nel citoplasma. La formazione del trombo piastrinico si realizza attraverso una serie di reazioni che iniziano in vivo con l'adesione delle piastrine alle fibrille del collagene di tipo I e III nonché a fibrille non collagene associate alla elastina. L'adesione delle cellule endoteliali è mediata dalle GP piastrine specifiche ed è favorita anche dalle emazie con un duplice meccanismo: tramite la liberazione di ADP dopo interazione con la lesione vascolare e fluendo di norma al centro del vaso, spostano le piastrine verso la parete in quantità proporzionale al valore dell'ematocrito. Si deve inoltre ricordare che allorché si crea una lesione, il sangue che passa attraverso un vaso reciso è sottoposto ad uno "shear stress" superiore a quello che agisce sugli elementi circolanti in condizioni normali e questo è un ulteriore stimolo sulle piastrine per un'accelerata adesività ed aggregazione.

Secrezione. La secrezione delle sostanze dei granuli è preceduta da uno spostamento dei granuli stessi in posizione centrale con formazione di un grappolo granulare, fenomeno che prelude alla fusione dei granuli con il sistema canalicolare aperto, attraverso il quale viene riversato all'esterno il contenuto dei granuli stessi. Tra le sostanze liberate dagli alfa granuli alcune sono tipicamente piastriniche come il fattore piastrinico 4 (FP 4), la β -tromboglobulina (β -TG) e la trombospondina (TSP), quest'ultima prodotta anche dalle cellule endoteliali; i FVIII: C e VW Ag, la fibronectina ed il FV.

Aggregazione. La successiva aggregazione delle piastrine è indotta da una serie di agenti aggreganti e tra questi il collagene e la trombina poiché è molto probabile che l'uno e l'altro diano l'avvio al fenomeno in vivo. Per questo è necessaria anche la presenza in concentrazione ottimale di Ca^{++} e fibrinogeno. Gli aggregati piastrinici si formano soprattutto attraverso la formazione di ponti di fibrinogeno che si fissano ai complessi glicoproteici IIb/IIIa situati sulle membrane piastriniche in opposizione. La molecola del fibrinogeno è collegata anche alle superfici delle piastrine mediante la trombospondina. Il sito di legame del fibrinogeno è schermato in condizioni di riposo, ma viene esposto in conseguenza dell'attivazione prodotta dall'ADP, da analoghi del TXA_2 , dalla trombina o dal fattore che attiva le piastrine. Anche altre proteine adesive partecipano all'aggregazione piastrinica così il fattore di Von Willebrand, la fibronectina e la vitronectina. L'innescò della reazione di aggregazione dipende dalla interazione tra induttore e recettore specifico di membrana, ma il suo compimento e la sua propagazione dipendono quasi sempre dall'ADP endogeno. I vari stimoli ambientali provocano una attività di contrazione dovuta a strutture di tipo acto-miosinico e regolata dai movimenti interni del Ca^{++} la cui concentrazione intracitoplasmatica dipende dal sistema dell'AMPc e dal metabolismo dell'acido arachidonico, alcuni prodotti del quale (endoperossidi ciclici e TXA_2) agirebbero da ionofori fisiologici.

Retrazione del coagulo. La microscopia elettronica ha permesso di studiare ed ipotizzare quali siano i meccanismi tramite i quali le piastrine partecipano alla retrazione del coagulo. Le piastrine, allineate lungo i filamenti di fibrina, emettono i loro pseudopodi lungo i filamenti stessi che, successivamente, vengono retratti. Questo processo richiede l'interazione tra la GP IIb/IIIa e la fibrina distesa alla superficie delle piastrine e fra le proteine contrattili ed i microtubuli presenti negli pseudopodi. Nei siti di legame per la fibrina sulla membrana piastrinica si

legano anche filamenti di actina. La miosina nel centro della piastrina interagisce quindi con l'actina, producendo una tensione. Il ripetersi dell'allungamento degli pseudopodi lungo i filamenti di fibrina e dell'accorciamento del complesso acto-miosinico causa la retrazione del coagulo, contribuisce alla sua lisi ed alla riapertura dei vasi trombizzati.

Piastrine e coagulazione. L'attività coagulante delle piastrine più nota è quella definita fattore piastrinico 3 (PF3). Essa è associata ai fosfolipidi di membrana caricati negativamente che, normalmente, sono segregati sul versante interno della membrana piastrinica, ma vengono esposti alla superficie piastrinica allorché le piastrine vengono "attivate". Il PF3 forma con i Ca^{++} , il FIX ed il F VIII un complesso capace di legare ed attivare il FXe quindi con i Ca^{++} , il FV ed il FXa un secondo complesso che lega la protrombina trasformandola in trombina. Sulla membrana piastrinica sono stati inoltre identificati recettori ad alta affinità per i vari fattori della coagulazione che pertanto possono essere legati ed attivati. L'attivazione del F VII infatti, che sembra essere il "trigger" della cascata coagulativa, attivando il FX, provoca sulla superficie piastrinica la formazione di tracce di trombina che, a sua volta, attiva le piastrine e soprattutto, il F VIII ed il FV che sono i veri amplificatori della velocità della coagulazione. Sulle piastrine esiste anche un recettore per HMWK che servirebbe da modulatore della fase di contatto. Recentemente è stato evidenziato un meccanismo regolatore delle piastrine sulla componente fibrinolitica plasmatica sia attivante che inibente.

Ruolo delle piastrine nella trombosi

Le piastrine svolgono anche un ruolo fondamentale nella genesi della trombosi e numerose ricerche che dimostrano il loro ruolo nella patogenesi della malattia aterosclerotica e delle sue complicanze ischemiche. Abbiamo in precedenza visto come, quando la parete di un vaso sanguigno è danneggiata, le piastrine possono aderire alle fibrille del collagene ed alle microfibrille della lamina elastica cui fa seguito la fase di aggregazione e secrezione. La progressione della lesione aterosclerotica sarebbe determinata dalla liberazione di un fattore mitogeno: PDGF (platelet derived growth factor), contenuto negli alfa granuli, che indurrebbe la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media all'intima ed inoltre la proliferazione delle cellule muscolari migrate con conseguente ispessimento della placca. Altri fattori piastrinici implicati nella progressione della lesione aterosclerotica sono il "fattore di permeabilità vascolare" responsabile dell'edema dell'intima e l'enzima elastasi, responsabile dell'elastinasi della parete vascolare. Recenti ricerche hanno dimostrato inoltre che a seguito dell'aggregazione piastrinica si ha l'attivazione del sistema emocoagulativo ed i fattori piastrinici, associati alla trombina, sono capaci di provocare una immediata liberazione dalle cellule endoteliali di un fattore definito EDRF (endothelium derived relaxing factor) che diffonde tra le cellule muscolari lisce della tonaca media del vaso e ne determina il rilascio per inibizione dei processi contrattili. La vasodilatazione che ne risulta tende ad allontanare il trombo in formazione prima che esso comprometta la circolazione ed inoltre questa sostanza inibisce l'aggregazione piastrinica con azione sinergica alle prostacicline. Una lesione aterosclerotica che danneggi l'endotelio vascolare impedisce la liberazione di questa sostanza con conseguente ulteriore aggravamento del fenomeno.

Coagulazione

La coagulazione del sangue avviene per la trasformazione di una glicoproteina plasmatica che circola allo stato di sol: il fibrinogeno, in una proteina polimerizzata a reticolo tridimensionale e quindi solido: la fibrina. Tale processo vede coinvolte diverse sostanze che, da un punto di vista chimico e funzionale, possono essere divise in: a) fattori del sistema di contatto; b) serin-proteasi vit-K dipendenti; c) cofattori non enzimatici che agiscono come acceleratori delle reazioni; d) fibrinogeno e F XIII.

a) Fattori del sistema di contatto

Questo gruppo comprende quattro proteine: F XII, F XI, Precallicreina (PK), Chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK). Le prime tre sono proenzimi mentre l'ultima è un cofattore non enzimatico. Esse hanno la capacità di legarsi a superfici a carica negativa, artificiali o naturali, in assenza di Ca^{++} . Il F XII ed il HMWK si legano alle superfici direttamente mentre la PK ed il F XI tramite il HMWK.

b) Fattori vit-K dipendenti

Questo gruppo comprende quattro proteine (II-VII-IX-X), che hanno in comune la presenza di diversi residui di acido gamma-carbossigluttammico nella loro estremità amino-terminale. Questi residui permettono alle proteine di legare i Ca^{++} e, tramite questi ioni, di legarsi a superfici fosfolipidiche sulle quali avvengono la maggior parte delle reazioni coagulative. La reazione enzimatica di gamma-carbossilazione (Fig. 4) avviene a livello dell'epatocita ad opera di una carbossilasi che richiede la vit-K come cofattore. In caso di deficit di vit-K come nel malassorbimento o nei deficit di apporto si formano delle proteine anormali, funzionalmente inattive che vengono chiamate PIVKA (Protein Induced By Vitamin K Absence). Anche i farmaci anticoagulanti orali (dicumarolici), bloccando il ciclo ossidoriduttivo della vit-K, impediscono a questa di funzionare da cofattore per la reazione di

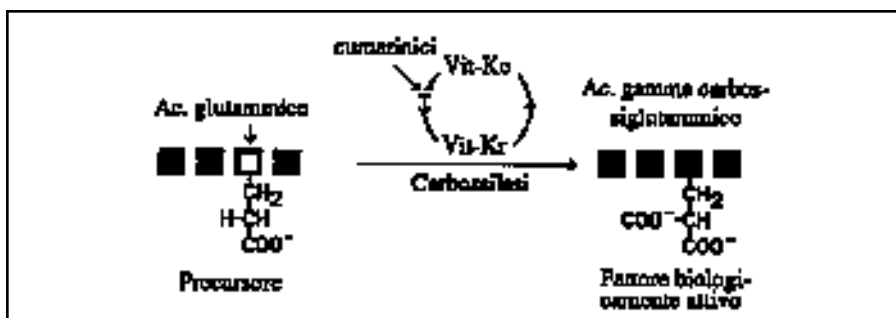


Figura 4. Azione della vit-K nel processo di attivazione di alcuni fattori della coagulazione.

gamma-carbossilazione. Recentemente è stato dimostrato che anche il sistema dei fagociti è in grado di sintetizzare il fattore VII e gli altri fattori vit-K dipendenti. Anche la Proteina C ed il suo cofattore Proteina-S, inibitori dei fattori della coagulazione sono vit-K dipendenti.

c) *Cofattori proteici*

Sono tre proteine che non possiedono attività enzimatica ma funzionano essenzialmente da acceleratori delle reazioni emocoagulative, due si trovano nel plasma (F VIII e F V) mentre la terza, l'apoproteina III, nei tessuti. Il FV, chiamato fattore labile a causa della sua instabilità, è sintetizzato nel fegato ma è anche contenuto nelle piastrine, nei fagociti mononucleati e nelle cellule endoteliali. IL F VIII si trova nel plasma in forma di complesso con il F Von Willebrand (F VW) ed esplica la sua attività allorché è sottoposto all'azione proteolitica di piccole quantità di trombina. Una descrizione più ampia di questo fattore è riportata nelle sindromi emofiliche. L'apoproteina III rappresenta la componente proteica di un complesso lipoproteico denominato tromboplastina tissutale (tissue factor) ed è presente, complessata con fosfolipidi, nel cervello, nel polmone, nei vasi e nella placenta. Non è dotata di attività proteolitica ma è indispensabile cofattore per l'attività enzimatica del F VII con cui forma un complesso.

d) *Fibrinogeno e F XIII*

Il fibrinogeno è una glicoproteina formata da tre paia di differenti catene polipeptidiche, denominate alfa, beta e gamma, organizzate in modo tale da ottenere una struttura dimerica legata da ponti disolfurici. Il F XIII è il precursore di una transaminasi e viene attivato dalla trombina in presenza di Ca^{++} .

La cascata emocoagulativa

Uno dei momenti fondamentali nel processo coagulativo è l'attivazione del F X che può avvenire tramite due meccanismi o sistemi interdipendenti l'uno con l'altro: il sistema intrinseco ed il sistema estrinseco. In entrambi i sistemi le reazioni che portano alla trasformazione del fibrinogeno in fibrina sono il frutto di una "cascata enzimatica" ed amplificatrice secondo la quale un fattore attivato agisce su di un altro trasformandolo da proenzima in enzima proteolitico che, a sua volta, ripete la stessa azione sul fattore successivo della sequenza (fig. 5). La conversione da proenzima ad enzima attivo avviene tramite una proteolisi limitata e selettiva ossia attraverso la scissione di pochi e ben definiti legami peptidici. A questo comportamento generale non partecipano il F V ed il F VIII:C i quali agiscono come acceleratori dopo essere stati attivati dalle prime tracce di trombina ed il F XIII che stabilizza la fibrina formando legami covalenti fra i monomeri che la costituiscono. Le reazioni enzimatiche avvengono in modo ottimale solo in presenza di superfici appropriate in assenza delle quali l'interazione tra i vari fattori della coagulazione avverrebbe troppo lentamente e non sarebbe finalizzata ad una adeguata emostasi. Quando sono adsorbiti su una superficie ed in presenza

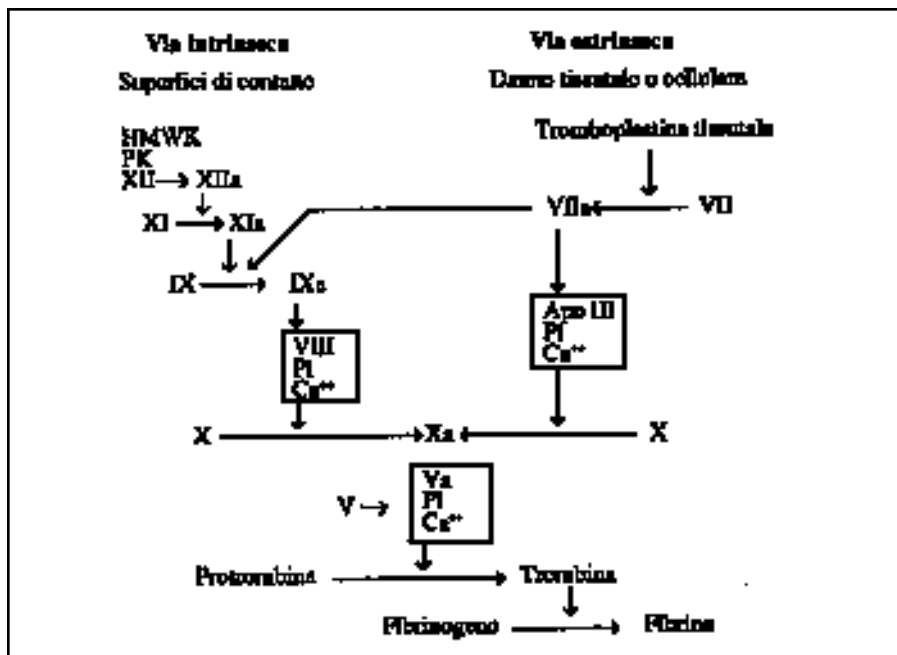


Figura 5. La cascata emocoagulativa.

di un adeguato cofattore, i fattori della coagulazione (tab. 4) raggiungono una concentrazione ottimale ed acquistano una disposizione sterica tale da facilitare la loro interazione ed aumentare la velocità della reazione enzimatica per una emostasi efficace.

Fattore	Denominazione	Sede di sintesi	Emivita (h)	Concent. plasma (mg%)	p.m.
I	Fibrinogeno	Fegato	90	200-400	340.000
II	Protrombina	Fegato	60	20	70.000
III	Tromboplastina tissutale	Tessuti	--	--	46.000
V	Proaccelerina Fattore labile	Fegato	18	0,5-1	330.000
VII	Proconvertina	Fegato	6	0,2	48.000
VIII	F. Antiemofilico A	Fegato Tessuti Linfonodi	14	0,05-0,15	300.000
IX	F. Antiemofilico B F. Christmas	Fegato	25	0,3-0,4	54.000
X	F. Stuard	Fegato	40	0,6-0,8	55.000
XI	Antecedente plasmatico tromboplastina	Fegato	50	0,4	160.000
XII	F. Hageman F. Flechter	Fegato	55	0,3	75.000
XIII	F. stabilizzante	Fegato	96	2,5	320.000
-	HMWK	Fegato?	168	0,7	110.000
-	Precallicreina	Fegato	--	0,15-0,5	85.000

Tabella 4. Fattori della coagulazione.

Sistema intrinseco

Nel sistema intrinseco (SI) della cascata emocoagulativa distinguiamo tre momenti essenziali: a) fase di contatto attivazione; b) attivazione del F IX; c) attivazione del F X. a) *Fase di contatto e attivazione.*

Il contatto del sangue con sostanze di composizione diversa dalla parete vascolare integra o dalla parete delle cellule ematiche come il collagene, le membrane basali degli endoteli vascolari, i lipopolissaccaridi batterici o con sostanze organiche ed inorganiche comunemente usate in laboratorio come il vetro, il caolino, l'acido ellagico dà inizio al SI della coagulazione con la cosiddetta fase di "contatto-attivazione". Questa fase richiede l'interazione di superfici caricate negativamente con tre proteine plasmatiche: il FXII, la precallieina (PK) ed il chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK). Tale reazione è stimolata e regolata dalla precallieina plasmatica la quale, trasformata in callieina dal F XIIa, con un meccanismo di retroazione, scinde il F XII in frammenti del F XII (F XII_f) più attivi del loro precursore (fig. 6). La precallieina è una gamma globulina a singola catena che viene convertita in callieina (K) trasformandosi in una catena leggera (p.m. 35.000) ed una catena pesante (p.m. 52.000) legate da un ponte disolfuro. La PK sembra avere solo il ruolo di acceleratore del processo e questo sembra dovuto al fatto che il F XII è capace di autoattivarsi: è stato infatti dimostrato che il F XIIa è in grado di attivare il F XII e che nel plasma deficiente di PK la coagulazione avviene normalmente proprio per la capacità che ha il F XII di autoattivarsi. La reciproca attivazione del F XII e della PK crea un sistema con un feed-back positivo che è quindi soggetto ad una rapida accelerazione. Il F XII_f è coinvolto nella scissione del F VII e ne aumenta l'attività coagulante, attiva inoltre il Cl. 11 F XIIa agisce anche come attivatore del plasminogeno con produzione di plasmina che, a sua volta, attiva il FXII. Sia il F XIIa che il F XII_f attivano un successivo fattore coagulativo: il F XI. Questa reazione necessita della presenza del chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK) il quale inoltre aumenta l'attivazione superficie-dipendente del FXII ed anche la scissione del F XII da parte della callieina. Il HMWK è clivato dalla callieina plasmatica in due siti per liberare la bradichinina: un nonapeptide che ha una potente azione vasoattiva, incrementa la permeabilità vascolare, provoca ipotensione, costrizione della circolazione polmonare e coronarica nonché attivazione della fosfolipasi A2 per aumentare la circolazione dell'acido arachidonico. La formazione del F XIa può avvenire anche in assenza del F XII, ad esempio per l'intervento di attività piastriniche (factor XII bypassing activity) e questo sembra essere uno dei motivi per cui il deficit congenito di F XII, di PK o di HMWK non provocano una diatesi emorragica. I componenti di questo sistema interagiscono con il sistema fibrinolitico, il sistema delle chinine, il sistema del complemento ed il sistema renina-angiotensina.

La fase di "contatto attivazione" è regolata da due meccanismi di controllo: quello intrinseco e quello estrinseco. La trasformazione del F Xa in F X_f è un esempio di meccanismo di controllo intrinseco così come la digestione operata dal F IXa sulla catena leggera del HMWK. Il controllo estrinseco è operato da inibitori presenti nel plasma che agiscono su ciascun fattore (tab. 5).

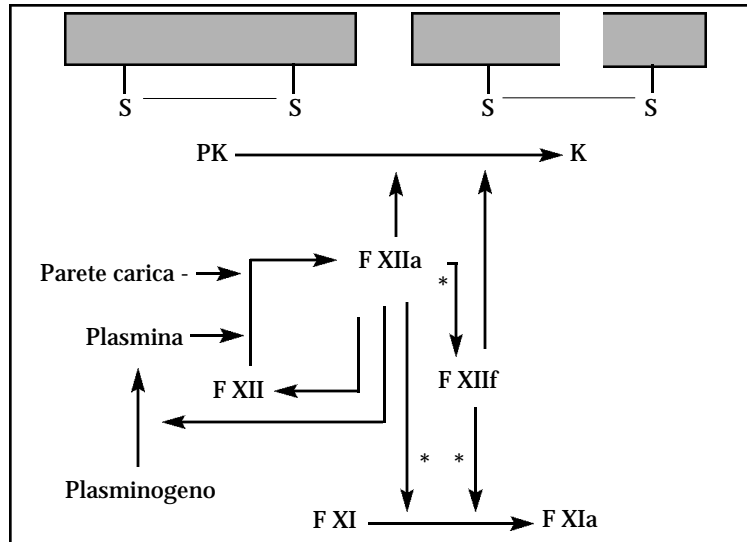


Figura 6. Fasi iniziali del sistema intrinseco della coagulazione.
 *Reazioni in cui interviene l'HMWK.

Enzima	Inibitore
F XIIa (F XIIa)	C1 INH
F XIa	C1 INH alfa-1-antitripsina
Callicreina	C1 INH alfa-2-macroglobulina
Plasmina	alfa-2-antiplasmina alfa-2-macroglobulina

Tabella 5. Inibitori plasmatici dei fattori del sistema "contatto-attivazione".

Attivazione del F IX.

Il F IX è una glicoproteina ad alto p.m. formata da un'unica catena polipeptidica che viene scissa in presenza di Ca^{++} , dal F XIa. Il F IX può inoltre essere attivato anche dalla callicreina, dal F VII e dal F Xa. E' quindi evidente come la distinzione tra sistema intrinseco ed estrinseco non si debba ritenere così marcata come si pensava e come sia possibile che le prime fasi del "contatto-attivazione" possano essere saltate da queste interazioni.

Attivazione del F X.

Il F XIa è una proteasi che attiva il F IX in F IXa e questo a sua volta, in presenza di F VII:C, di fosfolipidi a carica negativa (PF3) e Ca^{++} attacca il F X trasformandolo in F Xa. L'attivazione del F X, è uno dei momenti fundamen-

tali del processo emocoagulativo e può avvenire tramite la via estrinseca o la via intrinseca. All'attivazione di questo fattore partecipa il primo dei due co-fattori plasmatici che non hanno azione enzimatica ma funzionano essenzialmente da acceleratori delle reazioni coagulative: il F VIII:C.

Questo, presente in circolo sotto forma di complesso con il F VW, è dotato, nella sua forma nativa, di scarsa attività biologica. Come per il F V, l'espressione ottimale dell'attività si ha soltanto quando esso viene sottoposto all'azione proteolitica di piccole quantità di trombina e, come questo, è inattivato dalla proteasi serinica proteina C. Esistono vari meccanismi attivatori ed inibitori dei due fattori (fig. 7, 8 e 9) in quanto, anche se il F V prende parte ad una fase successiva della "cascata", esso purtuttavia, legato ai fosfolipidi ed alle piastrine, funziona a sua volta da recettore per il F Xa ed aumenta significativamente il legame di quest'ultimo alla superficie fosfolipidica. Va ricordato che le recenti tecnologie con DNA ricombinante e gli studi funzionali nonché epidemiologici hanno potuto dimostrare notevoli somiglianze strutturali e nella attività di questi fattori nonché la loro relazione in disordini emorragici e trombotici.

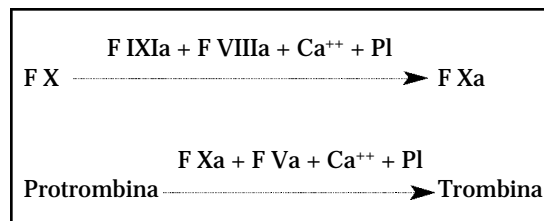


Figura 7. Ruolo del F VIIIa e del F Va nella coagulazione del sangue.

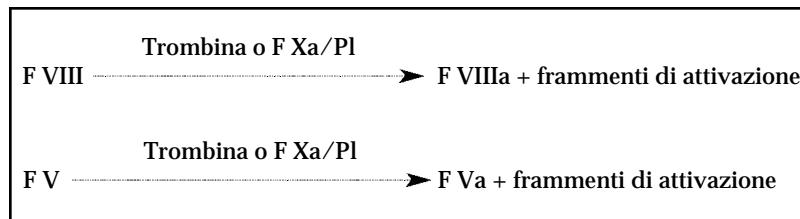


Figura 8. Inattivazione del F VIII e del F V.

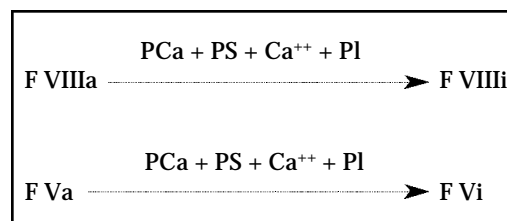


Figura 9. Inattivazione del F VIIIa e del F Va.

Sistema estrinseco

Il fattore tissutale (FT) è l'attivatore di questo sistema. Questo è presente in numerosi tessuti, nell'intima vascolare ed in molte cellule ematiche. Analogamente al PF3 piastrinico il FT viene esposto alla superficie solo dopo un danno o lisi cellulare. Allorché si libera, il FT attiva il F VII, formando un complesso enzimatico che agisce per proteolisi sul F X, trasformandolo in F Xa. L'attivazione del F X e la presenza di tracce di trombina formatesi attraverso questa via semplice e rapida, permettono l'attivazione e l'amplificazione della via intrinseca a vari livelli. Anche la callicreina ed il F XIIa sono in grado di attivare il F VII e quest'ultimo meccanismo sembra essere la causa della maggiore incidenza di trombosi che si verifica nelle donne che impiegano contraccettivi orali. Un altro fattore che è in grado di attivare e, a sua volta viene attivato dal F VII, è il F IX a dimostrazione delle numerose interazioni tra la via cstrinseca e quella intrinseca e della eccessiva schematizzazione che viene di solito effettuata nella descrizione delle due vie. La via estrinseca sembra, secondo le più recenti ricerche, avere un ruolo più importante della via intrinseca nell'innescio fisiologico della coagulazione in vivo e questo è dimostrato dal fatto che il F VII è l'unico dotato allo stato nativo di attività enzimatica e per le sue interazioni con il F IX. Tutto questo ha permesso di proporre un nuovo schema della cascata coagulativa (fig. 10).

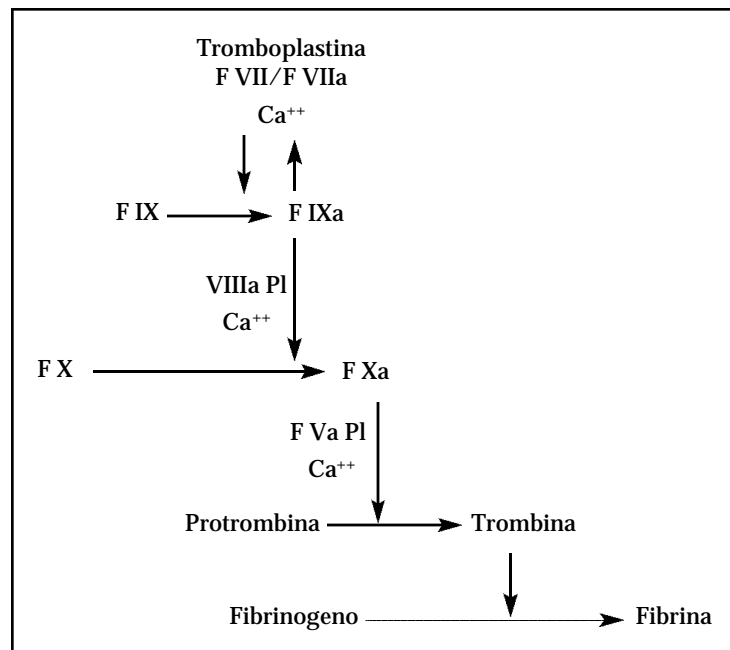


Tabella 10. Nuovo schema della cascata emocoagulativa.

Formazione della trombina.

L'ultima fase della coagulazione è avviata dal F Xa che converte la protrombina in trombina che è uno dei principali regolatori della cascata coagulativa in quanto, oltre ad agire sull'emostasi piastrinica, possiede un meccanismo di autocontrollo. All'inizio della sua formazione, se è presente in tracce, essa attiva il F V ed il F VII ed esalta la velocità della propria produzione: allorché ha raggiunto una concentrazione sufficiente, stacca dalla protrombina i residui gamma-carbossiglutammici, inattiva il F V ed il F VIIa e, attivando la proteina C, arresta la propria formazione.

Formazione di fibrina.

La molecola di fibrinogeno (I) (tab. 4) è costituita da due metà simmetriche ciascuna composta da tre distinte catene polipeptidiche legate fra loro da legami disolfuro. Queste catene sono indicate come: alfa-A (p.m. 63.500), beta-B (p.m. 56.000) e gamma (p.m. 47.000). In microscopia elettronica la molecola del I si presenta in forma trinodulare con un dominio centrale E che contiene le porzioni aminoterminali di tutte e tre le catene legate da ponti disolfuro, due domini carbossiterminali D costituiti dalle catene beta e gamma mentre le alfa emergono come un'appendice libera molto sensibile agli attacchi proteolitici. Il concetto di differenti domini molecolari si rivela utile anche da un punto di vista funzionale poiché permette di localizzare l'azione della trombina sul dominio centrale dove infatti stacca quattro piccoli peptidi: due Fibrinopeptidi A (EPA) e due Fibrinopeptidi B (FPB), formando così il monomero di fibrina. Il distacco di questi frammenti provoca la trasformazione della molecola dalla forma globulare in una forma lineare. L'FPA è la prima molecola rilasciata dal fibrinogeno in presenza di trombina e, pur non partecipando ai processi emocoagulativi ed avendo un'emivita molto breve, la sua determinazione riveste notevole interesse in tutti gli stati pretrombotici e di ipercoagulabilità così come nella CID. Appena liberatisi i monomeri di fibrina si associano tra loro mediante un legame tra un dominio E di una molecola e due D di altre due molecole, finché, tramite l'azione del F XIIIa e degli ioni Ca^{++} , si ha la stabilizzazione con formazione di due legami inter-gamma tra due domini D adiacenti ed inter-alfa tra domini D ed F. Si ha a questo punto la formazione di un reticolo di fibrina stabile che presenta una relativa resistenza alla proteolisi plasminica e quindi efficace per una emostasi definitiva (Fig. 11). In assenza di F XIII si ha la formazione di un trombo friabile con emorragia "tardive" e lenta ed imperfetta cicatrizzazione delle ferite poiché la fibrina insolubile è il supporto biologico necessario alla proliferazione dei fibroblasti.

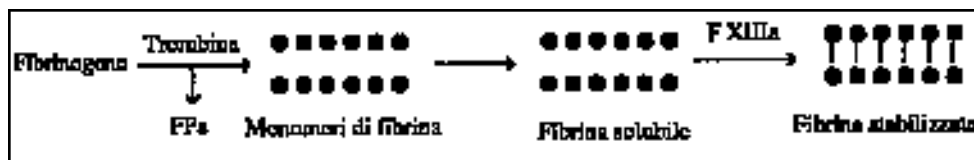


Figura 11. Formazione della fibrina stabilizzata.

Sistema fibrinolitico

La fibrina neoformata deve essere rimossa in maniera totale o parziale in modo da impedire l'ostruzione vascolare e ripristinare il circolo. Questo viene effettuato dal sistema fibrinolitico (SF), un altro sistema enzimatico che, in analogia al sistema coagulativo, deve operare in ristrette condizioni spazio-temporali per cui necessita di attivatori ed inibitori che agiscono solo nella zona in cui si è avuto accumulo di fibrina. Il SF partecipa anche al mantenimento della pervietà delle vie escrettrici del rene, alla riparazione dei tessuti ed al processo infiammatorio.

Plasminogeno (PGN). E' una glicoproteina a singola catena del p.m. di 92.000, sintetizzata dagli epatociti e probabilmente anche dai granulociti e dagli eosinofili nel midollo osseo. Circola nel sangue ad una concentrazione di 10-16 mg% con una vita media di 2,24 giorni. Viene incorporato in quantità rilevante nel reticolo di fibrina. L'attivazione del PGN in plasmina comporta il passaggio da una catena singola ad una doppia catena con legame disolfuro.

Plasmina (PL). La PL è un enzima proteolitico del gruppo delle serinproteasi con una spiccata, ma non assoluta specificità per la fibrina, può infatti attaccare anche il fibrinogeno, il F VIII, il F V ed altre proteine come ACTH, GH e glucagone. Risulta formata da due catene polipeptidiche legate tra loro da ponti disolfuro.

Attivatori del plasminogeno

Gli attivatori del PGN sono proteasi capaci di trasformare il PGN in PL. Attualmente sono note tre vie di attivazione della fibrinolisi: a) la via F XII dipendente, b) la via F XII indipendente o urochinasasi dipendente, c) la via dipendente dall'attivatore tissutale (t-PA). Le prime due vie vengono comunemente definite via intrinseca di attivazione in quanto tutte le componenti sono presenti nel sangue stesso. Il t-PA partecipa invece alla via estrinseca in quanto viene secreto dalle cellule di molti tessuti (polmone, prostata, utero, rene) e dagli endoteli vascolari.

a) *Attivazione F XII dipendente.*

Questo fattore, quando si fissa ad una superficie carica negativamente, subisce un cambiamento strutturale che gli permette l'interazione con il complesso formato dal HMWK e dalla PK. In questa interazione la PK viene trasformata in callicreina che è in grado di trasformare il plasminogeno in plasmina.

b) *Attivazione F XII indipendente e urechinasasi dipendente.*

In questa via è stato identificato un attivatore del plasminogeno che sembra essere prourochinasasi circolante. L'urochinasasi (UK) è una glicoproteina scoperta inizialmente nelle urine con p.m. 54.000. Questa proteina, ol-

tre che partecipare al processo fibrinolitico, sembra essere coinvolta in una serie di meccanismi proteolitici pericellulari implicati nel rimodellamento dei tessuti, nell'invasione tumorale, nell'embriogenesi e nei processi infiammatori.

c) *Attivatore tissutale.*

È senza dubbio quello più importante. Il t-PA viene rilasciato, insieme al suo inibitore (PAI) dalle cellule endoteliali ed il sistema è regolato, con un meccanismo non ancora sufficientemente chiarito, dalla proteina C attivata. Il t-PA è presente non solo nelle cellule endoteliali, ma anche nelle piastrine, nel plasma, nei leucociti, negli epatociti e nella placenta. In condizioni di riposo circola legato al suo inibitore specifico. Pur essendo sintetizzato come singola catena il t-PA viene convertito da minime quantità di plasmina in una forma a doppia catena. La catena leggera, situata nella porzione carbossiterminale, è costituita da 253 aminoacidi, mentre la catena pesante, costituita da 278 aminoacidi, è divisa in tre porzioni che si differenziano per caratteristiche e funzioni. F-finger: è responsabile della affinità della molecola per la fibrina ed ha una struttura simile alla fibronectina. E-epidermal growth factor: comune a molte proteasi seriniche. K-kringle: doppia struttura ad anello sensibile all'azione dell'inibitore. La caratteristica del t-PA è la particolare affinità per la fibrina mentre non mostra alcun effetto demolitore sul fibrinogeno. Mentre UK è sempre in grado di attivare il PGN, il t-PA richiede come cofattore indispensabile la fibrina con la quale forma un complesso trimolecolare insieme al PGN adsorbito sulla fibrina stessa. Sul fibrinogeno tale processo non è possibile in quanto il t-PA non ha alcuna affinità per esso per cui sarà solo la plasmina libera che riesce a superare l'azione inibitrice dell'alfa-2-antiplasmina ed avere effetto.

La demolizione del fibrinogeno e della fibrina

La fibrina, una volta formatasi, va incontro a proteolisi o fibrinolisi ad opera della plasmina. Questo enzima, se libero nel plasma, può attaccare anche il fibrinogeno (fibrinogenolisi) dando luogo alla formazione di prodotti di digestione o di degradazione che sono in parte identici a quelli della fibrina ed in parte diversi. I prodotti di degradazione del fibrinogeno (FDP) e della fibrina (fdp) mantengono i determinanti antigenici del fibrinogeno. La demolizione del fibrinogeno da parte della plasmina può essere schematicamente divisa in tre stadi anche se embricati tra loro (fig. 12). In un primo stadio viene attaccata la catena A-alfa che è più sensibile all'azione plasminica nella sua porzione carbossiterminale. Subito dopo segue la demolizione della porzione amino terminale della catena B-beta comprendente l'FPB. Si forma così il frammento X il quale conservando l'FPA è ancora coagulabile ed attaccabile. Se la digestione plasminica progredisce (secondo stadio) il frammento X viene suddiviso nel frammento Y e nel frammento D, più piccolo, che va incontro ad ulteriore demolizione. Il frammento Y è dotato di

attività antiaggregante piastrinica e non è più coagulabile con trombina, anche se riesce a fissarla, esercitando così un'azione antitrombinica. Inoltre, complessandosi con il fibrinmonomero, interferisce ed altera la polimerizzazione del fibrinogeno. Nel terzo stadio infine, si ha il distacco dal frammento Y di un ulteriore frammento D e resta il frammento F. Quest'ultimo ed in minor misura il frammento D, esercitano un'azione permeabilizzante sui vasi, sono dotati di attività antitrombinica ed interferiscono con la polimerizzazione del fibrinmonomero dando luogo a complessi solubili. La digestione plasminica della fibrina segue lo stesso andamento di quella del fibrinogeno con la differenza che, essendosi formati i legami covalenti intermolecolari nel polimero di fibrina per azione del F XIIIa, non può avvenire il distacco del frammento D, ma si verifica il distacco di un frammento D-D. Il dosaggio del D-Dimero, combinato con quello degli FDP e FPA, permette una differenziazione tra fibrinolisi, fibrinogenolisi ed iperattività trombinica. La sua determinazione è pertanto utile per il monitoraggio degli stati pre-trombotici o in quelle situazioni che comportano depositi di fibrina come nella CID, nelle trombosi, nell'embolia od in corso di terapia fibrinolitica. Il dosaggio può essere eseguito utilizzando particelle di latex che portano adeso l'anticorpo monoclonale anti-DD o con metodiche ELISA.

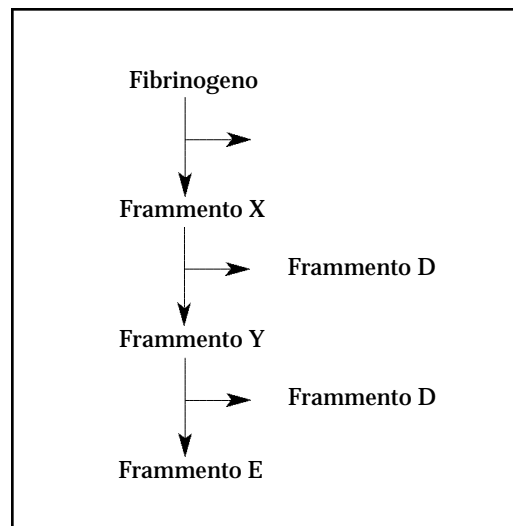


Figura 12. Rappresentazione schematica della degradazione del fibrinogeno.

Inibitori della coagulazione e della fibrinolisi

Una volta innescato il meccanismo della “cascata” emocoagulativa si ha una progressiva amplificazione del fenomeno sino ad una massiva produzione di trombina e quindi di fibrina. Risulta chiara quindi la necessità di un controllo che limiti il processo alla sede e nel momento in cui si rende necessario al fine di evitare che questo si trasformi in uno stato trombofilico o francamente trombotico. I meccanismi inibitori, oltre che fisiologici, possono essere secondari anche ad alcune patologie, particolarmente autoimmuni, o possono intervenire a seguito di terapia trasfusionale o con emoderivati.

Inibitori fisiologici della coagulazione.

Sistema antitrombina III (AT-III)-Eparina-Cofattore eparinico II.

L'AT III è una proteina di 58.000 di p.m. sintetizzata dal fegato e dalle cellule endoteliali che circola nel plasma alla concentrazione di circa 300 mg/l. L'AT III inibisce, oltre la trombina e la callicreina, diverse proteasi della via intrinseca (F IXa, F Xa, F XIa, F XIIa) attraverso la formazione di un complesso stechiometrico 1:1 tra enzima ed inibitore. L'azione dell'AT III è notevolmente accelerata dalla presenza dell'eparina la quale, legandosi ad un sito specifico dell'AT III, provoca delle modificazioni molecolari che facilitano l'attacco alle proteasi. Le cellule endoteliali sintetizzano sostanze eparinosimili come i proteoglicani e gli eparansolfati che vengono incorporati nella matrice extracellulare. Queste sostanze hanno il compito di legare l'AT III promuovendo l'inattivazione delle proteasi prodotte e particolarmente della trombina e del F Xa. L'attività anticoagulante dell'eparina risiede in una regione della molecola chiamata “domain 1” e questa regione è presente sia nelle preparazioni commerciali di eparina che nelle molecole di eparansolfato legate alle cellule endoteliali a dimostrazione di come le membrane delle cellule endoteliali abbiano dei mezzi molto sensibili ed efficienti per neutralizzare la trombina generata sopra o nelle vicinanze delle stesse. L'interazione dell'AT III con l'endotelio acquista quindi una funzione antitrombotica importante. Questo legame è inibito da molecole rilasciate dalle piastrine dopo attivazione e particolarmente dal PF4 che compete con l'AT III per i legami con l'eparansolfato. Un nuovo inibitore fisiologico, denominato cofattore eparinico II, si è aggiunto recentemente al sistema in quanto la sua azione inibitrice è accelerata dall'eparina. La sua attività funzionale viene misurata nel plasma immunodepleto di AT III in termini di capacità inibitoria della trombina in presenza di eparina. L'importanza clinica di questo sistema inibitorio fisiologico è stata dimostrata particolarmente dallo studio delle fami-

glie con carenza congenita della proteina. Il difetto congenito di AT III è generalmente trasmesso come carattere autosomico dominante e si manifesta con un elevato rischio di trombosi venose. Un deficit di AT III si può verificare anche secondariamente ad alcune patologie come nelle epatopatie croniche, per la diminuita sintesi, nella sindrome nefrosica, secondaria alla proteinuria, in corso di CID e durante l'assunzione di farmaci come la L-asparaginasi o i contraccettivi orali.

Sistema Proteina C-Proteina 5-Trombomodulina

L'osservazione e l'analisi di soggetti che sviluppano delle trombosi in età giovanile, ha confermato l'ipotesi dell'esistenza di inibitori dei fattori della coagulazione, in mancanza dei quali, per cause genetiche o acquisite, la "cascata" emocoagulativa non "frenata" conduce ad una diatesi trombofilica. Oltre l'AT III, è stato di recente associato a fenomeni di trombosi, la carenza della Proteina C (PC) e, successivamente, è stato notato che anche il deficit della Proteina S (PS), un cofattore della PC, si associa a manifestazioni cliniche di trombosi. Fanno parte di questo sistema anche l'inibitore specifico della PCa e la trombomodulina.

La PC è una glicoproteina la cui attivazione porta alla formazione di una serin proteasi: la Proteina C attivata (PCa) che catalizza in maniera specifica la proteolisi dei cofattori F VIIIa e F Va prevalentemente sulla parete vasale. Essa completa quindi l'azione inibitrice dell'AT III e svolge pertanto un importante ruolo nella regolazione del sistema coagulativo. La sintesi avviene nel fegato e, come i fattori del complesso pro trombinico, è vit-K dipendente. La molecola è costituita da una catena pesante con p.m. 41.000 e una catena leggera con p.m. 21.000 unite tra loro da ponti disolfuro. La catena pesante contiene il centro serinico attivo mentre la catena leggera, simile ai fattori vit-K dipendenti, sulla sua forma attiva può contenere fino a 10 residui di acido carbossilglutammico. L'attivazione, Ca^{++} dipendente, avviene ad opera della trombina con il clivaggio di un piccolo peptide nella parte aminotermine della catena pesante. La velocità è potenziata "in vivo" da un recettore di membrana delle cellule endoteliali: la trombomodulina che forma con la trombina un complesso capace di attivare la PC (fig. 13). La trombomodulina agisce due volte come anticoagulan-

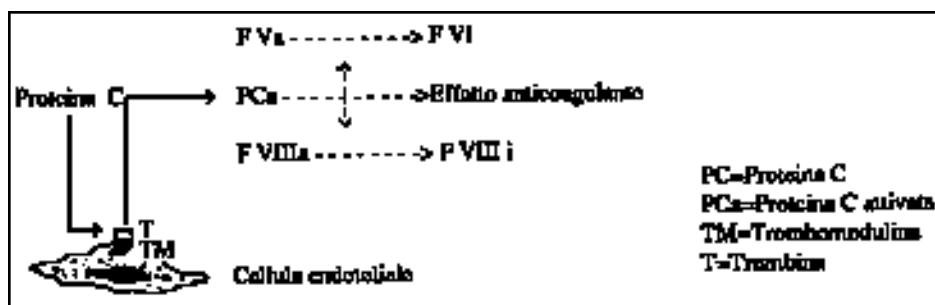


Figura 13. Attivazione della proteina C.

te: attivando con la trombina la PC inibisce il F VIII ed il F Va; complessando la trombina priva il fibrinogeno del suo enzima naturale ed impedisce l'attivazione di piastrine, FV e F VIII. Altra funzione riconosciuta alla PCa è quella di favorire un aumento dell'attività fibrinolitica. Recenti studi hanno infatti dimostrato che la PCa aumenta i livelli di t-PA a scapito del PAI e quindi accelera la trasformazione del plasminogeno in plasmina.

La Proteina S (PS) è una proteina vit-K dipendente ed è costituita da una singola catena con p.m. variabile tra 69.000 e 84.000. È cofattore della PCa nel processo di inattivazione del F Va e F VIII e per la stimolazione della fibrinolisi. Probabilmente agisce aumentando l'affinità della PC per le superfici fosfolipidiche. La PS può essere inattivata dalla trombina per clivaggio di un legame peptidico con perdita della sua attività di cofattore della PC. Circola nel plasma in forma libera per il 40% mentre la restante quota è veicolata dalla proteina legante il C4b. Per mezzo di dosaggi funzionali si determina la sola componente libera, mentre con i tests immunologici si hanno informazioni sulla concentrazione della PS in toto, legata e libera.

Gli inibitori patologici della coagulazione

Anticorpi diretti contro i fattori della coagulazione

In questo gruppo sono compresi gli inibitori del F VIII che si osservano in pazienti con emofilia A, nel post-partum ed associati a diversi disordini immunologici come l'artrite reumatoide ed il LES.

Un altro gruppo è rappresentato dagli inibitori del F Von Willebrand che si trovano in pazienti con malattia di VW o in pazienti senza precedenti anomalie dell'emostasi che sviluppano la così detta malattia di VW acquisita che, clinicamente, si caratterizza per la comparsa di lievi emorragie cutaneo-mucose in soggetti spesso affetti da malattie autoimmuni, linfoproliferative o in corso di interventi in circolazione extracorporea.

Sono stati descritti inibitori diretti contro altri fattori della coagulazione sia in soggetti congenitamente carenti che in soggetti normali con una sintomatologia notevolmente variabile.

Anticorpi antifosfolipidi: l'anticoagulante tipo lupus

L'anticoagulante tipo-lupus (LAC) è un inibitore acquisito della coagulazione che agisce sui fosfolipidi, componenti essenziali nella trasformazione della protrombina in trombina. Il LAC è una immunoglobulina appartenente alla classe IgG o IgM che possiede reattività crociata contro fosfolipidi contenuti in diverse strutture cellulari. Il LAC può essere riscontrato in pazienti con LES o altre malattie autoimmuni, in pazienti neoplastici o in trattamento con farmaci come la procainamide, la chinidina e in soggetti senza patologie

dimostrabili. La diagnosi di laboratorio si basa sulla proprietà dell'inibitore di rallentare la conversione della protrombina in trombina interferendo con la funzione del cofattore fosfolipidico della reazione. Pertanto, in presenza di LAC, il PTT risulterà allungato e non verrà corretto dall'aggiunta in proporzione 1:1 di plasma normale. Altri tests utilizzabili sono, oltre il PTTa con attivatori diversi (caolino, ac. ellagico), il tempo di coagulazione con caolino ed il test al veleno di vipera Russel diluito.

Inibitori della fibrinolisi

La plasmina, una volta generata, è in grado di digerire non solo la fibrina ma anche il fibrinogeno così come altre proteine della coagulazione con conseguente rischio emorragico da stato fibrinolitico generalizzato. L'attività proteolitica della plasmina necessita quindi di uno stretto controllo che può avvenire sia sulla plasmina stessa, tramite le antiplasmine, sia sugli attivatori, tramite gli antiattivatori. Il principale inibitore plasmatico della plasmina è l'alfa-2-antiplasmina. Infatti l'intervento delle altre antiproteasi (alfa-2-macroglobulina, alfa-1-antitripsina, AT III e C1INH) assume importanza solo quando la produzione di plasmina è così elevata da saturare completamente l'alfa-2-antiplasmina con la formazione di complessi irreversibili. L'alfa-2-antiplasmina è una proteina a singola catena con p.m. 70.000 che viene sintetizzata nel fegato. L'altro inibitore che interagisce direttamente con la plasmina è l'alfa-2-macroglobulina la quale è un inibitore di molte proteinasi e sul sistema fibrinolitico agisce come una seconda linea di difesa ed inattiva con velocità relativamente lenta la plasmina, la callicreina ed il t-PA. In caso di estesa attivazione del SF come nella CID o in corso di terapia trombolitica, la PL generata viene dapprima neutralizzata dall'alfa-2-antiplasmina. Poiché il plasminogeno è presente nel plasma ad una concentrazione molare due volte superiore all'alfa-2-antiplasmina, quest'ultima viene consumata prima che possa inattivare tutta la plasmina circolante. In questi casi l'alfa-2-macroglobulina neutralizza l'eccesso di plasmina formando con essa un complesso covalente.

L'inibizione del SF avviene anche tramite la produzione di inibitori degli attivatori. Così durante la produzione del t-PA si ha anche la contemporanea liberazione del suo inibitore specifico: PAI-1 il quale serve essenzialmente a proteggere il coagulo da una lisi troppo rapida e forma con il t-PA un complesso molto stabile ed enzimaticamente inattivo. Il PAI-1 è sintetizzato dalle cellule endoteliali, dagli epatociti ed è presente anche negli alfa granuli delle piastrine, da cui viene rilasciato dopo l'attivazione. Anche l'urochinasi è regolata da inibitori: così dal PAI-2, normalmente presente durante la gravidanza, e dal PAI-3 presente nelle urine e nel plasma. Altre sostanze regolatrici del processo fibrinolitico sono l'HRG (glicoproteina ricca di istidina) e la trombospondina nonché la fibrina stessa che, oltre ad essere la molecola target del sistema fibrinolitico ha anche una funzione regolatrice sul sistema stesso.

Le malattie emorragiche

La fisiologia dei processi emostatici dimostra che tutte le componenti che partecipano a questo sistema interagiscono continuamente per cui un eccessivo schematismo non può essere utilizzato allorché si pone la necessità di una corretta diagnosi di malattia emorragica, ma si deve ricorrere a tutta una serie di indagini che, globalmente, esplorino tutti i vari momenti e che permettano di evidenziare la o le componenti che risultano compromesse. Esamineremo quindi alcune delle più frequenti sindromi emorragiche e gli esami, attuabili in un laboratorio di piccole dimensioni, che possano essere di aiuto per una corretta diagnosi.

Malattie emorragiche da causa vascolare

Manifestazioni emorragiche che, quasi sempre assumono il carattere della porpora, possono essere provocate da malformazioni strutturali dei vasi e/o del tessuto connettivo (tab. 6). Possono essere congenite o essere provocate da un danno vascolare acquisito con un meccanismo allergico, infettivo o di altra natura come nelle paraproteinemie. Vi sono anche le così dette "porpore benigne", non associate ad alcuna malattia, la cui importanza clinica è praticamente irrilevante e la cui patogenesi è sconosciuta.

<p>Malformazioni strutturali dei vasi - Congenite (m. di Rendu-Osler; s. di Ehlers-Danlos; s. di Farlan; Pseudoxantoma elastico - Acquisite (porpora senile; scorbuto)</p>	<p>Vasculiti infettive - Batteriche; virali; rickettsie</p> <p>Porpora paraproteinica</p>
<p>Vasculiti immuni - S. di Schonlein-Henoch; porpora fulminante; porpora da farmaci (penicillina, aspirina etc.)</p>	<p>Altre: idiopatiche; ortostatiche; meccaniche</p>

Tabella 6. Malattie emorragiche da cause vascolari.

Trombocitopenie

Per trombocitopenie si intende una diminuzione del numero delle piastrine circolanti conseguente a diminuita produzione, aumentata distruzione, aumentato consumo o emodiluizione e distribuzione impropria.

Trombocitopenie da diminuita produzione

Ipeplasie megacariocitiche cegenite e acquisite

Le ipoplasie megacariocitiche congenite possono essere isolate o associate ad ipoplasia delle altre serie midollari, nonché ad anomalie di altri sistemi ed apparati. Le forme acquisite sono più frequenti e possono presentarsi isolate o associate ad una mielopatia involutiva globale. Alcune varietà, associate a LES o timoma, sono su base immunologica, mentre le forme idiopatiche sono espressione di un danno della cellula staminale totipotente. Una piastrinopenia secondaria ad una ipoplasia midollare si può instaurare anche dopo esposizione a farmaci quali il piramidone o suoi derivati, il cloranfenicolo, a sostanze chimiche come i solventi organici o i diserbanti, nell'alcoolismo o per infezioni da HBV, CMV e rosolia.

Trembecitepeiesi inefficace

In queste forme (tab. 7) è presente un numero di megacariociti normale o aumentato ed è possibile individuare delle forme congenite o acquisite

Piastrinepenie da disordini del cent relle della trenibepeiesi.

Derivano da una disregolazione dei diversi fattori umorali che vengono definiti "trombopoictina" e che sarebbero prodotti da cellule diffuse in tutto l'organismo.

Congenite:	s. di Wiskott-Aldrich; s. di Bernard-Soulier; anomalie di May-Hegglin; Gray platelet syndrome
Acquisite:	Deficit Vit. B12; deficit di folati; Emoglobinuria paratossica notturna; s. miclodisplastiche; terapie antitumorali

Tabella 7. Piastrinopenie da trombocitopoiesi inefficace.

Trombocitopenie da aumentata distruzione

Queste forme possono essere secondarie a cause extracorporeali (immunologiche o infettive) oppure intracorporeali (piastrinopatie).

Piastrinopatie immunologiche

Le piastrinopatie immunologiche (tab. 8) sono un gruppo di affezioni caratterizzate da riduzione del numero di piastrine nel sangue periferico dovute ad una accelerata distruzione delle piastrine attraverso un meccanismo immunologico. Gli anticorpi che intervengono possono essere diretti verso autoantigeni piastrinici, antigeni autologhi o eterologhi adsorbiti sulla superficie piastrinica, anticorpi diretti verso alloantigeni piastrinici derivanti da precedenti trasfusioni o gravidanze oppure dall'assorbimento sulla superficie piastrinica di immunocomplessi circolanti. La distruzione piastrinica può essere dovuta ad una successiva lisi operata dal complemento oppure a

Primitive:	Porpora trombocitopenica idiopatica (acuta e cronica)
Secondarie:	da alloimmunizzazione (neonatale, post-trasfusionale); a farmaci; ad infezioni, a mesechimopatie, a malattie linfoproliferative

Tabella 8. Classificazione clinica delle piastrinopenie immunologiche.

fagocitosi da parte del sistema monocito-macrofagico. Gli aspetti clinici ed ematologici sono simili nelle diverse forme, indipendentemente dalla causa, e dipendono soprattutto dalla intensità della piastrinopenia. Si possono avere infatti delle forme completamente asintomatiche, altre che vengono evidenziate occasionalmente in corso di esami ematoclinici, altre ancora, le più frequenti, per la comparsa di porpora cutaneo mucosa spontanea, ecchimosi per traumi anche modesti, sanguinamento gengivale, emorragie gastrointestinali. La diagnosi di piastrinopenia immunologica richiede la dimostrazione di Ig e/o di immunocomplessi sulla superficie piastrinica e si basano o sulla ricerca e quantificazione dei fenomeni secondari alla reazione immunologica, quali aggregazione piastrinica, liberazione di PF3, inibizione della retrazione del coagulo, fissazione del complemento. Attualmente la ricerca degli anticorpi antiplastrine viene effettuata in immunofluorescenza, in ELISA o utilizzando emazie sensibilizzate con anti-IgG che si legano agli anticorpi adesi alle piastrine. Un altro importante dato di laboratorio è rappresentato dalla riduzione della sopravvivenza di piastrine isologhe o autologhe marcate con Cr⁵¹ o Indio¹¹¹. Il numero delle piastrine è ridotto, il tempo di emorragia è allungato mentre i tests emocoagulativi sono tutti nei limiti della norma.

- Piastrinopenie immunologiche primitive

La porpora trombocitopenica idiopatica (PTI) è una sindrome acquisita, ad eziologia ignota, a patogenesi immune, caratterizzata da piastrinopenia per aumentata distruzione periferica delle piastrine e da un numero normale o aumentato di megacariociti midollari. La PTI può essere acuta o cronica.

La PTI acuta ha un esordio improvviso ed un decorso rapido con esito in guarigione. Questa forma colpisce prevalentemente le prime età della vita e frequentemente è preceduta da una infezione virale. Si pensa che la patogenesi sia legata all'adsorbimento di antigeni virali sulla superficie delle piastrine ai quali si legano anticorpi antiviral e il sistema piastrina-virus-antivirus viene fagocitato dal sistema macrofagico o, in alternativa, che immunocomplessi circolanti costituiti da antigeni virali e da anticorpi specifici vengano fissati alla superficie delle piastrine ad opera del recettore per il frammento Fc delle IgG con conseguente distruzione piastrinica per attivazione del complemento e per fagocitosi macrofagica. La sintomatologia clinica si manifesta con l'improvvisa comparsa di porpora cutaneo-mucosa e rapida caduta delle piastrine circolanti. La malattia si risolve spontaneamente entro uno o quattro-sei mesi dall'esordio.

L'esordio della PTI cronica è insidioso, la guarigione è più rara ed il decorso è fluttuante. La sindrome è caratterizzata da una piastrinopenia ed eziologia sconosciuta, provocata frequentemente da autoanticorpi antiplastrine anche se non sempre può essere escluso il ruolo patogenetico di etero antigeni. Le Ig appartengono prevalentemente alle IgG, da sole o associate ad IgA o IgM. Raramente si riscontrano solo IgM. Le IgG si comportano come paranticorpi che si legano sia alle piastrine autologhe che omologhe nonché ai megacariociti. La specificità anticorpale appare diretta contro antigeni propri delle piastrine e, più specificamente, sembrano essere coinvolte le GP di membrana IIb e III. La sindrome emorragica si manifesta prevalentemente nel sesso femminile (3:1), ha un esordio lento ed insidioso e si presenta con epistassi, gengivorragie, prolungato stillicidio ematico da piccole ferite ed assenza di splenomegalia. Le perdite emorragiche possono essere causa di anemie sideropeniche.

- Piastrinopenie immunologiche secondarie

Tra queste piastrinopenie ricordiamo la neonatale, provocata dal passaggio transplacentare di alloanticorpi IgG prodotti dalla madre e diretti contro antigeni di derivazione paterna, presenti sulle piastrine del feto. Gli anticorpi sono rivolti verso gli antigeni del sistema HLA o verso antigeni propri delle piastrine. Le manifestazioni emorragiche si risolvono spontaneamente, ma sono stati segnalati, seppur raramente, decessi per emorragia cerebrale.

La porpora post-trasfusionale è una rara sindrome emorragica che si manifesta 7-10 giorni dopo la trasfusione, particolarmente in donne che hanno avuto gravidanze o trasfusioni. La specificità anticorpale è prevalentemente rivolta verso l'antigene proprio delle piastrine P1 A1.

Le piastrinopenie da farmaci sono causate da numerosi composti (tab. 9). La distruzione piastrinica è provocata dalla produzione di anticorpi che possono essere rivolti contro il farmaco alla superficie piastrinica, contro il complesso farmaco-membrana o contro un neoantigene piastrinico indotto dal farmaco. Il quadro clinico è caratterizzato da una sindrome emorragica acuta che insorge a breve distanza dall'assunzione del farmaco. Diverse patologie, infine, possono essere causa di piastrinopenia immunologica e tra queste alcune mesenchimopatie, particolarmente il LES, infezioni virali o setticemie provocate da batteri sia Gram positivi che negativi, nei tumori solidi e nelle malattie linfoproliferative. Una porpora trombocitopenica viene frequentemente segnalata in soggetti con infezione da HIV.

Chinina	Sulfamidici	Cefalotina
Chinidina	Aminopirina	Trimetropin
Clorochina	Clorotiazide	Sulfametossazolo
Sedormid	Metildopa	Eparina
Ac. acetil salicilico	Rifampicina	

Tabella 9. Farmaci responsabili di piastrinopenie immunologiche.

Piastrinopatie

Queste forme con aumentata distruzione delle piastrine possono essere congenite o acquisite. Mentre per le prime è possibile tentare una classificazione a livello molecolare delle cause, per le seconde questo approccio è difficoltoso per la complessità eziologica e patogenetica.

- Le piastrinopatie congenite possono essere legate ad alterazioni della membrana citoplasmatica, dei granuli di deposito o alterazioni legate a difetti metabolici.

La sindrome di Bernard-Soulier è una piastrinopatia ereditata con meccanismo autosomico recessivo, caratterizzata dalla riduzione o dalla assenza della GP Ib, V e IX della membrana piastrinica, dalla presenza in circolo di piastrine giganti e, frequentemente, anche da un deficit quantitativo delle piastrine. Il deficit delle proteine di membrana non consente la normale adesione delle piastrine alla parete vasale lesa e questo si evidenzia con un tempo di emorragia particolarmente allungato, una ridotta o assente adesività piastrinica in vitro ed anche una riduzione dell'aggregazione da ristocetina. La sindrome emorragica comprende in genere epistassi, gengivorragie, menorragie ed emorragie post-traumatiche o chirurgiche.

La tromboastenia di Glanzman è una piastrinopatia ereditata con meccanismo autosomico recessivo e caratterizzata dalla carenza o da un'anomala composizione delle glicoproteine IIb-IIIa della membrana piastrinica che, come detto in precedenza, rappresenta il sito di legame per il fibrinogeno. L'anomalia del recettore del fibrinogeno impedisce l'aggregazione piastrinica che si ripercuote anche sulla reazione di rilascio e sulla retrazione del coagulo. La sintomatologia è sovrapponibile alla malattia di Bernard-Soulier.

Il deficit di glicoproteina Ia è stato scoperto recentemente, si tratta di una patologia estremamente rara che si manifesta con un deficit di adesione piastrinica.

Le piastrinopatie congenite da disordini metabolici sono conseguenti ad una alterazione del metabolismo dell'acido arachidonico che può essere localizzato a livello del rilascio dell'acido arachidonico da parte dei fosfolipidi di membrana o dovute ad un deficit qualitativo a quantitativo di cicloossigenasi o di tromboxano sintetasi.

Nel difetto dei granuli densi è presente una deplezione di tutte le sostanze contenute in questi granuli ed in particolare vi è una riduzione di ATP e ADP nel pool di deposito. La diatesi emorragica è normalmente modesta ed è correlabile con l'entità del deficit di ADP intrapiastrinico.

Il difetto dei granuli alfa, detto anche "sindrome delle piastrine grigie" per l'aspetto delle piastrine sugli strisci del sangue periferico, ha una sintomatologia emorragica generalmente modesta.

-Le piastrinopatie acquisite si riscontrano in corso di malattie mieloproliferative, nell'uremia, nell'insufficienza epatica grave ed in alcune forme autoimmuni con quadri emorragici e trombotici dovuti probabilmente ad una anomalia funzionale delle piastrine.

Piastrinopenie da aumentato consumo o da emodiluizione

Nella CID la piastrinopenia, che nella forma grave non può essere compensata dalla produzione midollare, è una delle cause del grave sanguinamento insieme al deficit di fibrinogeno, di altri fattori della coagulazione e degli FDP. Anche in corso di trasfusione massiva (sostituzione del 50% del volume ematico), allorché la terapia viene effettuata con sangue conservato in emoteca, si può andare incontro ad una piastrinopenia da emodiluizione.

Piastrinopenia da distribuzione impropria

Le splenomegalie e gli emangiomi giganti possono essere causa di piastrinopenie per sequestro nei cordoni e nei seni della polpa rossa le prime, nel letto vascolare le seconde.

Malattie emorragiche da difetti plasmatici

Queste malattie si distinguono in congenite ed acquisite. Le forme congenite (tab. 10, 11, 12) sono geneticamente determinate e quasi sempre compaiono in età pediatrica con un'anamnesi familiare positiva e con una sindrome emorragica sempre di tipo "plasmatico". Il numero delle piastrine è sempre normale ad eccezione della malattia di Von Willebrand in cui il difetto del F VIII coinvolge la funzionalità piastrinica. La carenza di un fattore della coagulazione può essere dovuto in genere ad una assente o ridotta sintesi oppure alla sintesi di una molecola anormale.

Le forme acquisite (tab. 13) sono sempre secondarie ad altre patologie alle quali partecipano in maniera variamente importante. In queste condizioni la carenza del fattore della coagulazione potrà essere legato più spesso alla formazione di anticorpi specifici o ad una eccessiva distruzione di questo.

Fattore alterato	Malattia	Ereditarietà	Prevalenza
F VIII	Emofilia A	Cromosoma X	1: 10.000 (85%)
	Von Willebrand Ia, IIa, IIb IIc, III	Autosomica dominante Autosomica recessiva	
F IX	Emofilia B	Cromosoma X	1: 90.000 (13%)
F XI	Emofilia C	Autosomico recessivo	1: 200.000 (1%)
Altre	v. tabella 11	Autosomico recessivo	1%

Tabella 10. Coagulopatie congenite.

Difetti del fibrinogeno	Deficit ed anomalie del F X
- Afibrinogenemia	Deficit ed anomalie del F XII
- Disfibrinogenemia	Difetti della precallicreina
Difetti del F II	Difetti dell'HMWK
- Ipoprotrombinemia	Difetti combinati:FV e F VII; F VII e F VIII;
- Disprotrombinemia	del complesso protrombinico;
Deficit ed anomalie del F V	F VII ed Emofilia A, Emofilia A e B
Deficit ed anomalie del F VII	

Tabella 11. Coagulopatie congenite.

Deficit di alfa-2-antiplasmina
Deficit degli attivatori della fibrinolisi
Difetto di plasminogeno

Tabella 12. Difetti congeniti del sistema fibrinolitico.

Deficit di sintesi epatica (epatopatie, deficit di vit-K, malattia emorragica del neonato)
Inibitori (anticorpali, non anticorpali)
Coagulazione intravascolare disseminata
Iperfibrinolisi patologica

Tabella 13. Coagulopatie acquisite.

Le sindromi emofiliche

Anche se per sindromi emofiliche si intendono quelle sindromi emorragiche caratterizzate dalla totale o parziale carenza di attività di uno dei fattori plasmatici della coagulazione, da un punto di vista storico e genetico questa definizione viene riservata a quelle forme di trasmissione diagenica dovute a carenza del F VIII (Emofilia A) o del F IX (Emofilia B) e si è soliti comprendere anche la sindrome emorragica dovuta a carenza di F XI (Emofilia C).

E' opportuno fare una breve sintesi delle caratteristiche del complesso F VIII/VW in quanto solo recentemente è stato possibile il suo isolamento e la sua caratterizzazione fisico chimica e strutturale.

Il F VIII plasmatico (tab. 14) è un complesso di due componenti con proprietà funzionali, biochimiche, immunologiche e sotto diverso controllo genetico. Una delle due componenti, detto F VIII:C (fattore antiemofilico) possiede l'attività procoagulante. L'altra, di maggior peso molecolare, è detta proteina correlata al F VIII (F VIIIIR) o fattore Von Willebrand (F VW) e prende parte ai processi di adesione piastrinica al subendotelio dei vasi. Il F VIII:C è sintetizzato nel fegato, ma anche in

F VIII/VWF	Fattore VIII/Fattore Von Willebrand
F VIII:C	Fattore VIII coagulante, fattore antiemofilico, (attività procoagulante misurata mediante metodiche funzionali)
F VIII:C Ag	Fattore VIII coagulante antigene (misurata con tecniche immunologiche usando anticorpi omologhi verso il F VIII/C)
F VIII/R (VWF)	Fattore Von Willebrand come attività nel tempo di sanguinamento
F VIII/R Ag	Fattore VIII related antigen, Antigene correlato al FVIII misurato immunologicamente usando anticorpi eterologhi contro il F VIII/VWF
F VIII/RRCo	Fattore VIII cofattore della Ristocetina Attività correlata al F VIII richiesta per l'aggregazione di piastrine indotta dall'antibiotico Ristocetina

Tabella 14. Nomenclatura proposta dall'International Committee on Thrombosis and Haemostasis per la descrizione delle diverse attività del F VII.

sedi extraepatiche non sufficientemente conosciute e svolge il ruolo di cofattore nell'attivazione enzimatica del FX da parte del FIXa. L'attivazione del F VIII richiede la presenza di tracce di trombina. Il gene che codifica il F VIII:C è localizzato nel cromosoma X.

Il F VW è una glicoproteina multimerica che si trova nel plasma unita in un complesso con la proteina procoagulante del F VIII sul quale agisce come stabilizzatore aumentandone l'emivita in circolo. Agisce come proteina carrier e concentra il F VIII nel luogo dove deve avvenire l'emostasi. Il deficit del F VIII:C nel plasma dei pazienti con m. di VW, nei casi in cui il FVW è gravemente ridotto, si spiega con la mancanza della funzione di carrier del F VIII esplicita dal F VW. Il 99% del complesso è formato dal F WV mentre la rimanente quota è rappresentata dal F VIII (fattore antiemofilico) la cui deficienza è responsabile dell'Emofilia A. Il F VW circolante nel plasma è costituito da una serie di multimeri differenti; il p.m. varia da 500.000 ad oltre 12.000.000. Questi grossi multimeri hanno come costituente un'unica subunità a catena singola di 225.000. La sintesi del F VW avviene nei megacariociti e nelle cellule endoteliali le quali lo riversano sia in direzione del lume vascolare sia verso il subendotelio entrando in questo caso a far parte della matrice endoteliale. Il gene che codifica la sintesi del F VW è localizzato sul cromosoma 12: esso dà luogo alla sintesi di una proteina denominata pre-pro-F VW. Dopo rimozione di un frammento di 22 aminoacidi, detto peptide di segnale, tale proteina viene glicosilata nel reticolo endoplasmatico liscio dando origine al pro-F VW. Dopo ulteriore frammentazione si ha la produzione di F VW "maturo". Nel plasma, proteasi non ancora identificate, agiscono sulle unità terminali dei multimeri circolanti staccando una o più unità protomeriche e dando luogo così a famiglie di multimeri di diverso p.m. Il F VW è essenziale per una emostasi primaria. Esso è infatti in grado di ancorarsi al sito di lesione vascolare legandosi al collagene subendoteliale e, probabilmente, ad altri recettori non identificati. Sulla superficie della mem-

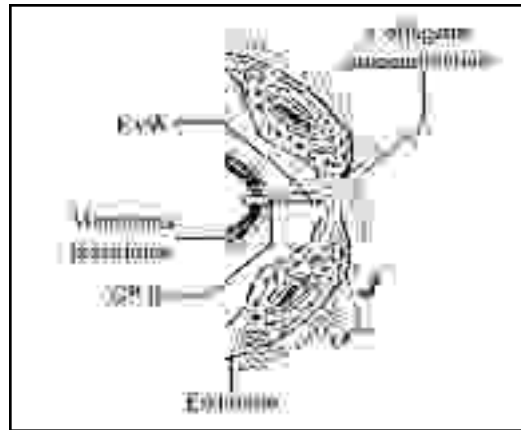


Figura 14. Processo di adesione del F v W alla superficie piastrinica ed al collagene sottoendoteliale.

brana piastrinica il F v W si ancora tramite la GP Ib (fig. 14). La ristocetina provoca in vitro una aggregazione delle piastrine causando la loro agglutinazione. La ristocetina consente al F v W che si lega alla GP Ib delle piastrine di fare da "ponte" fra piastrina e piastrina. Inoltre il F v W si lega ad un secondo recettore piastrinico costituito dalla GP IIb/IIIa che viene esposta alla superficie delle piastrine attivate e viene utilizzato anche dal fibrinogeno. In sintesi il F v W può fare da ponte fra piastrina e piastrina e fra trombo piastrinico ed endotelio stabilizzando così l'ammasso piastrinico e può ancorarlo al sito di lesione.

Emofilia A

È una malattia emorragica congenita dovuta all'assenza, alla diminuzione o all'alterata funzione del F VIII ed in funzione dell'entità del deficit le manifestazioni emorragiche variano in frequenza e gravità. La trasmissione del carattere è legata alla presenza sul cromosoma X di un allele mutante recessivo nel gene che controlla la sintesi del F VIII per cui i maschi sono sempre malati (emizigoti X^e Y). Le femmine possono essere o non essere ammalate (portatrici eterozigoti X^e X) o malate (omozigoti X^e X^e), ma quest'ultima evenienza è molto rara in quanto presuppone l'unione tra un uomo malato (X^e Y) con una donna portatrice (X^e X). La maggior parte delle femmine portatrici (eterozigote X^e X) produce in media un 50% della quantità normale di F VIII:C, quantità sufficiente per impedire una diatesi emorragica, ma insufficiente per svelare con i tests di I livello lo stato di portatrice. Inoltre in molte portatrici il livello di F VIII coagulante è quasi normale per il fenomeno della inattivazione casuale del cromosoma X (ipotesi della Lyon). Per la ricerca della femmina portatrice viene dosata contemporaneamente il F VIII coagulante con tests specifici ed il F VIII Ag con anticorpi anti-F VIII essendo l'attività biologica (F VIII:C) inferiore alla concentrazione della proteina (F VIII:R Ag). Questa metodica, pur avendo una certa utilità, manca di sensibilità e può portare ad una errata diagnosi.

Le manifestazioni emorragiche più comuni ed importanti sono gli ematomi, gli

ematomi, le emorragie gastroenteriche ed il sanguinamento post-chirurgico e post-traumatico. Gli ematomi sono caratteristici delle forme gravi e compaiono in genere entro il terzo anno di vita o comunque all'inizio della deambulazione. Con maggior frequenza sono colpite le articolazioni degli arti inferiori (anca, ginocchio, caviglie) ed il gomito. La ripetizione degli ematomi è causa di un ispessimento della membrana sinoviale, di una fibrosi dei tessuti periarticolari, della distruzione e della atrofia delle parti cartilaginee ed ossee, che conducono all'anchilosi dell'articolazione. Gli ematomi, grandi versamenti ematici, possono essere sottocutanei, sottofasciali od intramuscolari. La sintomatologia clinica è correlata al grado di carenza funzionale del F VIII e le varie forme vengono distinte in rapporto alla gravità: nella forma grave (carenza compresa tra 2-5%) le emorragie spontanee sono frequenti e gravi; nelle forme lievi (carenza tra 10 e 25%) gli ematomi e le emorragie spontanee sono rare. L'emorragia chirurgica e traumatica abbastanza gravi e spesso inattese. La diagnosi viene fatta nell'adulto; la subemofilia (carenza fra il 25 ed il 50%) si caratterizza per emorragie a seguito di gravi traumi ed interventi di chirurgia maggiore od estrazioni dentarie.

L'unico test di primo livello alterato è il PTT che, come detto in precedenza, indaga la via intrinseca della coagulazione. E' necessario eseguire il test anche su una miscela tra plasma del paziente e plasma normale per escludere la presenza di un inibitore: infatti circa il 12% dei pazienti con emofilia grave presenta anticorpi circolanti contro il F VIII che si sviluppano in seguito al trattamento sostitutivo. La diagnosi viene confermata dalla determinazione del F VIII:C.

Emofilia B (deficit del F IX)

La genetica, la fisiopatologia ed il quadro clinico dell'emofilia B sono identici a quelli dell'emofilia A. Anche in questo caso la diagnosi di laboratorio si basa sul dosaggio dell'attività coagulante del F IX, dopo aver osservato, nei tests di I livello, un allungamento del PTT.

Emofilia C (deficit del F XI)

Il deficit del F XI è trasmesso come un fattore autosomico recessivo incompleto ed il difetto sembra essere quantitativo. Le manifestazioni emorragiche spontanee sono molto più rare e lievi che nelle altre forme, mentre costanti sono le emorragie chirurgiche e traumatiche.

Coagulopatie congenite "non emofiliche"

Questo tipo di alterazioni, come detto in precedenza, si presentano meno frequentemente delle Sindromi "emofiliche" e possono dar luogo ad emorragie (per deficit, ad esempio, del complesso protrombinico), a trombosi (per deficit di AT III); o a nessuna sintomatologia (ad esempio nel deficit del F XIII).

Difetti del fibrinogeno

I difetti congeniti del fibrinogeno comprendono l'a/ipofibrinogenemia. La trasmissione ereditaria dell'afibrinogenemia può essere di due tipi: uno autosomico recessivo e l'altro autosomico intermedio. Questi pazienti mostrano una tendenza emorragica particolarmente grave in età neonatale e pediatrica.

La caratteristica di laboratorio di questa alterazione è la mancanza di formazione del coagulo nei tests di I livello (TT, PTT e PT). Oltre ai difetti quantitativi sono state descritte anche numerose anomalie della molecola (disfibrinogenemie). La modalità di trasmissione ereditaria è autosomica dominante a codominante, ma sono stati anche segnalati casi con trasmissione recessiva. L'anormalità viene riscontrata con un prolungamento del PT con livelli normali dei fattori del complesso protrombinico. Si determina allora il tempo di trombina e di reptilasi che rivelano una anomalie della formazione della fibrina che non è correlata con il basso livello di fibrinogeno.

Difetti del F II

Il deficit del F II (ipoprotrombinemia congenita) si trasmette con modalità autosomica incompletamente recessiva e presenta manifestazioni cliniche molto severe. I reperti di laboratorio consistono in un lieve prolungamento del PT e del PTT. Anomalie del F II (disprotrombinemie) si presentano con un quadro clinico variabile, ma comunque più modesto rispetto alle forme con deficit di F II.

Difetti del F V

La modalità di trasmissione è autosomica incompletamente recessiva. Clinicamente si manifestano con ecchimosi, epistassi e menometrorragie. Il PT e il PTT sono prolungati e corretti dall'aggiunta di plasma normale adsorbito ma non dall'aggiunta di siero normale.

Difetti del F VII

La modalità di trasmissione ereditaria è autosomica intermedia ed il quadro clinico è variabile, ma non sempre correla con il livello di fattore mancante. Il PT è prolungato e viene corretto dal siero normale mentre il PTT è normale. Sono state descritte anche anomalie della struttura del F VII (disproconvertinemie).

Difetti del F X

Il deficit del F X è uno dei più rari difetti coagulativi, la trasmissione è di tipo autosomico incompletamente recessivo ed il quadro clinico è caratterizzato da epistassi, ecchimosi ed emorragie gastrointestinali. Il PT ed il PTT sono prolungati e sono corretti dall'aggiunta di siero normale ma non di pla-

sma adsorbito. Il prolungamento del tempo di coagulazione con il veleno di vipera Russel che veniva utilizzato come discriminante tra il deficit di F X e di F VIII non è, allo stato attuale delle conoscenze, sempre valido. Sono state descritte anche forme anomale di F X che possono mostrare allungamenti isolati del PT a del PTT creando delle difficoltà diagnostiche. Il dosaggio del F X con metodi cromogenici può risolvere questi dubbi.

Deficienze dei fattori coagulativi della fase di contatto

Rientrano in questo gruppo i difetti di F XII, di PK, di HMWK e di F XI. Mentre i primi tre sono clinicamente silenti e l'anomalia viene normalmente svelata in seguito ad esami di laboratorio alternati (PTT prolungato) il deficit di F XI è stato descritto tra le sindromi emofiliche.

Difetti del F XIII

Il deficit di F XIII è una coagulopatia congenita rara con trasmissione autosomica incompletamente o recessiva. Clinicamente si può manifestare oltre che con emorragie anche con ritardi nella cicatrizzazione delle ferite e con la formazione di cheloidi. La solubilità del coagulo in soluzione 5 M di urea o in acido monoiodoacetico è un dato costante di laboratorio. La terapia si basa sull'impiego di plasma fresco o congelato o di concentrati del fattore mancante.

Difetti degli inibitori della coagulazione

Deficit qualitativi e quantitativi dei AT III, proteina C e proteina S possono provocare una diatesi trombofilica. La trasmissione è generalmente di tipo autosomico dominante. La diagnosi laboratoristica deve essere funzionale ed immunologica al fine di discriminare i deficit qualitativi da quelli quantitativi.

Malattia di Von Willebrand

La malattia di Von Willebrand (VWD) è una malattia emorragica ereditaria, ad espressione clinica variabile, dovuta ad un difetto qualitativo della molecola del Fattore Von Willebrand (FVW). Viene trasmessa con carattere autosomico per cui può interessare sia maschi che le femmine. In alcuni casi è stato ipotizzato un difettoso rilascio della molecola dall'endotelio oppure una sua abnorme proteolisi. Sono state documentate anche forme acquisite secondarie a malattie mieloproliferative o in corso di circolazione extracorporea. Recenti indagini epidemiologiche hanno documentato una prevalenza della malattia 100 volte superiore all'emofilia A che veniva ritenuta la coagulopatia congenita più frequente.

La patogenesi della malattia di VW può, alla luce delle recenti conoscenze sulla genetica e sulla struttura biochimica di questa molecola, derivare da tre difetti distinti:

- a) un difetto a livello del gene situato nel cromosoma 12 che sintetizza la subunità di base (delezioni o alterazioni geniche)
- b) anomalie di deposito o secrezione nelle cellule endoteliali e forse nelle piastrine
- c) mancanza o difetto dell'enzima responsabile del clivaggio del propeptide o delle prateasi depolimerizzanti.

La classificazione viene effettuata in tipi e sottotipi in funzione del deficit globale e/o dei soli multimeri ad alto p.m. ed in base alla trasmissione genetica.

Secondo questa classificazione si distinguono tre tipi principali i quali a loro volta vengono ulteriormente divisi in sottotipi. Più in generale possono essere distinte forme con deficit quantitativo (tipo I e III) da quelle caratterizzate da un deficit qualitativo (tipo IIA, IIB, IIC, IID). Il quadro clinico varia di severità secondo l'età di insorgenza e secondo le modalità di trasmissione della malattia: infatti l'anomalia genetica, che rappresenta la base patogenetica, ha una diversa espressività fenotipica fra i diversi ceppi familiari e, nello stesso ceppo familiare, tra i diversi componenti affetti. Le manifestazioni emorragiche che dominano il quadro clinico sono cutanee, mucose e viscerali. Quelle cutanee sono rappresentate da piccole ecchimosi spontanee o dopo lievi traumi mentre rare sono le petecchie e la porpora. Le manifestazioni emorragiche mucose sono rappresentate da epistassi spontanee e recidivanti e da gengivorragie. Le emorragie gastrointestinali sono possibili e si manifestano con melena, emorragie dell'apparato urinario o del sistema nervoso centrale.

La diagnostica di laboratorio si basa sulla dimostrazione che una o più funzioni del FVW sono difettose (tab. 15). E' abbastanza semplice nei casi

T.E	PT	PTT	Diagnosi
A	N	N	Piastrinopenia o piastrinopatia
N	N	A	Emofilia A o B o C
A	N	A	Malattia di VW

Tabella 15. Difetti dell'emostasi nelle sindromi emofiliche valutati con i test di I livello. A= Anormale; N= Normale.

“classici”, in cui sono chiaramente evidenziabili i tre elementi patogenetici fondamentali: l'allungamento del tempo di emorragia, la riduzione dell'adesività piastrinica e del livello plasmatico di F VIII:C, tanto più se la familiarità dell'affezione emorragica e la caratteristica della trasmissione ereditaria risultano dall'anamnesi. La valutazione può essere eseguita con:

- il tempo di emorragia che riflette il ruolo del FVW nell'emostasi primaria. Si deve tener presente però la scarsa sensibilità del test, infatti anche in soggetti con diagnosi accertata, essa non sempre è allungata.

- La determinazione immunologica (FVW:Ag) che valuta la quantità di proteina, ma non la funzionalità.
 - L'attività F VTIT:C che riflette il ruolo del F VW nello stabilizzare il F VIII:C in circolo. La riduzione del F VIII:C rappresenta un altro elemento diagnostico importante, ma non sempre necessariamente e, di regola, si accompagna con una riduzione dell'antigene correlato con il F VIII.
 - L'attività di cofattore della ristocetina che misura la capacità del F VW di legarsi ai recettori piastrinici ed agglutinarli. Questo sembra il test più sensibile. La riduzione del F VW:Rcof deve essere confermata due volte con o senza riduzione di F VW:Ag e F VITT:C.
- La diagnosi completa di m. di VW deve essere accompagnata dalla determinazione della risposta alla infusione di DDAVP. Questo farmaco provoca il rilascio dalle scorte endoteliali del F VW immagazzinato e permette di chiarire la fisiopatologia del difetto ed accertare le possibilità terapeutiche.

Coagulazione intravascolare disseminata

Con il termine di coagulazione intravascolare disseminata (CID) si intende una sindrome trombotico emorragica acuta, subacuta o cronica, caratterizzata da un aumento in circolo dei monomeri di fibrina, di fibrinopeptidi e degli FDP, spesso da un deficit di piastrine, fibrinogeno, protrombina, dei F V, F VIII, F X e F XII, dell'AT III e della proteina C. La massiva immissione in circolo di sostanze procoagulanti e/o un esteso danno degli endoteli vascolari producono un'attivazione dei processi emocoagulativi. I trombi di fibrina e di piastrine occludono il microcircolo con conseguenti insufficienze di organo. Il consumo delle piastrine e dei fattori della coagulazione, nonché l'iperfibrinolisi reattiva, sono alla base delle manifestazioni emorragiche.

Le cause sono numerose e comprendono infezioni generalizzate, neoplasie, lesioni tessutali estese (ustioni, colpo di calore, fratture ossee, traumi cranici e toracici), lo shock, interventi chirurgici, complicanze ostetriche (aborto settico, ritenzione di feto morto, abruptio placentae, embolia di liquido amniotico, rottura di utero), epatopatie, emolisi intravascolare, malformazioni vascolari, infusione di complessi protrombinici attivati e veleno di serpenti. Il momento scatenante della CID è la generazione intravascolare di un eccesso di trombina causato da numerosi fattori. L'attivazione disseminata dei processi coagulativi all'interno dei vasi conduce ad un'accelerato consumo dei fattori della coagulazione non sufficientemente compensato da un'aumentata sintesi ed un'accelerata neutralizzazione delle antiproteasi plasmatiche con conseguente deficit di AT III, della Proteina C e di C1-INAH. Tutto questo, associato ad un rapido consumo delle piastrine, provoca un grave difetto dell'emostasi con conseguenti manifestazioni emorragiche. Trombi di fibrina e di piastrine occludono il microcircolo di vari organi con conseguente necrosi ischemica e l'estesa deposizione di microfilamenti nei vasi provoca un'anemia emolitica microangiopatica. L'attivazione della fibrinolisi è reattiva alla deposizione di fibrina; la plasmina libera in circolo digerisce il fibrinogeno, il F V ed il F VIII deprimendo ulteriormente il livello plasmatico

di tali fattori. Gli FDP aggravano la sindrome emorragica interferendo con la funzione piastrinica, con la trombina e con meccanismi di polimerizzazione della fibrina.

La diagnosi di CID è clinica e laboratoristica. I segni clinici sono prima di tutto la presenza di una patologia di base in grado di scatenare una CID inoltre possono essere presenti:

- segni di trombosi microvascolare di tipo neurologico: delirio, coma, segni multifocali; cutanei: gangrena superficiale; renale: oliguria, iperazotemia; polmonare: acute respiratory distress syndrome; gastrointestinale: ulcerazioni acute;

- segni di diatesi emorragica di tipo neurologico: emorragia cerebrale; cutanea: petecchie, ecchimosi, stillicidio in sede di iniezione; renale: ematuria; a carico delle membrane mucose: epistassi, gengivorragie; gastrointestinale: sanguinamento massivo. La diagnosi di laboratorio di CID si basa su reperti emocoagulativi associati ad altri non emocoagulativi e bioumorali. Tra questi ultimi particolare importanza riveste l'esame emocromocitometrico al fine di evidenziare emazie frammentate (schistociti) patognomoniche dell'anemia emolitica microangiopatica. Importanti sono anche la bilirubinemica, l'azotemia, la creatininemia e gli elettroliti per la sorveglianza della funzione renale e dell'equilibrio acido-base. La ricerca degli immunocomplessi circolanti ed altre indagini immunologiche possono contribuire alla diagnosi di CID. Gli immunocomplessi sono capaci di attivare il F XII, promuovere l'aggregazione piastrinica, danneggiare le cellule endoteliali, indurre la sintesi di tromboplastina tissutale da parte del sistema monocito-macrofagico. Il laboratorio di emocoagulazione in corso di CID denuncia l'alterazione del PT e PIT, ma, più specificatamente, la carenza di fibrinogeno e piastrine. Questi ultimi due parametri devono essere accuratamente monitorati frequentemente in quanto una loro diminuzione progressiva ha più significato di un singolo valore istantaneo (tab. 16).

Costantemente	FPA	A
Alterati	FDP	A
	DD	A
	Tests di paracoagulazione	+
Incostantemente	Piastrine	R
Alterati	Fibrinogeno	R
	TT	A
	PT	A
	PTT	A
	AT III	R
	PC	R
A= Aumentato; R= Ridotto		

Tabella 16. Esami emocoagulativi in corso di CID.

Alterazione dell'emostasi nelle malattie epatiche

Il fegato svolge un ruolo di estrema importanza nei processi emocoagulativi. Esso è infatti la sede di sintesi dei fattori della coagulazione, di almeno due componenti del sistema fibrinolitico: il plasminogeno e l'alfa-2-antiplasmina e almeno due importanti inibitori: L'AT III e la proteina C. Per questi motivi un danno epatocellulare può essere associato a difetti emostatici multipli che possono causare manifestazioni emorragiche, ma anche trombotiche, dovute probabilmente ad un deficit di sintesi di AT III e di proteina C, nonché dalla incapacità del fegato di rimuovere dal circolo i fattori della coagulazione attivati.

Nei soggetti con malattie epatocellulari acute e croniche esiste un deficit di F V dovuto ad una insufficiente sintesi, a consumo o ad una proteolisi plasminica. Anche i fattori della fase di "contatto" sono compromessi ed in particolare il F XI. Nella cirrosi con grave ipertensione portale e nelle epatiti acute e croniche aggressive si riscontra frequentemente un tempo di trombina alterato per una disfibrinogenemia dovuta a varianti molecolari anomale del fibrinogeno ricche in carboidrati con deficit di polimerizzazione della molecola e per la presenza degli FDP. Alla diatesi emorragica possono concorrere, oltre alla depressione della sintesi proteica e la ridotta clearance dei fattori attivati, anche l'incremento dell'attività fibrinolitica, la frequente piastrinopenia da ipersequestro o la piastrinopatia nell'epatopatia alcolica o da deficit di acido folico. Questi ultimi deficit tuttavia non sembrano svolgere un ruolo particolarmente importante in quanto in questi pazienti il tempo di emorragia è quasi sempre normale. Nell'ittero ostruttivo il deficit della funzione emostatica è riconducibile ad un deficit di vit K che, essendo liposolubile, necessita di sali biliari per l'assorbimento dalla dieta, per cui la sintesi dei fattori vit K dipendenti, pur essendo normale, avviene in forma decarbossilata e pertanto inefficace. Le manifestazioni cliniche sono di tipo emorragico ma non tuttavia casi frequenti nelle malattie epatocellulari e nelle cirrosi. In quest'ultima patologia infatti le grandi emorragie sono quasi sempre riferibili a rottura delle varici esofagee, ad erosioni della mucosa gastrica a ulcerazioni duodenali sostenute dalla grave ipertensione portale.

Diagnostica delle malattie emorragiche

Il procedimento diagnostico di una malattia emorragica si basa sull'anamnesi, l'esame obiettivo e gli esami di laboratorio che possono essere di screening o di I livello, prove complementari a di 2° livello e prove specifiche.

L'anamnesi è senza dubbio la tappa più importante per un corretto approccio e spesso consente una diagnosi prima ancora di avere i dati di laboratorio. L'anamnesi deve mirare a stabilire se si tratta di una malattia sistemica dell'emostasi (sede multipla, spontanea, petecchie, ematomi) o un sanguinamento da cause locali (epistassi, menometrorragie, emorragie gastroenteriche) ed ancora se si tratta di una malattia congenita (età pediatrica, anamnesi familiare positiva, alterazione di una sola prova di I livello etc) oppure se acquisita (insorgenza in età adulta, anamnesi familiare negativa, emorragie generalizzate, associazione con altre malattie di base, carenze multiple di fattori, alterazioni multiple delle prove di I livello etc); se il difetto è della fase vascolopiastrinica, della fibrinoformazione, della stabilizzazione del coagulo; se secondaria ad altre patologie (epatopatie, malassorbimenti, nefropatie, emopatie); se secondaria a farmaci (soppressori della mielopoiesi, farmaci che provocano piastrinopenie - chinidina, diazepam, digitale, difenilidantoina, lidocaina, metildopa, rifampicina, aspirina, fenacetina, furosemide, penicilline, eritromicina, spironolattone, sulfamidici, eparina, barbiturici, cimetidina, codeina, tolbutamide-; farmaci che interferiscono con la funzionalità piastrinica - antiinfiammatori, antimitotici, beta bloccanti, antidepressivi, etc-). L'esame obiettivo deve includere un'attenta osservazione dei possibili siti di emorragia e devono essere attentamente ricercati segni e sintomi di malattie concomitanti come epatopatie, emopatie, collagenopatie e nefropatie. Le petecchie sono frequentemente espressione di una alterazione quantitativa e qualitativa delle piastrine così come le ecchimosi e le porpore. Gli ematomi che, se superficiali, causano una tumefazione e una deformità e spesso sono accompagnati da dolore spontaneo o provocato, sono espressione di gravi alterazioni dei meccanismi emocoagulativi, sono frequenti nell'emofilia classica e nel sovradosaggio di anticoagulanti orali. Alterazioni neurologiche devono far sospettare la possibilità di una emorragia cerebrale o di una malattia da "consumo" e di estrema importanza è un'accurata valutazione di eventuali patologie concomitanti: epatopatie, emopatie, nefropatie e collagenopatie. La coesistenza di sanguinamenti e di fenomeni tromboembolici o di uno stillicidio ematico in sede di iniezione endovenosa sono indicativi di una CID. I difetti di cicatrizzazione di eventuali ferite possono essere sintomatici di una afibrinogenemia, di una disfibrinogenemia o di un deficit di F XIII.

Prelievo e preparazione dei campioni di sangue per gli esami di laboratorio

Affinché un'analisi del sistema emocoagulativo sia affidabile è necessario eseguire un prelievo di sangue corretto in quanto un prelievo non correttamente eseguito o un sistema di trasporto non idoneo possono provocare una attivazione del processo con conseguente inattendibilità dei risultati. In molte ricerche sulla coagulazione il sangue deve essere reso incoagulabile ed anche questa fase è estremamente critica in quanto la proporzione tra sangue ed anticoagulante deve essere esatta (9:1). Ogni variazione del rapporto volumetrico porta a risultati errati. La stasi venosa prima del prelievo deve essere la più breve possibile e, comunque, non oltrepassare il minuto in quanto una stasi prolungata porta ad una attivazione locale della fibrinolisi. La puntura venosa deve essere rapida e corretta per evitare il più possibile la liberazione del materiale tromboplastinica. Il plasma per l'analisi deve essere ottenuto per centrifugazione (10 mm a 3.000 rpm) il più rapidamente possibile e dopo deve essere messo subito in altro contenitore. Se non può essere esaminato nelle quattro ore successive al prelievo è meglio una conservazione a temperatura ambiente tra 15° e 20°C. L'accuratezza degli esami dipende molto anche dalla pulizia delle vetrerie che deve essere assolutamente priva di tracce di detergenti e di trombina. In alcuni tests di laboratorio si richiede l'impiego di siero, di plasma fresco adsorbito o di plasma vecchio come reattivi in quanto veicolano particolari fattori della coagulazione.

Esami di laboratorio di screening (I° livello)

Tempo di emorragia (TE)

È l'unico indicatore "in vivo" dei difetti qualitativi e quantitativi delle piastrine, del tono vasale e del fattore Von Willebrand circolante. Il TE comincia a prolungarsi al di sotto delle 70-80.000 piastrine/mm³ ed è quasi sempre allungata al di sotto delle 40.000 e per almeno sette giorni dopo l'assunzione di aspirina o farmaci correlati. Negli ultimi anni si è cercato una sempre più accurata standardizzazione della metodica per garantire l'affidabilità della risposta considerando l'assoluta inutilità dei risultati nel caso in cui il test non sia eseguito correttamente e per questo sono disponibili dispositivi monouso. L'esecuzione del test inizia con un'incisione che deve essere indolore e superficiale in modo che siano incisi solo i vasi più piccoli. La lunghezza deve essere almeno 5 cm in quanto lunghezze inferiori, pur mantenendo una buona riproducibilità sembrano meno sensibili. La sede indicata è la superficie volare dell'avambraccio sia per l'uniformità del calibro dei microvasi sia per l'assenza di grossi vasi. La direzione dell'incisione deve essere orizzontale; la massima sensibilità della metodica si raggiunge con una pressione di 40 mm Hg che induce una stasi venosa. Si procede quindi ad

asciugare il sangue con carta da filtro ogni 30" facendo attenzione a non toccare l'incisione per evitare di disturbare la formazione del plug piastrinico ed ottenere dei risultati falsamente allungati. Valori normali sono 1-9 minuti.

Conta piastrinica (CP)

I valori normali della conta piastrinica sono di 150.000-400.000/mm³. Anche se non c'è una correlazione assoluta tra il numero di piastrine e frequenza a gravità delle emorragie, una emorragia spontanea è rara al di sopra di 40.000 piastrine/mm³; è frequente ma non costante al di sotto delle 40.000 ed è la regola al di sotto delle 20.000. In alcune malattie neoplastiche o autoaggressive la presenza dell'EDTA come anticoagulante provoca una pseudoaggregazione con conseguente pseudopiastrinopenia, probabilmente dovuta alla reazione tra immunocomplessi e membrana piastrinica alterata dall'EDTA stesso. Questa pseudopiastrinopenia può essere provocata anche da autoanticorpi agglutinanti le piastrine ed il fenomeno può essere visualizzato esaminando una striscia di sangue dove sono ben evidenti gli pseudoaggregati piastrinici. E' sempre utile verificare i risultati del conteggio con l'esame delle piastrine su striscia di sangue periferico colorato con M.G.G. Tale esame dà anche informazioni sulla morfologia e sulla distribuzione delle piastrine che possono essere utili nella valutazione clinica di un difetto dell'emostasi.

Tempo di tromboplastina parziale (PTTa)

E' un test di screening che esplora la via intrinseca e la via comune della coagulazione e che viene eseguita mettendo a contatto plasma raccolto in assenza di Ca⁺⁺ con una superficie a carica negativa (caolino, acido ellagico) e cefalina, un sostituto del PF3. Si misura il tempo di formazione del coagulo di fibrina dal momento in cui il Ca⁺⁺ viene di nuovo aggiunto al plasma. La superficie a carica negativa (caolino), permette l'attivazione dei così detti "fattori di contatto" (F XII - PK - HMWK) che iniziano la via intrinseca della coagulazione. Il fosfolipide, sostituendo i fattori piastrinici, fornisce un'altra superficie sulla quale avvengono in modo ottimale i processi di attivazione enzimatica che conducono alla formazione di fibrina. Questo tempo è detto "parziale" perché misura la generazione della protrombinasi (tromboplastinogenesi) solo per la via intrinseca. Carenze, anomalie od inibitori di ciascuno dei fattori della coagulazione interposti tra il F XII e la fibrina possono prolungare il PTT. Questo test è sensibile a livelli del 20% o meno dei F VIII e IX ed è usato anche per il monitoraggio della terapia eparinica. L'intervallo terapeutico dell'eparina è compreso tra 0.3-0.8 UI/ml di plasma. Ciò corrisponde in pratica ad un prolungamento del PTTa dei 1,5-2,5 volte il valore normale che è di 32-46 secondi.

Tempo di protrombina (tempo di Quick) (PT)

Questo test misura la via estrinseca e comune della coagulazione. Si esegue mettendo a contatto plasma raccolto in assenza di Ca^{++} con una tromboplastina a struttura lipoproteica (fattore tissutale) e si calcola il tempo di formazione della fibrina dal momento della ricalcificazione. Il PT è indipendente dalle piastrine poiché la tromboplastina tissutale che si aggiunge contiene fosfolipidi che sostituiscono il PF3. La tromboplastina si complessa con il F VII permettendo l'attivazione del F X e quindi la formazione di fibrina. Il test è particolarmente sensibile alla diminuzione del F VII permettendo l'attivazione del F X e meno alle carenze di protrombina e fibrinogeno. Il PT non si prolunga significativamente fino a che il fibrinogeno non scende al di sotto dei 100 mg% mentre è chiaramente patologico già a livelli del 50% di F VII. Questo è infatti il primo tra i fattori vit-K dipendenti a risentire della carenza di vit-K a causa della sua emivita particolarmente breve. I valori normali sono di 11-15 secondi.

Tempo di trombina (TT)

Si esegue aggiungendo direttamente la trombina al plasma e calcolando il tempo di formazione della fibrina. In tal modo tutti i fattori a monte della trombina vengono saltati. Quindi il TT dipende dalla concentrazione del fibrinogeno ed è allungato nelle ipo e disfibrinogenemie, nell'ipereparinemia e allorché vi è un eccesso di FDP che interferiscono con l'azione della trombina e con la polimerizzazione della fibrina. I valori normali sono compresi tra 18 e 22 secondi.

I substrati cromogenici

I tests tradizionali della coagulazione sono basati sull'osservazione della formazione o dissoluzione di un coagulo. E' chiaro però che tali metodiche sono influenzate da molte variabili con conseguenti problemi di accuratezza, riproducibilità, sensibilità e standardizzazione, per cui, negli ultimi anni, si sono sviluppate numerose ricerche su dei substrati sintetici sensibili all'azione enzimatica specifica dei singoli fattori della coagulazione, della fibrinolisi e degli inibitori ad essi correlati. I substrati cromogenici sono chimicamente costituiti da piccoli peptidi formati da sequenze aminoacidiche simili alla sequenza in cui avviene la scissione enzimatica nel substrato naturale cui vengono legati gruppi cromofori, come la parnitroanilina (pNA) che, in seguito alla rottura del legame con l'oligopeptide, manifesta un forte assorbimento a 405 nm. L'attività enzimatica sarà quindi proporzionale alla quantità di p-NA liberata e può essere determinata fotometricamente. Ovviamente, nello studio degli inibitori, la quantità di p-NA sarà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'inibitore. L'impiego di queste metodologie nel laboratorio di emocoagulazione offre numerosi vantaggi tra

i quali elevata specificità e sensibilità associate alla possibilità di poter essere adattati agli strumenti automatici di chimica-clinica comunemente presenti nei laboratori.

Esami complementari (II° livello)

Attualmente sono disponibili delle metodologie anche per laboratori medio-piccoli, ovvero con modesta strumentazione, che permettono di approfondire ulteriormente questa problematica e tra gli ultimi possiamo ricordare i substrati cromogenici e le metodiche immunoenzimatiche.

Thrombotest

Questo test si basa sull'uso di un reattivo costituito da plasma bovino adsorbito a solfato di bario, contenente il F V ed il Fibrinogeno, da tromboplastina bovina a bassa attività e da cefalina per assicurare una attivazione ottimale della via intrinseca. Il test ha un'alta sensibilità ai difetti coagulativi indotti sia dai dicumarolici che dai PVKA (protein induced by Vit-K absence), quei fattori del complesso protrombinico che risultano alterati sia nei deficit di Vit-K sia durante il trattamento con cumarinici. Il thrombotest è utile inoltre per la diagnosi di emofilia Bm, una variante dell'emofilia B.

Normotest

È una variante del tempo di protrombina particolarmente sensibile alla carenza quantitativa dei F VII-II e X mentre è insensibile agli inibitori ed in particolare ai PIVKA. Il normotest costituisce uno degli indici più sensibili della capacità protidosintetica degli epatociti in quanto fornisce determinazioni accurate dei vari fattori anche se presenti con un'attività inferiore al 50%. Il diverso comportamento del normotest e del thrombotest rispetto ai PIVKA consente la dimostrazione della presenza di tali inibitori mediante la determinazione del rapporto fra % di attività del normotest e del thrombotest. Il rapporto tra la differenza percentuale del normotest e del thrombotest con lo stesso normotest espresso in percento risulta inferiore all'unità in caso di presenza di PIVKA, in caso di terapia con cumarinici è di circa 0,5-0,6.

Tempo di reptilasi e tempo di trombin-coagulasi

Sono due test analoghi al tempo di trombina con l'unica differenza che risultano insensibili all'eparina e quindi possono essere utilizzati per lo studio della fibrinogenesi anche in pazienti in trattamento eparinico.

Dosaggio dei singoli fattori della coagulazione

Queste tecniche si basano sulla valutazione del grado di correzione operato dal plasma in esame sul tempo di tromboplastina parziale per i F XII-XI-IX-VIII e sul tempo di protrombina per i F II-V-VII-X eseguiti su un plasma substrato, carente completamente del fattore che si desidera dosare nel plasma in esame.

Tempo di Stypven-cefalina

Il veleno della vipera di Russel (Stypven) è dotato di una attività simile a quella della tromboplastina tissutale che trasforma la protrombina in trombina in presenza dei FV e X, ma non del F VII.

Metodi di esplorazione delle fibrinolisi

Anche lo studio della fibrinolisi può essere effettuato con metodiche, alcune non molto recenti, altre moderne e sensibili in laboratori di medie dimensioni ed un notevole contributo si è avuto negli ultimi anni con l'impiego degli anticorpi monoclonali ed substrati cromogenici.

Tempo di lisi del coagulo

La lisi del coagulo di fibrina, ottenuta da un campione di sangue diluito, avviene in un tempo minore rispetto alla lisi del sangue intero in quanto la diluizione riduce l'effetto degli inibitori della fibrinolisi e la concentrazione del fibrinogeno. E' un test globale che valuta il sistema fibrinolitico nel suo insieme.

Tempo di lisi delle euglobuline

Le euglobuline sono proteine che precipitano quando il plasma viene diluito. L'attivatore del plasminogeno, il fibrinogeno ed il plasminogeno sono euglobuline e possono essere separate per precipitazione dagli inibitori della fibrinolisi (antiplasmine e antiattivatori del plasminogeno) che sono solubili in acqua. Il precipitato formato dalle euglobuline viene ridissolto e quindi fatto coagulare per aggiunta di trombina.

L'attivatore del plasminogeno lo attiva in plasmina. Il tempo necessario affinché la plasmina lisi completamente il coagulo di fibrina rappresenta il tempo di lisi delle euglobuline.

Tempo di paracoagulazione

La trombina, generatasi per attivazione della coagulazione, scinde i fibrinopeptidi del fibrinogeno e dà luogo alla formazione di monomeri di fibrina che possono, prima di polimerizzare e precipitare per formare il reticolo di fibrina, rimanere in sospensione. Questo avviene per i legami che si formano tra i monomeri di fibrina con il fibrinogeno e con gli FDP ad alto peso molecolare (X a Y). L'aggiunta di etanolo o solfato di protamina al plasma scinde il legame dei complessi solubili. I monomeri ed i frammenti X polimerizzano e si verifica la formazione di un gel chiaramente visibile. Questo processo viene definito paracoagulazione.

Determinazione dei prodotti di degradazione del fibrinogeno

La plasmina formatasi in circolo per attivazione della fibrinolisi esercita la sua azione litica sulla fibrina o sul fibrinogeno formando i prodotti di degradazione del fibrinogeno (FDP). Gli FDP conservano i determinanti antigenici della molecola del fibrinogeno per cui sono in grado di reagire con un siero antifibrinogeno. Questo ha permesso di mettere a punto metodiche immunologiche per il dosaggio di questi prodotti (tab. 17).

Sistema rivelatore	Frammenti identificati
Lattice rivestito da anticorpi - anti D e anti-E - anti-fibrinogeno	Frammenti D ed E Tutti i frammenti
Stafilococco aureo	Frammenti X ed Y
Emazie tannate legate al fibrinogeno	Tutti i frammenti
Lattice rivestito da fibrinogeno	Tutti i frammenti

Tabella 17. Test per la misura degli FDP.

Altre indagini

Il dosaggio del plasminogeno e dell'anti-plasmina viene fatto con substrati cromogenici. Lo studio dei processi fibrinolitici può attualmente essere completato anche in laboratori di piccole dimensioni utilizzando i substrati cromogenici e le metodiche immunoenzimatiche. Si trovano attualmente in commercio kits che permettono il dosaggio del plasminogeno, dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) nonché del relativo inibitore (PAI).

Studio dell'aggregazione e dell'adesività piastrinica

Aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica può essere studiata in vitro con l'aiuto di un aggregometro con un metodo fotometrico sotto agitazione continua. L'aggiunta di un induttore nel plasma ricco di piastrine provoca l'aggregazione delle stesse con aumento della trasmissione ottica che viene espressa, per mezzo di un registratore, in una curva di aggregazione. Questo studio, relativamente semplice, è poco riproducibile a causa dei numerosi parametri che lo influenzano: viene comunque usato per monitorare la terapia antiaggregante, nello studio di un allungamento del tempo di emorragia con conta piastrinica normale, negli stati trombofilici e nelle trombosi recidivanti.

Adesività piastrinica

a) Metodo di Hellem: si basa sulla percentuale di piastrine che vengono trattenute, dopo il passaggio del sangue, spinto tramite una pompa a perfusione costante, in un tubicino di plastica contenente microsferi di vetro. Come anticoagulante viene utilizzato l'EDTA ed il risultato è espresso in % di piastrine trattenute. I valori normali sono tra il 70 ed il 98%.

b) Metodo di Saltzman. E' simile al precedente solo che il sangue viene aspirato con un vacutainer e fatto passare attraverso biglie di vetro. I valori relativi all'adesione si ottengono mediante differenza tra il valore percentuale delle piastrine recuperate e quelle presenti in un prelievo non trattato.

c) Metodo di Brchgrevink. Si valuta l'adesività mediante conta tra sangue venoso ed il sangue che fuoriesce da una piccola ferita.

d) Metodo di Hovig. Valuta la ritenzione piastrinica da parte del collagene dopo aver fatto passare su tale proteina il sangue trattato con EDTA. Tutti questi tests mancano di specificità e sensibilità per cui non vengono oggi impiegati per la diagnosi di malattia di von Willebrand.

Altri tests per lo studio della funzionalità piastrinica

Le metodiche immunoenzimatiche (ELISA) hanno permesso di poter valutare la funzionalità piastrinica tramite il dosaggio di alcune proteine specifiche delle piastrine che vengono liberate dagli alfa-granuli durante la reazione di secrezione. Tra queste il PF4 e la β -tromboglobulina: un rapporto tra quest'ultima ed il PF4 inferiore a 3 suggerisce un'attivazione in vitro delle piastrine. Concentrazioni elevate di queste due molecole si osservano in corso di coronaropatie, malattie cerebrovascolari, arteriopatie periferiche, trombosi venose profonde, diabete mellito, iperlipemia, preeclampsia, DIC, porpora trombotica trombocitopenica ed altre.

Interpretazione degli esami di laboratorio

Gli esami precedentemente ricordati fanno parte dei così detti esami di screening o di I livello e consentono una rapida esplorazione dell'emostasi ed una diagnosi presuntiva alla portata di tutti i laboratori. Ovviamente per poter definire una esatta diagnosi e l'entità del difetto per il monitoraggio di una eventuale terapia sostitutiva dovranno essere eseguiti gli esami di II livello e tests quantitativi dei singoli fattori carenti.

Prolungamento isolato del tempo di emorragia

Il prolungamento isolato del tempo di emorragia con normalità degli altri tests di I livello ed in particolare il numero delle piastrine può dipendere da una interazione farmacologica (aspirina ed altri FANS, dipiridamolo, sulfpirazone e ticlopidina); da una patologia associata (mieloproliferativa, uremia) da anomalie funzionali congenite delle piastrine (in questo caso sono necessari gli esami di II livello: test di aggregazione, studio delle GP di membrana, microscopia elettronica) o dalla malattia di von Willebrand (vedi).

Prolungamento del tempo di emorragia e del tempo di tromboplastina attivato

Può dipendere dalla malattia di von Willebrand. E' presente anche una carenza "secondaria" del F VIII:C tali da prolungare il PTTa: questa associazione in assenza di altre cause è indicativa di malattia di VW.

Prolungamento isolato del PTT

Se associata ad un'emorragia indica un deficit del F XI-IX-VIII oppure la presenza di inibitori acquisiti degli stessi fattori; se è presente in un paziente asintomatico o con storia di trombosi indica un deficit di F XII-precallecreina-HMWK o la presenza di anticoagulante tipo lupus. La distinzione tra carenza vera e presenza di inibitori circolanti viene fatta eseguendo il PTT su una miscela 1:1 del plasma del paziente con quello normale. Nel primo caso l'esame si normalizzerà, ma non così nel secondo, poiché gli inibitori agiscono anche sul plasma normale.

Prolungamento isolato del tempo di protrombina

Questa condizione può dipendere da carenza del F VII congenita o acquisita (epatopatie, malassorbimenti, anticoagulanti orali).

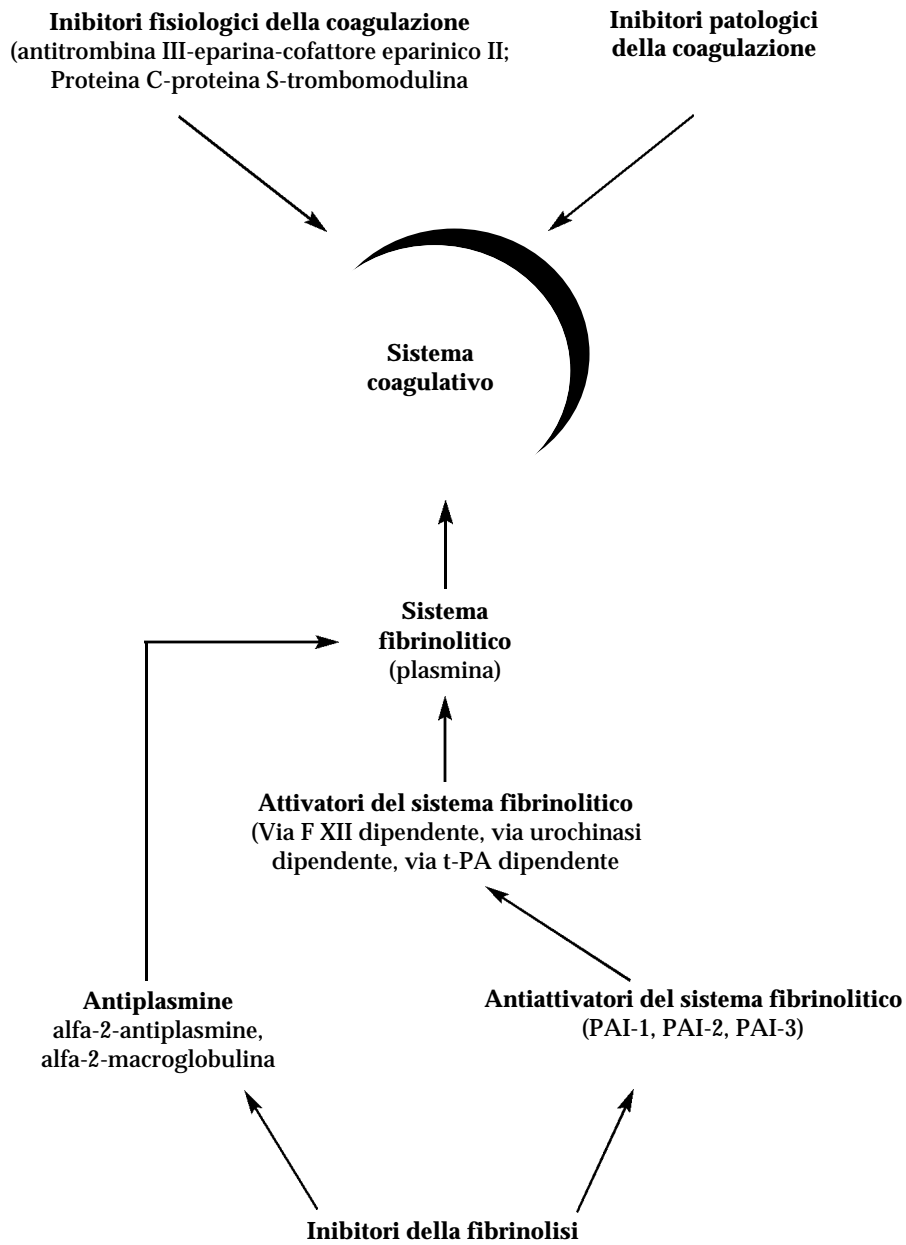
Prolungamento isolato del tempo di trombina (TT)

In questo caso possono essere presenti deficit o anomalie del fibrinogeno oppure eparina. La diagnosi differenziale nella prima condizione si fa do-

sando il fibrinogeno con l'immunodiffusione radiale (RID). Nella ipo/afibrinogenemia (congenite o secondarie ad epatopatie, tumori, setticemie, CID, farmaci) il TT è alterato come pure il RID; nelle disfibrinogenemie (congenite) il TT è alterato ed il RID normale. Le disfibrinogenemie congenite sono in genere asintomatiche, in alcuni casi possono essere associate ad una elevata incidenza di emorragie o trombosi.

Il prolungamento combinato del PTT e del PT

Può dipendere da epatopatie, anticoagulanti orali, eparina, anticoagulanti tipo lupus, carenze congenite dei F V-X-II-I.



Appendice A. Schema riassuntivo dei fattori che intervengono nel processo coagulativo.

ADP	Adenosindifosfato
AT III	Antitrombina III
ATP	Adenosintrifosfato
Beta-TG	Beta-tromboglobulina
CID	Coagulazione intravascolare disseminata
CI-INA	C1 mattivatore
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
FDP	Prodotti di degradazione del fibrinogeno
fdp	Prodotti di degradazione della fibrina
FI	Fibrinogeno
FPA	Fibrinopeptide A
FPB	Fibrinopeptide B
FT	Fattore tessutale
F vW	Fattore di Von Willebrand
F Va	Fattore V attivato
F Vi	fattore V inattivato
GP	Glicoproteine
HMWK	Chininogeno ad alto peso molecolare
HRG	Glicoproteina ricca di istidina
K	Callicreina
LAC	Anticoagulante tipo lupus
PAF	Platelet aggregating factor
PAI	Inibitore dell'attivatore del plasminogeno
PC	Proteina C
PCa	Proteina C attivata
PDGF	Fattore di crescita piastrinico
PF3	Fattore piastrinico 3
PF4	Fattore piastrinico 4
PGN	Plasminogeno
PIVKA	Protein induced vit-K absence
PL	Plasmina
PK	Precalliereina
PS	Proteina S
PT	Tempo di protrombina (tempo di Quick)
PT I	Porpora trombocitopenica idiopatica
PTT	Tempo di tromboplastina parziale
PTTa	Tempo di tromboplastina parziale attivato
RID	Immunodiffusione radiale
SE	Sistema estrinseco
SI	Sistema intrinseco
SF	Sistema fibrinolitico
t-PA	Attivatore tessutale del plasminogeno
TT	Tempo di tromhina
TXA ₂	Tromboxano A2
UK	Urochinasi

Appendice B. Abbreviazioni.

Bibliografia

Alami S., Hampton J.W., Race G.J. e Speem R.J.: Fibrin stabilizing factor (factor XIII) *Am. J. Med.* 44, 1, 1968.

Ascami Fe Pefetti V.: Coagulazione intravascolare disseminata e sindrome di Moschowitz. *Progr. Ematol. Clin.* 7, 289, 1988.

Astrup T.: Fibrinolysis in the organism. *Blood* 11, 781, 1988.

Bachman F. e Knuthof EKO.: Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects. *Scm. Thromb. Haemost.* 10,6, 1984.

Collen D.: On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 43,77, 1980.

Colman R.W.: Surface-mediated defence reactions. The plasma contact activation system. *J. Clin. Invest.* 73, 1249, 1984.

Doolittle R.F.: Fibrinogen and fibrin. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 195, 1984.

Esmon C.T.: The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 235, 1348, 1987.

Finazzi G., Cortelazzo S., Viero P, Barbui T.: IgM agammopathy and the lupus anticoagulant syndrome in habitual abortems. *JAMA* 255, 39, 1986.

Fawler W.E., Fretto L.J., Hamilton K.K., Erickson H.P. e McKee P.A.: Substructure of human von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 76, 1491, 1985.

Friedman P.A.: Vitamin-K dependent proteins. *N. Engl. J. Med.* 310, 1458, 1984.

George J.N., Nurden A.T., Phillips D.R.: Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N. Engl. J. Med.* 311, 1084, 1984.

Girma J.P., Meyer D., Verweij CL., Pannekoek K. e Sixma J.J.: Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood* 70, 605, 1987.

Hoyer L.W.: The factor VIII complex: structure and function. *Blood* 58, 1, 1981.

Karpaktin S.: Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Sem Haematol.* 22, 260, 1985.

- Kelton J.G.: Platelet associated IgG. An overview. *Clin. Res.* 33, 383, 1985.
- Lamale B., Griffin J.H.: Formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors. *Clin. Haematol.* 14, 281, 1985.
- Lijnen H.R., Collen D.: Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Sem. Thromb. Haem.* 8, 2, 1982.
- Mammen F.E.: Congenital coagulation disorders. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 9, 1, 1983.
- McMillan R.: Immune thrombocytopenia. *Clin Haematol.* 12, 69, 1983.
- Meyer D., Baumgartner H.R.: Role of von Willebrand factor in platelet adhesion to the subendothelium. *Br. J. Haemat.* 54, 1, 1983.
- Nemerson Y.: Tissue factor and haemostasis. *Blood* 71, 1, 1988.
- Pitney W.R.: Disseminated intravascular coagulation. *Seminars in haematology.* 8, 65, 1971.
- Rosemberg R.D. Rosemberg J.S.: Natural anticoagulant mechanism. *J. Clin. Invest.* 74, 1, 1984.
- Rossi Ferrini P.L., Grossi A. e Vannucchi A.: Indicazioni all'uso delle immunoglobuline nella terapia della porpora piastrinopenica idiopatica. *Prog. Ematol. Clin.* 5, 43, 1986.
- Sagripanti A., Fosella P.V.: La terapia trasfusionale nelle coagulopatie congenite. *Quaderni del CRE.* 1, 125, 1986.
- Sprengers E.D., Kluft C.: Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 69, 381, 1987.
- Thompson A.R.: Structure, function and molecular defects of factor IX. *Blood* 67, 565, 1986.
- Tura S et al.: Trombocitopenie. *Haematologica* 64, 179, 1979.
- Vehar G.A. et al.: Structure of human factor VIII. *Nature* 312, 337, 1984.
- Weiss H. J.: Congenital disorders of platelet function. *Sem Haematology.* 17, 228, 1980.
- Wilner T.H.: Molecular basis for measurements of circulating Fibrinogen Derivates. *Spect T.H.* 1978.

Wiman B., Collen D.: On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin. *Eur. J. Biochem.* 84, 573, 1978.

Wintrobe M.M. et al.: *Clinical Haematology*. VIII Ed. Philadelphia 1981.

Wood W.I. et al.: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312, 330, 1984.

Indice

Istruzioni per gli autori	pag. 2
Editoriale	3
Generalità	5
Fisiopatologia dellemostasi	6
La parete vascolare	6
Le piastrine	7
Morfologia ed ultrastruttura	7
Biochimica delle piastrine	9
Fisiologia delle piastrine	10
Ruolo delle piastrine nella trombosi	12
Coagulazione	13
La cascata emocoagulativa	15
Sistema intrinseco	17
Sistema estrinseco	20
Sistema fibrinolitico	22
Attivatori del plasminogeno	22
La demolizione del fibrinogeno e della fibrina	23
Inibitori della coagulazione e della fibrinolisi	25
Inibitori fisiologici della coagulazione	25
Inibitori patologici della coagulazione	27
Inibitori della fibrinolisi	28
Le malattie emorragiche	29
Malattie emorragiche da cause vascolari	29
Trombocitopenie	29
Trombocitopenie da diminuita produzione	30
Trombocitopenie da aumentata distruzione	30
Trombocitopenie da aumentato consumo o da emodiluizione....”	34
Trombocitopenie da distribuzione impropria	34
Malattie emorragiche da difetti plasmatici	34
Sindromi emofiliche	35

Coagulopatie congenite non emofiliche »	38
Coagulazione intravascolare disseminata »	42
Alterazione dell'emostasi nelle malattie epatiche »	44
Diagnostica delle malattie emorragiche »	45
Prelievo e preparazione dei campioni di sangue per gli esami di laboratorio »	46
Esami di laboratorio di screening (I° livello) »	46
Tempo di emorragia »	46
Conta piastrinica »	47
Tempo di tromboplastina parziale »	47
Tempo di protrombina »	48
Tempo di trombina »	48
I substrati cromogenici »	48
Esami complementari (II° livello) »	49
Thrombotest »	49
Normotest »	49
Test di reptilasi e tempo di trombin-coagulasi »	49
Dosaggio dei singoli fattori della coagulazione »	50
Tempo di Stypven-cefalina »	50
Metodi di esplorazione della fibrinolisi »	50
Tempo di lisi del coagulo »	50
Tempo di lisi delle euglobuline »	50
Tempo di paracoagulazione »	51
Determinazione dei prodotti di degradazione del fibrinogeno »	51
Altre indagini »	51
Studio dell'aggregazione e dell'adesività piastrinica »	52
Aggregazione piastrinica »	52
Adesività piastrinica »	52
Altri tests per lo studio della funzionalità piastrinica »	52
Interpretazione degli esami di laboratorio »	53
Appendice A »	55
Appendice B »	56
Bibliografia »	57
Indice »	60
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio »	62

Caleidoscopio

Italiano

1. Rattu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rattu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rattu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rattu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rattu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rattu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:

- L'amenorrea.* Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale.* Luglio '87.
 29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche.* Settembre '87.
 30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica.* Novembre '87.
 31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali.* Gennaio '88.
 32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario.* Febbraio '88.
 33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress.* Marzo '88.
 34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro.* Maggio '88.
 35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare.* Giugno '88.
 36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2).* Luglio '88.
 37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia.* Novembre '88.
 38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili.* Gennaio '89.
 39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie.* Febbraio '89.
 40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni.* Marzo '89.
 41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie coloretali.* Aprile '89.
 42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina.* Maggio '89.
 43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I.* Giugno '89.
 44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.* Luglio '89.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 7, numero 44

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rassu@ssnet.it

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

EDITORE

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Letizia Cuccuru

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,
Guida Pratica Immulite®, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Luglio 1989
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano