

# Il progresso nelle conoscenze dell'emostasi: impatto sul laboratorio

F. Rodeghiero

Dipartimento di Terapie Cellulari ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

## Riassunto

Lo sviluppo del laboratorio di coagulazione è avvenuto in parallelo con l'evoluzione delle conoscenze fisiopatologiche del sistema emostatico. I pionieri dello studio della coagulazione, utilizzando metodi molto semplici ed ingegnosi e sfruttando gli esperimenti della natura costituiti dalle coagulopatie congenite, avevano posto le basi per metodi di laboratorio quali il PTT o il PT, tuttora fondamentali, ed individuato fin dagli anni '60 tutti i fattori coagulativi la cui carenza poteva causare malattie emorragiche. I successivi progressi della tecnologia degli anticorpi policlonali/monoclonali hanno portato all'individuazione non solo dei difetti quantitativi di tali fattori, ma anche qualitativi, fornendo informazioni essenziali per studi sul rapporto struttura/funzione di molte proteine dell'emostasi. Inoltre, il progressivo interesse per i difetti trombofilici ha determinato lo sviluppo di test di rapido impiego non solo per il dosaggio degli inibitori naturali coinvolti (e.g. proteina C e S) ma anche per la valutazione dei frequenti polimorfismi genetici responsabili di trombofilia (FV *Leiden*, G20210A del gene della protrombina), test ora largamente usati anche nei laboratori di 1° livello. Peraltro, la capacità di identificare e caratterizzare la singola carenza/difetto, ormai quasi del tutto definita in ambito emorragico e trombotico almeno per i difetti più gravi, ha raggiunto livelli estremamente accurati. Nell'era attuale si assiste all'esplosione degli studi di numerosi polimorfismi genetici e di associazione genica in ampie popolazioni piuttosto che nei singoli per valutare l'entità del rischio emorragico/trombotico in determinate situazioni (es. rischio emorragico in chirurgia).

## Summary

### Understanding hemostasis: progress and impact on the laboratory

The development of coagulation laboratory has paralleled the advances of knowledge of the pathophysiology of the hemostatic system. By using rather simple methodologies and taking advantage of the "natural" experiments represented by patients with congenital clotting disorders, the pioneers in clotting studies have settled the basis for still seminal laboratory methods, like PTT or PT. This allowed since 1960s the identification of all the clotting factors, whose deficiency can cause specific bleeding disorders. Further outstanding progress for coagulation laboratory has stemmed from the production of polyclonal and monoclonal antibodies which allowed the distinction between quantitative and qualitative defects, providing clues about structure-function relationship studies of these proteins. Furthermore, the increasing interest towards inherited thrombophilia has prompted the implementation of several novel assays for the identification of abnormalities of the natural clotting inhibitors (e.g., Protein C and S) and the capability to identify very frequent genetic polymorphisms responsible for familial thrombosis (e.g. FV *Leiden*, G20210A prothrombin variation) with rather simple and fast methods, now widely used. Nowadays, very few, probably mild inherited bleeding disorders could go unrecognized by the present methods and even subtle abnormalities can be appreciated by the sophisticated laboratory methods available. Most of the present studies are now focusing on the identification of additional risk factors for bleeding and thrombosis assessed by wide screenings of several genetic polymorphisms and by gene association studies in large populations.

*Key-words:* Historical article, Hematology/history, Haemostasis, Thrombosis, Laboratory methods.

## Premesse

Nello sviluppo delle conoscenze del sistema emostatico possiamo distinguere due grandi periodi: quello dei pionieri e quello contemporaneo, che succede al primo dopo un ventennio di transizione molto ricco soprattutto per gli sviluppi consentiti dalla biologia molecolare, le nuove possibilità tecnologiche e l'irrompere della valutazione del rischio trombotico nel campo di indagine del laboratorio di coagulazione.

## Il periodo dei pionieri: la nascita del moderno laboratorio di coagulazione

### *Sviluppo delle moderne conoscenze della coagulazione*

L'epoca dei pionieri trova la propria conclusione ideale nel 1964 con la formulazione di un modello a cascata della coagulazione del sangue. Questa ipotesi venne proposta contemporaneamente, ma indipendentemente, da Macfarlane<sup>1</sup> e da Davie e Ratnoff<sup>2</sup> e venne rapidamente ed universalmente accettata.

Il modello si proponeva di spiegare la via intrinseca della coagulazione, ovvero come il sangue intero posto in una provetta di vetro potesse coagulare senza la necessità di alcuna aggiunta di sostanza estrinseca. Il modello era concepito come una serie di reazioni a cascata con amplificazione progressiva del processo. Ogni singola reazione comportava la conversione di uno zimogeno in un enzima proteolitico attivo che a sua volta agiva a valle attivando lo zimogeno successivo. Il modello non richiedeva alcun apporto di sostanze estrinseche ed il suo funzionamento poteva essere esplorato in vitro con il tempo di tromboplastina parziale (PTT, secondo la denominazione anglosassone). Il primo zimogeno che si presupponeva attivarsi autocataliticamente in seguito al contatto con sostanze artificiali quali il vetro era rappresentato dal fattore XII e l'ultimo dalla protrombina, dalla quale si generava la trombina in grado di trasformare il fibrinogeno in un gel insolubile di fibrina. Alcune limitazioni divennero immediatamente evidenti. Fra queste, nel modello di Macfarlane, la mancata identificazione dell'esatto ruolo delle piastrine/fosfolipidi, sostanze che durante l'esecuzione del PTT, effettuato generalmente su plasma povero di piastrine, avevano il loro corrispettivo funzionale nella cefalina (estratto cloroformico di cervello) che doveva essere aggiunta al sistema per ottenere la coagulazione in tempi rapidi. La cefalina fu denominata (e lo è tuttora, con grande confusione nei meno esperti) "tromboplastina parziale", in quanto non in grado di attivare la via estrinseca e di correggere il difetto coagulativo dell'emofilia A e B (v. sotto). Inoltre i due modelli non contemplavano la natura pro-enzimatica dei fattori V ed VIII (peraltro i primi ad essere identificati come causa di emorragia congenita fin dal 1945-46). Sappiamo ora che entrambi agiscono come cofattori e che non fanno parte delle tappe sequenziali previste dal modello a cascata. Essi vengono attivati

dalle prime tracce di trombina generata dal sistema ed agiscono, una volta attivati, come i più potenti moltiplicatori della velocità di generazione della trombina. Sono questi cofattori a rappresentare gli elementi cruciali nel controllo fisiologico del processo, come confermeranno le scoperte dell'attività anticoagulante del sistema proteina C/S<sup>3</sup> e trombomodulina<sup>4</sup> (vedi sotto). Subito dopo la sua introduzione, il PTT venne reso più ripetibile aggiungendo alla miscela di plasma e cefalina delle sostanze attivatrici - quali il caolino, la celite o l'acido ellagico - che agendo sul *loop* autocatalitico costituito dal fattore XII, dal chininogeno e della precallicreina consentivano di ottenere un tempo di coagulazione generalmente inferiore a 40 secondi. Il nuovo test denominato Activated PTT (APTT) è sostanzialmente quello tuttora in uso.

Già nel 1935 Armand Quick<sup>5</sup> aveva sviluppato un test denominato tempo di protrombina (PT, secondo l'acronimo anglosassone) che egli riteneva sensibile alla sola protrombina. Il test consisteva nel riscaldare a 37° C una miscela di plasma citratato di estratto tissutale e nel misurare il tempo di coagulazione dopo ricalcificazione. L'estratto tissutale denominato "tromboplastina totale" o in breve "tromboplastina" era costituito generalmente da un estratto secco di cervello ottenuto con acetone. Successivamente al 1992, dopo la clonazione del fattore tissutale umano (TF, *Tissue Factor* secondo la denominazione anglosassone), la tromboplastina è stata progressivamente sostituita dalle tromboplastine ricombinanti (fattore umano tissutale ricombinante ricostituito con una miscela di fosfolipidi in formulazione standardizzata). La necessità dell'aggiunta di fattori estrinseci al sangue spiega come fin dall'inizio il tempo di protrombina sia stato semplicisticamente ritenuto come il test che esplora la via estrinseca della coagulazione. In realtà è noto fin dagli anni '50 come il test sia dipendente anche dalla concentrazione dei fattori V, VII e X e da almeno un ventennio come la distinzione fra le due vie sia completamente artificiosa. Risultava tuttavia abbastanza intuitivo supporre che la via intrinseca e la via estrinseca, attraverso l'attivazione del fattore VII da parte dell'estratto tissutale, convergessero nell'attivare parallelamente ed indipendentemente il fattore X cui seguiva una via comune che portava alla conversione della protrombina in trombina in presenza di fattore V, ioni calcio e fosfolipidi. Questa semplificazione è tuttora utilizzata nella didattica ed è utile nell'interpretazione delle anomalie dell'(A)PTT e del PT che si riscontrano nelle malattie congenite della coagulazione.

Una seconda importante scoperta del periodo pionieristico, che ha le proprie radici negli anni 1930-40 e che porterà alla successiva introduzione dei dicumarolici come farmaci anticoagulanti nel 1941, è legata alla dimostrazione che i fattori II, VII, IX e X dipendono dalla vitamina K. Più precisamente, come verrà successivamente dimostrato da Stenflo nel 1974<sup>6</sup>, essa è necessaria per il processo di gamma-carbossilazione

**Tabella I.** Metodi di laboratorio per lo studio della coagulazione disponibili all'inizio degli anni '70.

<i>Test</i>	<i>Note anche alla luce delle conoscenze odierne</i>
Tempo di coagulazione del sangue intero	Impreciso, obsoleto Ripreso come <i>activated clotting time</i> in cardiocirurgia ( <i>point-of-care</i> )
Tempo di protrombina	Tuttora insostituibile
Tempo di protrombina parziale (PTT)	Poco usato, più impreciso di APTT
Tempo di protrombina parziale attivato (APTT)	Tuttora fondamentale Standardizzabile per il monitoraggio della terapia con eparina standard Tuttora screening per <i>lupus anticoagulant</i>
Tempo di trombina	Dipende da concentrazione e funzionalità del fibrinogeno Sensibile a eparina
Tempo di reptilase	Tuttora utile per escludere contaminazione eparinica del campione
Test del consumo di protrombina	Non più usato nella pratica
Saggi quantitativi dei singoli fattori	Dosaggi biologici a rette parallele Richiesto plasma carente del fattore in studio Tuttora in uso
Test per anticoagulanti circolanti	APTT/PT su miscela plasma normale/paziente ed eventuale dosaggio fattore
Fibrinogeno	Dai metodi basati sulla misura (peso o tirosina liberata, con reagente fenolico di Folin-Ciocalteu) ai metodi funzionali (Clauss) e ai metodi derivati dal PT Tuttora problemi di standardizzazione e calibrazione Preferire test funzionali nella CID
Fattore XIII	Tuttora il test di solubilità del coagulo in acido monocloroacetico è fondamentale
Tromboelastografia	Nato come test di ricerca Obsoleto nella versione originaria Riattualizzato come test globale nell'ultimo decennio ( <i>point-of-care</i> )

dei residui di acido glutammico dei precursori inattivi dei fattori vitamina K dipendenti. Rimaneva inoltre da risolvere un mistero: come mai i pazienti con emofilia A e B, privi rispettivamente del fattore VIII e IX, sanguinano così gravemente dopo i traumi? Infatti, in questi pazienti il tempo di protrombina è normale, dimostrando che la via estrinseca, quella ritenuta più fisiologica, almeno in vitro funziona perfettamente. La risposta a questo paradosso, fondamentale per la comprensione dell'emostasi in vivo, è stata fornita dagli studi di Osterud e Rapaport<sup>7</sup> che dimostrarono come il fattore IX potesse essere attivato dal complesso TF-VIIa-ioni calcio. Evidentemente in vivo la coagulazione è governata dal rilascio di TF che attiva il fattore VII che a sua volta attiva il FIX in presenza di fattore VIII (*te-*

*nase activity*) portando così all'attivazione del fattore X. Al contrario, nel tempo di protrombina l'eccesso di TF con la conseguente massiva attivazione del fattore VII va ad attivare direttamente il fattore X e sopravanza l'azione inibitoria del *tissue factor pathway inhibitor (TFPI)*. Tale inibitore agisce sul complesso TF/VIIa formando un complesso quaternario che comprende il FXa (TF-VIIa-Xa-TFPI)<sup>8,9</sup>. In sintesi è chiaro, in base alle conoscenze attuali, che i due test principali PTT o APTT e PT rappresentano situazioni artificiali che non si verificano in vivo.

I test di screening emocoagulativi e per i disordini della fibrinolisi disponibili all'inizio degli anni '70 sono presentati nelle Tabelle I e II<sup>10</sup>.

Nonostante le limitazioni di questi test nell'identifica-

**Tabella II.** Test disponibili per lo studio della fibrinolisi all'inizio degli anni '70.

<i>Test</i>	<i>Note</i>
Tempo di lisi delle euglobuline	Misura prevalentemente l'attività degli attivatori del plasminogeno
Lisi delle piastrine di fibrina	Miglioramento del test precedente in termini di standardizzazione
Misura del plasminogeno plasmatico	Attivatore streptochinasi Endpoint: tirosina liberata
Prodotti di degradazione del fibrinogeno/fibrina (FDP)	Metodi storici su siero o plasma defibrinogenato (immunotest di inibizione dell'emoglutinazione e agglutinazione al lattice) ora obsoleti Non specifici per i prodotti della fibrina e non precisi Attualmente sostituiti dalla misura del D-Dimero nel plasma

**Tabella III.** Disordini in cui i risultati del test di screening “primario” possono essere normali. Aggiornata da Wintrobe's Clinical Hematology, capitolo 33<sup>11</sup>.

Malattia di Von Willebrand (casi lievi o moderati)
Disordini ereditari della coagulazione lievi o moderati, in particolare la carenza parziale di fattore XI o FXII
Portatori eterozigoti di disordini ereditari della coagulazione
Carenza dei fattori di contatto (Chinogeni, Precallicreina)
Carenza di fattore XIII (fattore stabilizzante della fibrina)
Alcune forme di disfibrinogenemia
Disordini piastrinici
Telangiectasia ereditaria emorragica; sindrome di Ehlers-Danlos
Porpora allergica e “vascolare”
Difetto di a2- antiplasmina; difetto omozigote PAI-1
Scott syndrome; Quebec platelet disorder
Difetti lievi non meglio definiti

re alcune malattie emorragiche congenite e anomalie congenite prive di significato clinico (Tab. III)<sup>11</sup>, limitazioni che trovano un rilevante riflesso pratico, PTT/APTT e PT rimangono tutt'oggi alla base di tutto lo studio delle malattie emorragiche.

La successiva evoluzione è consistita unicamente nella loro esecuzione con sistemi sempre più automatizzati e basati su diversi metodi di rilevamento del coagulo (visuale, foto-ottico) o su rilascio di cromogeni da parte di substrati artificiali, resi possibili dall'evoluzione tecnologica. In parallelo, è andata sviluppandosi una crescente consapevolezza della cruciale necessità di un'adeguata standardizzazione attraverso l'uso di materiali di riferimento a potenza nota mediante l'adozione di conseguenti procedure di controllo di qualità. Un esempio particolare in questo ambito è stato rappresentato dalla standardizzazione del tempo di protrombina (Tab. IV)<sup>12</sup>.

Inoltre APTT e PT sono correntemente utilizzati per il dosaggio dei fattori coagulativi sfruttando la relazione dose risposta (saggio biologico secondo i principi del dosaggio a rette parallele) fra concentrazione del fattore in esame e tempo di coagulazione del test. Le diverse concentrazioni del fattore in esame sono ottenute diluendo un plasma normale (1U/mL, per defi-

nizione assunto come 100%) con diluizioni progressive del plasma normale con un plasma carente (0 U/mL, per definizione assunto come 0%) ottenuto da un paziente con deficienza congenita o dopo immunodeplezione. In questo ambito, la standardizzazione prevede come elemento critico la disponibilità di plasmi di riferimento calibrati contro standard internazionali in UI/mL.

### **Studio dell'emostasi primaria e malattia di von Willebrand**

Lo studio della fase primaria dell'emostasi si avvaleva di test molto semplici elencati e commentati nella Tabella V. Questi test trovavano indicazione in presenza di diatesi emorragica significativa e allungamento del tempo di sanguinamento in concomitanza della completa normalità dei test di screening emocoagulativo. L'identificazione e la definizione della malattia di von Willebrand, scoperta da Erik von Willebrand nel 1926, meritano un approfondimento separato. Il pediatra finlandese aveva studiato una famiglia in cui diversi membri, sia maschi che femmine, erano morti in età giovanile per emorragia. Nei probandi, similmente all'emofilia, il tempo di coagulazione era prolungato ma, sorprendentemente, il tempo di emorragia era abnormemente lungo. Inoltre potevano essere colpiti sia i maschi che le femmine. Per queste caratteristiche che differenziavano la nuova malattia dall'emofilia “classica”, essa venne denominata angioemofilia. Un progresso fondamentale nel chiarire la natura di questa misteriosa combinazione di anomalie divenne disponibile soltanto quasi cinquant'anni dopo con la dimostrazione che il fattore VIII ed il fattore von Willebrand (VWF) erano molecole distinte, prodotte da geni diversi che circolano sotto forma di un unico complesso molecolare<sup>13</sup> per cui in caso di difetto di VWF anche il fattore VIII risultava ridotto. L'effetto del VWF sull'emostasi primaria venne chiarito con la disponibilità di uno strano reagente di laboratorio: la ristocetina. Si trattava di un antibiotico ritirato dal commercio poiché provocava piastrinopenia. La ristocetina causava agglutinazione delle piastrine normali lavate e risospese in un plasma normale. Questa caratteristica si sarebbe rivelata fondamentale. Infatti, l'aggregazione da ristocetina (in-

**Tabella IV.** Standardizzazione del tempo di protrombina (modificato da Tripodi A<sup>12</sup>).

<i>Fasi</i>	<i>Periodo</i>
Prima descrizione del tempo di protrombina	1935
Primi tentativi di standardizzazione per il monitoraggio di pazienti in terapia anticoagulante orale	Anni '60
Modello di calibrazione Biggs-Denson	Anni '60
Modello di calibrazione WHO	Anni '70
Modello di calibrazione WHO rivisitato (ISI e INR)	Anni '80
Tromboplastina ricombinante	Anni '90
Point-of-care vs. centralizzazione	Dagli anni '90 ad oggi
Farmacogenetica	Dall'inizio del 2000

**Tabella V.** Test per lo studio dell'emostasi primaria disponibili all'inizio degli anni '70 e successivi.

<i>Test</i>	<i>Note</i>
Tempo di emorragia - Tempo di Ivy - Tempo di Mielke	Non più utilizzati La loro sostituzione con PFA-100™ non è sostenuta da sufficiente evidenza
Test al laccio	Obsoleto
Conta piastrinica	Tuttora fondamentale
Morfologia delle piastrine	Tuttora fondamentale
Retrazione del coagulo	Obsoleto
Tromboelastografia	Divenuta obsoleta è stata rivisitata con nuovi strumenti nell'ultimo decennio
Test del consumo di protrombina	Solo per ricerca o in casi speciali
Disponibilità del fattore piastrinico III	Solo per ricerca o in casi speciali
Test di adesività al vetro delle piastrine (secondo Hellem)	Obsoleto
Studi di aggregazione con ADP, adrenalina, collagene, ristocetina (ac. arachidonico o trombossano dagli anni '80)	Tuttora fondamentale Il moderno lumiaggregometro consente la misurazione dei nucleotidi rilasciati
Citofluorimetria	Studio recettori di membrana e micro vescicole

trodotto nel 1973 da Howard et al.<sup>14</sup>) non avveniva se le piastrine erano ottenute da pazienti con la Sindrome di Bernard-Soulier oppure se il plasma nel quale venivano risospeso era ottenuto da pazienti con totale carenza di VWF. Era facile concludere che sulle normali membrane piastriniche era presente un recettore (rivelatosi essere la glicoproteina Ib) in grado di interagire con un ligando rappresentato dal VWF che agiva da ponte fra le piastrine, agglutinandole. Venne rapidamente messo a punto un test funzionale (surrogato) per il dosaggio del VWF denominato attività di cofattore ristocetico (VWF:RCo). Questo nuovo dosaggio, di difficile standardizzazione, ma tuttora insostituibile (anche se si stanno proponendo test analoghi basati su anticorpi monoclonali su micro piastra), assieme alla disponibilità del dosaggio immunologico del VWF (VWF:Ag) dapprima con metodiche radioimmunometriche o immunoelettroforetiche (anni '70) ed infine mediante tecnica ELISA (dall'inizio degli anni '80), ha consentito di identificare oltre ai pazienti con carenza totale di VWF (tipo 3, molto raro, costituito dall'eredità di due alleli nulli), i più comuni casi con difetti quantitativi più lievi (tipo 1) o di varianti molecolari (tipo 2), con attività funzionale sproporzionalmente ridotta rispetto all'attività antigenica del VWF. Il VWF circola sotto forma di multimeri, ciascuno costituito da molti dimeri di subunità identiche e molte di queste varianti ne provocano una difettosa multimerizzazione, evidenziabile con l'analisi della composizione multimerica. Questa analisi, non necessaria nella routine clinica ma di grande importanza storica, prevede una separazione elettroforetica su gel o nitrato di cellulosa seguita da immunoevidenziazione con anticorpi marcati radioattivamente o più recentemente con fluo-

rocromi. Per la sua frequenza, la malattia di von Willebrand deve essere sempre considerata nei soggetti con diatesi emorragica "significativa" poiché anche gli attuali test di screening risultano spesso normali. Come definire "significativa" una diatesi emorragica e come combinare storia clinica con la trasmissione ereditaria ed i livelli di laboratorio di FVIII, VWF:Ag e VWF:RCo sta rappresentando un settore di intensa attività di ricerca internazionale cui anche il nostro gruppo sta contribuendo in modo rilevante<sup>15-17</sup> con lo scopo di formulare diagnosi non soltanto accurate ma anche clinicamente utili per predire il rischio emorragico futuro e guidare l'approccio terapeutico.

### Periodo di transizione

In questa fase, mal definibile nel suo arco temporale, giungono a maturazione le conoscenze circa il funzionamento del sistema emostatico inteso come sistema globale comprendente oltre alla fase plasmatica della coagulazione e della fibrinolisi anche l'endotelio e le piastrine con vie integrate di attivazione e controllo/inibizione. I test di laboratorio si rendono disponibili ai laboratori non specializzati e si dimostrano accurati e di provata utilità diagnostica. A questo progresso contribuiscono inoltre in modo determinante la crescente disponibilità di anticorpi policlonali (dall'inizio degli anni '70) e poi monoclonali (a partire dagli anni '80) dotati di elevata specificità verso i singoli componenti, nonché lo sviluppo delle tecniche della biologia molecolare.

### La scoperta delle varianti molecolari

La disponibilità di anticorpi specifici verso i diversi fattori emocoagulativi o addirittura verso singole por-

zioni molecolari degli stessi, nonché lo sviluppo di saggi immunologici quali l'immuno-elettroforesi bidimensionale o i test immunoenzimatici (ELISA), consente un'agevole distinzione delle carenze dovute alla totale o parziale deficienza quantitativa dai difetti cosiddetti funzionali (dimostratisi in seguito i più frequenti), nei quali l'attività antigenica risulta normale o lievemente ridotta e l'attività funzionale appare più gravemente compromessa (varianti molecolari).

La clonazione dei diversi fattori e la possibilità di sequenziamento aminoacidico, ormai alla portata dei laboratori meno sofisticati, consente la rapida caratterizzazione molecolare dei diversi difetti e la proposta di modelli molecolari atti a spiegare l'intrinseco difetto a livello genico e molecolare.

### Nasce l'interesse per le malattie trombotiche ed il concetto di trombofilia

Come si è potuto notare dall'esposizione precedente, sia l'impianto concettuale che la messa a punto dei test di laboratorio della fase pionieristica erano mirati esclusivamente alla spiegazione fisiopatologica ed alla diagnosi delle malattie emorragiche. La scoperta nel 1965 da parte del gruppo di Egberg<sup>18</sup> di una famiglia nella quale numerosi membri con carenza di antitrombina (allora denominata antitrombina III) soffrivano di trombosi venosa profonda con esordio spesso in età giovanile, anche senza causa apparente e con frequenti recidive, aveva aperto una nuova prospettiva. L'interesse nasceva dalla prova di principio che, come del resto si sospettava fin dall'epoca pionieristica, anomalie del sistema coagulativo potevano essere causa non soltanto di deficit coagulativi ma anche di situazioni di ipercoagulabilità. Questo concetto venne ancor più lucidamente esplorato con l'identificazione di pazienti con difetti di proteina C o proteina S che presentavano eccessiva predisposizione a manifestazioni tromboemboliche venose, permettendo infine di definire la trombofilia come una distinta condizione clinica meritevole di uno specifico studio di laboratorio. Le successive scoperte del frequente polimorfismo del fattore V (fattore V Leiden, presente in circa 3-5% della popolazione), che lo rende resistente all'azione inattivante della proteina C attivata, e del polimorfismo molecolare 20210A della protrombina (presente nel

2-3 % della popolazione), associato ad un aumento del livello circolante della stessa, nonché di altre cause acquisite di resistenza alla proteina C hanno reso possibile identificare una causa genetica di trombofilia in circa il 30% dei pazienti<sup>19</sup> e di stimarne il rischio relativo nei portatori (Tab. VI e Fig. 1). Fra le cause acquisite di trombofilia, viene a delinearsi con chiarezza l'entità del rischio trombotico associato al *lupus anticoagulante* (LA) o alla presenza di anticorpi antifosfolipidi (con o senza attività anticoagulante) e vengono definiti i criteri di laboratorio per la loro identificazione (Tab. VII).

Sorprendentemente, nonostante in questo periodo venga definitivamente chiarito il meccanismo molecolare della fibrinolisi, da questo settore non provengono sostanziali contributi di utilità diagnostica (ma notevolissimi sul piano terapeutico, con l'introduzione della terapia trombolitica). Fondamentale tuttavia si rivelerà l'identificazione di specifici prodotti di degradazione plasminica della fibrina stabilizzata dal fattore XIII, rappresentati dal D-dimero. Il dosaggio di questo derivato fibrinolitico renderà obsoleta (a partire dagli anni '80) la misurazione dei cosiddetti prodotti di degradazione del fibrinogeno/fibrina (FDP) che obbligavano a complesse procedure di separazione dal plasma del fibrinogeno. La misurazione della quantità di D-dimero circolante, affidabile e semplice, contribuirà a stabilire definitivamente l'estrema rarità della iperfibrinolisi primitiva. Essa consentirà infatti di reinterpretare la sin-

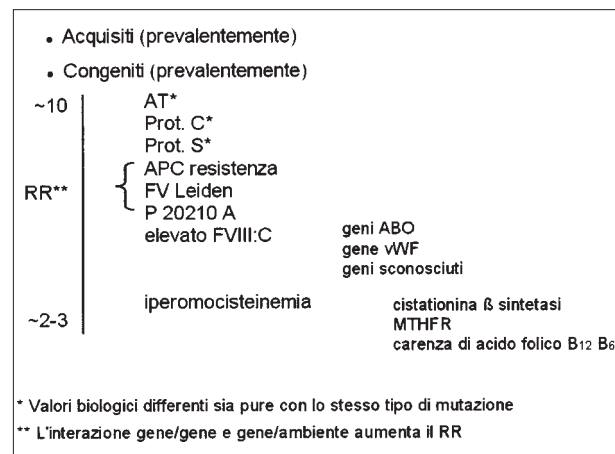


Figura 1. RR: Risk ratio rispetto alla popolazione generale.

Tabella VI. Prevalenza dei fattori di rischio per la trombofilia in pazienti con trombosi spontanea (da Rosendaal FR<sup>19</sup>).

Fattore di rischio	% popolazione generale	% pazienti con trombosi
Carenza di Proteina C	0.2 – 0.4	3
Carenza di Proteina S	NA	1 - 2
Carenza di Antitrombina	0 – 0.2	1
Fattore V Leiden	5	20
Protrombina 20210A	2	6
Livelli elevati di fattore VIII (>150 IU/dL)	11	25
Iperomocisteinemia (>18.5 μmol/L)	5	10

**Tabella VII.** Criteri di laboratorio per l'identificazione del Lupus Anticoagulant e degli anticorpi antifosfolipidi<sup>20</sup>.

Fase	Note
Test di screening	Dimostrazione del prolungamento di un tempo di coagulazione dipendente dai fosfolipidi oltre il limite massimo dell'intervallo di riferimento (di solito APTT)
Prova di correzione con plasma normale	Conferma della presenza di un inibitore ed esclusione della carenza di un fattore della coagulazione
Test con diverse concentrazioni di fosfolipidi	Conferma che l'inibitore è dipendente dai fosfolipidi e non diretto contro uno specifico fattore della coagulazione

drome da defibrinazione o coagulazione intravascolare disseminata (CID) come un processo fibrinolitico reattivo alla generazione di trombina in circolo, sconsigliando definitivamente l'uso degli antifibrinolitici in queste forme. Del tutto recentemente, inoltre, il dosaggio del D-dimero è stato proposto come marcatore da utilizzare nelle procedure di screening per la diagnosi di trombosi venosa profonda e di embolia polmonare nella popolazione ambulatoriale. Infatti, valori appena elevati, qualora dosati con metodi sensibili e ben standardizzati, in soggetti senza apparente patologia infiammatoria, traumatica o neoplastica hanno un notevole valore predittivo per TVP o EP<sup>21</sup>.

In questo periodo trovano la loro maturazione la standardizzazione del PT (Tab. IV) e la definizione e la messa a punto dei test per la piastrinopenia da eparina.

### Periodo attuale

Il fascino del laboratorio di emostasi sembra accrescersi sempre più. I "vecchi test", tuttora basati su saggi biologici - anche se ora eseguiti con metodi ad alta automazione ed elevata standardizzazione - coesistono con l'impiego delle metodiche immunologiche più avanzate e le indagini molecolari basate sulla PCR o il sequenziamento genico, ormai non più appannaggio esclusivo dei laboratori ultraspecialistici.

Lo studio dell'aggregazione delle piastrine si avvale, ormai da oltre un decennio, di lumiaggregometri in grado di misurare simultaneamente anche il rilascio dei nucleotidi e di porre agevolmente diagnosi di *storage pool disease*.

Infine la possibilità di dosare l'attività plasmatica della ADAMTS 13 - la metalloproteasi che, clivando il legame aminoacidico fra la tirosina in posizione 1605 e la metionina in posizione 1606 della subunità monomerica, stacca progressivamente dalle estremità dei multimeri del VWF i dimeri terminali, riducendo così la massa del VWF e la sua capacità di provocare adesione ed aggregazione piastrinica in vivo - sta trovando largo impiego nella diagnostica della porpora trombotica trombocitopenica (PTT). Infatti, in questa malattia molti casi acquisiti sono provocati da autoanticorpi che inibiscono l'attività di ADAMTS 13 il cui dosaggio, tuttora di dubbia utilità pratica, sarà certamente richiesto nel monitoraggio della terapia sostitutiva con ADAMTS 13 ricombinante, non appena resa disponibile all'uso clinico.

Nel campo della terapia antitrombotica la ricerca è rivolta verso lo sviluppo di farmaci anticoagulanti (derivati dell'eparina come il pentasaccaride o nuove molecole anticoagulanti dirette contro la trombina o il fattore X attivo) che non richiedono alcun monitoraggio di laboratorio, peraltro facilmente eseguibile adattando i test disponibili, ove fosse richiesto da condizioni cliniche particolari (es. insufficienza renale). Nel frattempo la disponibilità di semplici apparecchiature che effettuano il PT su sangue intero e/o capillare consente fin d'ora il monitoraggio della terapia anticoagulante orale (TAO) con dicumarolici o warfarina presso l'ambulatorio del medico curante o addirittura, in casi selezionati, a cura del paziente stesso, costituendo così dei *point of care* decentrati. Ove si consideri che circa l'1-2 % della popolazione adulta è in terapia anticoagulante orale e che i dati disponibili sui pazienti seguiti presso i *point of care* non sono inferiori a quelli ottenibili con il controllo centralizzato, la necessità di riconsiderare l'organizzazione del monitoraggio della terapia anticoagulante orale appare ineludibile.

Al termine di questa rassegna sui progressi scientifici e tecnologici è tuttavia lecito chiedersi se nonostante questi indubbi successi tutti i problemi sollevati dalla clinica delle malattie emorragiche e trombotiche siano sufficientemente esplorabili con i test a disposizione. Dall'angolo visuale del clinico alcuni aspetti rimangono irrisolti. Come già indicato nella Tabella III, alcune situazioni legate ad un aumentato rischio emorragico non vengono tuttora evidenziate da alcuno dei test di esplorazione globale della coagulazione. Il sogno di avere dei test globali rivive periodicamente. Fra i test globali recentemente proposti, segnaliamo la (riscoperta della) tromboelastografia, basata su sofisticate strumentazioni computerizzate che sfruttano il principio del tromboelastografo tradizionale rotazionale. Il potenziale diagnostico di questi strumenti non è stato tuttavia ancora validato da alcun studio controllato. Più promettente lo studio del potenziale trombinico mediante misurazione dell'area sotto la curva della cinetica di generazione della trombina<sup>22</sup>. Il test, pur non pienamente validato in sede diagnostica e non proponibile come test di screening nella pratica, è tuttavia sensibile a variazioni della "capacità coagulativa" dei singoli pazienti, normali o con carenze di fattori specifici. Ad esempio, emofilici con lo stesso livello residuo di fattore VIII possono avere differente severità clinica a

seconda del loro diverso potenziale piastrinico. La storia travagliata del tempo di emorragia, test che ha contribuito alla scoperta dei diversi disturbi dell'emostasi primaria e che è stato infine (inopinatamente) abbandonato a metà degli anni '80 perché poco standardizzabile, cruento, poco sensibile (e poco costoso!) è sfociata nella messa a punto di un test surrogato che misura il tempo di occlusione del sangue forzato attraverso un piccolo foro di una membrana di collagene in presenza di vari agonisti piastrinici quali ADP o adrenalina (*Platelet Function Analyzer*, PFA-100™). Anche questo test, tuttavia, è soggetto ad un tasso di falsi positivi e falsi negativi non accettabile nella pratica clinica. L'utilità di uno screening dell'emostasi primaria consiste principalmente nel ridurre il numero dei pazienti nei quali effettuare un approfondito studio della funzionalità piastrinica. La prassi del nostro centro è quella di effettuare questi studi soltanto in presenza di una chiara sintomatologia emorragica cutaneo/mucosa con normalità del VWF, casi nei quali il tempo di emorragia classico sarebbe pressoché invariabilmente prolungato. Tuttavia l'orientamento prevalente e raccomandato da molte autorità è per un più esteso studio della funzionalità piastrinica con prove di aggregazione e misurazione del contenuto dei granuli densi in tutti i casi dubbi<sup>23</sup>.

Nell'ambito dello studio della trombofilia non vi sono novità rilevanti da almeno un decennio e non ci si attende l'identificazione di nuovi fattori di rischio di elevato potere predittivo. Infatti, sia nel campo dell'emostasi che della trombosi la scoperta di nuovi fattori di rischio (es. maggior rischio post operatorio di emorragia in soggetti apparentemente sani o aumentato rischio trombotico venoso od arterioso in soggetti senza fattori noti di trombofilia) è oggi affidato sempre più allo studio dei polimorfismi genici o a studi di associazione genica su larghe popolazioni. Questi studi in genere non identificano tuttavia fattori con potere predittivo superiore a un rapporto di rischio superiore a 2, rispetto alla popolazione di riferimento.

Alla luce di queste considerazioni, ancora più entusiasmante appare un futuro che già si incomincia ad intravedere, nel quale, si pensi ai rapporti fra sviluppo tumorale ed emostasi e fra emostasi ed angiogenesi, entreranno sempre più come protagonisti gli elementi cellulari sia normali che neoplastici (endotelio, leucociti, cellule tumorali), il TF, le citochine, i fattori di crescita vascolari ed endoteliali. Non v'è dubbio che lo studio di laboratorio dell'emostasi applicato al contesto di queste complesse interazioni e delle nuove terapie antitumorali basate sui farmaci biologici ed antiangiogenici sarà uno degli elementi caratterizzanti del prossimo decennio.

## Bibliografia

1. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202:498-9.
2. Davie EW, Ratnoff ED. Waterfall sequence for intensive

- blood clotting. *Science* 1964; 145:1310-2.
3. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem* 1976; 251:355-63.
4. Esmon CT, Owen WG. Identification of endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:2249-52.
5. Quick AJ. The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem* 1935; 109:83.
6. Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:2730-3.
7. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII. Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5260-4.
8. Sanders NL, Bajaj SP, Zivelin A, Rapaport SI. Inhibition of tissue factor/VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component. *Blood* 1985; 66: 204-12.
9. Broze GJ. The rediscovering and isolation of TFPI. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1671-5.
10. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*, Fifth edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1975.
11. Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Bithell TC, Athens JW, Foerster J. *Clinical Hematology*, Seventh edition. London: Henry Kimpton Publishers; 1974. p. 1043-70.
12. Tripodi A. The history of phenotypic testing in thrombosis and hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 585-92.
13. Weiss HJ, Hoyer LW. Von Willebrand factor: dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. *Science* 1973; 182:1149-51.
14. Howard MA, Sawers RJ, Firkin BG. Ristocetin: a means of differentiating von Willebrand's disease into two groups. *Blood* 1973; 41:687-90.
15. Tositto A, Castaman G, Rodeghiero F. Evidence-based diagnosis of type 1 von Willebrand disease: a Bayes theorem approach. *Blood* 2008; 111:3998-4003.
16. Rodeghiero F, Castaman G, Tositto A. How we treat von Willebrand disease. Submitted to *Blood*, 2009.
17. Rodeghiero F, Tositto A, Castaman G. How to estimate bleeding risk in mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2007; 5(Suppl 1):157-66.
18. Egberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *ThrombDiath Haemorrh* 1965; 13:516-30.
19. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-73.
20. Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1597-603.
21. Righini M, Perrier A, De Moerloose P, Bounameaux H. D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1059-71.
22. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2008; 6:219-26.
23. Mumford AD. How useful is light transmission platelet aggregometry for the diagnosis of bleeding disorders? *J Thromb Haemost* 2009; 7:673-5.