



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Sistema Sanitario  Regione
Lombardia



FONDAZIONE
INTERNAZIONALE
MENARINI

XL Corso di aggiornamento

Alterazioni congenite ed acquisite della coagulazione

Focus su:

**40 anni dopo:
i test di laboratorio e loro utilità clinica nello
studio dell'emostasi e trombosi**

ABSTRACT BOOK

Fondazione IRCCS Ca' Granda
Ospedale Maggiore Policlinico

Aula Magna G.B. Candiani – Clinica Mangiagalli
Via della Commenda, 12



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Sistema Sanitario  Regione
Lombardia



FONDAZIONE
INTERNAZIONALE
MENARINI

XL Corso di aggiornamento

Alterazioni congenite ed acquisite della coagulazione

Focus su:

**40 anni dopo:
i test di laboratorio e loro utilità clinica nello
studio dell'emostasi e trombosi**

ABSTRACT BOOK

Fondazione IRCCS Ca' Granda
Ospedale Maggiore Policlinico

Aula Magna G.B. Candiani – Clinica Mangiagalli
Via della Commenda, 12

INDICE

G. de Gaetano

Alterazioni congenite e acquisite della coagulazione:
40 anni...e non sentirli pag. 1

G.F. Gensini

Errore in Medicina pag. 3

L. Iacoviello

Fattori di rischio cardiovascolare: dati e prospettive
dal Progetto Moli-sani pag. 10

B. Ferrari

Microangiopatie trombotiche e gravidanza pag. 16

D. Prisco, L. Ciucciarelli, A. Cameli,

C. Cenci, E. Silvestri

L'emorragia postpartum: nuovi spunti diagnostici
e terapeutici pag. 22

Focus su:

**40 anni dopo:
i test di laboratorio e loro utilità clinica nello studio
dell'emostasi e trombosi**

V. Pengo

Diagnosi della sindrome da anticorpi antifosfolipidi pag. 30

G. Palareti

Il laboratorio nella diagnosi e terapia
del tromboembolismo venoso pag. 32

| | |
|--|---------|
| M. Moia Controllo dell'anticoagulazione | pag. 37 |
| P.M. Mannucci Diagnosi dell'emofilia e della malattia di von Willebrand | pag. 41 |
| G.M. Podda, E.A. Femia, M. Pugliano, M. Cattaneo Diagnosi dei difetti funzionali piastrinici | pag. 43 |
| <hr/> | |
| M.B. Donati In principio era il Tissue Factor... <i>(ricordando Roberto Lorenzet)</i> | pag. 44 |
| M. Becatti, C. Fiorillo, R. Abbate Stress ossidativo ed emostasi | pag. 50 |
| A.M. Gori, A. Sereni, A. Kura, M. Pazzi, E. Grifoni, R. Marcucci I nuovi anticoagulanti orali: oltre l'effetto anticoagulante | pag. 56 |
| C. Cerletti, M. Bonaccio, A. Di Castelnuovo, L. Iacoviello, G. de Gaetano Piastrine e leucociti come cellule della "low grade inflammation" | pag. 67 |
| B. Giusti, E. Sticchi, R. De Carlo, A. Magi, L. Tattini, A. Volta, S. Rossinelli Il sequenziamento di seconda e terza generazione: nuove frontiere in diagnostica | pag. 72 |
| R. Marcucci, E. Grifoni Lipoproteina(a): update 2014, tra genetica e nuove possibilità terapeutiche | pag. 79 |

Alterazioni Congenite e Acquisite della Coagulazione: Metodi di Studio: 40 Anni....e non sentirli

Giovanni de Gaetano

Direttore, Dipartimento di Epidemiologia e Prevenzione, IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo NEUROMED, Pozzilli, Isernia

*I' mi son un che quando
Amor m'ispira noto e a quel modo
Ch'ei ditta dentro vo significando
Purgatorio, c. XXIV*

I meccanismi di adesione e aggregazione piastrinica, il coinvolgimento dei leucociti, il ruolo fondamentale dell'endotelio e del danno vascolare nell'attivare l'emostasi e la trombosi, sono ancora essenzialmente quelli descritti da Giulio Bizzozero nel 1882, ben 132 anni fa....

Il quartetto che cura la trombosi (eparina, warfarina, streptokinasi e aspirina) suona ancora da decenni, con qualche innesto di nuovi strumenti che non sostituiscono mai completamente quelli antichi.

Lo schema della coagulazione e i suoi fattori sono sostanzialmente quelli descritti nel 1954 dal Comitato che si riunì a Roma e dette ai fattori della coagulazione i numeri romani che ancora oggi adoperiamo.

Il primo Corso su "Alterazioni congenite e acquisite della coagulazione: metodi di studio" si tenne a Milano nel 1973, quando si cominciava ad andare a piedi le domeniche, per la crisi del petrolio. Oggi il 40° Corso si tiene ancora a Milano, in piena crisi economica, quando molta gente non arriva alla terza settimana del mese e non può seguire più la dieta mediterranea divenuta troppo costosa. Dalla guerra fredda siamo passati alla terza guerra mondiale, come ha recentemente ammonito Papa Francesco.

Cosa è cambiato allora in questi 40 anni?

E' quello che cercheremo di analizzare durante la presentazione, ripercorrendo brevemente le tappe principali che hanno segnato questi 40 anni di ricerca, lungo il filo storico e culturale tracciato dai 40 Corsi.

I programmi “Menarini” (e qui voglio ricordare con animo grato il Dr. Sergio Gorini) sono uno specchio fedele dell’evoluzione del pensiero e delle conoscenze avvenuti in questi ultimi decenni in Italia e nel mondo.

Sono anche il frutto di un clima di collaborazione e amicizia che ha contraddistinto nel nostro Paese la nascita e lo sviluppo dell’interesse e delle competenze nel campo dell’emostasi e della trombosi. Tre gruppi di lavoro, che in altri luoghi e tempi si sarebbero fatta una guerra ostinata, hanno mantenuto invece un alto livello di rispetto reciproco, coniugandolo con una costante competizione che ha contribuito a portare l’Italia tra i primissimi posti d’eccellenza nella scala internazionale dell’emostasi e della trombosi.

Se molto è stato fatto, molto resta ancora da fare.

Per dirla con il Presidente Obama: *The best is yet to come...*

In bocca al lupo, allora, a noi tutti e AD MAJORA!

Errore in Medicina

Gian Franco Gensini

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze

Il problema dell'errore in medicina ha radici lontane.

Qualsiasi atto medico, comunque svolto, ha in sé la possibilità di generare errori, che sono stati variamente classificati in funzione delle loro caratteristiche.

Certamente in un'epoca in cui la gestione del paziente diventa sempre più complessa in ragione proprio della complessità del paziente stesso, con la medicina personalizzata che impone riferimenti ulteriori rispetto ai classici processi di diagnosi e cura stereotipati per pazienti che venivano in passato etichettati con una comune definizione di malattia, risulta oggi particolarmente importante la messa in atto di tutte le procedure in grado di limitare il rischio di errore.

L'elemento cruciale in questo sistema è che quasi sempre in medicina la comparsa di un errore o di un evento *near miss*, come si usa dire, evitato appena, rappresenta un qualcosa che è collegato con un errore umano, cioè con la non adozione di procedure oppure con un errore nell'applicazione delle procedure perché si applica la procedura non corretta per la circostanza oppure perché all'interno della procedura non si svolgono pienamente alcuni passaggi o un passaggio solo, ma cruciale.

La consapevolezza che nella medicina attuale, in cui le azioni sanitarie sono il più spesso azioni di équipe in cui il processo interprofessionale rappresenta l'elemento che produce salute, l'attenzione all'analisi dei processi per l'identificazione degli errori possibili e la mappatura degli errori commessi sulla base delle segnalazioni a livello nazionale, rappresentano elementi centrali per l'identificazione delle aree a maggior rischio di errore, delle modalità con cui si genera l'errore e quindi la base per le azioni correttive che si possono effettuare.

Dall'individuazione delle dinamiche dell'errore si ricavano le dinamiche necessarie per andare a modificare quello che, non adeguatamente eseguito nell'ambito della procedura, ha rappresentato il motivo di errore.

Negli ultimi decenni si è assistito ad un rinnovato e crescente interesse per l'*errore in medicina* e per molto tempo si è ritenuto che esso derivasse semplicemente da un'incompleta osservazione dei fatti o da un'alterazione nella interpretazione dei testi diagnostici¹⁻⁴. Ai primi dell'Ottocento Maurizio Bufalini sosteneva che “non vi può essere altra conoscenza se non quella che deriva dalla semplice osservazione e non può essere considerata affidabile alcuna congettura che derivi unicamente dall'intelletto”. Antonio Gasbarrini insegnava ai suoi studenti che “attraverso una diligente e accurata osservazione si può arrivare alla malattia: i migliori clinici sono i migliori osservatori”. A Lipsia, M. Burger nel suo Trattato sugli errori in medicina interna, attribuiva gli errori a esami obiettivi incompleti e a errate interpretazioni degli esami diagnostici⁵.

Nella medicina moderna, la complessità del paziente, ovvero la coesistenza in uno stesso individuo di condizioni patologiche con diverso grado di gravità e di acuzie, rende la possibilità/probabilità di errore più elevata. E' implicito che nella medicina moderna debbano appartenere al bagaglio culturale del medico le strategie atte a prevenire errore stesso (quali la stesura di protocolli e di procedure condivise) e, qualora l'errore venga commesso, le modalità per gestirlo (ad esempio attraverso il rischio clinico). In altri termini, l'“errore in medicina” può essere considerato una “nuova condizione morbosa” (iatrogena) nella quale il medico deve essere edotto sulla prevenzione, fisiopatologia e trattamento. Come in ogni altro quadro patologico, il corretto inquadramento tassonomico ne consente l'identificazione e spesso l'individuazione degli elementi che possono aver portato alla sua genesi.

Nella realtà clinica, possiamo distinguere un *errore clinico vero e proprio* (che può avere una genesi sia cognitiva che metodologica) e un *errore di sistema* (da mettere in relazione all'organizzazione del percorso assistenziale).

La genesi dell'errore clinico è insita nel processo stesso di decisione clinica, quel processo che, condotto nelle condizioni più diverse (ambulatorio, sala operatoria, reparti di degenza, terapia intensiva) e con una tempistica la più varia (dai tempi stretti e obbligati del paziente critico a quelli ampi della prevenzione primaria) conduce in modo “inevitabile” alla definizione di un percorso preventivo o diagnostico e terapeutico.

La complessità dell'analisi decisionale in medicina deriva dal fatto che questa deve prendere in considerazione non solo elementi fattuali (come la probabilità o la gravità della malattia) ma anche elementi valutativi (come il vissuto di un processo morboso).

Così Redelmeir⁶ racchiudeva il valore clinico delle decisioni mediche: **“Il giudizio clinico merita grande attenzione per l'enorme potenzialità di errore che racchiude in sé così come per le concrete opportunità di successo”**

Una considerazione a parte, quasi trasversale, meritano la *comunicazione e la relazione*, fonti molto frequenti di errore a vari livelli. La comunicazione e la relazione sono infatti parte integrante della quotidianità professionale e protagonista dei principali momenti di cura. La raccolta anamnestica è il primo momento di incontro medico-paziente, e le informazioni che vengono raccolte in questa sede condizionano pesantemente il percorso diagnostico-terapeutico successivo, compromettendolo, sia quando sono errate che quando sono carenti. Il colloquio con i familiari è non solo un momento informativo per questi ultimi, ma anche verifica e completamento dei dati anamnestici. I ritmi serrati con cui spesso si lavora possono non consentire di dare spazio adeguato a questi incontri, e questo rappresenta spesso un elemento di debolezza per la piena comprensione del paziente. Infine, la comunicazione e la relazione con i colleghi, elementi motori della rete clinica, ma anche elementi determinanti della continuità delle cure (nel riaffidare ad esempio un paziente al medico curante) è un vero e proprio momento formativo e di crescita (ad esempio nella relazione tra medico ospedaliero e medico di medicina generale, nella gestione multidisciplinare dei pazienti, nella trasmissione delle “consegne” ad un cambio turno).

Prevenzione dell'errore

La prevenzione dell'errore consta di elementi diversi ciascuno dei quali non ha una efficacia assoluta, ma è parte necessaria di una sorta di “sistema preventivo”. Ad esempio, le Linee Guida non prevengono l'errore se non affiancate a protocolli attuativi (specifici per i diversi contesti), procedure condivise (specifiche per contesti, Reparti, Sale Operatorie) e a ripetuti controlli di qualità. Infatti la possibilità di commettere errori è costantemente presente, e costanti e sistematiche devono essere le “verifiche” della qualità/efficacia dei sistemi preventivi. Ad esempio, la stesura della corretta procedura per il posizionamento di accessi venosi centrali non può essere sufficiente alla prevenzione dell'errore se non affiancata a periodiche valutazioni della sua corretta applicazione.

Trattamento dell'errore

In primis si devono controllare e “riparare” le conseguenze, gestendo la “complicanza”. L'errore però non deve essere ignorato, come potrebbe suggerire il timore delle problematiche medico-legali connesse. Si devono informare in modo completo e corretto il paziente e i familiari e poi dedicare uno spazio per discutere in modo collegiale e per tradurre l'errore in formazione volta ad evitarne il ripetersi. In questi incontri è necessario:

Individuare l'errore

Questo processo richiede umiltà nel riconoscere l'errore, nel riconoscere la propria fallibilità e la necessità di continuare a formarsi anche in età professionale avanzata. E' possibile senz'altro riconoscere un nostro errore se abbiamo la cultura adeguata, abbandoniamo l'autoreferenzialità e permettiamo a terzi di rivalutare il nostro operato. Possiamo infatti non essere in grado di cogliere “devianze” da un percorso, se non conosciamo quello corretto.

Il clima in cui tutto questo viene affrontato è quello di considerare l'errore un "problema" che riguarda non il singolo professionista ma il gruppo, affinché si rafforzi il senso di "collegialità", la fiducia interpersonale e la determinazione della necessità di una crescita comune; analizzare la sua genesi ed in particolare stabilire se questa è da mettere in relazione ad un deficit di "conoscenze" oppure di "organizzazione".

Sarà così possibile rivedere, ampliare e soprattutto condividere le prime oppure modificare la seconda; analizzare le condizioni in cui di verifica l'errore. Molto spesso, soprattutto in medicina critica ma anche in ambulatorio, l'errore può essere messo in relazione a "carichi di lavoro eccessivo" e a ritmi lavorativi "non sostenibili". In tal caso dovranno essere applicati strumenti organizzativi.

Verificare l'applicazione degli strumenti utilizzati per prevenire il ripetersi dell'errore. Gli strumenti di verifica possono essere i più vari: da questionari ad un calendario di incontri periodici, ad una raccolta di dati. Per quanto la verifica possa essere considerata un dispendio di risorse e di tempo, è l'unico modo per tutelarsi "almeno dalla recidiva di errore". Non sono eccessive né superflue le risorse (in termini di tempo) che vengono dedicata a questo aspetto e non è un "problema" solo degli organizzatori sanitari.

Nella Tabella abbiamo cercato di evidenziare gli elementi essenziale nella gestione/trattamento dell'errore

| | Tipo di errore | |
|--|--|---|
| | CLINICO | SISTEMATICO |
| 1. Valutazione delle conseguenze dell'errore | Gestione della complicità impostazione percorso diagnostico/terapeutico, eventuale intensificazione dell'intensità delle cure | Gestione della complicità impostazione percorso diagnostico/terapeutico, eventuale intensificazione dell'intensità delle cure |
| 2. Informare paziente e familiari | L'informazione dovrebbe essere effettuata da tutte le figure professionali intervenute nel percorso assistenziale | L'informazione dovrebbe essere effettuata da tutte le figure professionali intervenute nel percorso assistenziale |
| 3 Individuazione della genesi dell'errore | Insita nel percorso decisionale: utilizzazione di strumenti quali l' <i>audit</i> per ripercorrere l'intero iter effettuato dal paziente | Insita nel percorso assistenziale: individuazione dell'anello "carente" (i.e. attivazione/tempo di trasporto) collegialmente, cioè con tutte le strutture coinvolte (i.e.. Sistema di Emergenza Territoriale, DEA, REparto) |
| 4. Attuazione di strumenti "terapeutici" | Compilazione di protocolli condivisi relativi al quadro patologico oggetto di errore | Complicazione di percorsi assistenziale condivisi |
| 5- Verifica a distanza di tempo dell'efficacia dello strumento "terapeutico" | Verifica attuazione protocollo (i.e valutazione outcome/tempo degenza/costi di pazienti con quella patologia) | Verifica attuazione del percorso assistenziale condiviso, mediante registro di tutti i pazienti con quella diagnosi nei 6 mesi successivi |

La valutazione della nostra pratica clinica quotidiana induce alcune riflessioni. L'errore in medicina rimane un prodotto, seppure negativo, delle cure mediche ed è il medico in primis chiamato ad affrontarlo.

E' compito di ciascun professionista conoscere e attuare tutti gli strumenti preventivi e soprattutto essere a conoscenza delle modalità con cui questo possa essere affrontato. Negare l'errore come possibile evenienza clinica significa non essere coscienti della complessità della medicina moderna. Temere l'errore può significare trasformare i propri atti medici in medicina difensiva.

Bibliografia

1. Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS (Institute of Medicine). To err is human: building a safer health system. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
2. Valentin A, Bion J. How safe is my intensive care unit? An overview of error causation and prevention. *Curr Opin Crit Care*. 2007 Dec;13(6):697-702.
3. Federspil G, Vettor R. Rational error in internal medicine. *Internal and Emergency Medicine* 2008; 3: 25-31.
4. Campbell SG, Croskerry P, Bond WF. Profiles in patient safety: A "perfect storm" in the emergency department. *Acad Emerg Med*. 2007 Aug;14(8):743-9.
5. Tarquini R, Lazzeri C, Gensini GF. (2010) [Dealing with error in cardiology]. *G Ital Cardiol (Rome)*. 11(2):121-6.
6. Redelmeier DA, Shafir E. Medical decision making in situations that offer multiple alternatives. *JAMA* 2008; 273;302.

Fattori di rischio cardiovascolare: dati e prospettive dal Progetto Moli-sani

Licia Iacoviello (per i Ricercatori del Progetto Moli-sani)
*Laboratorio di Epidemiologia Molecolare e Nutrizionale.
Dipartimento di Epidemiologia e Prevenzione. IRCCS Istituto
Neurologico Mediterraneo, NEUROMED*

Inquadramento generale

Le malattie cardiovascolari riconoscono un'eziologia multifattoriale, cioè più fattori di rischio che contribuiscono contemporaneamente al loro sviluppo. I fattori di rischio sono caratteristiche che aumentano o riducono la probabilità di insorgenza della malattia. Molti di essi sono stati identificati, ma molti ancora rimangono da scoprire.

Negli anni 50 si iniziarono diversi studi epidemiologici per identificare le cause delle malattie cardiovascolari e tra questi il Framingham Heart Study, avviato nel 1948 dall' United State Public Health Service, rimane una pietra miliare. La prima coorte comprendeva 5209 abitanti sani della contea di Framingham tra i 30 ei 60 anni. Nel 1971 , 5124 figli e figlie (e i loro coniugi) della coorte originale furono reclutati per l' Offspring Study. Infine, nel 2002, 4095 partecipanti sono stati inclusi nella coorte della terza generazione. Da allora lo studio Framingham ha identificato la maggior parte dei fattori di rischio oggi noti come il colesterolo, l'ipertensione, il diabete, il fumo, l'obesità, l'inattività fisica.

Le malattie cardiovascolari in Italia

Le malattie cardiovascolari rappresentano più del 50% delle cause di morte e disabilità in Italia. Nonostante la mortalità per infarto e altre coronaropatie sia più di quattro volte minore in Italia rispetto alla Finlandia o all'Inghilterra, il nostro Paese paga ancora un tributo troppo alto a queste malattie. Le malattie cardiovascolari sono responsabili di quasi la metà delle morti e più di tre quarti delle disabilità croniche del nostro Paese.

Molto è stato fatto per capire le cause e mettere in atto strategie preventive e terapeutiche più appropriate; tuttavia si devono tenere in conto alcune considerazioni .

1. La maggior parte degli studi per l'identificazione dei fattori di rischio cardiovascolare sono stati condotti in Paesi del Nord Europa o negli Stati Uniti
2. Le poche volte che l'Italia è stata inclusa in questi studi (MONICA, EPIC) sono state soprattutto le regioni del Nord ad essere coinvolte
4. I comportamenti a rischio (in particolare la scorretta alimentazione) variano tra le diverse regioni europee e all'interno dell'Italia tra il Nord e il Sud. Questa diversità potrebbe anche determinare una differente risposta a misure preventive e terapeutiche, la cui efficacia, nella maggioranza dei casi, è stata studiata in popolazioni nordiche
5. Esistono fattori di rischio emergenti, come quelli genetici, infiammatori o legati a costituenti della dieta ad alto contenuto antiossidante, il cui impatto sul cardiovascolare non è stato ancora definito
6. I fattori genetici, come pure la dieta, variano tra le diverse popolazioni europee e, a volte, anche tra il Nord e il Sud dell'Italia.

Perchè Moli-sani

Il Molise è una regione relativamente “piccola”, con i suoi 330.000 abitanti (di cui il 60% con più di 30 anni) distribuiti su un' area di 4.400 Km²; comprende un' aziende sanitarie locale (ASREM) che racchiude le 4 aree di distribuzione del territorio (*Alto Molise, Pentria, Centro Molise e Basso Molise*), ed è servita da circa 230 Medici di Medicina Generale. Nella ASREM sono distribuiti 9 presidi ospedalieri accreditati, pubblici o privati.

Essa, inoltre, occupa una posizione peculiare sia in Italia che in Europa: essendo collocata al crocevia tra il Nord e il Sud dell'Italia, ha mantenuto omogeneità genetica e culturale e stili di vita della più genuina tradizione del Sud. Nella regione Molise si alternano aree agricole ed aree industrializzate, zone montane, collinari e marittime. La sua dieta può essere considerata a tutti gli effetti “Mediterranea”, pur convivendo a pochi chilometri di distanza cucine più tipicamente montane o marine.

La popolazione Molisana è stata caratterizzata in passato da una forte emigrazione verso il Nord Europa e gli Stati Uniti il Nord Italia (quest'ultima ancora in corso), mentre la percentuale di immigrazione è praticamente nulla. Si comprende come questa Regione si presti bene ad un'indagine epidemiologica di territorio: in un'area relativamente ristretta permette di prendere in considerazione tutte le possibili variabili ambientali e genetiche capaci di influenzare le malattie.

Numerosi sono i risultati già emersi dallo studio Moli-sani sui fattori di rischio cardiovascolari, i loro determinanti e la loro associazione con la mortalità totale e cardiovascolare. Di particolare interesse sono i risultati sulla dieta mediterranea e sui biomarcatori di attivazione della coagulazione.

L'ipotesi del “Common Soil”

Uno degli aspetti più innovativi del Progetto Moli-sani è lo studio dei fattori di rischio e prevenzione secondo l'ottica del “**common soil**” tra malattie cardiovascolari e tumori.

Da tempo si pensa infatti che possa esistere **una base, un terreno comune, nella genesi delle malattie cardiovascolari e di alcuni tipi di tumore**, soprattutto i tumori del tratto gastrointestinale e quelli la cui crescita è legata a condizioni ormonali (tumori della mammella, dell'utero, dell'ovaio ed il tumore della prostata).

Come possiamo spiegare questa base comune? Innanzitutto a livello cellulare la crescita della lesione arteriosclerotica e del processo tumorale riconoscono meccanismi comuni, innescati da mediatori che fanno proliferare e migrare sia le cellule della parete vascolare che le cellule trasformate, il nucleo iniziale del tumore. Tali mediatori sono spesso di natura infiammatoria (citochine, fattori di crescita). L'infiammazione è infatti il più importante meccanismo di risposta che accomuna processi arteriosclerotici e crescita dei tumori.

Inoltre, dati epidemiologici evidenziano l'esistenza di fattori predisponenti (sindromi dismetaboliche, obesità, diabete, insulino-resistenza) o “cattive” abitudini di vita (sedentarietà, alimentazione ricca di grassi animali, povera di fibre e di frutta e verdura, e, certo non ultimo, il fumo di sigaretta) comuni a malattie cardiovascolari e tumori.

Per contro, il consumo degli ingredienti principali della dieta mediterranea (olio d'oliva, cereali non raffinati, frutta, verdura, pesce e vino in quantità moderate) previene, secondo recenti studi di popolazione, sia la mortalità da malattie cardiovascolari che da tumori. Tra le sostanze più importanti contenute nella dieta mediterranea, i polifenoli ad attività antiossidante sono capaci di prevenire - in sistemi sperimentali- sia la crescita di tumori che la formazione di trombosi.

Appare pertanto stimolante, poter seguire, **nell'ambito di un grande studio di popolazione come "Moli-sani"**, la comparsa di eventi sia cardiovascolari che tumorali in rapporto alle abitudini di vita, al profilo di rischio e ad una serie di *markers* biochimici e genetici di predisposizione a queste patologie.

Bibliografia:

1. Dawber TR, Meadors GF, Moore FEJ. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. Am J Public Health. 1951;41:279-86.
2. Splansky GL, Corey D, Yang Q, Arwood LD, Cupples LA, Benjamin EJ, et al. The third generation cohort of the National Heart, Lung, and Blood Institute's Framingham Heart Study: Design, Recruitment, and Initial Examination. Am J Epidemiol. 2007;165:1328-35.
3. Di Castelnuovo A, de Curtis A, Costanzo S, Persichillo M, Olivieri M, Zito F, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; MOLI-SANI Project Investigators.
4. Association of D-dimer levels with all-cause mortality in a healthy adult population: findings from the MOLI-SANI study. Haematologica. 2013 Sep;98(9):1476-80.
5. Rago L, Di Castelnuovo A, Assanelli D, Badilini F, Vaglio M, Gianfagna F, Salvetti M, Zito F, Alessandrini F, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. T-wave axis deviation, metabolic syndrome and estimated cardiovascular risk--in men and women of the MOLI-SANI study. Atherosclerosis. 2013 Feb;226(2):412-8.

6. Pounis G, Costanzo S, di Giuseppe R, de Lucia F, Santimone I, Sciarretta A, Barisciano P, Persichillo M, de Curtis A, Zito F, Di Castelnuovo AF, Sieri S, Benedetta Donati M, de Gaetano G, Iacoviello L. Consumption of healthy foods at different content of antioxidant vitamins and phytochemicals and metabolic risk factors for cardiovascular disease in men and women of the Moli-sani study. *Eur J Clin Nutr.* 2013 Feb;67(2):207-13.
7. Bonaccio M, Bonanni AE, Di Castelnuovo A, De Lucia F, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; Moli-sani Project Investigators. Low income is associated with poor adherence to a Mediterranean diet and a higher prevalence of obesity: cross-sectional results from the Moli-sani study. *BMJ Open.* 2012 Nov 19;2(6).
8. Arcari A, Magnacca S, Bracone F, Costanzo S, Persichillo M, Di Castelnuovo A, de Curtis A, Zito F, Schünemann HJ, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; Moli-sani Investigators. Relation between pulmonary function and 10-year risk for cardiovascular disease among healthy men and women in Italy: the Moli-sani Project. *Eur J Prev Cardiol.* 2013 Oct;20(5):862-71.
9. Di Castelnuovo A, Costanzo S, Persichillo M, Olivieri M, de Curtis A, Zito F, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; MOLI-SANI Project Investigators. Distribution of short and lifetime risks for cardiovascular disease in Italians. *Eur J Prev Cardiol.* 2012 Aug;19(4):723-30.
10. di Giuseppe R, Di Castelnuovo A, Melegari C, De Lucia F, Santimone I, Sciarretta A, Barisciano P, Persichillo M, De Curtis A, Zito F, Krogh V, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; Moli-sani Project Investigators. Typical breakfast food consumption and risk factors for cardiovascular disease in a large sample of Italian adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012 Apr;22(4):347-54.
11. Centritto F, Iacoviello L, di Giuseppe R, De Curtis A, Costanzo S, Zito F, Grioni S, Sieri S, Donati MB, de Gaetano G, Di Castelnuovo A; Moli-sani Investigators.

- Dietary patterns, cardiovascular risk factors and C-reactive protein in a healthy Italian population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Dec;19(10):697-706.
12. di Giuseppe R, Di Castelnuovo A, Centritto F, Zito F, De Curtis A, Costanzo S, Vohnout B, Sieri S, Krogh V, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in a healthy Italian population. *J Nutr.* 2008 Oct;138(10):1939-45.
 13. Iacoviello L, Santimone I, Latella MC, de Gaetano G, Donati MB. Nutrigenomics: a case for the common soil between cardiovascular disease and cancer. *Genes Nutr.* 2008;3:19-24.
 14. Donati MB. The "common soil hypothesis": evidence from population studies? *Thromb Res.* 2010 Apr;125 Suppl 2:S92-5.
 15. Iacoviello L, Agnoli C, De Curtis A, di Castelnuovo A, Giurdanella MC, Krogh V, Mattiello A, Matullo G, Sacerdote C, Tumino R, Vineis P, de Gaetano G, Panico S, Donati MB. Type 1 plasminogen activator inhibitor as a common risk factor for cancer and ischaemic vascular disease: the EPICOR study. *BMJ Open.* 2013;3(11):e003725.

Microangiopatie trombotiche e gravidanza

Barbara Ferrari

Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Dipartimento delle Unità Multispecialistiche e dei Trapianti, U.O.C. di Ematologia Non Tumorale e Coagulopatie, Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, Milano

Le microangiopatie trombotiche sono malattie occlusive del microcircolo, caratterizzate da anemia emolitica microangiopatica, piastrinopenia da consumo e danno d'organo multidistrettuale su base ischemica (*Symmers WS, 1952*). Rappresentano una sfida diagnostica e terapeutica, essendo patologie ad esordio acuto e decorso potenzialmente fatale. Nonostante i meccanismi patogenetici condizionanti le diverse forme di microangiopatia trombotica siano differenti, la diagnosi differenziale è resa spesso estremamente difficile dalla sovrapposizione delle caratteristiche cliniche e biochimiche, con possibili ricadute negative sulle scelte terapeutiche. Le difficoltà di gestione di tali malattie sono persino maggiori qualora si verificano in gravidanza o nel puerperio.

La gravidanza, infatti, oltre a rappresentare la *conditio sine qua non* per lo sviluppo di preeclampsia, eclampsia e sindrome HELLP, rappresenta un fattore di rischio per l'esordio o la recidiva di altre microangiopatie trombotiche che si possono verificare anche al di fuori del contesto gravidico, quali la porpora trombotica trombocitopenica (PTT), la sindrome emolitico-uremica atipica (aSEU), la sindrome catastrofica da anticorpi anti-fosfolipidi e la coagulazione intravascolare disseminata (CID).

Tra le microangiopatie trombotiche in gravidanza, la PTT rappresenta un esempio peculiare di patologia legata ad alterazione della coagulazione. La PTT è una malattia dovuta alla carenza, congenita o acquisita, dell'enzima ADAMTS13 (“a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif”, 13th member of the family), la metalloproteasi che taglia il fattore di von Willebrand (VWF) circolante, riducendone le dimensioni e, con esse, le proprietà trombogeniche: in assenza di ADAMTS13, i multimeri ad alto peso molecolare di VWF si accumulano e, in condizioni di adeguata

tensione tangenziale, causano aggregazione piastrinica e conseguente trombosi a livello del microcircolo (*Tsai HM, 2010*). Il danno ischemico che ne consegue interessa soprattutto il sistema nervoso centrale, ma può colpire qualsiasi altro distretto corporeo. La carenza di ADAMTS13 può derivare da un difetto genetico (estremamente raro, trasmesso con ereditarietà autosomica recessiva) oppure dallo sviluppo di auto-anticorpi anti-ADAMTS13, che causano la forma acquisita della malattia, che è di gran lunga la più frequente.

La PTT colpisce prevalentemente il sesso femminile e ha un picco di incidenza nella terza-quarta decade. Si stima che circa il 45% dei casi si verifichi in giovani donne in età fertile (*Tsai HM, 2007*) e che circa il 12-25% degli episodi acuti di PTT si verifichino nel contesto gravidico (*McCrae KR, 1997; George JN, 2003; Scully M, 2006*), sia come prima manifestazione della malattia, sia come ricorrenza.

L'associazione tra PTT e gravidanza è supportata non solo dalle osservazioni cliniche ma anche dai cambiamenti emostatici che si verificano in corso di gravidanza fisiologica. È stato dimostrato che i livelli di ADAMTS13 si riducono durante la gravidanza, in parallelo all'incremento dei livelli di VWF (*Sanchez-Luceros A, 2003; Mannucci PM, 2001*); questo potrebbe scatenare una PTT acuta in gravidanza, specialmente qualora i livelli basali di ADAMTS13 siano ridotti già in partenza. Inoltre, l'associazione tra esordio di PTT durante la prima gravidanza nelle donne affette dalla forma congenita (*George JN, 2003; Moatti-Cohen M, 2012*) supporta il nesso causale tra la malattia e la gestazione.

Nonostante i dati disponibili in letteratura siano talora contrastanti, specie per le difficoltà di classificazione delle microangiopatie gravidiche e la rarità della malattia (incidenza stimata di circa 1 su 25.000 gravidanze), la PTT in gravidanza sembra più frequente nel terzo trimestre o nel puerperio (*George JN, 2003; Scully M, 2014*). La sopravvivenza materna è legata alla tempestività del sospetto diagnostico e al conseguente avvio della plasmaferesi, che ha ridotto la mortalità dal 90% a meno del 10% (*Martin JN, 2008*).

Anche la mortalità perinatale si è drasticamente ridotta dopo l'introduzione della plasmateresi, sebbene tuttora rimanga in buona parte legata a complicanze secondarie alla prematurità.

Le donne affette da PTT congenita hanno un elevatissimo rischio di recidiva in gravidanza (*Vesely SK, 2004; Fujimura Y, 2009; Moatti-Cohen M, 2012*), pertanto vanno trattate con infusioni periodiche di plasma a scopo profilattico, per tutta la gravidanza e nel puerperio. Per quanto concerne la forma acquisita della malattia, i dati disponibili non sono ancora conclusivi. In un passato non troppo remoto, alle donne con PTT acquisita veniva sconsigliato di concepire per l'elevato rischio di recidiva di malattia. I dati più recenti sembrano in parte ridimensionare tale rischio, anche grazie ai miglioramenti diagnostico-terapeutici in questo campo (*Jiang Y, 2014; Scully M, 2014*). Sebbene non siano ad oggi disponibili marcatori prognostici per stratificare il rischio di recidiva in gravidanza, sono stati descritti casi di gravidanze non complicate, in cui il follow-up e le terapie attuate in gravidanza sono state dettate dal monitoraggio dei livelli di ADAMTS13 (*Yamashita E, 2012; Scully M, 2014*). In particolare, gli autori inglesi suggeriscono l'avvio di basse dosi di acido acetilsalicilico associato a dose profilattica di eparina non frazionata sin dalle prime fasi della gravidanza, soprattutto nelle donne con anamnesi di pregressa gravidanza complicata da perdita fetale; a tale terapia, può essere associata la plasmateresi profilattica, a cadenza dettata dai livelli di ADAMTS13. Tale approccio preventivo ha consentito di portare a termine la gravidanza in queste pazienti, senza complicazioni materno-fetali. Qualora, viceversa, la PTT recidivi in corso di gravidanza, è possibile portare a termine la gestazione con successo in termini di outcome materno-fetale. In questi casi, la terapia della PTT acuta non differisce da quella standard (ovvero plasmateresi associata a steroide sistemico), eccezion fatta per la scelta di terapie di seconda linea in cui il bilancio rischio-beneficio deve tener conto della potenziale teratogenicità dei farmaci (ad esempio, il rituximab, che attraversa la placenta e potrebbe causare malformazioni, sebbene raramente) (*Chakravarty EF, 2011*). L'interruzione di gravidanza / il parto non rappresentano la terapia di prima scelta in caso di PTT gravidica, a differenza di altre microangiopatie trombotiche in gravidanza, ma andrebbero presi in considerazione in caso di mancata

risposta alla terapia standard. Infine, nei casi di PTT che esordiscono in prossimità del termine della gestazione, si ritiene indicato procedere al parto non appena le condizioni materne siano state stabilizzate.

Globalmente, la decisione di intraprendere una gravidanza nelle donne affetta da PTT acquisita necessita di un appropriato counselling multidisciplinare (ematologico, ginecologico, psicologico), nonché del monitoraggio seriato dei livelli di ADAMTS13 e degli anticorpi anti-ADAMTS13, che rappresentano ad oggi gli unici strumenti oggettivi su cui valutare l'approccio terapeutico ottimale. In ogni caso, la normalizzazione dei livelli di ADAMTS13 e l'eradicazione degli anticorpi anti-ADAMTS13 prima della gravidanza sono obiettivi da perseguire nelle donne con PTT acquisita che desiderino concepire.

In conclusione, la PTT rimane ad oggi una malattia difficile da diagnosticare e da trattare, soprattutto in gravidanza, e necessita della stretta collaborazione degli specialisti ematologi e ginecologi, sia in caso di PTT acuta gravidica sia in fase di pianificazione di una gravidanza successiva alla diagnosi di malattia.

Bibliografia:

1. Chakravarty EF, Murray ER, Kelman A, Farmer P. Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab. *Blood* 2011;117:1499-506.
2. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol* 2009;144:742-54.
3. George JN. The association of pregnancy with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Hematol* 2003;10:339-344.

4. Jiang Y, McIntosh JJ, Reese JA, Deford CC, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Terrell DR, Vesely SK, Knudtson EJ, George JN. Pregnancy outcomes following recovery from acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2014;123:1674-80.
5. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001;98:2730-2735.
6. Martin JN Jr, Bailey AP, Rehberg JF, Owens MT, Keiser SD, May WL. Thrombotic thrombocytopenic purpura in 166 pregnancies: 1955-2006. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:98-104.
7. McCrae KR, Cines DB. Thrombotic microangiopathy during pregnancy. *Semin Hematol* 1997;34:148-58.
8. Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, Boisseau P, Galicier L, Azoulay E, Stepanian A, Delmas Y, Rondeau E, Bezieau S, Coppo P, Veyradier A; on behalf of the French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2012;119:5888-5897.
9. Sánchez-Luceros A, Meschengieser SS, Marchese C, Votta R, Casais P, Woods AI, Nadal MV, Salviú MJ, Lazzari MA. Factor VIII and von Willebrand factor changes during normal pregnancy and puerperium. *Blood Coagul Fibrinol* 2003;14:647-51.
10. Scully M, Starke R, Lee R, Mackie I, Machin S, Cohen H. Successful management of pregnancy in women with a history of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Coagul Fibrinol* 2006;17:459-463.
11. Scully M, Thomas M, Underwood M, Watson H, Langley K, Camilleri RS, Clark A, Creagh D, Rayment R, McDonald V, Roy A, Evans G, McGuckin S, Ainle FN, Maclean R, Lester W, Nash M, Scott R, O'Brien P and collaborators of the UK TTP Registry. Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood* 2014;10:211-219.

12. Symmers WS. Thrombotic microangiopathic haemolytic anemia (thrombotic microangiopathy). *Br Med J* 1952;2:897-903.
13. Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a thrombotic disorder caused by ADAMTS13 deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:609-32.
14. Tsai HM. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2010;91:1-19.
15. Vesely SK, Li X, McMinn JR, Terrell DR, Gorge JN. Pregnancy Outcomes after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Transfusion* 2004;44:1149-1158.
16. Yamashita E, Okada H, Yorioka H, Fujita S, Nishi K, Komiyama Y, Kanzaki H. Successful management of pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura by monitoring ADAMTS13 activity. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;38:567-9.

L'emorragia postpartum: nuovi spunti diagnostici e terapeutici

Domenico Prisco, Lucia Ciucciarelli, Annamaria Cameli, Caterina Cenci, Elena Silvestri

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze

L'emorragia postpartum (EPP) è definita come una perdita ematica di volume uguale o maggiore di 500 mL dopo un parto vaginale nelle 24 ore. Dopo taglio cesareo è invece considerato anomalo un sanguinamento uguale o superiore a 1000 mL.¹

Inoltre si definisce EPP primaria una perdita ematica che insorge entro 24 ore dal parto, mentre EPP secondaria se si verifica tra 24 ore e 12 settimane dopo il parto.^{2,3,4}

L'EPP è la principale causa di morbosità e mortalità materne ed è responsabile di circa un quarto di tutte le morti materne.¹ Ogni anno, in tutto il mondo, si verificano più di 14 milioni di casi di emorragie ostetriche, che provocano circa 127000 decessi.^{5,6} L'EPP, la cui frequenza è stimata tra il 5 ed il 22% dei parti,⁷ costituisce la causa principale di tutte le emorragie ostetriche.^{1,6} Negli Stati Uniti il numero delle EPP è in costante aumento.^{8,9,10}

La prevalenza di EPP varia tra il 7.2% dell'Oceania ed il 25.7% dell'Africa.¹¹

L'EPP ha numerosi fattori causali e questo rende la sua evenienza e la sua gravità difficili da prevedere. Le principali cause di EPP sono costituite da: atonia uterina, lacerazioni della cervice e/o del perineo, ritenzione di materiale placentare, disordini emocoagulativi.^{12,13} Ma molti dei casi di EPP avvengono in donne che non presentano condizioni predisponenti.¹⁴

In considerazione dell'alta mortalità e morbosità dell'EPP, è importante enfatizzare la necessità di una rapida diagnosi e di un management appropriato. Pertanto, sono stati proposti protocolli diagnostico-terapeutici, per supportare le varie figure professionali che collaborano alla gestione multidisciplinare di questa importante complicanza ostetrica.

Il trattamento dell'EPP prevede una terapia di prima linea con fluidi, trasfusioni ematiche e farmaci uterotonici.¹⁵ Se questi provvedimenti non sono sufficienti per controllare il sanguinamento, sono necessari interventi più drastici ed invasivi (suture compressive, suture devascularizzanti delle arterie uterine, ovariche o iliache interne, angiografia con embolizzazione selettiva di vasi pelvici ed infine isterectomia).¹⁶

Nonostante i suddetti interventi terapeutici, la morbosità e la mortalità correlate all'EPP, continuano a rimanere inaccettabilmente alte anche nei paesi ad alto reddito, determinando la necessità di eseguire un intervento di isterectomia in almeno il 50% dei casi.^{17,18}

E' inoltre necessario un intervento terapeutico precoce per aumentare la probabilità di sopravvivenza della paziente.^{2,19}

La gravidanza fisiologica è uno stato trombofilico per le progressive modificazioni dell'emostasi volte a difendere la donna dal rischio emorragico del parto. E' infatti noto che, con l'eccezione del fattore XI, tutti gli altri fattori della coagulazione, in particolare il fibrinogeno, incrementano durante la gravidanza.²⁰ Inoltre durante la gravidanza si ha una riduzione della conta piastrinica per volume plasmatico,²¹ una riduzione degli inibitori fisiologici della coagulazione, ed un graduale incremento dell'attività fibrinolitica.

La determinazione dell'emoglobina o dell'ematocrito durante un'emorragia ostetrica maggiore, come l'EPP, non sono buoni indicatori della perdita ematica acuta^{22,23,24} e la loro riduzione non avviene fino a 4 ore dal sanguinamento acuto.^{22,24} Sebbene il PT e l'aPTT siano dei test con molti limiti nel diagnosticare un'emorragia ostetrica maggiore,²⁵ ancora giocano un ruolo importante nel guidare la terapia trasfusionale.^{2,26,24} Solitamente peraltro, per ottenere i risultati di PT e aPTT e del dosaggio del fibrinogeno può essere necessario un tempo troppo lungo, fino a 60 minuti. L'introduzione nelle ultime decadi di test point-of-care (POC) come la tromboelastografia (TEG) e la tromboelastometria rotazionale (ROTEM) ha creato interesse per il loro uso nella diagnosi delle coagulopatie e nel guidare la terapia trasfusionale durante sanguinamenti maggiori.

Il principale vantaggio è che questi test possono essere eseguiti su campioni di sangue intero, vicino al paziente e forniscono rapidamente informazioni sull'intero processo coagulativo mediante un grafico che mostra la formazione e la lisi del coagulo²⁴. Una buona correlazione è stata dimostrata tra i risultati dei test di coagulazione ottenuti con tromboelastometria (TEM) e quelli convenzionali²⁷ e questo ha permesso negli ultimi anni la diffusione del loro uso nella gestione dell'emorragia massiva in pazienti non ostetrici, con risultati incoraggianti.²⁸ Il monitoraggio dello stato della coagulazione nelle pazienti con EPP può essere cruciale per una gestione efficace dell'emostasi e per effettuare una terapia mirata che possa consentire di migliorare la prognosi della paziente.

La concentrazione plasmatica del fibrinogeno può giocare un ruolo rilevante nel corso della EPP. La riduzione dei valori di fibrinogeno è infatti un predittore precoce di EPP, ed inoltre, l'entità della riduzione di tali valori, correla con la severità dell'emorragia.²⁹ Poiché i valori di FIBTEM (in TEM, reagente specifico per il processo di polimerizzazione della fibrina) diminuiscono ancora più rapidamente di quelli del fibrinogeno, essi possono essere d'ausilio per guidare precoci interventi terapeutici.²⁴

Dati di TEG e TEM ottenuti da donne in gravidanza sono al momento limitati, in particolare al periodo del peripartum e alle donne con EPP.^{30,31} Inoltre per ora non sono disponibili valori di riferimento standardizzati per il monitoraggio con test POC in ambito ostetrico-ginecologico.^{32,33,34} Pertanto vengono suggerite indicazioni terapeutiche in base all'interpretazione dei parametri viscoelastici, che possano essere di supporto nella pratica clinica.^{35,36} Sono quindi necessari ulteriori ricerche in questo campo, al fine di limitare la morbosità e la mortalità di questa grave complicanza ostetrica.

Attualmente è in corso un grande trial randomizzato, WOMAN (World Maternal Antifibrinolytic Trial), in doppio cieco, sull'uso di acido tranexamico vs placebo, volto a determinare l'effetto della precoce somministrazione di acido tranexamico sulla mortalità, la necessità di eseguire un intervento di isterectomia e sulle altre morbosità (interventi chirurgici, terapia trasfusionale, rischio di eventi vascolari non fatali) in donne con diagnosi di EPP.³⁷

In caso di mancata risposta alla terapia convenzionale, viene utilizzato off-label il rFVIIa (bolo di 60-90 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ eventualmente ripetuto entro 15-30 minuti), prima di ricorrere all'isterectomia, una volta assicurati valori normali di pH e temperatura e adeguati livelli di piastrine e fibrinogeno. Attualmente non sono disponibili dati da trial randomizzati controllati che consentano di sostenere l'uso del rFVIIa nelle emorragie ostetriche. Tuttavia, quando efficace, il rFVIIa determina una riduzione dell'entità dell'emorragia in 10-15 minuti dopo la prima dose.¹⁶ Infine promettente è l'uso di concentrati di fibrinogeno anche se sono necessari studi ad hoc.

Ancora oggi l'EPP rimane un'importante complicanza ostetrica dall'outcome spesso sfavorevole. Nonostante la letteratura offra sempre più dati sulla gestione delle emorragie nei vari contesti clinici, come nel trauma, attualmente c'è ancora una scarsità di evidenze sul management dell'EPP. Ulteriori studi sono necessari per ottimizzare la difficile gestione multidisciplinare di questa importante complicanza al fine di raggiungere la riduzione della mortalità e morbosità materne.²⁴

Bibliografia:

1. WHO Recommendations for the prevention and treatment of postpartum haemorrhage. 2012
2. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). Prevention and management of postpartum haemorrhage. Green-top Guideline N. 52, 2009-2011
3. Mousa HA, Alfirevic Z. Treatment for primary postpartum haemorrhage. Cochrane Database Syst Rev 2007
4. Alexander J, Thomas PW, Sanghera J. Treatments for secondary postpartum haemorrhage. Cochrane Database Syst Rev 2002
5. WHO Reducing the global burden: postpartum haemorrhage. *Making Pregnancy Safer*. 2007
6. Prata N, Bell S, Weidert K. Prevention of postpartum hemorrhage in low-resource settings: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2013

7. Rogers S, Chang AMZ. Postpartum hemorrhage and other problems of the third stage. In: James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B (eds). *High Risk Pregnancy. Management options*. Philadelphia: ElsevierSaunders, 2006
8. Shields LE, Wiesner S, Fulton J, Pelletreau B. Comprehensive maternal hemorrhage protocols reduce the use of blood products and improve patient safety. *Am J Obstet Gynecol*. 2014
9. Bateman BT, Berman MF, Riley LE, Leffert LR. *Anesth Analg*. 2010 The epidemiology of postpartum hemorrhage in a large, nationwide sample of deliveries. *Anesth Analg*. 2010
10. Callaghan WM, Kuklina EV, Berg CJ. Trends in postpartum hemorrhage: United States, 1994-2006. *Am J Obstet Gynecol*. 2010
11. Calver C, Thomas SL, Ronsmans C, et al. Identifying regional variation in the prevalence of postpartum haemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *PlosOne*. 2012
12. Mukherjee S, Sabaratnam A. Post-partum haemorrhage. *Obstet Gynaecol Reprod Med*. 2009
13. Lancé MD. The management of critical bleeding in obstetrics. *Reviews in Health Care*. 2013
14. Ministero della Salute. Dipartimento della qualità. Direzione generale della programmazione sanitaria, dei livelli di assistenza e dei principi etici di sistema. Ufficio III. Documento di integrazione ed indirizzo relativo alla raccomandazione per la prevenzione della morte materna correlata al travaglio e/o parto. 2007
15. Mousa HA, Walkinshaw S. Major postpartum haemorrhage. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2001
16. Magon N, Babu KM, Kapur K, Chopra S, Joneja GS. Recombinant activated factor VII in post partum haemorrhage. *Niger Med J*. 2013
17. Hazra S, Chilaka VN, Rajendran S, Konje JC. Massive postpartum haemorrhage as a cause of maternal morbidity in a large tertiary hospital. *J Obstet Gynaecol*. 2004

18. Yamamoto H, Sagae S, Nishikawa S, Kudo R. Emergency postpartum hysterectomy in obstetric practice. *J Obstet Gynaecol Res.* 2000
19. Linee guida AOGOI. Emorragia post-partum: linee guida per la prevenzione, la diagnosi e il trattamento. I libri dell'AOGOI, 2009
20. O'Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003
21. Aster RH "Gestational" thrombocytopenia: a plea for conservative management. *N Engl J Med.* 1990
22. Palm C, Rydhstroem H. Association of blood loss during delivery to B-hemoglobin. *Gynecol Obstet Invest.* 1997
23. Larsson C, Saltvedt S, Wiklund I, Pahlen S, Andolf E. Estimation of blood loss after cesarean section and vaginal delivery has low validity with a tendency to exaggeration. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006
24. Allard S, Green L, Hunt BJ How we manage the haematological aspects of major obstetric haemorrhage. *Br J Haematol.* 2014
25. Solomon C, Collis RE, Collins PW. Haemostatic monitoring during postpartum haemorrhage and implications for management. *Br J Anaesth.* 2012
26. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernández-Mondéjar E, Filipescu D, Hunt BJ, Komadina R, Nardi G, Neugebauer E, Ozier Y, Riddez L, Schultz A, Vincent JL, Rossaint R. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care.* 2013
27. Spiel AO, Mayr FB, Firbas C, Quehenberger P, Jilma B Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans. *J Thromb Haemost.* 2006.
28. Lier H, Vorweg M, Hanke A, Görlinger K. Thromboelastometry guided therapy of severe bleeding. Essener Runde algorithm. *Hamostaseologie.* 2013

29. Charbit B, Mandelbrot L, Samain E, Baron G, Haddaoui B, Keita H, Sibony O, Mahieu-Caputo D, Hurtaud-Roux MF, Huisse MG, Denninger MH, de Prost D; PPH Study Group. The decrease of fibrinogen is an early predictor of the severity of postpartum hemorrhage. *J Thromb Haemost.* 2007
30. Huissoud C, Carrabin N, Audibert F, Levrat A, Massignon D, Berland M, Rudigoz RC. Bedside assessment of fibrinogen level in postpartum haemorrhage by thrombelastometry. *BJOG.* 2009
31. Hill JS, Devenie G, Powell M. Point-of-care testing of coagulation and fibrinolytic status during postpartum haemorrhage: developing a thrombelastography®-guided transfusion algorithm. *Anaesth Intensive Care.* 2012
32. de Lange NM, Lancé MD, de Groot R, et al. Obstetric hemorrhage and coagulation: an update. Thromboelastography, thromboelastometry, and conventional coagulation tests in the diagnosis and prediction of postpartum hemorrhage. *Obstet Gynecol Sur.* 2012
33. de Lange NM, van Rheenen-Flach LE, Lancé MD, et al. Peripartum reference ranges for ROTEM(R) thromboelastometry. *Br J Anaesth.* 2014
34. Karlsson O, Jeppsson A, Hellgren M. Major obstetric haemorrhage: monitoring with thromboelastography, laboratory analyses or both? *Int J Obstet Anesth.* 2014
35. Brizzi A. Protocollo decisionale Emorragia Acuta Postparto, Casa di Cura Santa Maria, Bari
36. SIGO-AOGOI-AGUI Gestione multidisciplinare dell'emorragia post- partum. 2014
37. CRASH-2 trial collaborators, Shakur H, Roberts I, Bautista R, Caballero J, Coats T, Dewan Y, El-Sayed H, Gogichaishvili T, Gupta S, Herrera J, Hunt B, Iribhogbe P, Izurieta M, Khamis H, Komolafe E, Marrero MA, Mejía-Mantilla J, Miranda J, Morales C, Olaomi O, Ollidashi F, Perel P, Peto R, Ramana PV, Ravi RR, Yutthakasemsunt S. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010

Focus su:

**Storia dei test di laboratorio e loro utilità clinica
nello studio dell'emostasi e trombosi**

Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome

Vittorio Pengo

Clinical Cardiology, Thrombosis Center, University of Padova

Among the so-called antiphospholipid antibodies, the presence of LAC is strongly associated with thrombosis and obstetric complications. Thromboembolic complications, venous thromboembolism (deep vein thrombosis and/or pulmonary embolism) and cerebral ischemia [transient ischemic attack (TIA) or stroke] are the most frequent. In a systematic review of the literature, LAC has been shown to be statistically associated with both venous and arterial thromboembolism with an odds ratio ranging from 4.09 to 16.2. Obstetric complications include foetal death, preeclampsia or eclampsia, and multiple abortions. The association of other antiphospholipid antibodies such as anticardiolipin antibodies (aCL) and $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ with the clinical manifestations described above is less striking. The contemporaneous positivity in coagulation (LAC) and solid-phase assays (aCL and $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ antibodies) is due to the presence of a common pathogenic group of $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ antibodies.

As LAC is less sensitive with respect to solid-phase assays, triple positivity suggests that the $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ antibodies present in plasma are able to express LAC activity. In the absence of standardization and reference material for testing, an antiphospholipid laboratory profile could help to better classify these patients. With this in mind we examined the results of all the three tests obtained in 618 consecutive subjects and compared subjects with previously documented thrombosis-related events with those without, for the most part, normal subjects. When antiphospholipid antibody profiles, instead of individual test positivity, were considered in a multivariate analysis taking into account age, gender, the presence of SLE or other autoimmune diseases, and established risk factors for venous and arterial thromboembolism, triple positivity was found to be a strong independent risk factor (odds ratio 33.3, confidence interval 7.0–157.6) [1]. Significance was maintained when an association with venous or arterial thromboembolism was considered.

Double positivity with negative LAC was a highly significant risk factor for obstetric complications only (odds ratio 10.8, confidence interval 2.9-40.8). Other combinations were not statistically significant. The analysis of a complete antiphospholipid antibody profile, as compared to a single testing, can thus better identify patients at risk. In fact, it is a common experience that some isolated and often transient episodes of LAC positivity, such as those not infrequently found in children or young adults during a coagulation screening before surgery, are benign and not associated to thromboembolism. In the same way, isolated aCL positivity can easily be found in infectious diseases where no association with thrombosis has been reported. It is important to underline that only some antibodies to a specific domain of β_2 GPI express LAC activity and correlate strongly with thromboembolic events [2]. Other autoantibodies to β_2 GPI may not be pathogenic and this may explain why studies on a β_2 GPI antibody detection in solid-phase assays do not produce uniform results as IgG a β_2 GPI is associated with thrombosis in only a subset of patients. In those cases (from 2 to 10%) in which a β_2 GPI is the sole antibody detected in patients with clinical manifestations of APS, it may not be pathogenic. In conclusion, a complete pattern of aPL antibodies comprising LAC, aCL, and a β_2 GPI is important for identifying pathogenic a β_2 GPI antibodies and the associated risk of clinical manifestations.

References:

1. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 93: 147-52.
2. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG (2005) IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 105:1540-1545

Il Laboratorio nella Diagnosi e Terapia del Tromboembolismo Venoso

Gualtiero Palareti

Prof. Malattie Cardiovascolari; Università di Bologna

Il D-dimero nelle strategie diagnostiche del tromboembolismo venoso

La procedura diagnostica in pazienti con sospetto tromboembolismo venoso (TEV), che include la trombosi venosa profonda (TVP) e l'embolia polmonare (EP), non può basarsi solo sui segni e sintomi in quanto essi non sono specifici e molto frequenti in altre patologie. La strategia diagnostica si basa quindi su una sequenza di accertamenti che a partire dalla stima del rischio clinico individuale (probabilità clinica pre-test, PCP) mediante l'uso di score validati, prevede in certi casi l'uso del test di misurazione del D-dimero e infine l'impiego del test di "imaging" che consentono la diagnosi di presenza o di esclusione della patologia (l'ultrasonografia per compressione o l'angio-TC o la scintigrafia polmonare, a secondo dei casi). Un approccio diagnostico corretto (sia a tutela del paziente che per l'impegno di risorse del sistema sanitario) prevede di ricorrere ai test di imaging nei casi in cui la presenza della patologia non può essere esclusa con altri mezzi. È stato dimostrato che la presenza di TVP (1, 2) o di EP (3) può essere esclusa con sicurezza per i pazienti quando la PCP è bassa o intermedia e i D-dimeri sono al disotto del cut-off specificatamente definito dalle ditte produttrici per l'esclusione del TEV (solitamente 500 µg/l). Questa procedura consente di escludere con sicurezza per i pazienti la presenza di TEV in circa il 30% di pazienti con sospetta EP e in una proporzione ancora maggiore per quanto riguarda la TVP. Tuttavia, la concentrazione dei D-dimeri aumenta con l'età e conseguentemente la specificità del test per la presenza di TEV diminuisce, il che rende l'esecuzione del test meno utile nei pazienti anziani a causa dell'alta prevalenza di risultati falsi positivi, con una specificità che può scendere anche a solo il 5-10% in soggetti con oltre 80 anni (4, 5).

Recenti studi hanno affrontato questo problema ed hanno proposto delle soluzioni che consentono di ridurre il numero di false positività del D-dimero negli anziani e quindi di aumentare l'utilità di effettuare questo dosaggio in pazienti non giovani con sospetta TEV. Haas e coll. (6) hanno esaminato tre diversi metodi commerciali per il D-dimero concludendo che un livello di cut-off di 750 µg/l nei soggetti con età => 60 anni, migliorava la performance clinica del test in combinazione con la PTP, rispetto al cut-off convenzionale di 500 µg/l, senza riduzione di rilievo del valore predittivo negativo. In uno studio retrospettivo Douma e coll. (7) hanno esaminato la performance del test del D-dimero in soggetti con sospetta TVP in associazione con la PTP ed hanno dimostrato che un cut-off aggiustato per l'età (età moltiplicata per 10) in soggetti con più di 50 anni invece che lo standard cut-off di 500 µg/l aumentava in misura rilevante la performance diagnostica del test. In un recente studio prospettico, multicentrico Righini e coll. (8) hanno applicato a pazienti che si sono presentati consecutivamente a un dipartimento di emergenza con un sospetto di embolia polmonare una strategia diagnostica basata sull'impiego dei D-dimeri con il cut-off aggiustato per l'età (x 10) associato alla PTP. Nei pazienti con non-alta PTP la performance del test usando il cut-off aggiustato per l'età è risultata significativamente migliore rispetto all'uso del cut-off tradizionale, senza un incremento di complicanze nei soggetti ritenuti negativi. Questi risultati confermano l'opportunità di adottare cut-off aggiustati per l'età quando si esegue il test del D-dimero in soggetti con età superiore a 50 anni con sospetta TEV e non-alta probabilità clinica.

Uso del D-dimero per la valutazione del rischio individuale di recidiva dopo un primo TEV

Dopo una prima TEV i pazienti devono essere stratificati in differenti categorie di rischio di recidiva a secondo delle loro caratteristiche cliniche e del tipo di evento indice. La durata del trattamento è soprattutto incerta nei pazienti con TEV idiopatica. Pazienti con tumore in fase attiva, sindrome da anticorpi antifosfolipidi, eventi ricorrenti, deficit di antitrombina, proteina C o proteina S, omozigosi del Fattore V Leiden o doppia eterozigosi e quelli con TEV idiopatica sono candidati ad un trattamento indefinito.

Recenti studi hanno dimostrato che altri fattori hanno un valore di predittività rispetto al rischio di recidiva di TEV, e in particolare i maschi sono più a rischio di recidiva delle femmine, il livello di D-dimeri misurati dopo l'interruzione della TAO, la persistenza di un residuo trombotico come pure la presenza di ipertensione arteriosa polmonare. La comparsa di un'alterazione del livello dei D-dimeri nei primi mesi dopo la sospensione della TAO costituisce un fattore di predittività per recidiva e pertanto suggerisce una ripresa della TAO.

La misurazione del D-dimero dopo la sospensione della terapia anticoagulante (TAC) è stata proposta quindi come mezzo idoneo a valutare il rischio individuale di recidiva del TEV (9, 10). Risultati simili sono poi stati riportati da ulteriori studi di coorte (11-14). Uno studio prospettico, collaborativo, randomizzato (PROLONG study) ha poi confermato che soggetti con D-dimero alterato hanno più elevata incidenza di recidiva e traggono beneficio dalla ripresa della terapia anticoagulante (15). Nel recente studio collaborativo prospettico DULCIS (16) pazienti ambulatoriali che avevano sofferto di un primo TEV (idiopatico o associato a deboli fattori di rischio) sono stati inclusi dopo almeno 3 mesi di TAC (12 mesi in caso di presenza di residuo trombotico venoso). È stata quindi seguita una procedura di management che prevedeva l'esecuzione seriale durante i primi 3 mesi dalla sospensione della TAC. Per misurare i D-dimeri sono stati impiegati test commerciali e adottati cut-off specifici per età e sesso come calcolati in un lavoro precedente (17). Dei 1010 pazienti inclusi nello studio e seguiti per due anni la TAC è stata interrotta in 528 (52.3%) che hanno avuto un test persistentemente negative. In costoro si sono verificate nel corso del follow-up 25 eventi di recidiva di TEV (3.0% paz-anno; 95% CI 2.0 – 4.4%). Dei rimanenti 482 pazienti, che hanno presentato un D-dimero positivo, 373 hanno ripreso la TAC mentre 109 hanno rifiutato di farlo e tutti sono stati seguiti per il tempo predeterminato. In quest'ultimo gruppo si sono verificate 15 recidive di TEV (8.8% paz-anno; 95% CI 5.0-14.1). Nel gruppo che ha ripreso la TAC si sono verificati 4 eventi di TEV, in genere in occasione di temporanee sospensioni della terapia (0.7% paz-anno; 95% CI 0.2-1.7; HR = 2.92; 95% CI 1.87 - 9.72; P = 0.0006), ed anche 14 eventi di emorragia maggiore (2.3% paz-anno; 95% CI 1.3-3.9).

Lo studio ha dimostrato che l'esecuzione seriale del test del D-dimero effettuato dopo la sospensione della TAC dopo un primo evento idiopatico di TEV rappresenta una strategia che può essere impiegata nella pratica clinica per identificare i pazienti che hanno un più basso rischio di recidiva e in costoro la TAC può essere sospesa con sicurezza.

Bibliografia:

1. Schutgens RE, Ackermack P, Haas FJ, et al. Combination of a normal D-dimer concentration and a non-high pretest clinical probability score is a safe strategy to exclude deep venous thrombosis. *Circulation* 2003; 107: 593-7.
2. Bates SM, Kearon C, Crowther M, et al. A diagnostic strategy involving a quantitative latex D-dimer assay reliably excludes deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 2003; 138: 787-94.
3. van Belle A, Buller HR, Huisman MV, et al. Effectiveness of managing suspected pulmonary embolism using an algorithm combining clinical probability, D-dimer testing, and computed tomography. *JAMA* 2006; 295: 172-9.
4. Harper PL, Theakston E, Ahmed J, et al. D-dimer concentration increases with age reducing the clinical value of the D-dimer assay in the elderly. *Intern Med J* 2007; 37: 607-13.
5. Righini M, Goehring C, Bounameaux H, et al. Effects of age on the performance of common diagnostic tests for pulmonary embolism. *Am J Med* 2000; 109: 357-61.
6. Haas FJ, Schutgens RE, Biesma DH. An age-adapted approach for the use of D-dimers in the exclusion of deep venous thrombosis. *Am J Hematol* 2009; 84: 488-91.
7. Douma RA, Tan M, Schutgens RE, et al. Using an age-dependent D-dimer cut-off value increases the number of older patients in whom deep vein thrombosis can be safely excluded. *Haematologica* 2012; 97: 1507-13.
8. Righini M, Van Es J, Den Exter PL, et al. Age-adjusted D-dimer cutoff levels to rule out pulmonary embolism: the ADJUST-PE study. *JAMA* 2014; 311: 1117-24.

9. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, et al. Risk of venous thromboembolism recurrence: High negative predictive value of D-dimer performed after oral anticoagulation is stopped. *Thromb Haemost* 2002; 87: 7-12.
10. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, et al. Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation* 2003; 108: 313-8.
11. Eichinger S, Minar E, Bialonczyk C, et al. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA Journal of the American Medical Association* 2003; 290: 1071-4.
12. Shrivastava S, Ridker PM, Glynn RJ, et al. D-dimer, factor VIII coagulant activity, low-intensity warfarin and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1208-14.
13. Baglin T, Palmer CR, Luddington R, et al. Unprovoked recurrent venous thrombosis: prediction by D-dimer and clinical risk factors. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 577-82.
14. Poli D, Antonucci E, Ciuti G, et al. Combination of D-dimer, F1+2 and residual vein obstruction as predictors of VTE recurrence in patients with first VTE episode after OAT withdrawal. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 708-10.
15. Palareti G, Cosmi B, Legnani C, et al. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 1780-9.
16. Palareti G, Cosmi B, Legnani C, et al. D-dimer to guide the duration of anticoagulation in patients with venous thromboembolism: a management study. *Blood* 2014; 124: 196-203.
17. Legnani C, Cini M, Cosmi B, et al. Age and gender specific cut-off values to improve the performance of D-dimer assays to predict the risk of venous thromboembolism recurrence. *Intern Emerg Med* 2013; 8: 229-36.

Controllo dell'anticoagulazione

Marco Moia

Centro Emofilia e Trombosi A. Bianchi Bonomi, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Milano

Lo sviluppo di farmaci completamente nuovi, o con migliori caratteristiche di efficacia e sicurezza rispetto ai precedenti, ha caratterizzato molti settori della medicina. Per oltre mezzo secolo, questo non è accaduto con i farmaci anticoagulanti. La scoperta del warfarin risale ormai a più di 70 anni fa, quella dell'eparina è vecchia di quasi un secolo. Anche se lo sviluppo della ricerca farmacologica si è fatto sempre più attivo e prolifico negli ultimi anni, warfarin ed eparina sono ancora regolarmente in uso e, per alcune indicazioni, ritenuti attualmente insostituibili. Per entrambi i farmaci i motivi di tale straordinaria longevità risiedono principalmente nell'elevata efficacia di tali molecole, nel basso costo e, soprattutto, nell'umana ingegnosità, capace di rendere sufficientemente sicuri due farmaci che sono estremamente potenti ed efficaci, ma potenzialmente anche pericolosi. Non vi è dubbio che il controllo di laboratorio sia stato la chiave vincente per trasformare eparina e warfarin, da molecole scoperte per caso con scarsa conoscenza dei meccanismi biologici alla base del loro funzionamento, in farmaci di fondamentale importanza per milioni di pazienti e per il progresso anche di altri settori della medicina, dalla cardiocirurgia alla nefrologia. Per l'eparina, farmaco per uso parenterale con breve emivita ed uso prevalentemente intra-ospedaliero, l'evoluzione nei sistemi di monitoraggio di laboratorio ha subito un rallentamento negli ultimi 20-30 anni. Infatti, con la disponibilità di evoluzioni farmacologiche della molecola originale (eparine a basso peso molecolare) o di farmaci sintetici che ne sfruttano in parte il meccanismo d'azione (principalmente il pentasaccaride sintetico fondaparinux), la necessità di un controllo di laboratorio è apparsa meno pressante. Tali farmaci "derivati" dal capostipite hanno infatti permesso di ovviare alla necessità di uno stretto monitoraggio di laboratorio ed aggiustamento terapeutico in molti pazienti, rendendo i nuovi farmaci spesso utilizzabili anche al di fuori dell'ambiente protetto ospedaliero.

Il ridotto interesse al monitoraggio non ha certo favorito il finanziamento alla ricerca in tale settore. Le conseguenze di tali avvenimenti sono palesi ancora oggi: anche se esiste la possibilità di dosare accuratamente i livelli plasmatici di eparine e fondaparinux tramite test cromogenici, tali test non sono stati integrati, di fatto, per larga parte di laboratori ed ospedali nella quotidiana disponibilità del medico, neppure nelle situazioni di urgenza/emergenza. Il controllo di laboratorio dell'eparina non frazionata si basa quindi ancora su test molto vecchi (aPTT, tempo di coagulazione su sangue intero), con alcune criticità relative alla diversa sensibilità dei reagenti in uso per il monitoraggio della terapia eparinica, criticità che non sono mai state adeguatamente risolte.

Il controllo di laboratorio di warfarin e degli altri principali antagonisti della vitamina K (AVK) ha invece vissuto una costante evoluzione ed una standardizzazione, a partire dagli studi della metà degli anni '80, con la messa a punto del sistema dell'INR (International Normalized Ratio) per standardizzare il tempo di protrombina (PT). Il risultato di tale impressionante mole di lavoro si è concretizzato nella standardizzazione "planetaria" dei risultati di laboratorio per il monitoraggio della terapia con AVK tramite un semplice test di laboratorio, utilizzabile con economicità e relativa semplicità su milioni di pazienti. E' stato quindi possibile stabilire intervalli terapeutici appropriati, con un miglioramento qualitativo rilevante nella efficacia e sicurezza della terapia con AVK che, a oltre mezzo secolo dai primi tentativi, è diventata ora uno standard di trattamento, con il quale confrontare ogni nuovo farmaco anticoagulante per via orale. Successivamente è stato anche possibile realizzare dei coagulometri portatili, o point of care, utili sia al letto del paziente che nel controllo domiciliare della terapia. Veniamo ad oggi. La ricerca farmacologica, finalizzata alla prevenzione e terapia delle malattie tromboemboliche, ha sviluppato nuove molecole specifiche, con precisi target di azione (il fattore II o il fattore X della coagulazione) che mirano a sostituire, almeno in parte, la terapia tradizionale con AVK e/o le eparine. I nuovi anticoagulanti orali (NAO) sono farmaci di grande interesse nella pratica clinica quotidiana perché la loro indicazione riguarda potenzialmente almeno un milione di persone nella sola Italia.

La selezione delle molecole ha mirato a realizzare farmaci efficaci, sicuri e di semplice impiego. Si è puntato molto sul concetto di dosi “fisse” per ogni paziente, tutt'al più aggiustate in base all'indicazione terapeutica ed a caratteristiche del paziente stesso (funzione renale, età), ma senza la necessità di un monitoraggio di laboratorio con conseguente aggiustamento posologico. Non vi sono dubbi che molti dei risultati attesi siano stati raggiunti: tre molecole, dabigatran etexilate, rivaroxaban e apixaban sono già state registrate da EMA ed AIFA e vengono quotidianamente prescritte. Non vi sono pertanto dubbi sulla qualità clinica di tali farmaci. Alcune perplessità sulla completa assenza di indicazioni a controlli di laboratorio erano tuttavia già state formulate fin dall'inizio della loro introduzione. Vi è ora la consapevolezza che il laboratorio resti di grande utilità in alcune situazioni di urgenza ed emergenza (complicanze emorragiche o trombotiche, interventi chirurgici). Stanno inoltre emergendo altri possibili impieghi di test di laboratorio per il dosaggio plasmatico dell'attività anticoagulante di tali farmaci, test già disponibili e ben funzionanti, se opportunamente messi a punto. E' verosimile che questi test permettano in futuro di utilizzare i NAO anche in pazienti che, per proprie caratteristiche (peso, età, funzione renale) non sono stati inclusi negli studi e, quindi, non possono ad oggi giovare dei nuovi farmaci. Un'altra ipotesi di lavoro parte dalla presunzione che i nuovi farmaci possano ottenere in alcuni pazienti, a dosaggi personalizzati, risultati migliori di quelli dei vecchi AVK, mentre dagli studi ad oggi disponibili, soprattutto per quanto riguarda l'efficacia, i nuovi farmaci hanno dimostrato “solamente” di essere non inferiori agli AVK. L'ipotesi che un “tailoring” della dose dei NAO possa portare ad un miglioramento dei risultati risulta ragionevole (si tratta di molecole studiate appositamente per essere farmaci anticoagulanti) e trova supporto da analisi retrospettive di studi nei pazienti con fibrillazione atriale (gli eventi emorragici e trombotici risulterebbero correlati rispettivamente con livelli plasmatici elevati o bassi di farmaco). La storia degli AVK dimostra infatti che è stato possibile migliorare, e di molto, l'efficacia e la sicurezza dei farmaci anticoagulanti tramite un uso ragionato e guidato da appropriati test di laboratorio.

Bibliografia:

1. Duxbury BM, Poller L. The oral anticoagulant saga: past, present, and future. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001;7:269-75.
2. Loeliger EA, Poller L, Samama M, Thomson JM, Van den Besselaar AM, Vermeylen J, Verstraete M. Questions and answers on prothrombin time standardisation in oral anticoagulant control. *Thromb Haemost.* 1985 ;54:515-7.
3. Hirsh J, Poller L. The international normalized ratio. A guide to understanding and correcting its problems. *Arch Intern Med.* 1994;154:282-8.
4. Tripodi A, Chantarangkul V, Moia M. More on: new antithrombotics: a need for laboratory monitoring. For or against. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2087-8.
5. Tripodi A. The laboratory and the direct oral anticoagulants. *Blood.* 2013;121:4032-5.

Diagnosi dell'emofilia e della malattia di von Willebrand

P.M. Mannucci

Direzione Scientifica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Diagnosi di emofilia. Fino agli anni '70 lo screening dei difetti congeniti della coagulazione era inadeguato, perché i metodi disponibili per esplorare il sistema intrinseco (tempo di coagulazione e tempo di ricalcificazione del plasma) erano insufficientemente sensibili ai difetti più lievi. L'introduzione del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) (basato inizialmente sul caolino come attivatore della fase di contatto e poi su sostanze come la silice micronizzata o l'acido ellagico) ha determinato un grande progresso. Questi metodi di screening sono infatti capaci di identificare anche le carenze lievi di fattori della coagulazione del sistema intrinseco, in particolare nell'emofilia A e B. L'APTT ha rappresentato anche la base per lo sviluppo di metodi di dosaggio quantitativo dei livelli plasmatici dei fattori VIII e IX, soppiantando così i metodi a due tempi basati sul test di generazione della tromboplastina. I metodi di dosaggio a due tempi basati sull'utilizzo dei substrati cromogenici successivamente sviluppati non sono largamente usati nella pratica clinica, più per il loro costo che per la loro complessità. Vi sono però casi di emofilia lieve clinicamente significativi che non sono rilevabili con i metodi a un tempo del fattore VIII, mentre lo sono con i metodi a due tempi. Occorre quindi considerare l'esecuzione di questi in presenza di una storia emorragica con normale fattore VIII a un tempo e APTT.

Diagnosi della malattia di von Willebrand. Per molti anni la diagnosi di questa frequente malattia emorragica era basata sul riscontro di un tempo di emorragia allungato, che la distingueva dall'emofilia A similmente caratterizzata da bassi livelli plasmatici di fattore VIII. Una scoperta seminale è stata quella di Zimmerman, che nel 1971 dimostrò che il factor VIII related antigen è normale nell'emofilia A ma carente nella malattia di von Willebrand.

Il dosaggio di questa proprietà del fattore von Willebrand (VWF:Ag) non è però sufficiente per diagnosticare tutte le forme di malattia di von Willebrand, perché in quelle caratterizzate dalla presenza di fattore Willebrand disfunzionale, il VWF:Ag è presente in concentrazioni normali nel plasma. Un sostanziale progresso è stato quindi determinato dalla possibilità di misurare in laboratorio la funzione del fattore Willebrand nell'emostasi primaria, utilizzando metodi basati sull'utilizzo dell'antibiotico ristocetina, in seguito alla scoperta di Firkin e del suo gruppo nel 1973. Attualmente il dosaggio del cofattore plasmatico della ristocetina (VWF:RCo) rappresenta il principale test, la cui normalità esclude con elevata accuratezza la diagnosi di malattia di von Willebrand. Vi sono delle eccezioni, rappresentate dal tipo 2N, in cui il fattore Willebrand è ridotto solo nella sua proprietà di legare il fattore VIII (che è diminuito come nell'emofilia lieve), e dei rarissimi casi in cui è alterata la proprietà del fattore Willebrand di legarsi al collagene.

Conclusioni. Attualmente le diagnosi di emofilia A e B e quella della malattia di von Willebrand sono sufficientemente accurate e specifiche se eseguite in laboratori mediamente attrezzati. Le pietre miliari di questo progresso sono state lo sviluppo dell'APTT e dei dosaggi delle varie proprietà del fattore von Willebrand. Rimane da sottolineare l'importanza della raccolta accurata della storia clinica, resa più cogente dallo sviluppo di scores per la quantificazione del rischio di emorragia, tra cui è stato pioneristico lo score Vicenza.

Diagnosi dei Difetti Funzionali Piastrinici

GianMarco Podda¹, Eti Alessandra Femia¹, Mariateresa Pugliano²,
Marco Cattaneo¹

Medicina III, Azienda Ospedaliera San Paolo

*Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di
Milano.*

²*S.I.M.T – Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia,
Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano*

I difetti funzionali piastrinici (PFD) sono associati ad un maggiore rischio di sanguinamento. Tipicamente, i pazienti con PFD hanno emorragie muco-cutanee di gravità variabile e sanguinamenti post-chirurgici e post-traumatici sproporzionati alla causa scatenante. L'iter diagnostico di laboratorio per la valutazione dei PFD dovrebbe essere basato su una strategia in due fasi: la prima prevede test di screening ed aiuta a generare un'ipotesi diagnostica che dovrebbe poi essere confermata nella seconda fase, che è basata sull'utilizzo di test specifici. La prima fase dovrebbe includere: conta completa delle cellule del sangue con particolare attenzione alla conta piastrinica e al volume piastrinico medio, analisi morfologica dello striscio di sangue periferico e la valutazione dell'aggregazione piastrinica. Anche se l'aggregometria a trasmissione della luce (LTA) è il test di funzione piastrinica più utilizzato, questa è relativamente insensibile ai difetti di secrezione piastrinica; per questo motivo, test di laboratorio che misurano simultaneamente l'aggregazione piastrinica e la secrezione, come la lumiaggregometria, dovrebbero essere preferite ai tradizionali LTA. Test globali dell'emostasi primaria, come il tempo di emorragia ed il PFA-100® appaiono di limitata utilità diagnostica perché poco sensibili nell'identificare la maggior parte delle piastrinopatie. La seconda fase prevede test specifici quali ad esempio, la citometria a flusso, il Western blotting e l'analisi del DNA.

In principio era il Tissue Factor... *(ricordando Roberto Lorenzet)*

Maria Benedetta Donati, MD, PhD
*Dipartimento di Epidemiologia e Prevenzione, IRCCS NEUROMED,
Pozzilli, Isernia*

Quando nel 1935 Armand Quick proponeva con una pubblicazione sul Journal of Biological Chemistry il test che da lui ha preso il nome, cioè il test di Quick o Tempo di Protrombina, per lo studio della coagulazione negli emofilici e nei pazienti con ittero ostruttivo, nessuno poteva pensare che l'essenza del reagente impiegato allora, cioè dell'estratto tessutale, sarebbe divenuto un protagonista così centrale della ricerca biomedica nei decenni a cavallo tra il ventesimo e il ventunesimo secolo, fino ad oggi (1). L'estratto tessutale denominato "tromboplastina totale" o, in breve, "tromboplastina", era costituito generalmente da un estratto secco di cervello di coniglio ottenuto con acetone. Dopo il 1992, con la clonazione del fattore tessutale umano (Tissue Factor, TF) la tromboplastina è stata progressivamente sostituita dalle tromboplastine ricombinanti, cioè da fattore tessutale umano ricombinante ricostituito con una miscela di fosfolipidi.

Il riconoscimento della funzione cruciale del TF nei processi della trombosi, dell'aterogenesi e della progressione tumorale è avvenuto soprattutto grazie ad una svolta molto importante nella storia delle conoscenze in questi settori: il passaggio dallo studio dei fattori della coagulazione in fase fluida (come in tutti i decenni dedicati prevalentemente alle malattie emorragiche), alla scoperta che i processi emostatici (e successivamente anche trombotici) avvenivano, preferibilmente, sulle superfici cellulari. Le cellule offrivano superfici catalitiche ottimali per le reazioni della cascata coagulativa (già descritte in fase fluida) e possedevano recettori, con cui rispondevano a stimoli liberando mediatori importanti sia per la crescita e la migrazione di altre cellule, che per la propagazione dei processi coagulativi. Nello studio "cellulare" dell'emostasi sono state chiamate in causa innanzitutto le cellule del sangue, come le piastrine e i leucociti, e, nel corso degli anni Settanta, le cellule endoteliali

messe in coltura da cordone ombelicale umano, una novità importante, che permetteva di studiare la funzionalità di una struttura fino ad allora quasi inaccessibile, come la parete vascolare.

Si situa in questo contesto un'osservazione originale che il nostro gruppo, con Roberto Lorenzet ancora fresco di studi, pubblicò nel 1983 su un importante giornale americano e che ha avuto un grande impatto sulla ricerca successiva in campo vascolare e infiammatorio: le cellule endoteliali umane in coltura, se stimolate da una *noxa* infiammatoria forte come l'endotossina batterica, sono in grado di generare un'attività di Tissue Factor, sia biologica (procoagulante), che immunologica, in assenza di danno cellulare, così fornendo una possibile base razionale per la ben nota sindrome di coagulazione intravascolare disseminata che si associa alle condizioni di sepsi (2). Questo sistema sperimentale è stato successivamente esteso da noi e da altri gruppi alla stimolazione della generazione di TF con citochine infiammatorie o fattori di crescita, a dimostrare come l'endotelio in coltura non sia fonte di TF in condizioni di riposo, ma possa diventarlo se stimolato con agonisti della sua sintesi a livello trascrizionale.

Sono dello stesso anno altre due pubblicazioni del giovane Lorenzet su giornali americani che estendono lo studio del TF a tipi cellulari diversi, quali i monociti/macrofagi, classiche cellule della difesa immunitaria contro insulti di vario genere, compresa la progressione tumorale. L'espressione stimolata di TF in queste cellule appare come una funzione autonoma da altre componenti cellulari (es. linfociti) e caratterizzante il tipo cellulare stesso, in quanto riscontrata in popolazioni monocitarie ottenute da distretti anatomici diversi, dai monociti/macrofagi circolanti ai macrofagi peritoneali a quelli alveolari o presenti nel latte (3).

Nel secondo lavoro, con esperimenti condotti in un tumore sperimentale del coniglio, il V2 carcinoma, veniva affrontato il problema della barriera tumore/ospite a livello della quale i macrofagi infiltranti il tumore armano la difesa dell'ospite nei confronti dell'avanzata del tumore: a tale resistenza contribuisce la deposizione di fibrina nell'interfaccia, favorita dalla disponibilità di elevate quantità di TF prodotte dai macrofagi stimolati dalle cellule tumorali (4).

Dai macrofagi, ulteriore estensione dell'orizzonte, fino alle cellule tumorali, capaci di rendere disponibile il TF in maniera costitutiva; questi lavori degli anni Ottanta, in cui il TF delle cellule tumorali, da nostri studi sia in modelli sperimentali che dal sangue circolante di pazienti con tumore, veniva considerato soprattutto come attore principale dei rapporti tra tumori e trombosi, hanno successivamente aperto la strada agli studi più recenti sulla “doppia anima” del TF, con i suoi effetti sia procoagulanti che di “signalling molecule”, capace di influenzare la progressione del tumore e la formazione delle metastasi, con meccanismi coagulazione-indipendenti (5).

Nel cuore degli anni Ottanta si situa poi il periodo di alcuni anni trascorso da Roberto a New York nel Laboratorio di Julian Niemetz, un pioniere degli studi sul TF, che già all'inizio degli anni Settanta aveva individuato un ruolo importante per l'attività procoagulante dei leucociti nella patogenesi della coagulazione intravascolare disseminata che accompagna la classica reazione di Sanarelli-Schwarzman. Quell'intenso periodo di lavoro ha portato alla scoperta che il TF dei monociti poteva essere stimolato non solo da prodotti batterici, ma da un'importante interazione cellulare, quella con le piastrine del sangue, tramite un prodotto della cascata dell'acido arachidonico, derivato dalla via della lipossigenasi, il 12-HETE, acido idrossi-eicosatetraenoico (6).

Questa osservazione originale ha aperto la strada ad ulteriori scoperte sulle interazioni tra monociti e piastrine condotte successivamente dal gruppo di Roberto Lorenzet ed Emanuela Napoleone al Negri Sud e attraverso collaborazioni internazionali con il gruppo dei Furie a Boston. Si è così giunti all'osservazione che una molecola adesiva espressa sulle piastrine e sulle cellule endoteliali attivate, la P-selettina, era in grado di aumentare l'espressione di TF da parte dei monociti ed anche di mediare il “binding” di piastrine e cellule endoteliali con monociti e neutrofili, disegnando così uno scenario di interazioni cellulari di più ampio respiro e di estrema rilevanza nelle risposte infiammatorie, nell'aterogenesi e nella migrazione di cellule tumorali (7). A “chiudere il circolo”, nell'induzione di TF dei monociti da parte delle piastrine, l'azione della P-selettina viene potenziata dal 12-HETE piastrinico (8).

A queste prime osservazioni sono seguiti una serie di studi che hanno approfondito il concetto di interazioni cellulari tra piastrine, monociti, neutrofili e cellule endoteliali dove l'espressione di TF, insieme a quella di fattori di crescita, si presentava come una risposta "infiammatoria" generata da adesioni cellula/cellula realizzate da una "machinery" di molecole di adesione e rispettivi recettori (9-11). Questi studi si sono integrati con una linea di ricerca sulle interazioni piastrine/neutrofili che ha caratterizzato il lavoro di una parte del nostro gruppo negli ultimi venti anni (12)

A queste interazioni si sono nuovamente aggiunte le cellule tumorali non solo con il loro potere costitutivo di esprimere TF, ma anche con le loro interazioni con le cellule dell'ospite, soprattutto per quanto riguarda le cellule endoteliali e il processo dell'angiogenesi.

Negli ultimi anni Roberto si è occupato a lungo della cosiddetta "procoagulant/proangiogenic loop", cioè di quei processi di mutua stimolazione tra TF e VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) che fanno parte degli effetti non coagulazione-dipendenti del TF sulla crescita e la disseminazione tumorale. Alla luce di questi studi è stata data un'interpretazione degli effetti di un noto farmaco antitumorale, il paclitaxel, capace di spegnere l'attività di TF di cellule tumorali umane e di cellule vascolari dell'ospite, e, più recentemente, è stato affrontato il problema delle complicanze trombotiche del trattamento di pazienti oncologici con farmaci antiangiogenetici (13-15).

La prematura scomparsa di Roberto Lorenzet nel gennaio scorso, ha rallentato questi studi, ma ha reso ancora più forte il fascino e l'emozione di aver lavorato con lui e i suoi collaboratori per tanti anni.

Bibliografia:

1. Quick AJ: The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. J Biol Chem 1935;78:1149-52.
2. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati MB, Semeraro N. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. J Clin Invest. 1983;71:1893-6.

3. Semeraro N, Biondi A, Lorenzet R, Locati D, Mantovani A, Donati MB. Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites. *Immunology*. 1983;50:529-35.
4. Lorenzet R, Peri G, Locati D, Allavena P, Colucci M, Semeraro N, Mantovani A, Donati MB. Generation of procoagulant activity by mononuclear phagocytes: a possible mechanism contributing to blood clotting activation within malignant tissues. *Blood*. 1983;62:271-3.
5. Lorenzet R, Bottazzi B, Locati D, Colucci M, Mantovani A, Semeraro N, Donati MB. Failure to warfarin to affect the tissue factor activity and the metastatic potential of murine fibrosarcoma cells. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1985;21:263-5.
6. Lorenzet R, Niemetz J, Marcus AJ, Broekman MJ. Enhancement of mononuclear procoagulant activity by platelet 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Clin Invest*. 1986;7:418-23.
7. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8767-71.
8. Pellegrini G, Malandra R, Celi A, Furie BC, Furie B, Lorenzet R. 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid upregulates P-selectin-induced tissue factor activity on monocytes. *FEBS Lett*. 1998;441:463-6.
9. Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet R. Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood*. 1997;89:541-9.
10. Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin Hematol*. 1997;34:327-35.
11. Napoleone E, Di Santo A, Bastone A, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, Donati MB, Lorenzet R. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:782-7.

12. Cerletti C, de Gaetano G, Lorenzet R. Platelet - leukocyte interactions: multiple links between inflammation, blood coagulation and vascular risk. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2010;2:e2010023.
13. Napoleone E, Zurlo F, Latella MC, Amore C, Di Santo A, Iacoviello L, Donati MB, Lorenzet R. Paclitaxel downregulates tissue factor in cancer and host tumour-associated cells. *Eur J Cancer.* 2009;45:470-7.
14. Donati MB, Lorenzet R. Overview on tumor angiogenesis. Pp 3-14 IN: *Tumor angiogenesis. From molecular mechanism to targeted therapy.* Eds: Merklend FS et al, Wiley-Blackwell 2010.
15. Donati MB, Lorenzet R. Thrombosis and cancer: 40 years of research. *Thromb Res.* 2012;129:348-52.

Stress Ossidativo ed Emostasi

Matteo Becatti*, Claudia Fiorillo* e Rosanna Abbate**

**Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche
"Mario Serio"*

***Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di
Firenze
SOD Malattie Aterotrombotiche AOU-Careggi*

E' ben noto che la formazione di specie reattive dell'Ossigeno (ROS) e dell'Azoto (RNS), identificate generalmente come RONS, capaci di determinare attraverso l'ossidazione alterazioni funzionali e/o strutturali, è un meccanismo di disfunzione endoteliale che è associato a numerose patologie cardiovascolari.

I target principali di queste specie reattive sono lipidi e proteine delle cellule endoteliali, delle piastrine e del plasma che, ossidandosi, perdono le caratteristiche funzionali e possono alterare l'equilibrio del sistema emostatico.

La reazione delle RONS con le proteine cellulari porta alla formazione di residui aminoacidici nitrosilati, all'ossidazione dei gruppi tiolici e alla formazione di carbonili proteici. L'attacco ossidativo alle proteine piastriniche può indurre cambiamenti nel signaling cellulare alterando il processo di emostasi. Inoltre, l'ossidazione di residui aminoacidici del fibrinogeno –proteina chiave della cascata coagulativa- e del plasminogeno –proteina essenziale del processo fibrinolitico- può causare alterazioni importanti nell'intero processo. Effetti dello stress ossidativo su alcuni elementi coinvolti nel processo emostatico verranno esaminati in questa sintesi.

Lo stress ossidativo

Lo stress ossidativo rappresenta una condizione di squilibrio tra i processi proossidanti e i processi antiossidanti.

Principali responsabili delle modificazioni ossidative, sia reversibili che irreversibili, che avvengono durante le reazioni redox, sono le RONS, molecole, molto instabili e reattive, che tendono a sottrarre un elettrone da altre molecole, ossidandole, e generando reazioni a catena che si autosostengono e si propagano.

Tra esse figurano:

- 1) il radicale ossidrilico OH^\bullet ;
- 2) il radicale anione superossido $\text{O}_2^{\bullet-}$;
- 3) il perossido di idrogeno H_2O_2 ;
- 4) l'ossigeno singoletto $^1\text{O}_2$ che è una forma attivata dell'ossigeno
- 5) l'ossido di Azoto (NO), prodotto dagli enzimi nNOS, eNOS, iNOS.

La maggior parte delle ROS hanno come precursore $\text{O}_2^{\bullet-}$ che è prodotto dalla respirazione cellulare nella catena di trasporto nel mitocondrio e dall'enzima di membrana NADPH ossidasi. $\text{O}_2^{\bullet-}$ è responsabile, insieme ad NO, della generazione di uno dei più potenti agenti ossidanti, il perossinitrito (ONOO^-). Le ROS sono in grado di interagire con tutte le macromolecole biologiche (proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici) provocando alterazioni di diversa natura ed entità.

In condizioni fisiologiche, esistono meccanismi in grado di mantenere basse le concentrazioni di questi prodotti potenzialmente citotossici: le due più importanti difese enzimatiche sono rappresentate dalla superossido dismutasi, che elimina il superossido, e dalla catalasi, che detossifica l'acqua ossigenata insieme alla perossidasi. Vi sono poi antiossidanti non enzimatici di varia natura che reagiscono con le specie radicaliche formando prodotti non radicalici. Tra queste sostanze, naturali e sintetiche, vi sono sostanze idrosolubili (acido L-ascorbico, acido urico) e liposolubili (α -tocoferoli, carotenoidi, retinolo); quest'ultime sono associate con le membrane cellulari e, inoltre, si trovano a livello extracellulare con le membrane plasmatiche. Data la scarsità di enzimi antiossidanti nei fluidi extracellulari, gli antiossidanti non enzimatici rivestono un ruolo chiave a questo livello.

Fibrinogeno e stress ossidativo

La conversione del fibrinogeno in fibrina consta di tre passaggi: nel primo passaggio la proteolisi trombinica taglia i fibrinopeptidi FpA e FpB dal fibrinogeno per produrre monomeri di fibrina; nel passaggio successivo, dai monomeri si ha la formazione di polimeri intermedi attraverso interazioni non covalenti.

Nella terza ed ultima fase, i polimeri intermedi si aggregano a formare il coagulo di fibrina vero e proprio. I monomeri di fibrina (ottenuti dall'azione della trombina) polimerizzano in aggregati per produrre un network tridimensionale di fibre. La fibrina infine viene stabilizzata con una transglutaminasi, il fattore XIIIa, attraverso la formazione di legami covalenti intramolecolari in specifici siti, in modo da rendere l'intero coagulo più solido e resistente alla dissoluzione fibrinolitica.

Un interessante studio di Pawel Novak ha messo in luce come modificazioni ossidative e di nitrosilazione indotte dal perossinitrito comportino conseguenze strutturali e funzionali a carico del fibrinogeno. Infatti la nitrosilazione può essere determinante nella comparsa di 'cross-links' di ditirosine a carico delle catene α del fibrinogeno modificato; è stato visto che le zone occupate dalle ditirosine sono soprattutto le catene α e i domini D, ma non il dominio E; è stato anche visto come un elevato livello di nitrosilazione e di ossidazione sia in grado di indurre alterazioni nella funzionalità del fibrinogeno nel processo di formazione del coagulo ed in particolare nella sua suscettibilità all'azione litica alla plasmina. Recentemente è stato osservato come la nitrificazione dei residui di tirosina del fibrinogeno acceleri in modo significativo il cross-linking da parte del fattore XIII e la formazione del coagulo, mentre l'esposizione del fibrinogeno ad ossidanti 'non-nitrosilanti' decelerano la formazione del coagulo. Ad ogni modo, la questione è ancora dibattuta ed ulteriori studi sono necessari per chiarire questi aspetti.

I carbonili proteici sono considerati markers di stress ossidativo. Aumentati livelli di carbonili proteici sono stati osservati in numerose patologie acute e croniche. Studi sperimentali hanno dimostrato come alterazioni nella struttura del fibrinogeno/fibrina che sono state osservate in patologie cardiovascolari derivano dall'introduzione di gruppi carbonilici a livello delle catene laterali dei residui di lisina, arginina, prolina e treonina, (producendo derivati chetonici ed aldeidici).

Recenti studi del nostro gruppo di ricerca hanno evidenziato che la carbonilazione del fibrinogeno comporta modificazioni in termini di struttura secondaria della molecola che si ripercuotono anche nella

struttura terziaria, portando ad un'alterazione della funzione del fibrinogeno, ovvero della sua capacità di aggregazione/lisi.

In questo ambito di ricerca abbiamo descritto in pazienti colpiti da infarto acuto del miocardio (post-AMI) la presenza di elevati livelli ematici di stress ossidativo associati ad una marcata carbonilazione del fibrinogeno. In particolare, abbiamo dimostrato che le alterazioni ossidative a carico del fibrinogeno sono causa di importanti modificazioni strutturali che si ripercuotono in un'alterata funzione della proteina. Infatti il fibrinogeno dei pazienti post-AMI, rispetto al fibrinogeno purificato da soggetti sani, presenta aumentati livelli di carbonilazione che si ripercuotono in differenti cinetiche di polimerizzazione/lisi della fibrina.

Endotelio e stress ossidativo

è ben noto che le RONS possono alterare la funzione endoteliale determinando importanti effetti vasocostrittori. L' $O_2\cdot^-$ può formarsi nelle cellule endoteliali con diversi meccanismi: dalla NADPH ossidasi a seguito della stimolazione da parte dell'Angiotensina II, oppure dall'attivazione delle cellule polimorfonucleate o in conseguenza della riperfusione post-ischemica o dall'enzima eNOS in condizioni disaccoppiate. Quando l' $O_2\cdot^-$ è presente in elevata quantità, può reagire con l'NO formando il potente derivato pro-ossidante perossinitrito ONOO $^-$.

Gli effetti combinati procurati dall' $O_2\cdot^-$ sull'inattivazione dell'NO e dall'azione perossidante e nitrosilante del perossinitrito, con inibizione dei canali K^+ delle cellule muscolari lisce e sulla formazione di PGI_2 , causano un'azione di vasocostrizione e contribuiscono a danneggiare la funzione endoteliale ed a favorire il processo aterogenetico. Al contrario, in presenza di una ridotta formazione di $O_2\cdot^-$ prevale, grazie all'attività della superossido dismutasi SOD, la formazione di perossido di idrogeno H_2O_2 da cui risulta un effetto di vasodilatazione mediato dall'attivazione dei canali K^+ calcio dipendenti.

Piastrine e stress ossidativo

La partecipazione delle piastrine alla produzione di RONS è oggi ben caratterizzata ed è determinata in massima parte dalla presenza nelle piastrine degli enzimi NADPH ossidasi, eNOS e lipoossigenasi.

Le specie reattive influenzano l'attività piastrinica. La produzione di O_2^{\bullet} a livello dell'endotelio dei vasi riduce la soglia di attivazione piastrinica e può indurre l'aggregazione spontanea. O_2^{\bullet} inoltre, aumenta la biodisponibilità di ADP incrementando il numero di piastrine reclutate, mentre l' NO, al contrario, è un potente inibitore dell'attivazione piastrinica.

Gli isoprostani, prodotti in seguito all'iperproduzione di ROS, a loro volta contribuiscono alla fase tardiva dell'aggregazione piastrinica e quindi alla formazione del trombo. La grande influenza che hanno le RONS nella fisiologia delle piastrine mette in evidenza che lo stress ossidativo ha un ruolo anche in patologie aterosclerotiche.

Recenti studi del nostro gruppo di ricerca hanno mostrato alti livelli di stress ossidativo piastrinico e leucocitario in pazienti con sindrome coronarica acuta. In particolare, nei pazienti non responders (con alta attività piastrinica residua in corso di doppia terapia antiaggregante piastrinica -acido acetilsalicilico+clopidogrel) è stata evidenziata una significativa correlazione tra i livelli di stress ossidativo e i differenti pathways di aggregazione piastrinica, suggerendo un ruolo dello stress ossidativo quale fattore prognostico di “resistenza” alla doppia terapia antiaggregante piastrinica.

Bibliografia:

1. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 1991 Oct 29;30(43):10363-70.
2. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004 Oct;122(4):339-52.
3. Konings J, Govers-Riemslog JW, Philippou H, Mutch NJ, Borissoff JI, Allan P, Mohan S, Tans G, Ten Cate H, Ariëns RA. Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3942-51.
4. Shacter E, Williams JA, Levine RL. Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. *Free Radic Biol Med*. 1995 Apr;18(4):815-21.

5. Becatti M, Marcucci R, Bruschi G, Taddei N, Bani D, Gori AM, Giusti B, Gensini GF, Abbate R, Fiorillo C. Oxidative modification of fibrinogen is associated with altered function and structure in the subacute phase of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Jul;34(7):1355-61.
6. Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Nagaswami C, Scheiner T, Torbet J, Vilaire G, Bennett JS, Murciano JC, Muzykantov V, Penn MS, Hazen SL, Weisel JW, Ischiropoulos H. Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2004 Mar 5;279(10):8820-6.
7. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost.* 2005;3(2):254-67.
8. Sauls DL, Warren M, Hoffman M. Homocysteinylated fibrinogen forms disulfide-linked complexes with albumin. *Thromb Res.* 2011 Jun;127(6):576-81.
9. Nowak P, Zbikowska HM, Ponczek M, Kolodziejczyk J, Wachowicz B. Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences. *Thromb Res.* 2007;121(2):163-74.
10. Becatti M, Fiorillo C, Gori AM, Marcucci R, Paniccia R, Giusti B, Violi F, Pignatelli P, Gensini GF, Abbate R. Platelet and leukocyte ROS production and lipoperoxidation are associated with high platelet reactivity in Non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI) patients on dual antiplatelet treatment. *Atherosclerosis.* 2013 Dec;231(2):392-400.

I nuovi anticoagulanti orali: oltre l'effetto anticoagulante

Anna Maria Gori, Alice Sereni, Ada Kura, Maddalena Pazzi, Elisa Grifoni, Rossella Marcucci

Dip. Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze, SOD Malattie Aterotrombotiche, Az. Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

Da alcuni anni, la scelta terapeutica in presenza dell'indicazione ad un anticoagulante orale, si è ampliata grazie all'introduzione dei cosiddetti nuovi anticoagulanti orali (NAO) quali Dabigatran (inibitore diretto della trombina) Rivaroxaban ed Apixaban (inibitori diretti del FXa). Tali farmaci, a parità di efficacia clinica, dimostrata sia nei pazienti con Fibrillazione Atriale Non Valvolare (FANV) che in quelli affetti da Tromboembolismo Venoso, presentano profili di sicurezza migliori rispetto ai precedenti antagonisti della vitamina K (AVK). I NAO, infatti, si sono dimostrati associati ad un rischio di sanguinamento generale, ed in particolare cerebrale, più basso (1-4).

Peculiarità di questi nuovi farmaci che consentono di impiegare un dosaggio fisso e di non richiedere il monitoraggio dell'efficacia anticoagulante, sono il rapido inizio di azione, la rapida eliminazione e la farmacocinetica più prevedibile rispetto agli AVK.

Parallelamente agli studi di sicurezza ed efficacia clinica, sono stati effettuati numerosi studi in modelli animali, in sistemi in vitro ed ex-vivo volti a valutare le capacità non strettamente anticoagulanti dei NAO ed in particolare le capacità dei NAO di modulare l'infiammazione, la matrice extracellulare, la proliferazione cellulare, e l'angiogenesi.

Fino agli anni 80, la teoria "lipidica", che prevedeva l'accumulo passivo di lipidi nella parete dei vasi arteriosi come causa principale dell'aterosclerosi era considerata predominante. In questi ultimi 30 anni, tuttavia, numerosi studi clinici e sperimentali hanno evidenziato un ruolo cruciale dell'infiammazione nella patogenesi della malattia aterosclerotica e strette interazioni fra processo infiammatorio, trombotosi e danno vascolare.

I processi infiammatori, infatti, sono coinvolti nell'inizio e nella progressione dell'aterosclerosi e sono implicati anche nella rottura della placca aterosclerotica.

E' ormai chiaramente dimostrato che l'infiammazione è strettamente legata alla coagulazione in diverse condizioni patologiche e che esiste una associazione bidirezionale tra i due sistemi. Il sistema emostatico, infatti, esercita una serie di azioni sul sistema vascolare, che possono influenzare la composizione molecolare e cellulare della parete arteriosa e della placca aterosclerotica.

Oltre al suo ruolo nella coagulazione, il fattore Xa partecipa ad altre attività cellulari fisiologiche e non, prevalentemente attraverso l'attivazione dei recettori PAR. L'attivazione del fattore X determina l'avvio di un segnale intracellulare, mediato dai recettori PAR-2 o, quando in complesso ternario con TF-FVIIa, dai recettori PAR-1 e PAR-2, presenti sulle cellule endoteliali, sui leucociti, sulle cellule muscolari lisce, sui fibroblasti e sulle cellule dendritiche. Il segnale intracellulare PAR-mediato contribuisce alla produzione di citochine pro-infiammatorie, tra cui interleuchina-6, interleuchina-8 e di chemochine e all'espressione di molecole di adesione cellulare, quali E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, l'up-regolazione del fattore tissutale, la proliferazione delle cellule vascolari lisce ed il rilascio di fattori di crescita (5).

La trombina è una serina proteasi fondamentale per la coagulazione, ma è anche dotata di numerose altre capacità. La trombina attiva rapidamente i recettori PAR-1, -3 e -4 ma non il recettore PAR-2 (5). Le attività pro-infiammatorie indotte dalla trombina comprendono l'up-regolazione delle molecole adesive sui leucociti, della P-selectina sulle piastrine e cellule endoteliali e la stimolazione di citochine pro-infiammatorie e la produzione di chemochine (5-6). La trombina potenzia inoltre anche gli effetti del VEGF, legato al coagulo indotto dalla trombina, in quanto la trombina lo protegge dall'inattivazione operata dalla antitrombina, contribuendo così all'angiogenesi e alla riparazione dei tessuti nei siti di lesione. Stimolando il rilascio di istamina e di serotonina, la trombina contribuisce anche alla maggiore permeabilità vascolare, edema e gonfiore che sono associati con l'infiammazione (5-6).

Inoltre, legandosi alla trombomodulina, la trombina favorisce la trasformazione della proteina C in proteina C attivata, che è un anticoagulante potente, ma anche una molecola anti-infiammatoria. Inoltre, la trombina può diminuire il rilascio di interleuchina-12 e promuovere l'up-regolazione dell'interleuchina-10 nei monociti, inducendo in tal modo le azioni immunosoppressive e anti-infiammatorie (6).

La dimostrazione che l'inibizione del FXa determina un blocco di alcune delle citochine pro-infiammatorie, come evidenziato da alcuni esperimenti di colture cellulari incubate con un inibitore del Fattore Xa (7-8), ha dato l'avvio ad una serie di esperimenti in vitro che hanno dimostrato che il rivaroxaban inibisce, in maniera dose-dipendente, l'attività procoagulante dei monociti/macrofagi attivati e la secrezione di cito/chemochine infiammatorie dai monociti attivati attraverso la via di attivazione PAR-1 dipendente (8). Inoltre, nelle cellule endoteliali umane ombelicali il trattamento con rivaroxaban o con dabigatran riduce la formazione di trombina determinando, inoltre una down-regolazione dell'espressione delle citochine pro-infiammatorie (9).

Un'ulteriore prova di un effetto anti-infiammatorio dei NAO, PAR-mediato, è emersa dallo studio condotto su preparati di tessuto atriale umano, messi in coltura per 24 ore con il FXa. Al fine di mimare la fibrillazione atriale, era inoltre applicata una rapida stimolazione a 4 Hz. Il trattamento del tessuto atriale con FXa e con la stimolazione a 4 Hz ha determinato un significativo aumento dell'mRNA per PAR-1 e PAR-2, un'attivazione delle MAK ed un'aumentata espressione delle molecole adesive ICAM e VCAM, della IL-8 e del PAI-1, tutti fenomeni che sono risultati inibiti dal trattamento con rivaroxaban (10).

Gli studi su modelli animali ed in particolare gli studi sui topi knock-out per l'apolipoproteina E con lesioni aterosclerotiche avanzate hanno messo in evidenza che la somministrazione di rivaroxaban (inibitore del Xa) (5 mg / kg / die) con la dieta per 26 settimane favorisce la stabilità delle placche aterosclerotiche e la riduzione dell'espressione dei mediatori pro-infiammatori nei preparati dell'aorta toracica, tra cui l'IL-6, il TNF- α e la MCP-1 (11).

I dati derivanti da questo studio suggeriscono che la somministrazione cronica di rivaroxaban pur non essendo in grado di influenzare la progressione delle lesioni aterosclerotiche è capace di ridurre l'espressione di alcuni marcatori dell'infiammazione e di promuovere la stabilità delle lesioni stesse nel modello animale. Nello stesso modello animale di topi ApoE^{-/-}, alimentati con una dieta ricca di colesterolo per 4 settimane e trattati per via orale con dabigatran (inibitore della trombina) (1,2 g/ kg /die) o placebo, il trattamento con l'inibitore della trombina si associa ad una riduzione significativa delle lesioni aterosclerotiche e ad una minor infiltrazione dei macrofagi nelle lesioni aterosclerotiche. Parallelamente si osserva una riduzione dello stress ossidativo nei preparati di aorta toracica di topi ApoE^{-/-} (12).

Nel modello di topi transgenici T_MPro/Pro: ApoE^{2/2} (proni all'aterosclerosi), caratterizzati da un fenotipo di ipercoagulabilità geneticamente determinato, si assiste all'instaurarsi di una grave aterosclerosi, con vulnerabilità della placca ed aterotrombosi spontanea. La somministrazione di dabigatran o della proteina C attivata ricombinante è capace di contrastare il fenotipo pro-infiammatorio e pro-aterogeno nei topi T_MPro/Pro: apoE² / 2 (13).

La dimostrazione che gli inibitori del F_Xa non solo inibiscono il sistema della coagulazione, ma attenuano anche l'interazione leucociti-endotelio in modelli di infiammazione acuta è stata ottenuta da studi effettuati in un modello murino di diabete di tipo 2 (KK-Ay). Il trattamento con 5 o 10 mg / kg di rivaroxaban somministrati per via orale a topi KK-Ay per 7 settimane determina una riduzione significativa del numero dei leucociti adesi alle cellule endoteliali e del numero di aggregati leucociti-piastrine, evidenziando come il rivaroxaban attenui l'interazione leucociti-piastrine-cellula endoteliale, che a sua volta porta alla attenuazione della formazione di microtrombi nel modello murino di diabete mellito (14).

A tutt'oggi sono scarsi gli studi presenti in letteratura che hanno messo in evidenza una riduzione dei livelli circolanti dei marcatori dell'infiammazione o delle molecole adesive in pazienti sottoposti a trattamento con inibitori della trombina o con inibitori del F_Xa.

In un gruppo pazienti con fibrillazione atriale sottoposti ad ablazione randomizzati al trattamento con dabigatran 110 mg (due volte al giorno) o a warfarin (INR 2-3) per 3 mesi dopo la procedura di ablazione sono stati determinati i livelli circolanti della Proteina C Reattiva (PCR), D-dimero, e frammento della protrombina F 1+2 dopo 30 e 90 giorni di trattamento. I risultati hanno mostrato una significativa e rapida riduzione dei livelli di PCR, D-dimero e F1+2 nel gruppo trattamento dabigatran rispetto ai pazienti trattati con warfarin, suggerendo un effetto benefico per il dabigatran anche in termini di riduzione della risposta infiammatoria (15).

Un recente studio che ha esaminato le proteine plasmatiche biologicamente rilevanti nei pazienti con FANV (16). I pazienti sono stati randomizzati a ricevere il trattamento per 24 settimane con rivaroxaban (n=93) o con warfarin (n=94). Rispetto al warfarin, il trattamento con rivaroxaban per 24 settimane è associato ad un aumento significativo dei livelli della trombomodulina (TM) e una tendenza verso una riduzione dei livelli metalloproteinasi-9 (16). Il meccanismo esatto per l'aumento osservato dei livelli di TM non è stato del tutto chiarito. Tuttavia, poiché l'infiammazione downregola la TM, è stato ipotizzato che la capacità anti-infiammatoria del rivaroxaban possa aver contribuito indirettamente all'aumento dei livelli TM. L'aumento dei livelli di TM offre potenziali vantaggi, in quanto la TM esplica attività anti-infiammatorie mediate sia da meccanismi APC- dipendenti e APC-indipendenti (17). Inoltre, è stata dimostrata un'espressione ridotta di TM da parte dell'endotelio sovrastante le placche aterosclerotiche delle arterie coronarie in pazienti con cardiopatia ischemica (18), e una down-regolazione della TM correla con l'aumento delle complicanze trombotiche (19) in modelli animali.

In considerazione del ruolo delle metalloproteinasi nel rischio di trasformazione emorragica nei pazienti con ictus ischemico acuto trattati con trombolisi sistemica (20) e del possibile ruolo dei NAO nei processi di degradazione della matrice extracellulare, sono stati condotti studi in un modello animale di occlusione transitoria dell'arteria media cerebrale per valutare i rischi ed i benefici del trattamento con tPA in corso di terapia anticoagulante con warfarin o con dabigatran.

Il pre-trattamento con warfarin (0,2 mg/kg/die) o dabigatran (20 mg/kg/die), o placebo for 7 days era seguito dall'induzione dell'occlusione transitoria dell'arteria cerebrale per 120 min e dalla successiva riperfusione e somministrazione di tPA (10 mg/kg/10 ml). Il pre-trattamento con dabigatran migliorava significativamente la paraparesi ed il volume dell'emorragia intracerebrale rispetto a quanto osservato nel gruppo trattato con warfarin. Di notevole interesse, la dimostrazione che il trattamento con dabigatran riduce grandemente l'attivazione della metalloproteinasi-9 (che si associa ad un aumento del rischio di trasformazione emorragica) rispetto al trattamento con warfarin, indicando che il dabigatran può offrire una protezione neurovascolare e rendendo ragione almeno in parte della riduzione delle complicanze emorragiche osservata nei pazienti trattati con dabigatran nello studio RE-LY (21). Recentemente, lo stesso gruppo ha condotto studi, sempre nel modello di occlusione dell'arteria media cerebrale, per valutare gli effetti della somministrazione di rivaroxaban e apixaban sul rischio emorragico in corso di trattamento con tPA (22). Analogamente a quanto osservato per lo studio con dabigatran anche rivaroxaban e apixaban migliorano significativamente la paraparesi e riducono l'entità dell'emorragia intracerebrale in confronto a quanto osservato per il gruppo trattato con warfarin. Inoltre, l'attivazione della metalloproteinasi-9 è risultata fortemente inibita dal trattamento con rivaroxaban e con apixaban, suggerendo come anche questi due farmaci offrono una protezione neurovascolare (22).

Infine, i NAO sono implicati anche in altre attività quali le attività antifibrotiche e antiproliferative.

Poiché la trombina è mitogena per i fibroblasti polmonari, aumenta l'effetto proliferativo del fibrinogeno sui fibroblasti, differenzia i normali fibroblasti di polmone ad un fenotipo di miofibroblasti mediante un meccanismo PAR-1 e proteina chinasi-dipendente ed aumenta l'espressione delle chemochine proinfiammatorie e delle proteine della matrice extracellulare, come il collagene, fibronectina e tenascina, l'attivazione di queste cellule da parte della trombina è un meccanismo probabile per lo sviluppo e la progressione della fibrosi polmonare in generale, e in particolare SSC-associata malattia interstiziale polmonare (SSc-ILD), in cui danno

endoteliale e l'attivazione della cascata coagulativa è molto diffusa (23). Nel modello murino stato dimostrato che l'inibizione della trombina attenua l'espressione delle citochine fibrogeniche nel polmone e l'accumulo di collagene riducendo gli effetti profibrotici della trombina (23). La somministrazione orale dell'inibitore diretto della trombina attenua lo sviluppo della fibrosi polmonare indotta da bleomicina. Il dabigatran riduce, quindi, significativamente l'attività della trombina e livelli di fattore di crescita nel liquido bronco alveolare, riducendo al contempo il numero di cellule infiammatorie e le concentrazioni proteiche. Nei topi trattati, inoltre, risulta istologicamente evidente la riduzione dell'infiammazione polmonare e della fibrosi (23).

Oltre alle azioni profibrotiche la trombina può modificare il comportamento delle cellule tumorali direttamente attraverso l'attivazione dei recettori PAR o indirettamente mediante la generazione di matrici di fibrina. Il dabigatran inibisce l'invasività delle cellule di carcinoma della mammella attraverso le membrane rivestite con Matrigel a concentrazioni che non hanno effetto sull'indice di proliferazione delle cellule tumorali in coltura. Anche nel modello animale, usato per lo studio dell'invasività delle cellule di carcinoma della mammella in xenotrapianti tracheali in topi nudi, la somministrazione per via orale del dabigatran due volte al giorno alla dose di 45 mg/ kg per oltre 4 settimane ha messo in evidenza una minore invasione delle cellule tumorali attraverso la parete tracheale rispetto topi trattati con placebo. Il trattamento con dabigatran evidenzia, inoltre, una attività antitumorale, con una riduzione del 50% del volume del tumore a 4 settimane e del numero delle cellule tumorali nel sangue e delle micrometastasi del fegato (24). Questi risultati suggeriscono che la somministrazione orale di un inibitore diretto della trombina sia in grado di inibire l'invasione e metastasi dei tumori maligni della mammella, indicando come il trattamento con gli inibitori diretti della trombina può essere utile non solo prevenzione degli eventi trombotici nei pazienti con tumore, ma anche come terapia aggiuntiva per il trattamento di tumori maligni.

In conclusione, gli studi preclinici hanno dimostrato che l'inibizione del target fattore Xa e trombina presenta aspetti che vanno al di là degli effetti anticoagulanti e mettono in evidenza le capacità

anti-infiammatorie, anti-fibrotiche ed anti-proliferative dei nuovi anticoagulanti orali, suggerendo nuovi meccanismi fisiopatologici sottostanti all'efficacia terapeutica dei NAO ed indicando come i nuovi studi sui NAO debbano considerare anche le azioni non-anticoagulanti dei NAO fra gli indici di sicurezza ed efficacia.

Bibliografia:

1. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J et al. RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2009 Sep 17;361(12):1139-51. doi: 10.1056/NEJMoa0905561. Epub 2009 Aug 30.
2. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J et al. Rivaroxaban versus warfarin in non valvular atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011 Sep 8;365(10):883-91. doi: 10.1056/NEJMoa1009638. Epub 2011 Aug 10.
3. Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B et al. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *EINSTEIN Investigators. N Engl J Med.* 2010 Dec 23;363(26):2499-510. doi: 10.1056/NEJMoa1007903. Epub 2010 Dec 3.
4. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ et al. ARISTOTLE Committees and Investigators. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011 Sep 15;365(11):981-92. doi: 10.1056/NEJMoa1107039. Epub 2011 Aug 27.
5. Esmon CT. Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thromb Haemost.* 2014 Apr 1;111(4):625-33.
6. ten Cate H. Tissue factor-driven thrombin generation and inflammation in atherosclerosis. *Thromb Res.* 2012 May;129 Suppl 2:S38-40.
7. Ragosta M, Gimple LW, Gertz SD, et al. Specific Factor Xa inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation* 1994; 89: 1262-1271.

8. Laurent M, Varin R, Joimel U, et al. A novel mechanism of action of riva- roxaban: inhibition of monocyte and macrophage procoagulant activity and consequence on inflammatory process. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009; 114: Abstract 3124.
9. Borissoff JJ, Otten JJ, Heeneman S, et al. Genetic and pharmacological modifi- cations of thrombin formation in apolipoprotein E-deficient mice determine atherosclerosis severity and atherothrombosis onset in a neutrophil-dependent manner. *PLoS One* 2013; 8: e55784.
10. Bukowska A, Zacharias I, Weinert S, Skopp K, Hartmann C, Huth C, Goette A. Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue. *Eur J Pharmacol.* 2013 Oct 15;718(1-3):114-23.
11. Zhou Q, Bea F, Preusch M, et al. Evaluation of plaque stability of advanced atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice after treatment with the oral Fac- tor Xa inhibitor rivaroxaban. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 432080.
12. Pingel S, Tiyerili V, Mueller J, Werner N, Nickenig G, Mueller C. Thrombin inhibition by dabigatran attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Arch Med Sci.* 2014 Feb 24;10(1):154-60.
13. Borissoff JJ, Otten JJ, Heeneman S, Leenders P, van Oerle R, Soehnlein O, Loubel ST, Hamulyák K, Hackeng TM, Daemen MJ, Degen JL, Weiler H, Esmon CT, van Ryn J, Biessen EA, Spronk HM, ten Cate H. Genetic and pharmacological modifications of thrombin formation in apolipoprotein e-deficient mice determine atherosclerosis severity and atherothrombosis onset in a neutrophil-dependent manner. *PLoS One.* 2013;8(2):e55784.
14. Iba T, Aihara K, Yamada A, Nagayama M, Tabe Y, Ohsaka A. Rivaroxaban attenuates leukocyte adhesion in the microvasculature and thrombus formation in an experimental mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res.* 2014 Feb;133(2):276-80.

15. Amini S, Gholami K, Bakhshandeh H, Fariborz Farsad B. Effect of Oral Anticoagulant Therapy on Coagulation Activity and Inflammatory Markers in Patients with Atrial Fibrillation Undergoing Ablation: A Randomized Comparison between Dabigatran and Warfarin. *Iran J Pharm Res.* 2013 Fall;12(4):945-53.
16. Chan MY, Lin M, Lucas J, et al. Plasma proteomics of patients with non-valvular atrial fibrillation on chronic anti-coagulation with warfarin or a direct Factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost* 2012; 108: 1180-1191.
17. Conway EM, Van de WM, Pollefeyt S, et al. The lectin like domain of thrombo- modulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 2002; 196: 565-577.
18. Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, et al. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 797-802.
19. Kim AY, Walinsky PL, Kolodgie FD, et al. Early loss of thrombomodulin expression impairs vein graft thromboresistance: implications for vein graft failure. *Circ Res* 2002; 90: 205-212.
20. Inzitari D, Giusti B, Nencini P, Gori AM, Nesi M, Palumbo V, Piccardi B, Armillis A, Pracucci G, Bono G, Bovi P, Consoli D, Guidotti M, Nucera A, Massaro F, Micieli G, Orlandi G, Perini F, Tassi R, Tola MR, Sessa M, Toni D, Abbate R; MAGIC Study Group. MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. *Stroke.* 2013 Oct;44(10):2901-3.
21. Kono S, Deguchi K, Omote Y, Yunoki T, Yamashita T, Kurata T, Ikeda Y, Abe K. Reducing hemorrhagic complication by dabigatran via neurovascular protection after recanalization with tissue plasminogen activator in ischemic stroke of rat. *J Neurosci Res.* 2014 Jan;92(1):46-53.

22. Kono S, Yamashita T, Deguchi K, Omote Y, Yunoki T, Sato K, Kurata T, Hishikawa N, Abe K. Rivaroxaban and apixaban reduce hemorrhagic transformation after thrombolysis by protection of neurovascular unit in rat. *Stroke*. 2014 Aug;45(8):2404-10.
23. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum*. 2011 May;63(5):1416-25.
24. DeFeo K, Hayes C, Chernick M, Ryn JV, Gilmour SK. Use of dabigatran etexilate to reduce breast cancer progression. *Cancer Biol Ther*. 2010 Nov 15;10(10):1001-8.

Piastrine e Leucociti come Cellule della “Low Grade Inflammation”

Chiara Cerletti, Marialaura Bonaccio, Augusto Di Castelnuovo, Licia Iacoviello e Giovanni de Gaetano

Dipartimento di Epidemiologia e Prevenzione, IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo NEUROMED, Pozzilli, Isernia

La variabilità interindividuale degli indici piastrinici (conta e volume piastrinico medio) e della loro funzione è nota da tempo, in rapporto a condizioni cliniche, come la trombocitopenia e la trombocitosi e a varianti che danno luogo a fenotipi emorragici, come la trombostenia di Glanzmann e la malattia di von Willebrand. Questa variabilità di risposta piastrinica è in larga parte determinata geneticamente.

Più recentemente, l'osservazione di variazioni individuali nella funzione piastrinica e soprattutto nella risposta agli antiaggreganti piastrinici ha allargato lo spettro di osservazione e confermato la rilevanza clinica della variabilità piastrinica in rapporto al rischio trombotico e cardiovascolare e, forse, anche ad altre malattie croniche multifattoriali.

Nell'ambito degli intervalli di “normalità”, ai quali sinora è stata rivolta poca attenzione e attribuita scarsa importanza clinica, variazioni della conta piastrinica e dei globuli bianchi sono state recentemente riconosciute come possibili marcatori di rischio cardio- e cerebro-vascolare. Mentre il numero dei globuli bianchi, in particolare dei neutrofili, è noto da tempo come un fattore associato alle malattie ischemiche vascolari, solo ultimamente sono apparsi lavori che riportano un'associazione tra la conta piastrinica e la morte vascolare e non vascolare, inclusi i tumori.

Nell'ampia coorte di circa 25.000 persone appartenenti alla popolazione generale dello studio Moli-sani (dai 35 anni in su) gli indici piastrinici sono stati studiati in rapporto a numerose variabili biochimiche, ambientali e cliniche: oltre a variabili come età e sesso (la conta piastrinica diminuisce all'aumentare dell'età, ed è costantemente superiore nelle donne rispetto agli uomini, negli stessi intervalli di età), la conta piastrinica è risultata significativamente associata in modo diretto alla conta dei globuli bianchi, alla proteina C

reattiva e al D-dimero, suggerendo una relazione tra conta piastrinica e infiammazione.

Low-grade inflammation

La “low-grade inflammation” o infiammazione subclinica è una condizione (sistemica o locale, spesso cronica) caratterizzata da aumentati livelli di marcatori di infiammazione plasmatici e/o cellulari senza nessun segno clinico evidente.

Questo stato infiammatorio non è ancora stato definito in modo uniforme e viene rilevato generalmente analizzando il livello di alcuni marcatori plasmatici e/o cellulari. La proteina C reattiva è stata sinora il marker di infiammazione subclinica più studiato e i suoi livelli sono risultati predittivi di rischio cardiovascolare; tuttavia vari altri marcatori infiammatori, come i livelli di interleuchine, di fibrinogeno e di molecole adesive circolanti (E-selettina, ICAM-1 e VCAM-1) sono stati associati con l’infiammazione “low-grade” e con il rischio di diabete di tipo 2, di malattia cardiovascolare e di tumori. Più recentemente anche il numero di piastrine e di globuli bianchi nel sangue, o il rapporto tra neutrofili e linfociti sono stati considerati indici di infiammazione silente e predittivi di malattie croniche.

Marcatori di “low-grade inflammation” e alimentazione

Studi epidemiologici sulle abitudini alimentari dimostrano che esiste un’associazione tra tipo di alimentazione e marcatori di infiammazione: una dieta di tipo occidentale, ricca in carne rossa, è associata ad alti livelli dei più importanti marcatori di infiammazione (proteina C reattiva, interleuchina-1 e fibrinogeno), mentre la dieta mediterranea, caratterizzata da un consumo di vegetali, cereali, legumi, olio di oliva e vino in moderazione, è associata a livelli inferiori di questi marcatori e, soprattutto, a un numero inferiore di eventi cardiovascolari. Le osservazioni a questo proposito sui marcatori cellulari, soprattutto sulla conta piastrinica, e i loro determinanti, sono tuttavia ancora scarsi.

Partendo dall’osservazione dello studio Moli-sani che il numero di piastrine è associato alla conta dei globuli bianchi e dal ruolo che le piastrine possono giocare nell’infiammazione, si è studiato in questa popolazione il rapporto tra il grado di adesione alla dieta mediterranea

e la conta di piastrine e globuli bianchi, basandosi sull'ipotesi che una dieta ricca di cibi salutari e di sostanze antiossidanti potrebbe influenzare i livelli di questi due marcatori cellulari della infiammazione "low-grade".

Una migliore adesione alla dieta mediterranea è risultata essere associata in modo significativo ad un ridotto numero sia di piastrine che di globuli bianchi: i soggetti che aderiscono maggiormente a questo stile alimentare hanno una probabilità (odds ratio) inferiore di trovarsi nel gruppo con conte piastriniche più alte rispetto ai soggetti che aderiscono meno; analogamente, un'adesione massimale alla dieta mediterranea è associata ad una maggior probabilità di avere i globuli bianchi relativamente bassi. L'associazione tra dieta mediterranea e livelli di queste due cellule infiammatorie sono spiegati in parte dall'alto contenuto di antiossidanti e di fibre, tipico di una alimentazione di tipo mediterraneo, e sostengono ulteriormente l'ipotesi che una dieta ricca di cibi salutari ad alto potere antiossidante possa favorevolmente influenzare lo stato di infiammazione "low-grade".

Il potenziale effetto favorevole degli antiossidanti contenuti nell'alimentazione è in stretta relazione con un meccanismo intermedio di malattia, quale lo stress ossidativo. A questo proposito, un modello sperimentale, utile alla descrizione e comprensione di meccanismi, è rappresentato da un pasto grasso, usato come un "challenge" di stress ossidativo. E' stato descritto in volontari apparentemente sani un rapido aumento post-prandiale di globuli bianchi, in particolare granulociti, e di piastrine, una diminuzione del volume piastrinico medio e un aumento dello stato di attivazione e di degranulazione con rilascio dell'enzima mieloperossidasi da parte dei granulociti. Le variazioni cellulari post-prandiali, reversibili e oscillanti nell'ambito di valori normali, come quelli riportati nella popolazione Moli-sani, possono essere prevenute dall'ingestione contemporanea di succo d'arancia, ricco in polifenoli e antocianine in particolare, durante il pasto grasso stesso.

Lo stato post-prandiale, un fenomeno fisiologico che può ripetersi più volte al giorno, se non inserito nel contesto di una sana alimentazione, potrebbe portare ad una serie di eventi complessi, che legano lo stress

ossidativo alla “low-grade inflammation”, con possibili conseguenze cliniche di tipo aterotrombotico.

Parametri facilmente accessibili e misurabili, come il conteggio delle cellule ematiche, rappresentano dei marcatori della “low-grade inflammation”, utili alla comprensione di meccanismi patogenetici e alla loro modulazione preventiva tramite modificazioni dello stile di vita e dell'alimentazione.

Bibliografia:

1. Santimone I, Di Castelnuovo A, De Curtis A, Spinelli M, Cugino D, Gianfagna F, Zito F, Donati MB, Cerletti C, de Gaetano G, Iacoviello L; MOLI-SANI Project Investigators. White blood cell count, sex and age are major determinants of heterogeneity of platelet indices in an adult general population: results from the MOLI-SANI project. *Haematologica*. 2011;96:1180-8.
2. de Gaetano G, Santimone I, Gianfagna F, Iacoviello L, Cerletti C. Variability of platelet indices and function: acquired and genetic factors. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;;395-434.
3. Biino G, Santimone I, Minelli C, Sorice R, Frongia B, Traglia, Ulivi S, Di Castelnuovo A, Gögele M, Nutile T, Francavilla M, Sala C, Pirastu N, Cerletti C, Iacoviello L, Gasparini P, Toniolo D, Ciullo M, Pramstaller P, Pirastu M, de Gaetano G, Balduino CL. Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data. *PLoS One*. 2013;8:e54289.
4. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ*. 2000;321:199-204.
5. de Gaetano G, Evangelista V, Cerletti C. Should cardiologists forget about platelets and take an interest in blood leukocytes? *Ital Heart J*. 2000;1:453-6.
6. Coller BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:658-70.

7. Tamburrelli C, Gianfagna F, D'Imperio M, De Curtis A, Rotilio D, Iacoviello L, de Gaetano G, Donati MB, Cerletti C. Postprandial cell inflammatory response to a standardised fatty meal in subjects at different degree of cardiovascular risk. *Thromb Haemost.* 2012;107:530-7.
8. Cerletti C, Tamburrelli C, Gianfagna F, D'Imperio M, De Curtis A, Lorenzet R, Rotilio D, Iacoviello L, de Gaetano G, Donati MB. Blood cell response to a fatty meal in healthy subjects at different degree of cardiovascular risk: effect of orange juice intake. *J Thromb Haemost* 2013; 11, Supplement 2, Pages 1–1322, Abstract PB 3.66-4.
8. Bonaccio M, Di Castelnuovo A, De Curtis A, Costanzo S, Persichillo M, Donati MB, Cerletti C, Iacoviello L, de Gaetano G; Moli-sani Project Investigators. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower platelet and leukocyte counts: results from the Moli-sani study. *Blood.* 2014;123:3037-44.

Il sequenziamento di seconda e terza generazione: nuove frontiere in diagnostica

Betti Giusti, Elena Sticchi, Rosina De Cario, Alberto Magi, Lorenzo Tattini, Andrea Volta, Serena Rossinelli

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze -SOD Malattie Aterotrombotiche, Dipartimento del Cuore e dei Vasi, AOU Careggi, Firenze

La scoperta della struttura del DNA è stata una delle più importanti scoperte scientifiche del ventesimo secolo. A metà del '900 lo studio di Erwin Chargaff, insieme agli studi condotti da Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, permetteranno a James Watson e Francis Crick di formulare il modello a doppia elica del DNA pubblicato sulla rivista scientifica Nature il 25 Aprile 1953. Da questo momento, i ricercatori iniziarono a elaborare progetti ed esperimenti che consentissero la determinazione della sequenza del DNA che contribuirono allo sviluppo e messa a punto della tecnologia di sequenziamento di Allan Maxam e Walter Gilbert (1973), basata su modificazioni chimiche del DNA e sul conseguente taglio in posizioni specifiche, e successivamente quella di Frederick Sanger, basata sull'introduzione di terminatori di catena (1975). Quest'ultimo metodo, che è passato dall'uso di dideossinucleotidi trifosfati (ddNTPs) marcati con fosforo radioattivo a quello di ddNTPs marcati con molecole fluorescenti, è tutt'oggi il metodo *gold standard* per la determinazione della sequenza del DNA e quello alla base di tutti i sequenziatori automatici tradizionali usati nei tanti laboratori di ricerca e diagnostica genetico-molecolare.

Negli anni '90 e nei primi dieci anni del 2000, parte della comunità scientifica si è dedicata all'identificazione di metodiche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) caratterizzate da una più elevata produttività e da costi più contenuti rispetto al sequenziamento Sanger di prima generazione. Sono state quindi sviluppate tutta una serie di tecnologie NGS basate su principi molto diversi tra loro, ma accomunate dalla necessità di amplificare ancora il materiale genetico di partenza mediante metodica PCR e dalla possibilità di sequenziare ampi tratti del genoma o interi genomi con tempi (giorni o poche settimane) e costi ridotti rispetto al sequenziamento tradizionale di

prima generazione (Wang Z e coll. Front Genet 2013; Johnsen JM e coll. Blood 2013; Koboldt DC e coll. Cell 2013; Nguyen L, Burnett L Clin Biochem Rev 2014; Lapunzina P e coll. Genet Mol Biol 2014; Mori A e coll. Blood Res 2013; Zhou X, Rokas A Mol Ecol 2014; Johansen Taber KA e coll. JAMA Intern Med 2014; Rabbani B e coll. Hum Genet 2014).

Le principali tecnologie NGS commercialmente disponibili sono:

- 454 Roche - basata sulla metodica della PCR in emulsione e del pirosequenziamento, una tecnica di rilevazione della chemiluminescenza derivante dal rilascio del pirofosfato a seguito dell' incorporazione di deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) ad opera di una DNA-polimerasi (sequenziamento contemporaneo e parallelo di frammenti di oltre 400 basi);
- Solexa/Illumina – basata sulla frammentazione del DNA per nebulizzazione e sequenziamento mediante aggiunta di deossiribonucleotidi marcati con molecole fluorescenti del DNA attaccato su un supporto solido grazie a raggi UV e oligonucleotidi adattatori (sequenziamento contemporaneo e parallelo di frammenti <100 basi);
- Supported Oligonucleotide Ligation and Detection (SOLiD) Life Technologies – basata su sequenziamento di “short reads” di DNA o frammenti di DNA legati a oligonucleotidi adattatori, immobilizzati su biglie e amplificati clonalmente mediante PCR in emulsione. Le biglie con i prodotti di amplificazione clonale vengono fissate sulla superficie di vetro dotata di una cella a flusso, sulla quale ha luogo la reazione di sequenziamento mediante reazioni di ligazione (sequenziamento contemporaneo e parallelo di frammenti circa 35 basi);
- Ion Torrent Life Technologies – basata sulla tecnologia dei semiconduttori in grado di monitorizzare le variazioni del pH ambientale dovuto al formarsi di ioni quando un singolo nucleotide è incorporato dall'enzima DNA polimerasi nella catena nascente di DNA a doppia elica e viene rilasciato uno ione idrogeno come sottoprodotto (sequenziamento contemporaneo e parallelo di frammenti <100 basi).

Negli ultimi anni sono state presentate ulteriori piattaforme per il sequenziamento del DNA, dette di terza/quarta generazione; queste permettono un sequenziamento molto rapido senza richiedere amplificazione tramite reazione PCR del campione. Tra le più promettenti la tecnologia Smrt della Pacific Bioscience e le due piattaforme Nanopore (GridION e MinION) della Oxford Nanopore Technologies. Si stima che queste tecnologie una volta commercializzate porteranno nel prossimo futuro il sequenziamento dell'intero genoma umano dagli attuali 2.000/15.000 Euro a cifre intorno ai 100 Euro, costi nemmeno lontanamente confrontabili ai 3 miliardi di dollari spesi una quindicina di anni fa per il completamento del Progetto Genoma Umano.

In particolare, il sequenziamento del DNA attraverso nanopori offre grandi vantaggi potenziali rispetto ad altre metodiche. Il concetto di base è semplice: il DNA viene fatto passare attraverso un nanoporo, inserito all'interno di una membrana lipidica con una differenza di potenziale ai due lati, e ogni base viene letta nel punto più stretto del poro sfruttando la corrente ionica che passa al suo interno per determinare l'identità della base. Sulla *flow-cell* che viene alloggiata in un semplice supporto della grandezza di una chiavetta USB vi sono più di 500 nanopori che lavorando contemporaneamente consentono il sequenziamento di lunghi filamenti di DNA (circa 15.000 bp). Questo anno, Oxford Nanopore ha aperto un programma di sperimentazione specifico per il dispositivo MinION, "MinION Access Program" (MAP), a cui si accede rispondendo ad un bando di chiamata per la selezione di esperti nel settore con validi progetti di applicazione della tecnologia. Ai partecipanti selezionati per tale programma è richiesto di testare lo strumento sia con DNA di fago Lambda fornito dalla ditta come esperimento di controllo, sia con campioni di DNA umano del proprio progetto. L'attività dei ricercatori coinvolti è fondamentale al fine di testare le caratteristiche della tecnologia e di analizzare la qualità e la lunghezza delle reads ottenute su campioni reali e di valutare l'effettivo funzionamento del dispositivo nei laboratori di ricerca e diagnosi genetica. Il nostro gruppo è stato selezionato grazie ad un progetto che ha come scopo quello di confrontare i risultati del sequenziamento di seconda generazione di un pannello di 94 geni (454 Roche) e terza generazione dell'intero genoma (Nanopore) di 100 soggetti affetti da Sindrome di Marfan precedentemente caratterizzati

cl clinicamente e geneticamente con sequenziamento tradizionale Sanger del gene *FBNI* codificante la fibrillina-1 (50 soggetti con e 50 soggetti senza mutazione patogenetica nel gene *FBNI* identificata) (Pepe G e coll. J Mol Cell Cardiol 1997; Pepe G e coll. Clin Genet 2001; Giusti B e coll. Eur Heart J 2003; Attanasio M e coll. Clin Genet 2008; Pepe G e coll. BMC Med Genet 2014). D'altra parte, già il sequenziamento di seconda generazione nella diagnostica genetica della sindrome di Marfan e malattie correlate ha mostrato di essere una strategia più efficace rispetto all'approccio tradizionale (Baetens M e coll. Hum Mutat 2011; Wooderchak-Donahue WL e coll. BMC Med Genomics 2012).

Le tecnologie di sequenziamento ad elevata produttività, oltre al sequenziamento di porzioni o interi genomi, forniscono opportunità senza precedenti per la ricerca scientifica e la diagnostica; ad oggi, infatti, esse sono state applicate in una grande varietà di contesti: metagenomica, sequenziamento e valutazione dell'espressione del trascrittoma, epigenetica, mappatura delle proteine leganti il DNA.

Una delle criticità che sono state affrontate in questi anni di enorme diffusione delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione o ad elevata produttività è quella relativa allo sviluppo di metodiche computazionali adatte ad estrarre l'informazione più accurata sulla base anche del tipo di piattaforma utilizzata o delle varianti genetiche da identificare (Abel HJ e Duncavage EJ Cancer Genet 2013; Del Chierico F e coll. Methods Mol Biol 2015; Magi A e coll. Genes (Basel) 2010; Magi A e coll. Genome Biol 2013; Magi A e coll. Bioinformatics 2014; Pippucci T e coll. Hum Hered 2014). La figura del bioinformatico è diventata quindi centrale nella gestione dei dati ottenuti dalle piattaforme di sequenziamento NGS sia a fini di ricerca che diagnostici (Lindblom A, Robinson PN Hum Mutat 2011).

Ormai molti sono i laboratori che utilizzano tecnologie di sequenziamento ad alta produttività per supportare la diagnostica genetica di numerose patologie. In questo senso, lo sviluppo di linee guida per la gestione del test, la validazione e la consulenza genetica dei dati ottenuti con tali strategie sta animando il mondo scientifico e si stanno costituendo e/o consolidando organismi, quali EuroGentest, un ente di coordinamento sovvenzionato dalla comunità europea, con lo scopo di armonizzare l'utilizzo dei test genetici NGS in Europa (Schmidtke J e coll. Eur J Hum Genet 2010; Dierking A e coll. Eur J

Hum Genet 2013; Weiss MM e coll. Hum Mutat 2013; Rehm HL Nat Rev Genet 2013; Rigter T e coll. Hum Mutat 2013; Dierking A, Schmidtke J Eur J Hum Genet 2014; Salto-Tellez M, Gonzalez de Castro D J Pathol 2014).

Bibliografia:

1. Abel HJ, Duncavage EJ. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. *Cancer Genet* 2013;206(12):432-40.
2. Attanasio M, Lapini I, Evangelisti L, et al. FBN1 mutation screening of patients with Marfan syndrome and related disorders: detection of 46 novel FBN1 mutations. *Clin Genet* 2008;74(1):39-46.
3. Baetens M, Van Laer L, De Leeneer K, et al. Applying massive parallel sequencing to molecular diagnosis of Marfan and Loeys-Dietz syndromes. *Hum Mutat* 2011;32(9):1053-62.
4. Del Chierico F, Ancora M, Marcacci M, et al. Choice of next-generation sequencing pipelines. *Methods Mol Biol* 2015;1231:31-47.
5. Dierking A, Schmidtke J, Matthijs G, Cassiman JJ. The EuroGentest Clinical Utility Gene Cards continued. *Eur J Hum Genet* 2013;21:1.
6. Dierking A, Schmidtke J. The future of Clinical Utility Gene Cards in the context of next-generation sequencing diagnostic panels. *Eur J Hum Genet* 2014;22(11):1247.
7. Giusti B, Porciani MC, Brunelli T, et al. Phenotypic variability of cardiovascular manifestations in Marfan Syndrome. Possible role of hyperhomocysteinemia and C677T MTHFR gene polymorphism. *Eur Heart J* 2003;24(22):2038-45.
8. Johansen Taber KA, Dickinson BD, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Intern Med.* 2014;174(2):275-80.
9. Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. *Blood* 2013;122(19):3268-75.

10. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013;155(1):27-38.
11. Lapunzina P, López RO, Rodríguez-Laguna L, et al. Impact of NGS in the medical sciences: Genetic syndromes with an increased risk of developing cancer as an example of the use of new technologies. *Genet Mol Biol* 2014 Mar;37(1 Suppl):241-9.
12. Lindblom A, Robinson PN. Bioinformatics for human genetics: promises and challenges. *Hum Mutat* 2011;32(5):495-500.
13. Magi A, Benelli M, Gozzini A, et al. Bioinformatics for next generation sequencing data. *Genes (Basel)* 2010;1(2):294-307.
14. Magi A, Tattini L, Cifola I, et al. EXCAVATOR: detecting copy number variants from whole-exome sequencing data. *Genome Biol* 2013;14(10):R120.
15. Magi A, Tattini L, Palombo F, et al. H3M2: detection of runs of homozygosity from whole-exome sequencing data. *Bioinformatics* 2014;30(20):285-9.
16. Mori A, Deola S, Xumerle L, et al. Next generation sequencing: new tools in immunology and hematology. *Blood Res* 2013;48(4):242-9.
17. Nguyen L, Burnett L. Automation of molecular-based analyses: a primer on massively parallel sequencing. *Clin Biochem Rev* 2014;35(3):169-76.
18. Pepe G, Giusti B, Attanasio M, et al. A major involvement of the cardiovascular system in patients affected by Marfan syndrome: novel mutations in fibrillin 1 gene. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(7):1877-84.
19. Pepe G, Giusti B, Evangelisti L, et al. Fibrillin-1 (FBN1) gene frameshift mutations in Marfan patients: genotype-phenotype correlation. *Clin Genet* 2001;59(6):444-50.
20. Pepe G, Nistri S, Giusti B, et al. Identification of fibrillin 1 gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Med Genet* 2014 Feb 24;15:23.

21. Pippucci T, Magi A, Gialluisi A, Romeo G. Detection of runs of homozygosity from whole exome sequencing data: state of the art and perspectives for clinical, population and epidemiological studies. *Hum Hered* 2014;77(1-4):63-72.
22. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 2014;59(1):5-15.
23. Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet* 2013;14:295-300.
24. Rigger T, Henneman L, Kristoffersson U, et al. Reflecting on earlier experiences with unsolicited findings: points to consider for next-generation sequencing and informed consent in diagnostics. *Hum Mutat* 2013;34(10):1322-8.
25. Salto-Tellez M, Gonzalez de Castro D. Next-generation sequencing: a change of paradigm in molecular diagnostic validation. *J Pathol* 2014;234(1):5-10.
26. Schmidtke J, Cassiman JJ. The EuroGentest clinical utility gene cards. *Eur J Hum Genet* 2010;18:1068.
27. Wang Z, Liu X, Yang BZ, Gelernter J. The role and challenges of exome sequencing in studies of human diseases. *Front Genet* 2013;4:160.
28. Weiss MM, Van der Zwaag B, Jongbloed JD et al. Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: a National Collaborative Study of Dutch Genome Diagnostic Laboratories. *Hum Mutat* 2013;34:1313-1321.
29. Wooderchak-Donahue WL, O'Fallon B, Furtado LV, et al. A direct comparison of next generation sequencing enrichment methods using an aortopathy gene panel- clinical diagnostics perspective. *BMC Med Genomics* 2012;5:50.
30. Zhou X, Rokas A. Prevention, diagnosis and treatment of high-throughput sequencing data pathologies. *Mol Ecol* 2014;23(7):1679-700.

Lipoproteina(a): update 2014, tra genetica e nuove possibilità terapeutiche

Rossella Marcucci, Elisa Grifoni

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze

La Lp(a) è stata identificata per la prima volta nel 1963 da Berg come variante delle LDL. Al pari delle LDL, è costituita da un core di colesterolo e fosfolipidi e da una componente proteica, l' apo B100 che è però legata con un legame disolfuro ad una molecola di apolipoproteina (a), che le conferisce caratteristiche del tutto peculiari. L'apolipoproteina (a) presenta, infatti, un'omologia strutturale con il plasminogeno. Il plasminogeno è una proteina a singola catena aminoacidica costituita da un frammento ad attività proteasica e da 5 frammenti detti "kringle": sono gruppi di circa 100 aminoacidi in cui sono presenti almeno sei residui di cisteina che costituiscono legami disolfuro intracatena che danno il caratteristico aspetto a ciambella, kringle appunto. Il plasminogeno viene attivato da una serie di molecole (t-PA, streptokinasi, urokinasi) che agiscono a livello di un sito di clivaggio che contiene un'arginina, liberando così la plasmina, il frammento ad attività proteasica. L'apolipoproteina (a) non contiene i primi tre kringle, contiene il kringle V ed il frammento ad attività proteasica ed un numero variabile di frammenti tipo ripetuti analoghi al kringle IV. L'apo(a) non ha attività proteasica, perché a livello del sito di clivaggio l'arginina è sostituita da una serina.

Esistono 10 classi diverse di kringle IV che differiscono tra loro per la sequenza aminoacidica e sono numerate in ordine progressivo da 1 a 10. Ogni classe è presente in copia singola, ad eccezione della classe 2 che è presente in copie multiple variabili (da 3 a 30): questo è la causa della variabilità delle isoforme dell'apo(a), che hanno un peso variabile da 300 a più di 800 KD. Ogni isoforma è codificata da un allele in un singolo locus. Esiste, peraltro, una forte correlazione inversa tra peso molecolare delle isoforme e livelli circolanti di Lp(a): i soggetti omozigoti per le isoforme a peso molecolare minore hanno livelli di Lp(a) 10 volte superiori ai soggetti omozigoti per le isoforme a peso molecolare maggiore.

Studi di popolazione hanno evidenziato una distribuzione continua, ma estremamente disomogenea dei livelli di Lp(a), con una distribuzione uniforme e pressoché gaussiana nelle popolazioni nere, disomogenea nelle popolazioni europee e compressa nei valori più bassi nelle popolazioni orientali. Tale variabilità è il risultato della diversa frequenza degli alleli e dell'effetto degli stessi sui livelli di Lp(a). Nelle popolazioni orientali, l'allele che codifica per l'isoforma a p.m. maggiore è molto più frequente che non nelle popolazioni nere. D'altra parte, il locus per l'apo(a), con il suo complesso sistema di alleli multipli, non è il solo determinante dei livelli di Lp(a). Esisterebbero altri fattori genetici in grado di influenzare i livelli di Lp(a). Per esempio, è stato dimostrato che pazienti con ipercolesterolemia familiare, con un recettore LDL alterato funzionalmente e strutturalmente, hanno livelli di Lp(a) 2-3 volte superiori a soggetti normocolesterolemici.

I fattori genetici, tuttavia, non sono i soli responsabili dei livelli circolanti di Lp(a). Ad essi viene attribuito circa il 70-75% della variabilità della Lp(a). E' stato anche dimostrata la possibilità di modificazioni dei livelli circolanti in rapporto a condizioni ambientali, ad esempio la presenza di uno stato infiammatorio. E' stato dimostrato, in vitro, la possibilità che citochine (IL-6, TGF beta e TNF) possano modulare in senso positivo o negativo l'espressione di mRNA per la Lp(a). Esistono anche numerose segnalazioni, in vivo, di una variazione dei livelli di Lp(a) in rapporto alla presenza di stati infiammatori: nell'artrite reumatoide, nella fase attiva della malattia di Behcet.

In virtù della capacità della Lp(a) di legarsi alla fibrina, è stato ipotizzato che essa possa giocare un ruolo nei processi di guarigione delle ferite a livello dei vasi sanguigni. Laddove si forma un primo tappo di fibrina, ma dove la guarigione definitiva è legata alla crescita di nuove cellule che hanno bisogno di colesterolo per le loro membrane, la lipoproteina (a) servirebbe a portare il colesterolo dove è necessario.

Per quanto riguarda il metabolismo della Lp(a), la sua sintesi avviene sicuramente a livello epatico: sicuramente, per la presenza di grandi quantità di mRNA a livello epatico e perché dopo trapianto di fegato si assiste ad un completo cambiamento delle isoforme della apo(a) che

divengono uguali a quelle del donatore. Non altrettanto chiaro è il destino catabolico di questa molecola: le LDL vengono rimosse dal circolo per il legame con il recettore delle LDL. Anche la Lp(a), per la presenza dell'apoB100, è in grado di legarsi al recettore delle LDL, ma la presenza dell'apo(a) determina un ingombro sterico che rende il legame poco stabile, per cui non sembra questa essere la via principale di catabolismo della Lp(a). E' stato proposto che venga eliminata a livello renale: è infatti chiaro come aumentino i suoi livelli circolanti in rapporto ad una progressiva riduzione di funzionalità renale. I risultati del Framingham, su più di 1000 uomini e 1000 donne, non evidenziano alcuna differenza significativa tra i due sessi. Come potete vedere, i livelli di Lp(a) aumentano lievemente con l'età, ma non è mai dimostrabile una differenza significativa. Solo confrontando il gruppo di donne prima e dopo la menopausa, è possibile dimostrare una differenza statisticamente significativa con livelli più elevati dopo la menopausa.

In virtù della presenza dell'apoB100 e del colesterolo e dell'apo(a) è stato prospettato un ruolo della Lp(a) nei processi di aterogenesi e di trombogenesi. La forte omologia dell'apo(a) con il plasminogeno, componente critico del sistema di generazione della plasmina a livello delle cellule endoteliali, suggerisce che la presenza di Lp(a) potrebbe indurre una ridotta generazione di plasmina. E' stata quindi esplorata la possibilità che la Lp(a) competa con il plasminogeno a livello dei siti di legame sulla superficie endoteliale. Effettivamente, come potete vedere, è stato dimostrato che la Lp(a) compete con il plasminogeno e riduce la generazione di plasmina. Tale inibizione non si verifica in fase fluida, in assenza di cellule endoteliali: questo non ci stupisce, come è noto, infatti, le reazioni coagulative e fibrinolitiche avvengono principalmente in fase solida e l'endotelio è l'elemento cellulare chiave che offre le superfici ottimali per queste reazioni. A concentrazioni di Lp(a) superiori a 250 mg/L circa il 20% dei siti di legame del plasminogeno è occupato dalla Lp(a). Che sia l'apo(a) la responsabile di tale azione è dimostrato dal fatto che la componente apo(a), in assenza delle LDL, mostra un diretto legame con le cellule endoteliali, un legame dose-dipendente che sottolinea come l'apo(a) interagisca con le cellule endoteliali con una affinità ed efficienza paragonabili a quelle del plasminogeno.

La modulazione, in senso negativo, del sistema fibrinolitico, da parte della Lp(a) si realizza anche attraverso altre vie. L'esposizione di cellule endoteliali per 24 ore a Lp(a) induce un importante aumento di espressione di PAI-antigene, con un consensuale aumento di PAI-attività. Questo effetto non si osserva quando le cellule sono poste a contatto con LDL o plasminogeno. Questo effetto è mediato da un significativo aumento dei livelli di mRNA per il PAI-1, effetto che appare specifico per il tipo cellulare, dal momento che si verifica solo a livello delle cellule endoteliali e non, ad esempio, a livello dei fibroblasti.

Per quanto riguarda gli effetti aterogeni della Lp(a), gli studi si sono rivolti a valutare l'azione dell'apoB100 e delle LDL. Tuttavia, come già detto, il legame della Lp(a) con il recettore delle LDL è debole. Infatti i farmaci ipocolesterolemizzanti che aumentano il numero dei recettori delle LDL non diminuiscono i livelli di Lp(a). La Lp(a) si è, d'altra parte, dimostrata capace di attraversare l'endotelio dei vasi arteriosi per raggiungere l'intima dove si può complessare con componenti della matrice quali proteoglicani, glicosaminoglicani e collagene così come con la fibrina contribuendo alla formazione della placca. In presenza di monociti macrofagi, questi complessi inducono esterificazioni del colesterolo con accumulo intracellulare e formazione di foam-cells. Al potenziale aterogeno contribuisce anche l'aumento dei livelli dell'inibitore della fibrinolisi PAI-1. Più recentemente, l'attenzione si è spostata sul ruolo delle cellule muscolari lisce. La plasmina è capace di attivare il TGF beta ed il TGF beta attivato è un inibitore della migrazione delle cellule muscolari lisce. La Lp(a), riducendo la generazione di plasmina e quindi l'attivazione del TGF beta, indirettamente promuove la migrazione delle cellule muscolari lisce, fase proliferativa precoce della formazione della lesione aterosclerotica.

Nell'ambito della cardiopatia ischemica è stato dimostrato in 500 soggetti con infarto miocardico in giovane età la presenza di elevati livelli di Lp(a). Ancora, i livelli di Lp(a) possono essere utili nella identificazione, nell'ambito della ipercolesterolemia familiare, di quei pazienti a più alto rischio di eventi coronarici. Per quanto riguarda un aspetto più particolare, ma di grande impatto clinico, come la restenosi dopo angioplastica coronarica, dopo una serie di risultati contrastanti

comparsi in letteratura, il Flare Trial, studio di intervento in cui si è testato l'effetto della fluvastatina (40 mg/die) nella riduzione di restenosi, non ha, come potete vedere, dimostrato alcuna relazione tra i livelli circolanti di Lp(a) e la restenosi in più di 800 pazienti. Dati del nostro gruppo, pur su un numero più limitato di pazienti, sembrano ancora riservare un ruolo alla Lp(a) nella restenosi, in particolare in presenza di un altro fattore di rischio trombotico quale gli anticorpi anticardiolipina. Questo sottolinea l'importanza dell'interazione tra fattori di rischio che, di per sé, hanno un peso modesto ma che, insieme, potenziano i loro effetti protrombotici, e vedremo come anche in numerosi studi successivi verrà dimostrata più volte l'interazione tra Lp(a) ed altri fattori di rischio. Nell'ambito delle manifestazioni cerebrovascolari, uno studio italiano condotto su oltre 400 pazienti di età avanzata (dai 65 agli 84 aa), ha dimostrato che elevati livelli di Lp(a) interagiscono con il fumo nell'aumentare in modo significativo il rischio di stroke. Non soltanto nei pazienti di età avanzata, ma anche in giovane età è stato dimostrato un ruolo di elevati livelli di Lp(a) che, da soli, aumentano il rischio di circa 7 volte, ed insieme al fattore V Leiden di più di 20 volte. Sempre nell'ambito cerebrovascolare, il Bruneck Study ha valutato l'associazione tra Lp(a) e la progressione a 5 aa dell'aterosclerosi carotidea in una popolazione di 826 soggetti. Livelli elevati di Lp(a) sono risultati predittivi di aterogenesi precoce in modo dose-dipendente, ed in particolare è stato evidenziato un ruolo significativo nei soggetti con valori di LDL elevati. Più recentemente, sono comparsi in letteratura dati anche sulla associazione tra Lp(a) e tromboembolismo venoso: la plausibilità biologica per questa associazione, sulla base di quello che abbiamo detto, è presente. Dati del nostro gruppo, condotti su 603 pazienti hanno confermato che livelli elevati di Lp(a) sono un fattore di rischio indipendente di malattia tromboembolica venosa: ne è stato dimostrato il ruolo indipendente nella trombosi venosa idiopatica e, per la prima volta, nella recidiva di trombosi venosa profonda insieme all'iperomocisteinemia e, come noto, alla doppia eterozigosi fattore V Leiden-polimorfismo della protrombina.

Nel 2000 sono usciti i risultati di una metanalisi degli studi prospettici su Lp(a) e cardiopatia sichefica che, come vedete, su un totale di

4044 pazienti evidenziano un aumento di circa 2 volte del rischio di sviluppare cardiopatia ischemica. Nel 2001 i risultati dello studio PROCAM su circa 800 uomini seguiti per 10 aa hanno confermato un aumento significativo del rischio di eventi coronarici associato a livelli di Lp(a) superiori a 200 mg/dl. Infine quest'anno, lo studio PRIME, su 9133 uomini seguiti per 5 aa, ha dimostrato che livelli elevati di Lp(a) sono un fattore di rischio di infarto miocardico, morte coronarica ed angina, in particolare in presenza di livelli elevati di LDL.

Tutti gli studi presenti in letteratura individuano, in realtà, un cut-off al di sopra del quale è presente un aumento del rischio e al di sotto del quale questo rischio è assente. Tale cut-off è nella maggioranza dei casi posto a 30 mg/dl, ma in alcuni casi anche a 20 mg/dl. Questo discorso ci permette di considerare il problema della quantificazione dei livelli di Lp(a) e del dosaggio. Esistono delle variabili pre-analitiche: è importante ricordare come la conservazione dei campioni congelati per 25 mesi è associata ad una riduzione significativa dei livelli circolanti proporzionale al peso molecolare delle isoforme. Per quanto riguarda i metodi, ne abbiamo a disposizione numerosi ed uno di quelli più usati è il metodo ELISA: ricordiamo che è stato validato come il metodo a maggiore specificità e sensibilità quello che usa due anticorpi in due steps: nel primo step un anticorpo monoclonale anti apo(a) e nel secondo un policlonale anti apo(b) coniugato con una perossidasi per la detection. Fondamentale l'utilizzo di un metodo che utilizzi anticorpi diretti contro le regioni NON variabili della Lp(a), e quindi non soggetto a variazioni in eccesso o in difetto.

Non esiste, al momento, una terapia in grado di ridurre i livelli in modo significativo. Sappiamo che l'acido nicotinico è associato ad una riduzione dei livelli circolanti a dosaggi elevati che risultano gravati da un numero notevole di effetti collaterali che, nella pratica clinica, ne rende difficile l'applicazione. In Italia non abbiamo a disposizione una formulazione contenente acido nicotinico e quella che avevamo – in associazione a laropiprant – è stata ritirata dal mercato dopo i risultati deludenti dello studio HPS2-THRIVE. Ugualmente la procedura di LDL aferesi che è in grado di ridurre i livelli per un tempo limitato, circa una-due settimane: l'alta invasività

ed anche l'alto costo ne riducono l'applicabilità solo a pazienti altamente selezionati.

Un recente consensud document della Società Europea di Cardiologia identifica la Lp(a) come marcatore di rischio aterotrombotico da ricercare nei pzienti con eventi cardiovascolari in giovane età; con familiarità; in corso di terapia con statine; in assenza di fattori di rischio cardiovascolare classici.

