

FISIOPATOLOGIA E DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DEL SISTEMA COAGULATIVO E FIBRINOLITICO.

La fisiopatologia del sistema coagulativo e fibrinolitico, in modo sempre più dettagliato, è stata caratterizzata e definita negli ultimi due decenni. Sono state precisate le proprietà biochimiche delle componenti presenti in circolo, le reazioni di attivazione con i loro meccanismi di controregolazione, le interconnessioni esistenti con l'endotelio, i fattori del complemento, i mediatori della flogosi, le citochine, il sistema fibrinolitico. E' stato possibile mettere in evidenza molteplici alterazioni genetiche che hanno reso sempre più evidente il ruolo svolto dal sistema emostatico nella patogenesi delle malattie tromboemboliche e delle complicanze emocoagulative della sepsi, delle neoplasie, dell'angiopatia diabetica, dell'aterosclerosi, dell'eclampsia gravidica. Di pari passo anche la diagnostica di laboratorio si è andata affinando, fino a proporre validi tests di "prima istanza", specifici algoritmi diagnostici e di monitoraggio terapeutico, dosaggi molecolari dei difetti genetici.

COMPONENTI DEL SISTEMA EMOCOAGULATIVO.

Le piastrine, l'endotelio vascolare, i processi biochimici che portano alla trombinogenesi e quelli che controllano la plasminogenesi e la fibrinolisi rappresentano le componenti cellulari e molecolari del sistema emocoagulativo. (Tabella I).

Tabella I. COMPONENTI del SISTEMA EMOCOAGULATIVO

PIASTRINE

Struttura (Glicocalice-Membrana, Microtubuli, Granuli, Mitocondri)

Funzione (Adesione, Modificazione forma, Aggregazione, Secrezione)

ENDOTELIO

Attività Procoagulante (FT, Fatt. V, Fatt. vW)

Attività Anticoagulante (ATIII, Proteoglicani, Proteine C-S)

Sistema Fibrinolitico (t-PA)

Regolazione Attivazione Piastrinica

COAGULAZIONE

Fattori della coagulazione

Trombinogenesi

FIBRINOLISI

Plasminogenesi

Prodotti di degradazione della Fibrina

Le piastrine hanno una struttura cellulare relativamente semplificata, nella quale la membrana presenta molecole recettoriali e di adesione; i microtubuli costituiscono il sistema contrattile che consente il cambiamento morfologico; i granuli sono le aree di deposito delle molecole presintetizzate ed i mitocondri i serbatoi energetici. La funzione delle piastrine è di costituire il trombo, nella sua fase di organizzazione iniziale, attraverso l'adesione mediata da GPIIb/IX col

fattore von Willebrand e la fibrina e la successiva modificazione di forma con l'esposizione del complesso GPIIb-IIIa, con funzione di integrina ed ad attività recettoriale per il fibrinogeno, suo ligando bivalente specifico. L'internalizzazione del fibrinogeno precede immediatamente l'aggregazione irreversibile e la secrezione delle sostanze contenute nei granuli. Si possono distinguere induttori fisiologici, farmacologici e patologici dell'attivazione piastrinica: tra i primi trombina, collagene (I, III, IV), ADP, adrenalina, prostaglandine e trombossani, NO, PAF, tra i secondi gli immunocomplessi circolanti. Questi fattori rappresentano segnali di membrana che sono tradotti nel citoplasma cellulare provocando il rilascio degli ioni-Calcio, la sintesi delle prostaglandine (PGI₂) e del trombossano A₂, la fosforilazione di proteine per effetto della PKC, la comparsa di specifici recettori sulla membrana. I fenomeni biologici associati all'aggregazione piastrinica sono, in modo sequenziale, rappresentati da:

- AUMENTO del Calcio intracitoplasmatico
- MODIFICAZIONE conformazionale
- ELEVATA affinità di legame di GpIIb-GpIIIa
- PRODUZIONE di Trombossano A₂
- FOSFORILAZIONE di proteine
- RILASCIO del contenuto dei granuli e dei lisosomi
- INDUZIONE dell'attività coagulante
- COMPARSA sulla membrana cellulare di proteine
- AGGREGAZIONE PIASTRINICA SECONDARIA

L'integrità anatomica e funzionale di tutta la struttura vascolare ed, in particolare, dell'endotelio rappresenta uno dei fattori principali di regolazione dell'equilibrio coagulazione-fibrinolisi. Le proprietà procoagulanti sono svolte dalle cellule endoteliali attraverso la sintesi del Fattore tissutale, del Fattore V e del Fattore von Willebrand. Le proprietà anticoagulanti, dalla capacità di sintetizzare Antitrombina III, TFPI, Proteoglicani tra i quali eparansolfato, e di attivare il sistema Proteina C-S. Grazie alla capacità di sintetizzare il principale attivatore fisiologico del plasminogeno, l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), ed il suo inibitore (PAI), le cellule endoteliali contribuiscono a regolare il sistema fibrinolitico. In modo altrettanto efficace regolano la funzionalità piastrinica attraverso la prostaciclina, ad attività antiaggregante, ed il PAF, ad attività aggregante.

Il processo coagulativo vero e proprio è costituito da tutta quella serie di reazioni biochimiche auto regolate, che su un substrato rappresentato dai fosfolipidi di membrana delle cellule (piastrine, endotelio) danno luogo alla formazione controllata e, normalmente, mai esuberante di trombina. La coagulazione è iniziata quando il danno endoteliale espone il sangue al fattore tissutale prodotto costitutivamente dalle cellule sottoendoteliali. Il fattore VIIa, presente nel plasma, lega il fattore tissutale e questo complesso consente la produzione di limitate quantità di fattore X e fattore IX. Assieme alla comparsa del fattore Xa, diventano manifesti gli effetti regolatori-inibitori del TFPI sul complesso proconvertinico e, in tal modo, è prevenuta l'eccessiva produzione di fattore Xa. Tramite la via alternativa, che implica l'attività dei fattori VIIIa e IXa, si ottiene ulteriore necessaria produzione di fattore Xa e, quindi, di trombina, con un immediato innesco di un meccanismo di automantenimento che sarà successivamente controllato. Oltre alle piastrine ed alle cellule endoteliali, possono scatenare il processo coagulativo le cellule del sistema monocito-macrofagico, le cellule neoplastiche, le cellule endoteliali alla presenza di macromolecole attivanti (endotossine, immunocomplessi, citochine). I meccanismi di controllo della coagulazione possono essere distinti in aspecifici, di autocontrollo e specifici. Quelli aspecifici limitano la formazione della

trombina e sono costituiti dalla normale e costante velocità del flusso ematico e dall'adsorbimento della trombina sulla fibrina. I meccanismi di autocontrollo contribuiscono a rallentare la velocità di alcune reazioni coagulative. I meccanismi specifici di controllo della coagulazione sono rappresentati dagli inibitori fisiologici della coagulazione: Antitrombina III, Proteina C/S, Cofattore Eparinico II.

Il sistema della Fibrinolisi contribuisce, anch'esso in maniera controllata, alla trasformazione del plasminogeno in plasmina e, quindi, alla scissione enzimatica del fibrinogeno e della fibrina. Esistono degli attivatori (t-PA) e degli inibitori (PAI, alfa2-antiplasmina) fisiologici ed altri farmacologici della degradazione del plasminogeno in plasmina e, quindi, del processo fibrinolitico. La plasmina induce caratteristiche modificazioni enzimatiche a carico della molecola del fibrinogeno con la formazione dei prodotti di degradazione del fibrinogeno (PDF, frammenti D ed E) e della fibrina con la formazione del D-dimero.

FISIOPATOLOGIA DELL'EMOSTASI

Con il termine di emostasi si comprendono tutti quei meccanismi fisiologici che intervengono per evitare perdite di sangue. Essa si svolge attraverso l'intervento sincronizzato di numerosi sistemi fisiologici correlati tra loro. I meccanismi emostatici comprendono quattro sistemi principali:

Il sistema vascolare

Le piastrine

Il sistema della coagulazione

Il sistema fibrinolitico

Si possono schematicamente descrivere quattro fasi dell'Emostasi:

FASE VASCOLARE (Emostasi primaria)

Lesione endoteliale

Avviene in pochi secondi

Formazione del tappo piastrinico

Arresto sanguinamento a livello dei capillari, arteriole e venule

FASE PIASTRINICA

Adesione

Aggregazione

Modificazione conformazionale

Liberazione di mediatori

FASE COAGULATIVA (Emostasi secondaria)

Richiede alcuni minuti per il suo completamento

Attivazione cascata coagulativa

Formazione di fibrina

Previene il sanguinamento secondario a carico dei grossi vasi

FIBRINOLISI

Meccanismo cellulare: liberazione enzimi proteolitici di derivazione leucocitaria.

Meccanismo plasmatico: avviene per opera dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), della Urochinasi (UK) e della Streptochinasi (SK); si ha la trasformazione del plasminogeno in plasmina, degradazione del fibrinogeno, fibrina e di altre proteine plasmatiche.

FASE VASCOLARE

Il primo evento che si verifica in seguito alla soluzione di continuo di un vaso è rappresentato dalla contrazione vasale. Questo fenomeno tende di per sé ad arrestare il flusso ematico e a determinare l'emostasi: esso è tuttavia insufficiente per l'emostasi permanente a causa della sua transitorietà. Il fenomeno della contrazione vasale è legato a riflessi di tipo neurovegetativo, i quali sono innescati probabilmente dalla lesione endoteliale ed alla liberazione di sostanze vasoattive (serotonina, catecolamine) contenute nelle piastrine. L'attività procoagulante delle cellule endoteliali è correlata innanzi tutto alla loro capacità di sintetizzare:

- 1) Fattore tissutale, fosfolipoproteina che nelle cellule stimulate può essere espressa per oltre il 70% sulle membrane.
- 2) Il fattore V, che, attivato da minime quantità di trombina, può formare, per azione del complesso fattore tissutale + fattore VII o dal complesso VIIIa + IXa + PL + Ca⁺⁺, il complesso Xa + Va + PL + Ca⁺⁺
- 3) Fattore di von Willebrand, che, legandosi alla glicoproteina piastrinica GPIIb, permette l'adesione piastrinica, e per ulteriore legame con la GPIIb/IIIa potenzia l'aggregazione.

Le cellule endoteliali posseggono inoltre i recettori per i fattori IX e IXa e per il complesso Xa + Va + PL + Ca⁺⁺. L'intervento in senso procoagulante delle cellule endoteliali è bilanciato dalle loro attività di tipo anticoagulante. Queste cellule producono sia ATIII, sia alcuni proteoglicani, quali il dermatansolfato, condroitinsolfato, eparansolfato. L'eparansolfato, in particolare, possiede una capacità superiore di circa 5 volte superiore all'eparina di legare ATIII. Così la cellula endoteliale, con i suoi proteoglicani e ATIII, può neutralizzare immediatamente la trombina eventualmente formatasi.

FASE PIASTRINCA

Le strutture alle quali le piastrine aderiscono sono il collagene sottoendoteliale, microfibrille e altre strutture sottoendoteliali. Subito dopo l'adesione le piastrine producono trombassano A2 (potente sostanza vasocostrittrice attivante le proteine) e secernono (release reaction) vari costituenti endocellulari fra i quali l'adenosidifosfato (ADP), il quale favorisce il successivo processo di aggregazione piastrinica che consiste nell'unione delle piastrine tra loro fino a formare il cosiddetto tappo piastrinico, occludente la breccia vasale. Oltre all'ADP, le piastrine attivate liberano molte sostanze contenute nei loro granuli, quali la serotonina (vasocostrittrice), proteine adesive (fibrinogeno, fattore di von Willebrand, fibronectina). Inoltre le piastrine attivate espongono sulla loro superficie fosfolipidi di membrana, i quali fungono da superficie di appoggio per le reazioni della fase della coagulazione che interviene subito dopo la fase piastrinica. Il fenomeno della aggregazione piastrinica è comunque un processo reversibile, poiché le piastrine tendono a disperdersi con ripresa secondaria dell'emorragia, se non interviene la fase coagulatoria. La fase

piastrinica ha quindi un'importanza notevole nel determinismo dell'emostasi primaria, ma non è sufficiente per l'emostasi definitiva.

FASE DELLA COAGULAZIONE

E' la più importante fase dell'emostasi, che in condizioni normali porta ad arresto permanente dell'emorragia. La coagulazione avviene per opera della trasformazione del fibrinogeno in fibrina per azione della trombina, alla cui formazione si giunge attraverso l'attivazione di alcuni fattori, che sono trasformati da zimogeni ad enzimi attivi (proteasi seriniche), e di altri cofattori non enzimatici (fattore V e VIII). Importante è anche l'intervento degli ioni calcio e dei fosfolipidi di membrana cellulare (ad es. l'attivazione del fattore X e della protrombina si verificano a livello delle membrane cellulari). Schema cascata emocoagulativa (Figura.1).

Il meccanismo della coagulazione in vivo risulta dalla complessa interazione tra i meccanismi estrinseco, intrinseco, comune, in cui i fini meccanismi di feedback portano all'amplificazione del segnale iniziale, che deriva dalla interazione tra il fattore tissutale, presente sulla superficie di molte linee cellulari, e i suoi ligandi, il fattore VII, il fattore VIIa. Non tutti i fattori della coagulazione agiscono con meccanismo enzimatico; alcuni, ad esempio, i fattori VIII e V agiscono come cofattori catalizzanti.

FIBRINOLISI

Nell'emostasi interviene un'altra componente, la fibrinolisi, la quale in realtà è una componente antiemostatica in quanto la sua attivazione determina la dissoluzione del coagulo di fibrina. Tuttavia è importante considerare anche la fibrinolisi nel contesto dell'emostasi proprio perché una sua alterazione può essere responsabile di diatesi emorragiche. Prodotto finale di questo meccanismo è la produzione di plasmina, enzima proteolitico capace di lisare la fibrina. La plasmina è generata a partire da un precursore plasmatico inattivo, il plasminogeno, attraverso 3 sistemi: attivazione intrinseca mediante il fattore XIIa, la callicreina e il chininogeno ad alto peso molecolare; attivazione estrinseca mediante azione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) rilasciato dalla parete vasale dopo vari stimoli; ed infine attivazione esogena con urochinasi e streptochinasi.

Le attivazioni intrinseca ed estrinseca sono a loro volta regolate dalla presenza di inattivatori plasmatici (inibitore dell'attivazione del plasminogeno) e della presenza di inibitori capaci d'inattivare la plasmina circolante (α 2-antiplasmina e α 2-macroglobulina, antitrombina, α 1-antitripsina, inibitore della C1-esterasi e antichimotripsina). La fibrinoformazione, oltre che dal sistema fibrinolitico è regolata anche da un sistema di anticoagulanti naturali.

L'antitrombina III è il principale inibitore fisiologico delle proteasi seriniche generate durante l'attivazione del sistema coagulativo. Essa inattiva la trombina e i fattori Xa, IXa, XIa, XIIa, questa inattivazione è accelerata notevolmente dall'eparina.

LA Proteina C è una glicoproteina plasmatica che, nella sua forma attiva, inattiva i fattori Va e VIIIa.

La Proteina S è il cofattore della proteina C, essenziale alla sua azione anticoagulante.

Difetti qualitativi o quantitativi congeniti di questi inibitori fisiologici della coagulazione comportano un grave rischio di tromboembolismo venoso (trombosi ereditarie). Cofattore eparinico II, per lungo tempo ritenuto una funzione della antitrombina III (o cofattore eparinico), in

realtà esso rappresenta un sistema specifico d'inibizione della trombina, che si differenzia completamente dall'antitrombina III. Dal punto di vista funzionale si differenzia dall'AT III perché la trombina ne è inibita, non inattivata. Per esplicare la sua azione sulla trombina, essa richiede la presenza di tracce di eparina, il cofattore eparinico II è inattivo sul fattore Xa.

(TAB: fattori coagulazione inserire)

CASCATA EMOCOAGULATIVA

SISTEMA INTRINSECO

L'innescò di questo meccanismo avviene attraverso l'attivazione per "contatto" di alcune proteine plasmatiche, i cosiddetti fattori contatto della coagulazione (fattori XI, XII), con la superficie alterata dell'endotelio vascolare, con altri tessuti o materiali estranei. Alla fase di contatto vi partecipano almeno quattro proteine plasmatiche: il fattore XII, il fattore XI, la precallieina e il chininogeno ad alto peso molecolare. La complessa interazione tra questi quattro fattori sulla superficie di contatto porta alla trasformazione del fattore XII in F XIIa; quest'ultimo a sua volta converte il fattore XI in F XIa. Va tenuto conto anche che il F.XIIa è in grado di attivare anche la precallieina in callieina e che quest'ultima è in grado di convertire il fattore XIIa. Tale reciproca attivazione del fattore XII e della precallieina rappresenta un meccanismo di feed-back positivo. Il fattore XIa a sua volta attiva il fattore IX che nella sua forma attivata insieme al fattore VIIIa al calcio ed al PF-3 (*) forma un complesso in grado di attivare il fattore X in Xa. Il fattore Xa ha anche la capacità di attivare il fattore VII.

(*) PF-3= *Fattore3 piastrinico è un fosfolipide di membrana, dotato della più importante attività procoagulante piastrinica.*)

SISTEMA ESTRINSECO

Rappresenta l'insieme di trasformazioni che avvengono nel sangue in seguito al danno tessutale provocato da una lesione o da una superficie trombogena (ateroma); viene attivata dalla liberazione della cosiddetta tromboplastina o fattore tissutale che interagisce con il fattore VII in presenza di ioni calcio formando un complesso (detto attivatore estrinseco del fattore X) che converte il fattore X in Xa.

VIA COMUNE

Entrambe le vie Estrinseca ed Intrinseca convergono in una via "comune" che finisce con il trasformare la proteina plasmatica protrombina (fattore II) nella sua forma attiva la trombina (fattore IIa). Questa fase terminale del processo di coagulazione ha inizio con l'attivazione del fattore X (che può avvenire sia attraverso la via intrinseca sia estrinseca). La reazione del fattore Xa con la protrombina necessita della presenza di ioni calcio e di fosfolipidi ed è notevolmente favorita dall'intervento di un'altra proteina plasmatica, il fattore V. La trombina è un enzima proteolitico operante la conversione del fibrinogeno in fibrina, staccando dalla molecola del fibrinogeno i fibrinopeptidi A e B. Quello che rimane della molecola del fibrinogeno rappresenta il monomero di fibrina. I monomeri di fibrina polimerizzano spontaneamente per formare un gel assai poco solido che depolimerizza molto facilmente quando in laboratorio viene posto in presenza di una soluzione di urea 5M o di acido monocloracetico 1%. La polimerizzazione irreversibile si realizza per

l'intervento del fattore XIII attivato che provoca la formazione di legami covalenti tra catene laterali dei monomeri di fibrina. (vedi schema cascata coagulativa)

MECCANISMI DI INIBIZIONE DELLA FIBRINOLISI

FISIOLOGICI

Inibitori degli attivatori del plasminogeno → PAI-1, PAI-2 , PAI-3

Inattivatori plasmatici della plasmina → Antiplasmine (α_2 AP, α MG)

FARMACOLOGICI

Inibitori del completo clivaggio proteolitico del plasminogeno: →Antiproteasi
(determinano una minore affinità della plasmina per la fibrina).

Analoghi dei substrati fisiologici della plasmina: →Acido epsilon-amino caproico o EACA, Acido tranexamico.

INIBITORI FISIOLOGICI DELLA COAGULAZIONE

ANTITROMBINA (AT III)

Da sola rende conto di circa il 75% del potere anticoagulante del plasma.

Inibisce tutti i fattori ad eccezione del fattore VIIa

Si lega alla trombina ed il complesso viene rapidamente allontanato dal plasma

In presenza di eparina la velocità di legame trombina-AT III è aumentata di circa 2000 volte.

COFATTORE EPARINICO II

Inattiva la trombina in presenza di elevate concentrazioni di eparina

Non è attivo verso le altre serin-proteasi

A differenza dell'AT-III la sua azione è potenziata dal dermatansolfato.

PROTEINA C

E' il cofattore della proteina S

E' una glicoproteina Vitamina K-dipendente

La forma attivata inattiva i fattori Va e VIIa

La velocità di attivazione della P C da parte della trombina è potenziata dalla trombomodulina.

Stimola la fibrinolisi diminuendo l'attività degli inibitori endoteliali del t-PA (attivatore tissutale del plasminogeno).

PROTEINA S

E' una proteina Vitamina K-dipendente

Nel plasma è presente come forma libera (40%) e forma legata alle proteine che lega anche il frammento C4b del complemento (60%).

La forma libera agisce come cofattore della Proteina C attiva

Bassi livelli di proteina S possono provocare tromboembolie venose.

COAGULOPATIE

Le coagulopatie sono disordini della coagulazione plasmatica congeniti o acquisiti. Le forme congenite più frequenti sono rappresentate dalla carenza dei fattori VIII e IX (Emofilia A e B), le altre sono più rare. I disordini acquisiti sono più frequenti e più complessi in quanto derivano dalla carenza di più fattori ed interessano contemporaneamente l'emostasi primaria e secondaria. Gli altri possono essere secondari a difetti di sintesi o ad aumentata rimozione o inattivazione in circolo ad opera di anticorpi circolanti. Tra le forme acquisite le più comuni sono:

- La Coagulazione intravascolare disseminata (CID)
- La diatesi emorragica nelle epatopatie
- Deficit di vitamina K
- Emorragie da farmaci (terapie con anticoagulanti)
- Coagulopatie Autoimmuni

CLASSIFICAZIONE

Coagulopatie Congenite

Emofilia A

Emofilia B

Malattia di von Willebrand

Disfibrinogemia

Afibrinogemia

Deficit fattore I,II,V,VII,X,XI,XII,XIII

Deficit combinato di più fattori

Coagulopatie Acquisite

Epatopatie

Nefropatie

Deficit Vitamina K

Coagulopatie Autoimmuni

CID

FISIOPATOLOGIA DELLA MALATTIA TROMBOEMBOLICA

L'attivazione incontrollata del sistema emocoagulativo all'interno dell'apparato vascolare è alla base patogenetica della malattia tromboembolica. Essa è un fenomeno multifattoriale che riconosce, nelle sue varie forme cliniche, cause genetiche e/o acquisite che possono condurre a condizioni primitive e/o secondarie di ipercoagulabilità. Inoltre, in questi complessi meccanismi patogenetici, hanno un ruolo predominante, di volta in volta, modificazioni della parete vascolare che provocano specifici danni endoteliali; modificazioni locali del flusso ematico che provocano alterazioni della velocità di scorrimento del sangue; modificazioni della composizione del sangue che provocano alterazioni della viscosità. (Tabella II).

Tabella II. FISIOPATOLOGIA della MALATTIA TROMBOTICA

Incontrollata attivazione del sistema emocoagulativo nel distretto vascolare per:

- Modificazioni della Parete vascolare: danno endoteliale
- Modificazioni locali del flusso ematico: velocità di scorrimento
- Modificazioni della composizione del sangue: viscosità

Fenomeno multifattoriale legato a condizioni primitive e/o secondarie di ipercoagulabilità per cause genetiche e/o acquisite

- Condizioni Primitive di Ipercoagulabilità

- Deficit di AT III
- Deficit di Proteina C-Proteina S
- Deficit del Cofattore Eparinico
- Anomalie Quali- Quantitative del Plasminogeno
- Anomalie del sistema Fibrinolitico
- Disfibrinogenemia
- Presenza di Lupus anticoagulante (LAC)
- Trombocitosi

- Condizioni Secondarie di Ipercoagulabilità

a patologie che condizionano l'equilibrio del sistema

Alterazioni della coagulazione e della fibrinolisi

- Neoplasie - Gravidanza - Trattamento estroprogestinico - Sindrome nefrosica –
Infusione di concentrati del complesso protrombinico.

Alterazioni delle piastrine

- Disordini microproliferativi - Emoglobinuria parossistica notturna – Iperlipidemie - Diabete mellito -
Ipertensione arteriosa – Aterosclerosi - Trombocitopenia indotta da eparina.

Alterazioni emoreologiche e dei vasi

- Stasi venosa - Decorso postoperatorio - Anemia a cellule falciformi - Superfici artificiali –
Vasculiti Arteriopatie obliteranti - Omocistinuria - Sindromi da iperviscosità - Anemie microangiopatiche con trombocitopenia.

La trombosi del distretto venoso, che porta in modo caratteristico alla formazione del trombo rosso, è specificamente legata alla riduzione del flusso sanguigno nel distretto interessato ed a fattori che provocano ipercoagulabilità. La trombosi arteriosa, con la formazione del trombo bianco, è strettamente dipendente dall'elevato stress del circolo, come si può verificare nell'ipertensione arteriosa in presenza di lesioni vascolari sistemiche, flogistiche, metaboliche, in relazione ad alterazioni del numero e della funzionalità piastrinica, come si possono osservare nelle emopatie. La malattia tromboembolica può riconoscere, infine, nella sua patogenesi fattori iatrogeni, legati a terapie antitrombotiche non adeguatamente condotte e fattori immunopatogenetici, quali la presenza di anticorpi antifosfolipidi. (Tabella III).

Tabella III. EZIOPATOGENESI della MALATTIA TROMBOTICA

TROMBOSI VENOSA (Trombo rosso)

- Riduzione del flusso sanguigno
- Ipercoagulabilità

TROMBOSI ARTERIOSA (Trombo bianco)

- Elevato stress del circolo
- Lesione vascolare
 - Aterosclerosi
 - Omocistinuria
 - Iperomocisteinemia
 - Vasculopatie infiammatorie
 - Vasculopatie da Malattie sistemiche
- Alterazioni Piastriniche
 - Disordini Mieloproliferativi (PV, CML, MM, ET)
- Trombocitopenie e Trombosi Associate all'Eparina
- Sindrome da Anticorpi Anti-Fosfolipidi

La regolazione del processo trombogenetico è operata da fattori antitrombotici che agiscono sia nell'emostasi fisiologica sia nella trombosi patologica. Questi fattori possono essere distinti e descritti in quanto prevalentemente efficaci nell'inibire all'attività piastrinica oppure nell'inibire la formazione e la deposizione della fibrina. Tra i primi inibiscono e, quindi, controregolano l'aggregazione e l'attivazione delle piastrine nella trombogenesi, le prostacicline, l'ossido nitrico e l'ADPasi. Regolano l'eccessiva formazione di fibrina e la degradazione incontrollata dei suoi frammenti, invece, gli inibitori fisiologici della coagulazione, quali l'Antitrombina III, il sistema Proteina C-Proteina S, l'inibitore della via metabolica del fattore tissutale (TFPI) ed il sistema fibrinolitico nel suo complesso. (Tabella IV)

Tabella IV. FATTORI ANTITROMBOTICI INIBIZIONE dell'ATTIVITA' PIASTRINICA

- Prostacicline
- Ossido Nitrico
- ADPasi

INIBIZIONE dei DEPOSITI DI FIBRINA

- Antitrombina III
- Proteina C-Proteina S
- TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)
- Sistema Fibrinolitico

CONDIZIONI DI IPERCOAGULABILITA'

In relazione alla complessa patogenesi della malattia tromboembolica ed alla multifattorialità degli eventi morbosi, le condizioni di ipercoagulabilità possono essere distinte in primitive e secondarie. Tra quelle primitive, le più importanti per incidenza e gravità clinica, sono i deficit di ATIII e quelli del sistema Proteina C-Proteina S.

DEFICIT di ANTITROMBINA III

L'Antitrombina III è una glicoproteina con massa di 60 kD, costituita da una singola catena di 432 aa. e quattro catene oligosaccaridiche laterali. Sintetizzata dal fegato, ha una concentrazione plasmatica di circa 125 µg/mL. Possiede attività inibitrice delle serina-proteasi ed è, quindi, capace di inattivare trombina ed altri fattori attivati della coagulazione (IX,X,XI,XII). La sua attività inibente è fortemente accelerata dai proteoglicani e dall'eparina, con la quale, assieme alla proteasi, forma un complesso ternario che aumenta drasticamente la velocità di inibizione della trombina.

Sono descritti due tipi principali di carenza congenita di AT III, trasmessi come carattere autosomico dominante, provocate da delezioni o da mutazioni *non-senso* nel gene localizzato in posizione 1q23-25: il tipo I, con diminuita sintesi della proteina; il tipo II, con sintesi di una proteina funzionalmente incompleta, alterata nel sito di legame con le serinaproteasi (in vicinanza dell'arginina 393) oppure in quello di legame con l'eparina (in vicinanza del triptofano 49), oppure in entrambi. Nella maggior parte dei soggetti eterozigoti, con un livello plasmatico di AT tra il 40 ed il 70% dei valori di riferimento, la manifestazione clinica della malattia si verifica in età giovanile con una tendenza marcata di trombosi venose profonde, spesso in concomitanza con altri fattori scatenanti quali, interventi chirurgici, gravidanza, puerperio, uso di contraccettivi orali, e con la comparsa della grave complicanza dell'embolia polmonare. I difetti acquisiti di AT III si possono evidenziare in corso di malattie sistemiche e di organo quali, epatopatie croniche, nefrosi, neoplasie, ustioni estese, leucemie, coagulazione intravascolare disseminata, terapia con eparina.

DEFICIT di PROTEINA C

La proteina C è una glicoproteina di 62 kD, costituita, nella forma matura, da due catene polipeptidiche: quella leggera presenta un dominio con nove residui di acido gamma-carbossilglutammico legato a due domini EGF-simili; quella pesante contiene il sito catalitico. Il complesso trombina-trombomodulina attiva in modo ottimale la proteina C. Questa, assieme al suo cofattore specifico la glicoproteina S, che ne incrementa l'affinità di legame ai fosfolipidi, forma un complesso legato alla membrana APC-PS, che inattiva i fattori Va e VIIIa.

La carenza congenita di Proteina C si trasmette come carattere autosomico dominante ad espressività incompleta, con situazioni fenotipicamente diverse a seconda dei livelli plasmatici della proteina. Gravissimi deficit, in condizioni di omozigosi, possono provocare la morte, per trombosi diffuse e massive, nei neonati. Nei soggetti adulti il deficit si manifesta con marcate trombosi venose profonde. La malattia, che ha un'incidenza di 1/16.000, è geneticamente determinata da delezioni od inserzioni (tipo I con diminuita sintesi di proteina) o da mutazioni *non-senso* (tipo II con proteina funzionalmente alterata) nel gene localizzato in posizione 3p11.1-3q11.2.

Una particolare resistenza alla APC è stata messa in evidenza come legata allo stato di eterozigosi o di omozigosi per la mutazione puntiforme nel gene (1q21-25) per il Fattore V, nella posizione 1691 della tripletta che codifica (CGA-CAA) per Arginina 506, sostituita da acido glutamico. Questa sostituzione altera il sito di "cleavage" della proteina C sul fattore V (Fattore V di Leiden) e ne impedisce l'inattivazione.

Deficit acquisiti della proteina C si possono verificare in condizioni morbose simili a quelle che determinano il deficit dell'Antitrombina III.

DEFICIT di PROTEINA S

Deficit ereditari della glicoproteina S rappresentano un importante fattore di rischio di trombosi venose. Sono descritti tre tipi di difetti: tipo I (deficit quantitativo) caratterizzato dalla diminuzione

della Proteina S totale e libera circolante; il tipo II che presenta un deficit funzionale con normali livelli plasmatici della proteina; il tipo III che presenta una riduzione selettiva dei livelli plasmatici di proteina libera. La proteina S è una glicoproteina di 69 kD che agisce come cofattore della proteina C nell'inattivare i fattori procoagulanti Va e VIIIa. Circola nel plasma in una forma legata al C4b-BP ed una libera funzionalmente attiva. Nonostante la difficoltà di caratterizzare le mutazioni, legata alla presenza di un gene e di uno pseudogene inattivo, sono state finora messe in evidenza oltre trenta mutazioni puntiformi.

Tabella V.

Manifestazioni trombotiche in soggetti con carenze congenite di Proteina S, C, e di AT III

	DEFICIT di		
	Proteina S	Proteina C	AT III
Trombosi Venose Profonde	74%	83%	88%
Tromboflebiti Superficiali	72%	63 %	8%
Embolie Polmonari	38%	53%	40%
Recidive di Trombosi Venose	77%	70%	60%

L'ipercoagulabilità può essere causata da alterazioni istologiche e funzionali delle cellule endoteliali (attivazione del fattore V, inibizione del t-PA, alterazioni della produzione di NO e prostaciline) dovute ad iperomocisteinemia, una malattia ereditaria che comporta aumento nel plasma ed accumulo nei tessuti di omocisteina per difetti enzimatici che ne impediscono il corretto e completo metabolismo. In particolare sono frequenti la carenza di cistationina-beta-sintetasi che impedisce la transulfurazione a cisteina e la carenza di metilentetraidrofolato-reduttasi che impedisce la rimetilazione dell'omocisteina a metionina. Si possono, quindi, riscontrare livelli molto elevati, elevati, e moderatamente elevati dell'aminoacido (v.n. fino a 16 $\mu\text{mol/L}$), in casi particolari dovuti anche a fattori acquisiti (insufficienza renale cronica, trattamento con antifolici).

Un'altra sindrome primitiva da ipercoagulabilità si può verificare in pazienti affetti da Lupus eritematoso sistemico per la comparsa di autoanticorpi di tipo IgG o IgM contro i fosfolipidi (LAC). In questa situazione il reperto laboratoristico è quello dell'allungamento dei tempi di tromboplastina parziale e di protrombina, ma dal punto di vista clinico si appalesano trombosi arteriose e venose recidivanti.

Le condizioni secondarie di ipercoagulabilità che favoriscono l'insorgenza di tromboembolismo, sono tutte quelle associate a patologie che condizionano l'equilibrio del sistema della coagulazione e della fibrinolisi, del numero e della funzionalità piastrinica, della normale struttura e funzione vascoloendoteliale. In particolare, vanno menzionati i difetti piastrinici con danno emostatico e, tra questi, le trombocitopatie congenite che provocano alterazioni della membrana piastrinica e quelle che provocano difetti intracellulari. (Tabella VI)

Tabella VI. DIFETTI PIASTRINICI CON DANNO EMOSTATICO**DIFETTI di ADESIVITA'**

- Malattia di von Willebrand
- Sindrome di Bernard-Soulier (assenza di GpIb)

DIFETTI di AGGREGAZIONE

- Tromboastenia di Glanzmann (assenza di GpIIb-GpIIIa)

DIFETTI della SECREZIONE

- Diminuita attività della ciclossigenasi
 - da Aspirina, da FANS
 - Congenita
- Difetti del "Granule storage pool"
 - Acquisiti, Congeniti
- Uremia

MASCHERAMENTO PIASTRINICO

- da antibiotici, da paraproteine

DEFICIT DI COFATTORE EPARINICO

Anche tale deficit si associa a sviluppo di trombosi venose profonde. Il difetto viene trasmesso come carattere autosomico dominante. Anche in alcune condizioni acquisite, si riscontra deficit di cofattore eparinico II, come nelle Epatopatie croniche e nella CID.

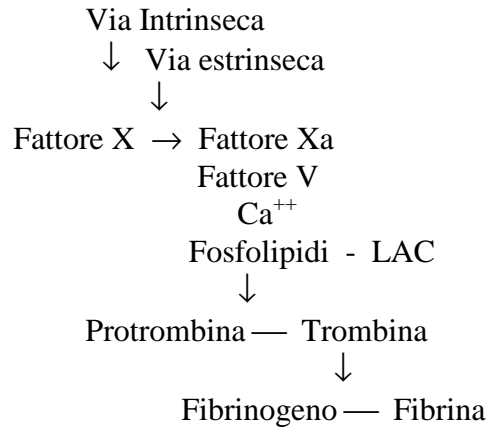
“LUPUS ANTICOAGULANT” (LAC)

I pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES), neoplasie, HIV, in donne con aborto recidivante ed anche in individui sani si può riscontrare la comparsa di un autoanticorpo IgG o IgM diretto contro i fosfolipidi (LAC) (*)

Esso inibisce l'attività dei fosfolipidi che intervengono nella tromboplastinogenesi intrinseca ed in quella estrinseca, provocando l'allungamento dei tempi di coagulazione che esplorano queste fasi, come il tempo di tromboplastina parziale ed il tempo di protrombina. Tuttavia tale attività anticoagulante non provoca in genere lo sviluppo di una sindrome emorragica, risultando bensì frequentemente associata a trombosi venose o arteriose. La patogenesi tuttavia di tale associazione non è chiara. E' stato dimostrato che questi reperti sono attribuibili alla presenza di autoanticorpi diretti contro i fosfolipidi, in particolare contro la cardiolipina (antigene fosfolipidico presente nei reagenti per la sifilide), contro i fosfolipidi della membrana piastrinica e contro la componente fosfolipidica della protrombinasi. Poiché questi anticorpi si riscontrano anche in pazienti non affetti da LES, è stata definita una distinta sindrome da anticorpi anti-cardiolipina (APS), caratterizzata da trombosi arteriose e venose recidivanti, aborti ricorrenti da trombosi placentari e trombocitopenia, spesso associati ad ipertensione arteriosa labile, livedo reticularis, emicrania, attacchi ischemici cerebrali ed altri disturbi neurologici. E' risultato evidente che la ricerca di anticorpi anti-cardiolipina costituisce uno dei test più sensibili della ricerca del LAC ai fini della diagnosi della predetta sindrome.

E' stato supposto che tale autoanticorpo, reagendo con i fosfolipidi della membrana piastrinica, inibisca l'attivazione e l'aggregazione piastrinica. Secondo altri autori il LAC inibisce l'attività della callicreina e la fibrinolisi, in altre parole dei fosfolipidi che potenziano l'attivazione della proteina C da parte della trombina. Non è invece ancora chiaro se questi anticorpi agiscano anche contro altre membrane cellulari (ad es. dei neuroni).

Ipotetico meccanismo d'azione del “Lupus anticoagulant” (LAC)



SINDROME DA ANTICORPI ANTI FOSFOLIPIDI

I criteri proposti per la diagnosi di sindrome da Anticorpi Anti-fosfolipidi sono

Clinici

Presenza di trombosi venose
 Presenza di trombosi arteriose
 Aborti ripetuti
 Trombocitopenia

Sierologici

Presenza di anticorpi IgG anti-cardiolipina (oltre 10 U)
 Presenza di LAC
 Presenza di anticorpi IgM anti-cardiolipina (oltre 10 U) + presenza di LAC

La diagnosi può essere posta correttamente, se sono soddisfatti un criterio clinico ed uno sierologico.

I tests sierologici devono rimanere positivi per un periodo di almeno otto settimane.

(*) Tali anticorpi sono un gruppo diversificato di immunoglobuline comprendenti tra gli altri gli anticorpi anticardiolipina e l'anticoagulante lupus.

CID (COAGULAZIONE INTRAVASCOLARE DISSEMINATA)

Nota anche come coagulopatia da consumo o sindrome da defibrinazione, si tratta di una profonda alterazione dell'emostasi coinvolgente la parete vasale, le piastrine, la cascata coagulatoria, i meccanismi d'inibizione della coagulazione e la fibrinolisi.

La patogenesi della CID è legata ad una attivazione della coagulazione in vivo, che causa consumo dei fattori della coagulazione e delle piastrine. La formazione di microtrombi provoca danno ischemico d'organo diffuso o localizzato ed anemia emolitica microangiopatica, mentre il consumo dei fattori della coagulazione e delle piastrine porta ad una diatesi emorragica. La sede di questi fenomeni è il microcircolo in particolare a livello di cervello, rene, intestino, cute.

La CID può comparire in corso di varie patologie, il quadro clinico è caratterizzato da:

- emorragie cutanee e mucose
- necrosi tissutale
- microtrombi
- disfunzione d'organo multipla

I test di laboratorio riflettono le gravi alterazioni dell'emostasi:

- prolungamento di PT, aPTT, TT
- marcata diminuzione del fibrinogeno
- diminuzione conta piastrinica
- aumento dei prodotti di degradazione del fibrinogeno/fibrina (FDP).

Accanto a questo quadro classico della CID scompensata, o acuta, si possono riconoscere anche delle condizioni di CID cronica, o compensata o anche ipercompensata, in cui le alterazioni degli esami di laboratorio sono meno drammatiche, tanto la diagnosi di queste forme è generalmente più complessa.

PATOGENESI

Il sistema della coagulazione, indipendentemente dal fatto che sia attivato dalla via estrinseca o da quella intrinseca, è regolato in modo tale che la produzione di trombina sia localizzata alla sede del danno vascolare. Attraverso la sua azione catalitica sulle piastrine e sui fattori I, V, VIII e XIII, la trombina attiva l'emostasi localmente, causando la formazione del tappo emostatico. In condizioni normali, la limitazione dell'attività della trombina alla sede del danno vascolare è assicurata dall'effetto diluente del flusso sanguigno, dalla presenza in circolo d'inibitori fisiologici della coagulazione e dalla rimozione, attraverso il sistema macrofagico epatico, dei fattori della coagulazione attivati. Questi raffinati sistemi di controllo possono essere scardinati in varie circostanze:

- 1) Danno tissutale massivo, che determina la liberazione di enormi quantità di materiale tromboplastico, causando un'eccessiva attivazione del sistema estrinseco della coagulazione;
- 2) Danno endoteliale generalizzato, che espone notevoli quantità di strutture attivanti il sistema intrinseco della coagulazione
- 3) Shock, associato a riduzione del flusso sanguigno, con perdita dell'azione diluente sui fattori della coagulazione attivati.
- 4) Alterata perfusione o funzione epatica, con conseguente difettosa rimozione dei fattori attivati della coagulazione attraverso il sistema macrofagico epatico.

Molte sono le possibili cause scatenanti la CID:

Infezioni (setticemie - viremie – emoparassitosi malarica) nel 70% dei casi

Neoplasie (ca. metastatizzati - leucemie acute in particolare la promielocitica) nel 70% dei casi

Patologie ostetriche (aborto settico- eclampsia - placenta previa) nel 30%

Shock (trauma chirurgico esteso – ustioni - colpo di calore)

Epatopatie (necrosi epatica acuta - cirrosi)

Trapianti (rigetto acuto).

Malformazioni vascolari

Gli estesi stimoli che attivano il sistema della coagulazione attivano anche il sistema fibrinolitico.

La plasmina circolante degrada i fattori VIII, il fibrinogeno e la fibrina, dando luogo alla formazione di prodotti di degradazione del fibrinogeno e della fibrina, che possono interferire con la funzione piastrinica e con la normale polimerizzazione della fibrina.

Le conseguenze della CID dipendono dall'eziologia e dalla rapidità di propagazione dell'evento scatenante. Se l'attivazione della coagulazione avviene lentamente, si ha la produzione di un eccesso di prodotti attivati, che predispongono alla formazione di trombi. Le manifestazioni cliniche, più o meno silenti, saranno in questo caso prevalentemente di tipo trombotico: infarti d'organo e trombosi venosa profonda (CID cronica). Se la reazione al contrario è esplosiva, di rapida propagazione, il quadro clinico è dominato dalla coagulazione intravascolare con deplezione di piastrine e di fattori I,II,V,VIII,XIII e produzione di FDP da parte della plasmina (CID acuta), la manifestazione clinica tipica è in questo caso l'emorragia.

DIAGNOSI

E' necessario utilizzare test di semplice esecuzione, che siano il più possibile specifici e che diano una risposta nel più breve tempo possibile. Esami più complicati hanno un interesse solo relativo per la definizione rapida della diagnosi, ma tuttavia possono risultare utili nelle forme dubbie di CID cronica. I test di laboratorio di primaria importanza sono:

Dosaggio di Fibrinogeno - PT- aPTT- Conta piastrine - TT (tempo di trombina) – FDP - D-Dimero(*).

Il livello del fibrinogeno plasmatico può essere marcatamente diminuito nella CID acuta; normale in quella cronica; aumentato in quella ipercompensata ad es. in corso di patologie tumorali o infiammazioni croniche.

Se il conteggio delle piastrine è ripetutamente normale, è possibile escludere la diagnosi di CID acuta o subacuta. Il PT è generalmente prolungato nella CID acuta scompensata, tale prolungamento è dovuto principalmente al consumo del fattore V e del fibrinogeno.

Il TT è prolungato per effetto sia della ipofibrinogenemia sia della presenza di FDP. Poiché il TT è sensibile all'eparina, che in alcune situazioni deve essere somministrata al paziente, sarà utile monitorare anche il tempo di trombinocoagulasi sensibile all'eparina. L'aPTT è generalmente meno prolungato del PT.

Tabella VII.**PROFILO DEGLI ESAMI DI LABORATORIO NELLE DIVERSE FORME DI CID**

	CID ACUTA	CID CRONICA	CID IPERCOMPENSATA
Fibrinogeno	↓	normale	↑
Piastrine	↓	normale o ↓	normale
PT	prolungato	normale	normale
TT	prolungato++	prolungato +	prolungato +
aPTT	prolungato	normale	normale/accorciato
FDP	aumentati ++	aumentati +	aumentati +

Come detto precedentemente, raramente si può rendere necessario eseguire test più complessi al fine di confermare il sospetto di CID, tra questi i dosaggi dei fattori II, V, VIII, AT III e del fibrinopeptide A.

E' molto evidente quanto sia importante il monitoraggio terapeutico da parte del laboratorio. Il presidio terapeutico d'eccellenza è quello di rimuovere la causa scatenante la CID, nei casi in cui ciò non è possibile è necessario ricorrere ad una terapia a base di eparina per interrompere l'attivazione della coagulazione. Un altro possibile approccio terapeutico al paziente con CID è la plasmferesi, nel tentativo di rimuovere dal circolo il materiale tromboplastinico-simile responsabile dell'attivazione della cascata coagulativa, dei complessi antigene-anticorpo, degli FDP, o degli stessi fattori della coagulazione attivati.

(*) E' il frammento che si forma per azione litica della plasmina sulla fibrina. Il frammento D è un dimero costituito da 2 unità tenute assieme da legami gamma-gamma, formatosi per azione stabilizzante del fattore XIII. Oggi grazie all'uso di anticorpi monoclonali è possibile dosare mediante metodica immunoenzimatica o radioimmunologica il D-Dimero. Esso inoltre è da considerare come marker di una pregressa o presente attivazione della coagulazione.

TESTS DI LABORATORIO.

Lo scopo principale della diagnostica di laboratorio delle sindromi tromboemboliche è quello di identificare accuratamente, a livello biochimico e molecolare, le alterazioni ed i deficit presenti nei soggetti che hanno già manifestato una chiara sintomatologia trombotica ed in quelli ancora in fase asintomatica. Nel caso dei difetti ereditari della coagulazione la diagnosi di laboratorio è semplificata dalla disponibilità di validi tests di screening, quali il tempo di protrombina, ed il tempo di tromboplastina parziale attivata ed il dosaggio del fibrinogeno, che consentono di individuare i soggetti che devono essere sottoposti ad ulteriori e specifici tests. D'altro canto, può non essere ritenuto conveniente sul piano economico, né valido dal punto di vista culturale, attuare una simile procedura nella diagnostica delle alterazioni tromboemboliche che possono non essere messe in evidenza da indagini analitiche di prima istanza e necessitano di dosaggi analitici complicati, che sono eseguiti su pazienti preselezionati ad alto rischio. Una possibilità da valutare, legata al costo-beneficio, è quella di sottoporre ad indagini soggetti giovani che, in seguito alla esposizione a fattori di rischio, quali gravidanza, terapia con contraccettivi orali, interventi di chirurgia ortopedica, possano andare incontro a fenomeni tromboembolici con esito profondamente invalidante, con una frequenza molto più elevata della popolazione normale.

La selezione deve essere preceduta e basata da un'accurata raccolta dell'anamnesi del soggetto e della sua famiglia, che consenta di orientarsi tra cause acquisite di tromboembolismo (neoplasie, disordini mieloproliferativi, LES, sindrome da anticorpi antifosfolipidi) e cause ereditarie. L'anamnesi familiare negativa non deve far escludere la possibilità di mutazioni genetiche i cui effetti non si siano ancora evidenziati. Come in tanti altri casi, le indagini di laboratorio per confermare la diagnosi di tromboembolia su base genetica devono essere specifici, ed ad elevato valore predittivo.

Un possibile algoritmo diagnostico di laboratorio prescrive di utilizzare, inizialmente, delle indagini che consentano di escludere o confermare le possibili cause più frequenti di trombofilia, tenendo presente che i tests funzionali consentono di mettere in evidenza sia i deficit quantitativi sia quelli qualitativi, mentre i dosaggi immunoenzimatici servono solo a diagnosticare quelli qualitativi. Non esiste un singolo test di laboratorio che da solo sia direttamente significativo per diagnosticare uno stato pretrombotico. E', invece, molto più significativo eseguire un complesso di indagini sulle quali basare un valido supporto patogenetico del sospetto diagnostico: conta delle piastrine, ematocrito, APTT, PT, TT, AT III, attività fibrinolitica plasmatica, lipoproteine. A questi tests si possono associare la valutazione del tempo di lisi euglobulinica, significativamente diminuito nell'ipercoagulabilità, ed i tests per misurare la reazione di conversione fibrinogeno-fibrina. (Tabella VIII).

Tabella VIII. ALGORITMI DIAGNOSTICI

Tests I Istanza	Tests II Istanza
	COAGULAZIONE
PT; APTT Fibrinogeno, FDP	ATIII, HC II, Proteina C/S, Fatt.V Leiden, Fibrinopeptide A, Compl. Trombina-Antitrombina
	PIASTRINE
Numero, Adesione, Aggregazione	Fatt. Piastrinico 4, Tromboglobulina, TxA ₂ PGF1alfa, PGH ₂ , PAF
	FIBRINOLISI
Lisi Euglobuline	Plasminogeno, Antiplasmina, Attivatore Tissutale Plasminogeno, PAI, D-dimero, Prodotti degradazione Fibrina, Prodotti degradazione Fibrinogeno
	ENDOTELIO
	vWF, TPA, PAI, IL-8, IL-6

Per misurare il rischio di trombosi arteriosa ed, eventualmente, per poterne prevenire le conseguenze (ictus cerebrale, infarto del miocardio) dal punto di vista epidemiologico e prospettico

è di notevole importanza, per uno stesso paziente, poter disporre di dati, raccolti in tempi successivi, riguardanti la concentrazione di fibrinogeno e di fattore VII. Da studi condotti a livello internazionale, si può concludere che elevati livelli di entrambe queste molecole rappresentano fattori patogenetici di grande importanza della arteriopatia trombotica ed il loro dosaggio dovrebbe essere incluso, costantemente, nella valutazione del rischio trombotico arterioso.

In generale, soltanto la carenza e l'alterazione funzionale di AT III, o di Proteina C-Proteina S, o di Cofattore Eparinico II rappresentano fattori eziopatogenetici certi di sindromi tromboemboliche, mentre non lo sono i deficit di alfa-2 macroglobulina e di alfa-1 antitripsina.

Nei casi di deficit di Antitrombina III si possono utilizzare indagini che misurano l'attività del cofattore eparinico per l'antitrombina impiegando come cofattore la trombina o il fattore Xa, facendo riferimento ad uno standard internazionale per AT. Si possono distinguere un deficit di tipo I, con ridotta concentrazione e ridotta attività funzionale, e deficit di tipo II con attività funzionale deficitaria per alterazioni del sito recettoriale per le serinaproteasi o per l'eparina. I metodi immunochimici, dosando la concentrazione dell'analita, non consentono di mettere in evidenza i soggetti portatori di questi ultimi tipi di deficit.

Nei casi di deficit di Proteina C possono essere utilizzati vari dosaggi che differiscono a seconda del differente attivatore utilizzato e del metodo per evidenziare la reazione. Anche in questo caso è disponibile uno standard internazionale di PC e spesso sono da preferire i metodi che richiedono l'impiego del veleno di serpente, quale attivatore della PC, ed un substrato sintetico, quale supporto di reazione. Un importante criterio di scelta delle indagini che definiscono la "resistenza alla APC" è quello della comparsa di episodi di tromboembolismo venoso in pazienti di età inferiore ai 40 anni e i tromboembolismo primario in pazienti più anziani o di trombosi nei neonati. La resistenza alla APC è stata originariamente valutata mediante un test funzionale basato sulla capacità del plasma del paziente di resistere al prolungamento della APTT dopo aggiunta di proteina C attivata. Questo dosaggio, fatte salve le condizioni peculiari di esecuzione, consente di discriminare molto accuratamente tra pazienti "resistenti" con mutazione di Leiden nel fattore V e pazienti senza resistenza. Tuttavia, il risultato deve essere confermato dalla ricerca delle possibili mutazioni nei pochi pazienti sintomatici nei quali il risultato del test non è discriminante.

La diagnosi di laboratorio dei deficit di Proteina S risulta più complessa e, fino ad oggi, i metodi immunoenzimatici che impiegano anticorpi monoclonali sono i più affidabili per misurare la concentrazione totale di PS. La frazione libera, il cui dosaggio ha un peculiare significato clinico-diagnostico (Bassa nel difetto di tipo I, Normale nel tipo II), può essere misurata dopo precipitazione di quella legata al C4b-Binding Protein con PEG.

Indagini per possibili alterazioni nel metabolismo dell'omocisteina sono necessarie in soggetti affetti da trombosi arteriose e/o venose in giovane età. La diagnosi di laboratorio di iperomocisteinemia viene eseguita valutando i livelli plasmatici dell'aminoacido mediante un accurato metodo cromatografico, in condizioni basali e 4 ed 8 ore dopo carico orale con metionina (0.1 g/kg di peso corporeo) ed, eventualmente, con test molecolari per la ricerca della mutazione.

Le alterazioni del sistema fibrinolitico, nel senso dell'ipofibrinolisi, possono essere messe in evidenza mediante tests di laboratorio che consentano la diagnosi di difetti congeniti dei fattori fibrinolitici contribuendo a chiarire la patogenesi della trombofilia dovuta a deficit del Plasminogeno. Essi sono trasmessi con eredità autosomica dominante; danno conto del 2-3% delle trombosi venose profonde in età giovanile e richiedono il dosaggio del plasminogeno e della sua attività biologica.

Le alterazioni in senso iperfibrinolitico possono essere dovuti a deficit della alfa-2 antiplasmina trasmessi con carattere autosomico recessivo. L'attività di questo inibitore è di circa il 10% nei soggetti omozigoti e del 50% negli eterozigoti. Questi pazienti manifestano gravi emorragie, sin dall'inizio della loro vita extrauterina e il difetto deve essere sospettato, in presenza di valori normali ai tests di screening per la coagulazione e dell'accorciamento del tempo di lisi del coagulo e di quello del tempo di lisi delle euglobine. Tuttavia è necessario dosare l'attività biologica (5-7 mg/dL) e quella antigenica dell'inibitore, la cui riduzione è patognomonica del deficit. (Tabella IX).

**Tabella IX. CORRELAZIONI TRA TESTS DI COAGULABILITA'
E DISORDINI EMOSTATICI**

ALLUNGAMENTO DEL TEMPO DI TROMBOPLASTINA PARZIALE (PTT)

Senza Emorragia: Fattori XII, Chininogeno, Precallicreina

Emorragia lieve: Fattore XI

Emorragia grave o frequente: Fattore VIII, Fatt. IX

ALLUNGAMENTO DEL TEMPO DI PROTROMBINA (PT)

Deficit Fattore VII

Deficit iniziale di Vitamina K

Terapia con anticoagulante

ALLUNGAMENTO di PTT e PT

Deficit di fattori II, V o X

Deficit di Vitamina K

Terapia con anticoagulante

ALLUNGAMENTO del TEMPO DI TROMBINA (TT)

Emorragia lieve o rara: afibrinogenemia

Emorragia grave e frequente: disfibrinogenemia

Somministrazione di Eparina

SOLUBILITA' del COAGULO in Urea 5M

Deficit di Fatt. XIII

Deficit di Cross-linking

LISI RAPIDA del COAGULO

Inibitore della alfa-2 plasmina.

I meccanismi patogenetici delle sindromi tromboemboliche sono estremamente complessi perché risultanti da una articolata interazione multifattoriale. Di essa fanno parte la risposta endoteliale alla velocità del flusso ematico ed alla composizione del sangue, l'aggregabilità piastrinica, la controllata attivazione ed inibizione del sistema coagulativo e fibrinolitico. Pertanto, riteniamo molto auspicabile che l'atteggiamento del medico di laboratorio sia quello di ricercare una stretta

collaborazione col clinico. Tale collaborazione deve essere volta sia a valutare adeguatamente i risultati delle indagini di prima istanza, sia a scegliere le indagini di laboratorio che più efficacemente possano consentire di precisare la diagnosi eziopatogenetica e di monitorare i risultati terapeutici.

BIBLIOGRAFIA.

- Bertina R.M., et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369:64-67, 1994
- Broze G.J. Jr Tissue factor pathway inhibitor and revised theory of coagulation. *Annu.Rev.Med.*,46:103-112, 1995
- DeStefano V., Finazzi G., Mannucci P.M. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes and management. *Blood*, 87 n.5: 3531-44, 1996
- George J.N., Shattil S.J. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N.Engl.J.Med.*, 324:27, 1991
- Goyette P. et al. Seven novel mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype-phenotype correlation in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J. Hum. Genet.* 56:1052, 1995
- Griffin J.H., Evatt B., Wideman C., Fernandez J.A.. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood*, 82, n.7:1989-93, 1993
- Kroll HM, et al. Platelets and Shear stress. *Blood* 88, n.5: 1525, 1996
- Rodgers G.M.. Activated protein C resistance and inherited thrombosis. *Am J. Clin. Pathol.*, 103: 261-62, 1995.
- Schafer A.J., Kroll M.H.. Nonatheromatous arterial thrombosis. *Ann. Rev. Med.*, 44:155-70, 1993.