

# Emostasi e rischio trombotico

**Emostasi:** attivazione controllata dei fattori della coagulazione e delle piastrine che portano alla formazione del coagulo

**Trombosi:** attivazione incontrollata

## Equilibrio tra

- **Forze anticoagulanti:** per la fluidità del sangue all'interno dei vasi integri
- **Forze procoagulanti:** per evitare la fuoriuscita del sangue da un vaso non più integro

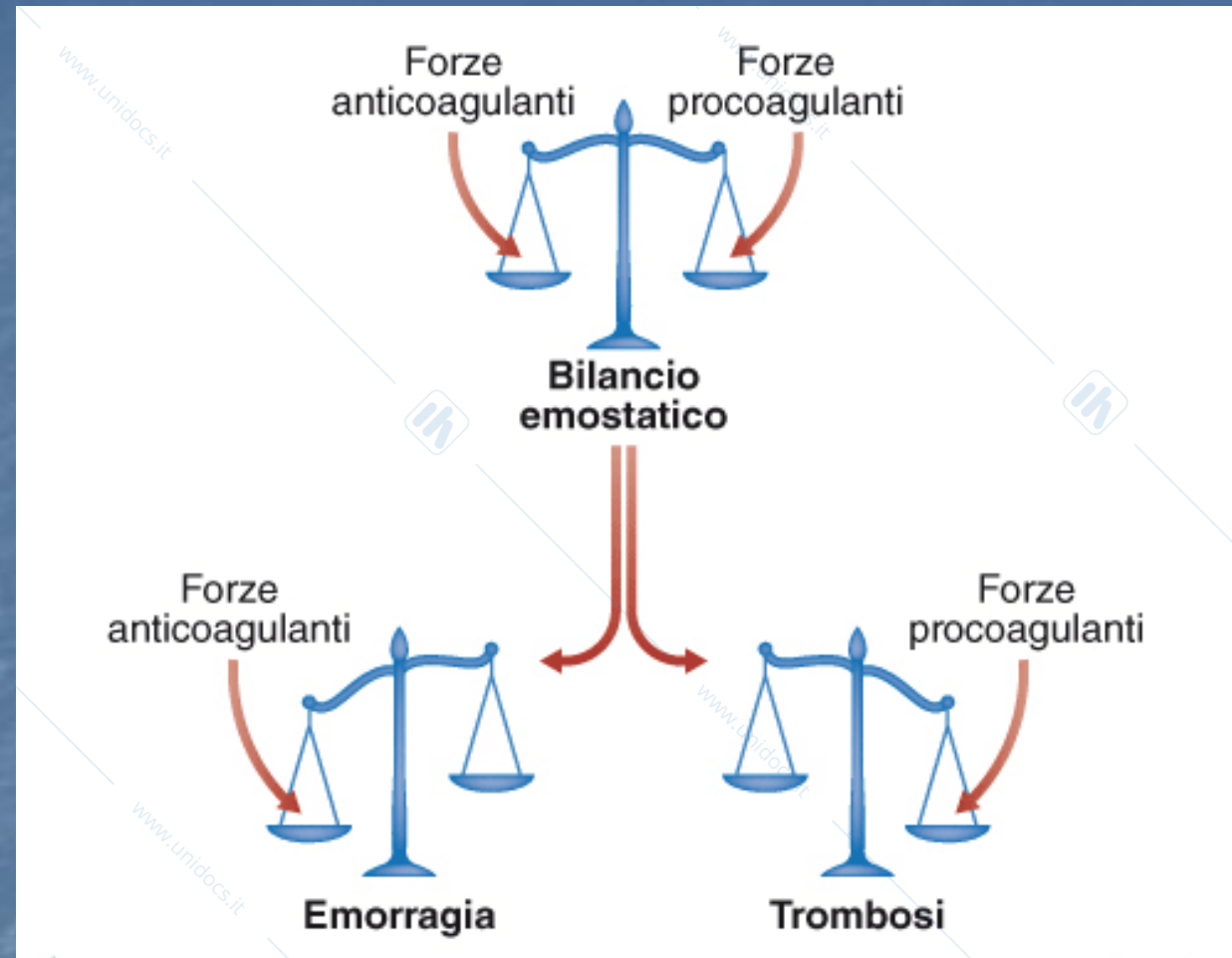
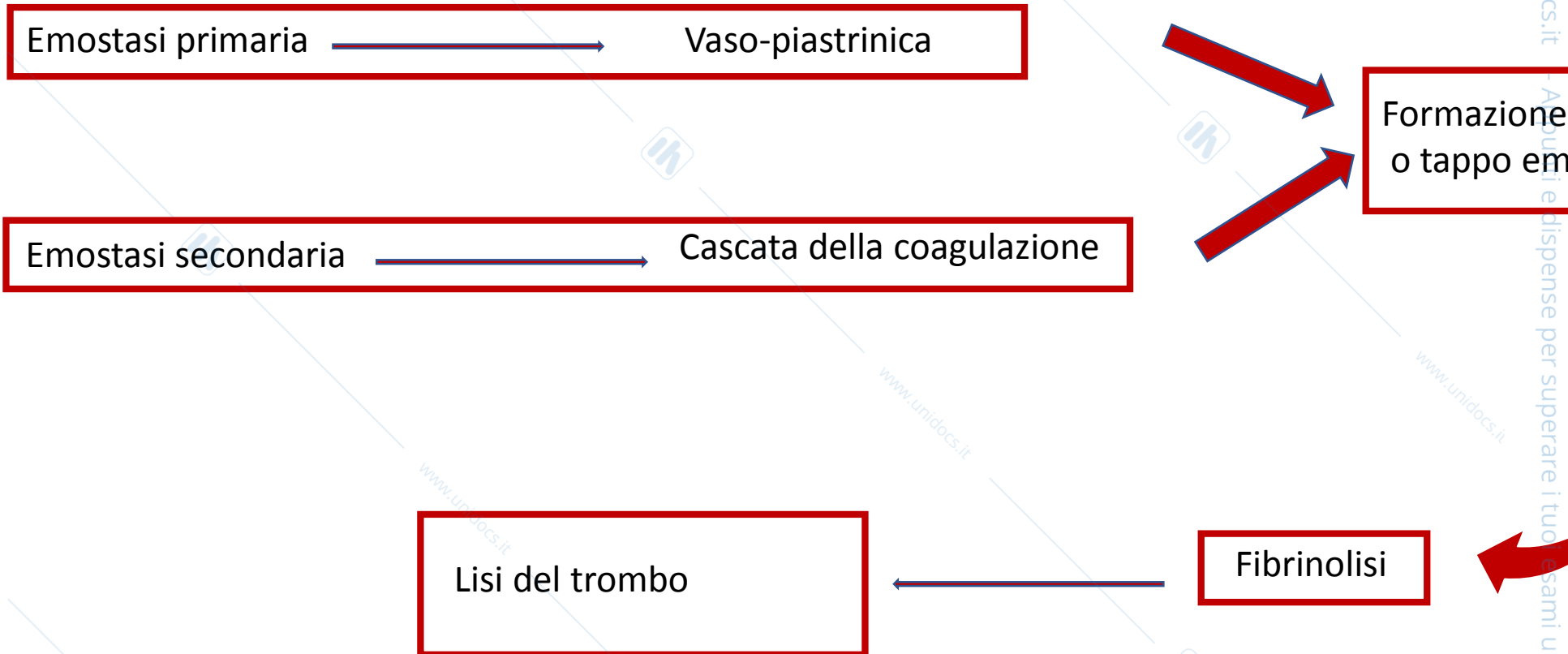


Figura 14.1: Bilancio emostatico.

# FASI DELL'EMOSTASI



# Emostasi primaria

## Operata da:

- Endotelio
- Cellule muscolari
- Piastrine



## Vasocostrizione

- Riduzione della portata del sangue
- Marginazione delle piastrine
- Accumulo dei fattori della coagulazione



## Liberazione dall'endotelio di

- Fattore di Von Willebrand (VWF)

## **PIASTRINE (o trombociti) principali effettori dell'emostasi primaria**

Elementi corpuscolati del sangue privi di nucleo derivanti dalla lisi dei megacariociti

Contengono

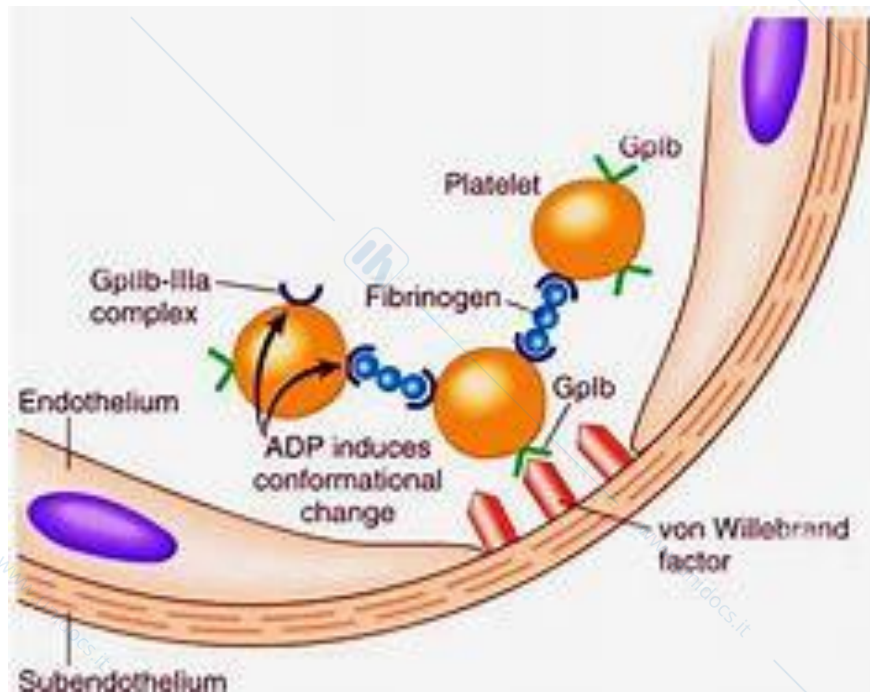
- Granuli  $\alpha$ : fibrinogeno, fattori della coagulazione, TXA<sub>2</sub>, ADP
- Granuli  $\delta$ : istamina, serotonina, calcio
- Granuli  $\gamma$ : idrolasi lisosomiali, perossisomi

# Fase I: legame delle piastrine al collagene esposto dalla lesione del vaso

Mediata da

**GP IIb/IIIa** sulla membrana delle piastrine che legherà il fibrinogeno

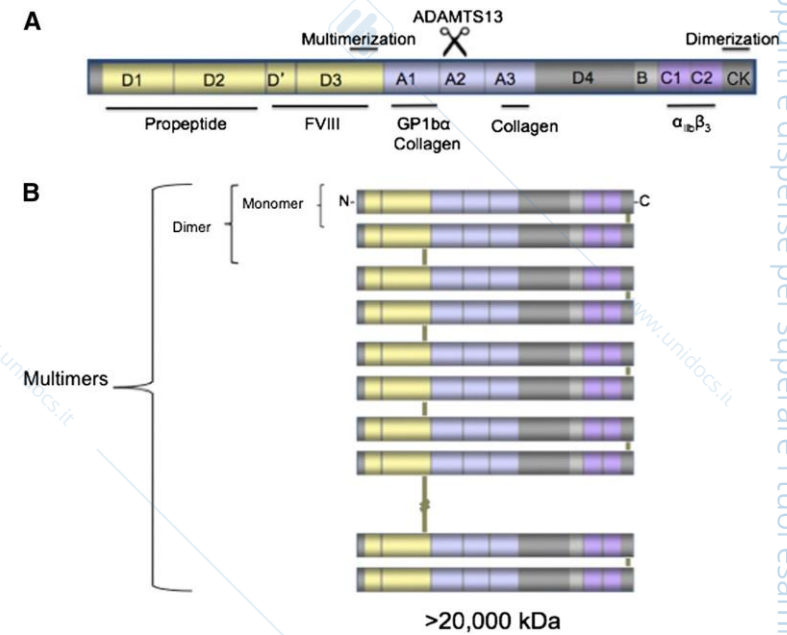
**GPIb** che si lega a **VWF**



## Fattore di Von Willebrand

Si lega alla superficie delle piastrine

Consente l'adesione alla superficie sub-



## Fase II: *shape change*

- Esposizione della fosfatidil serina all'esterno delle piastrine

### Fase III

rilascio dalle piastrine dei granuli contenenti:  
ADP, serotonina, TXA<sub>2</sub> (trombossano A<sub>2</sub>)

### Fase IV

aggregazione delle piastrine tra loro  
esposizione in membrana di GPIIb/IIIa che lega il Fibrinogeno

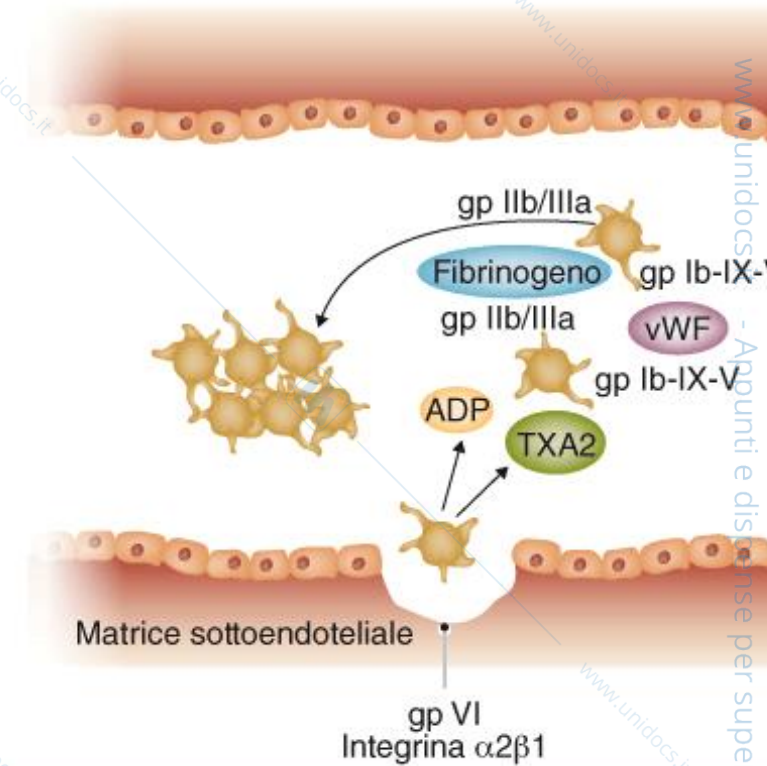


Figura 14.2: Emostasi primaria.



A cura di M. Ciaccio – G. Lippi  
Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio  
Edises

## EMOSTASI SECONDARIA (coagulazione)

Generazione del reticolo di FIBRINA

### Cascata della coagulazione del sangue:

- Sequenza di reazioni enzimatiche proteolitiche
- Attivazione in sequenze di zimogeni a enzimi proteolitici attivi
- Amplificazione del processo

Tre fasi sequenziali

- ✓ **Fase di attivazione** esposizione del **Fattore tissutale (TF)** da parte dell'endotelio
- ✓ **Fase di propagazione** della TROMBINA
- ✓ **Fase di spegnimento** previene l'eccessiva formazione del coagulo

Fattore della coagulazione

COO<sup>-</sup>

+  
Ca  
+

PO<sup>-</sup>



Fosfolipid  
negativi

Figura 14.3: Ruolo del calcio nell'emostasi secondaria.

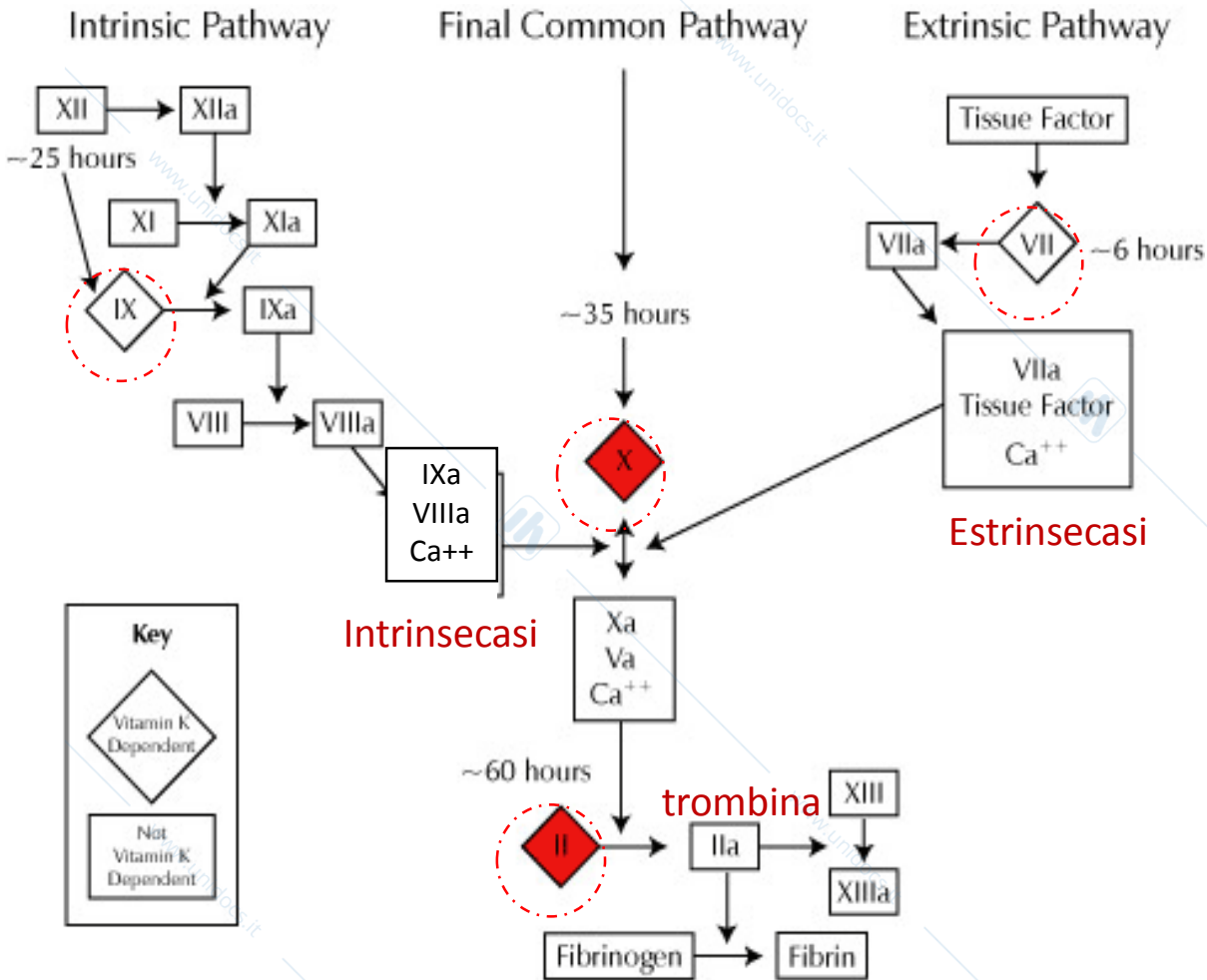


A cura di M. Ciaccio – G. Lippi

Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio

EdiSES

## Burst della trombina



## EMOSTASTASI SECONDARIA

Generazione del reticolo di FIBRINA

Tissue Factor è rilasciato dall'endotelio dannato

F = fattore proteico, proteine circolanti nel plasma sintetizzate dal FEGATO

1) TF taglia FVII e lo attiva a FVIIa  
Complesso TF-FVIIa = **estrinsecasi**

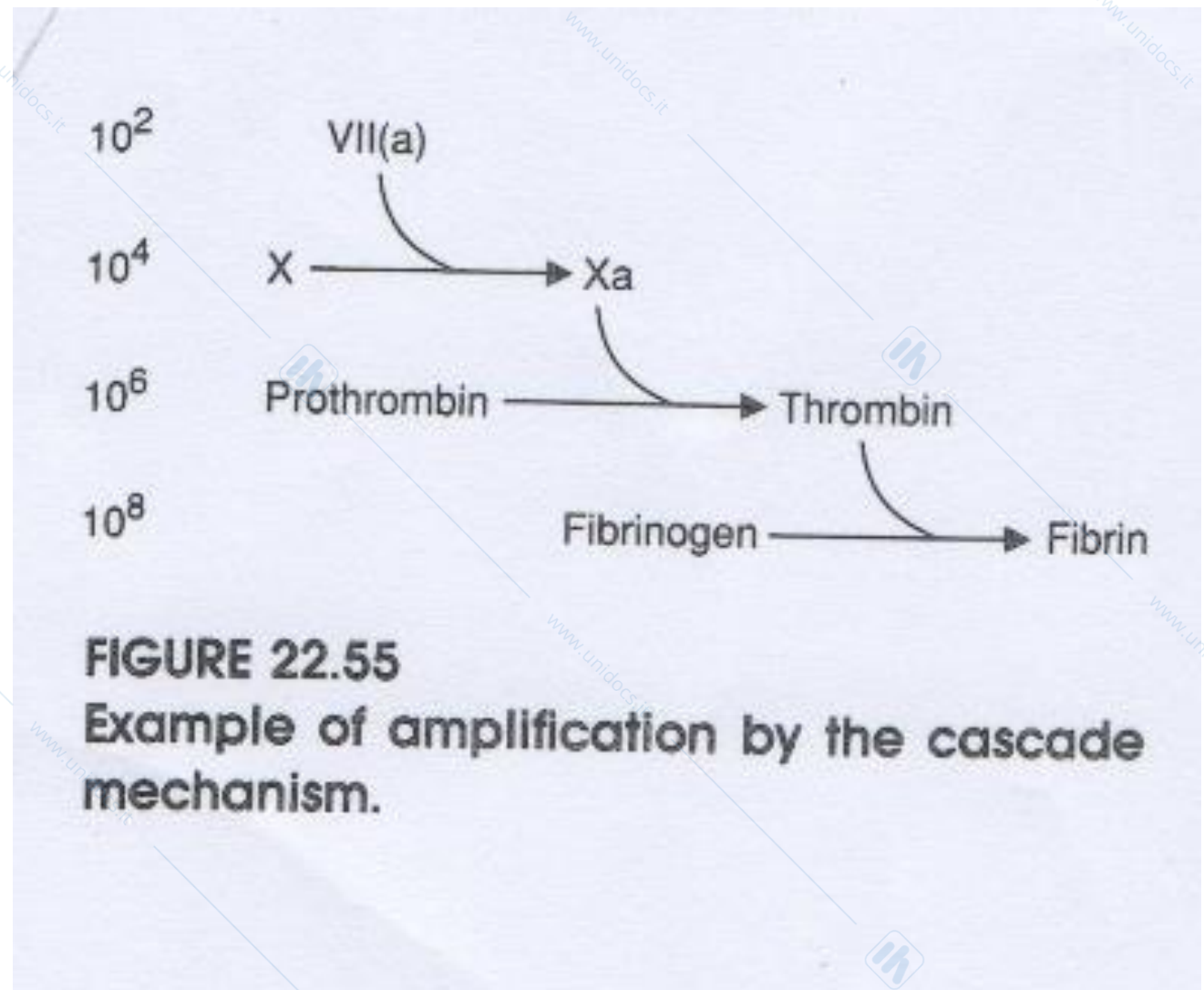
2) FX attivato a FXa attiva FII (pro-trombina) a FIIa (**trombina**)

3) FIIa (**trombina**) taglia il fibrinogeno (FBG) a fibrina che poi polimerizza

**Burst della trombina:** genera la maggior parte della trombina

**FIXa + FVIIIa = intrinsecasi**, molto più potente nell'attivare FX

# AMPLIFICAZIONE

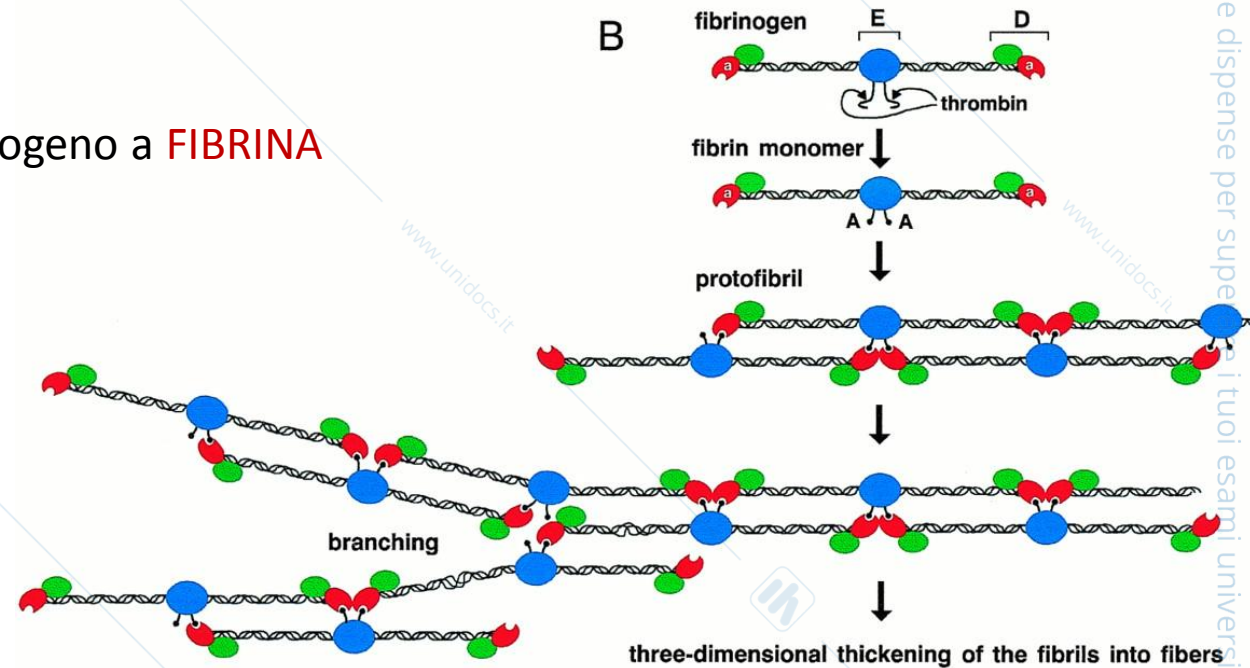
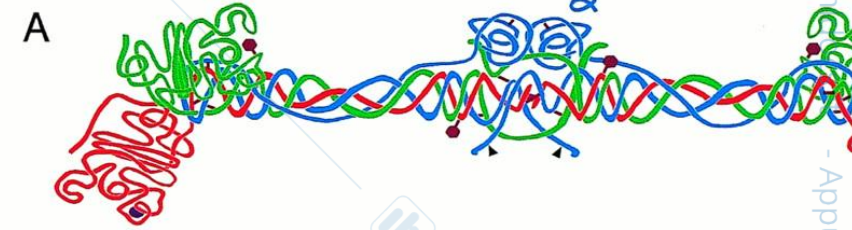


**Fibrinogeno**, dimero, MW 340 kDa.

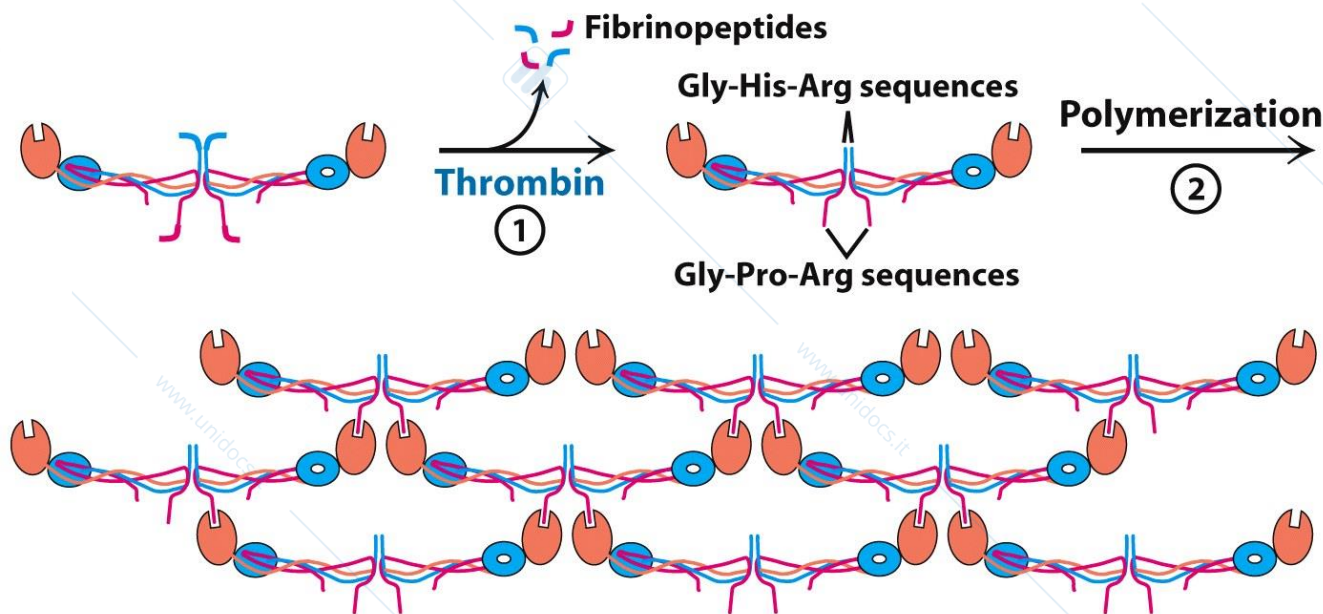
Ciascun monomero composto da tre catene (alfa, beta, gamma) caratterizzate da *Coiled-coil*

La struttura del dimero presenta tre *nodi* (regioni ingrossate): uno centrale, detto regione E, che contiene le estremità amino-terminali delle catene, e due laterali, dette D.

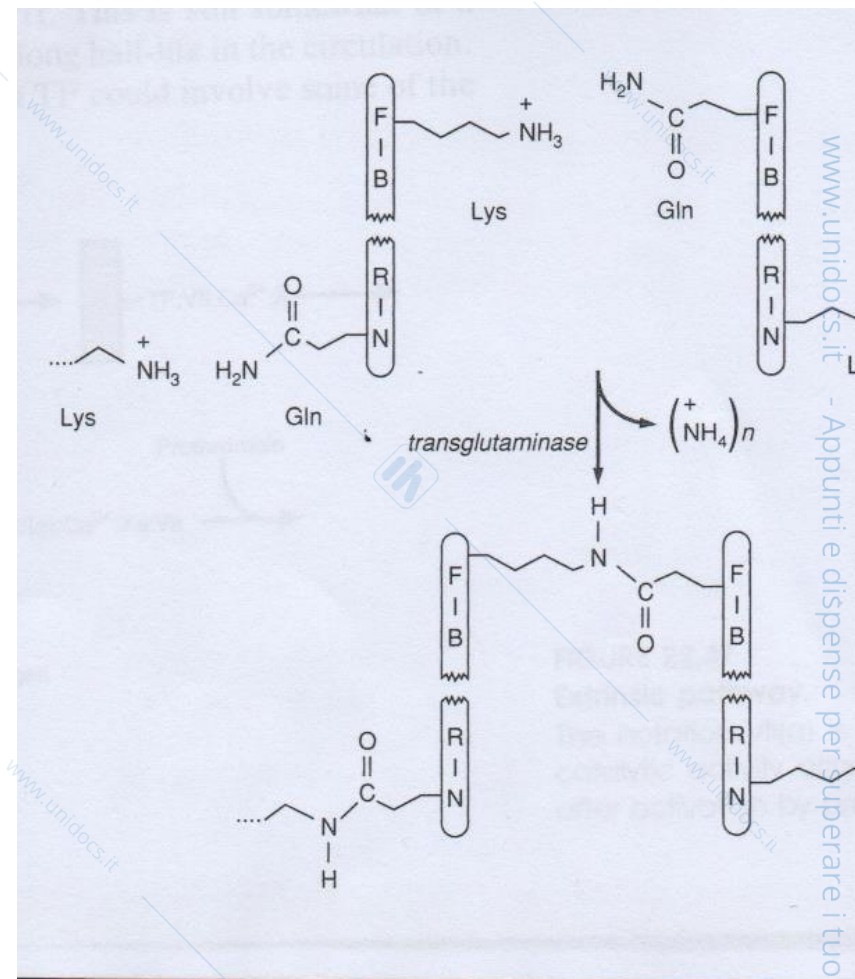
La **TROMBINA**, una serin proteasi, taglia il fibrinogeno a **FIBRINA**



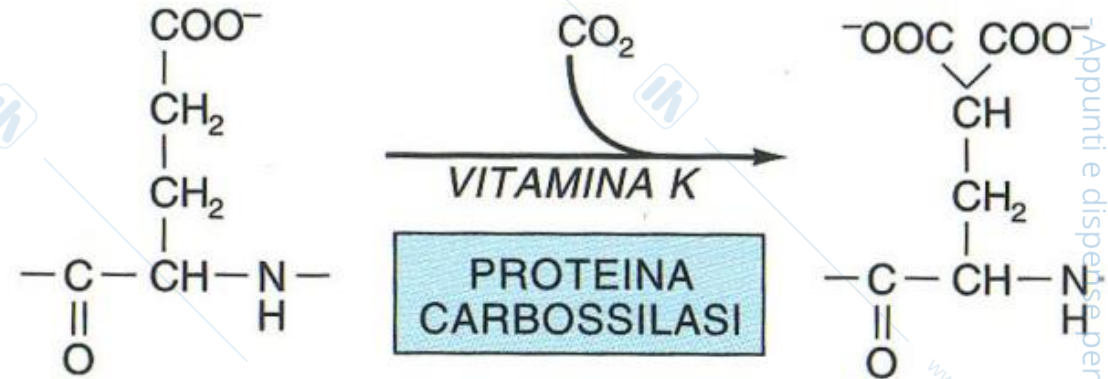
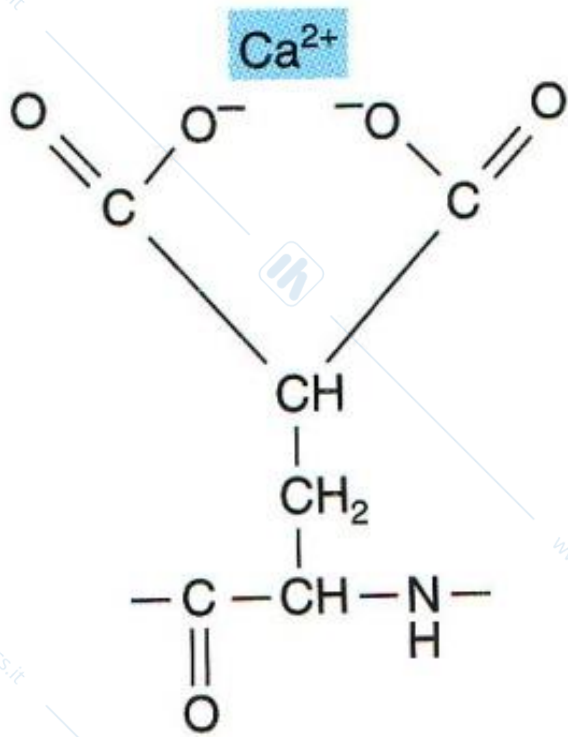
**Il polimero di fibrina è stabilizzato da legami covalenti (cross-links) grazie all'azione della transglutaminasi (FXIII)**



**Figure 10.29**  
*Biochemistry, Seventh Edition*  
 © 2012 W. H. Freeman and Company



Alcune proteine della cascata di coagulazione del sangue sono  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti  
FII, FVII, FIX, FX

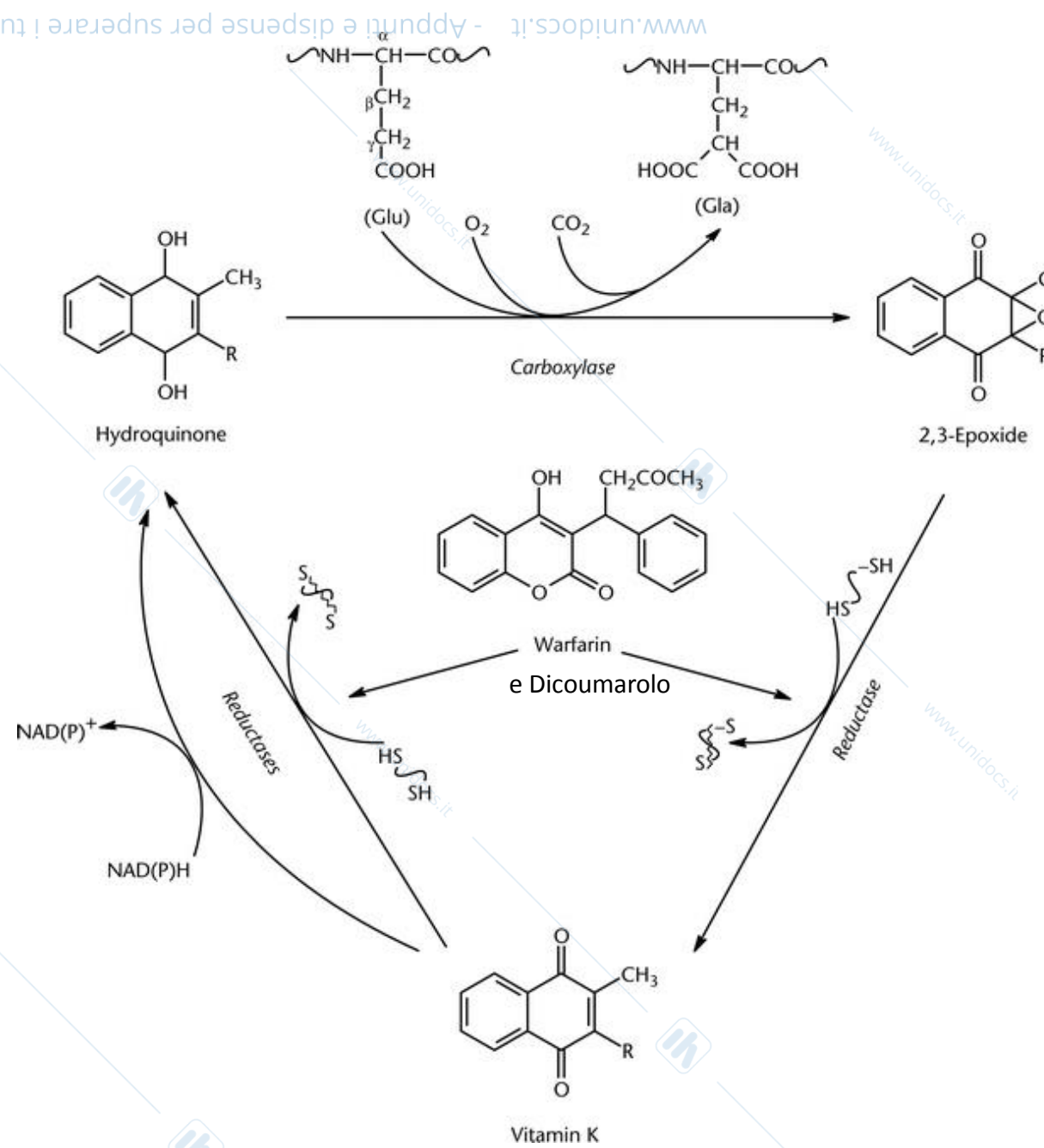


La vitamina K è il cofattore della  
**Gamma-GLUTAMMILCARBOSSILASI**

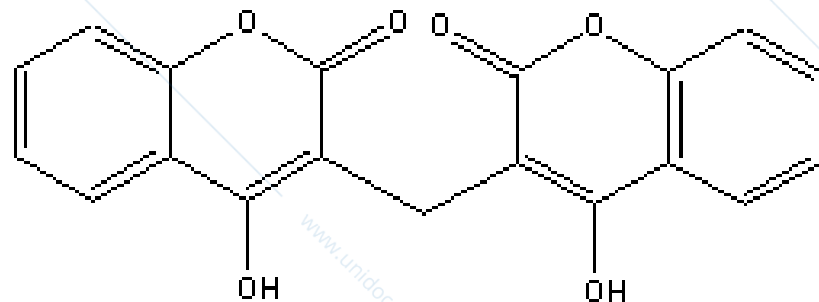
**Il  $\gamma$ -carbossiglutamato (GLA) complessa gli ioni calcio**

# Ciclo catalitico delle gamma-glutammilcarbossilasi e recupero della vitamina K attiva

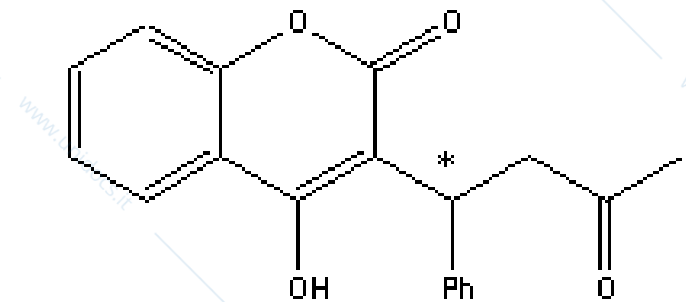
**Warfarina e dicumarolo (anticoagulanti) sono suoi inibitori**



## L'azione anticoagulante di warfarina e dicumarolo (inibitori delle reduttasi)



Dicoumarol



Warfarin

## Via estrinseca

Attivazione della coagulazione  
Attivata dal Fattore Tissutale (TF)

## Via intrinseca

Burst della trombina (fase di amplificazione)  
Attivazione da contatto

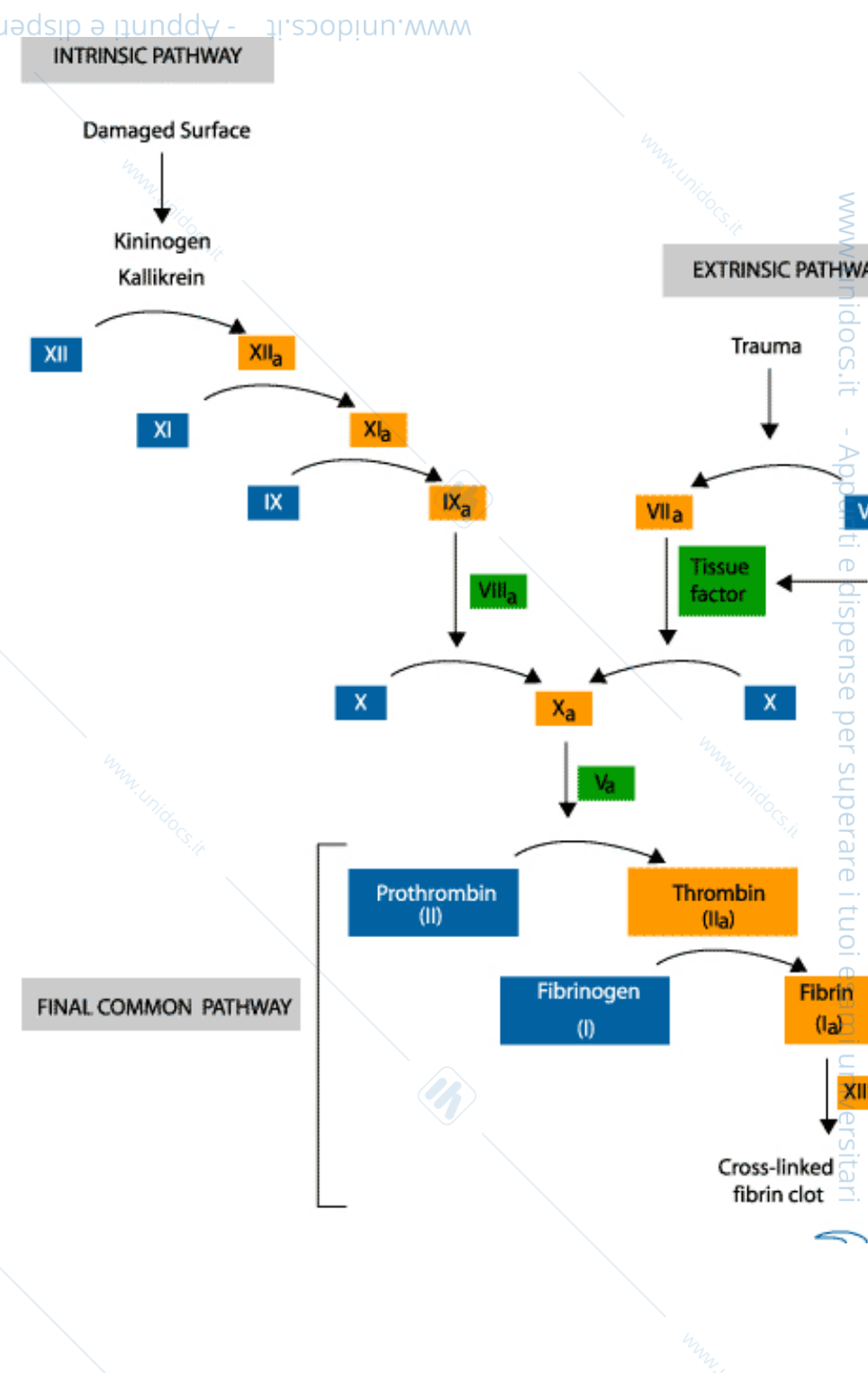
Attivata da:

Formazione di un complesso tra collagene, chininogeno e callicreina, che porta all'attivazione del FXII

Molti fattori della coagulazione sono PROTEASI a SERINA che attivano per taglio proteolitico proteine a valle

I fattori FIII, FV, FVIII, FXIII FIII, FV e FVIII sono glicoproteine

Factor XIII è una transglutaminasi.



# DIFETTI CONGENITI DEI FATTORI DELLA COAGULAZIONE

## Deficit di sintesi

o

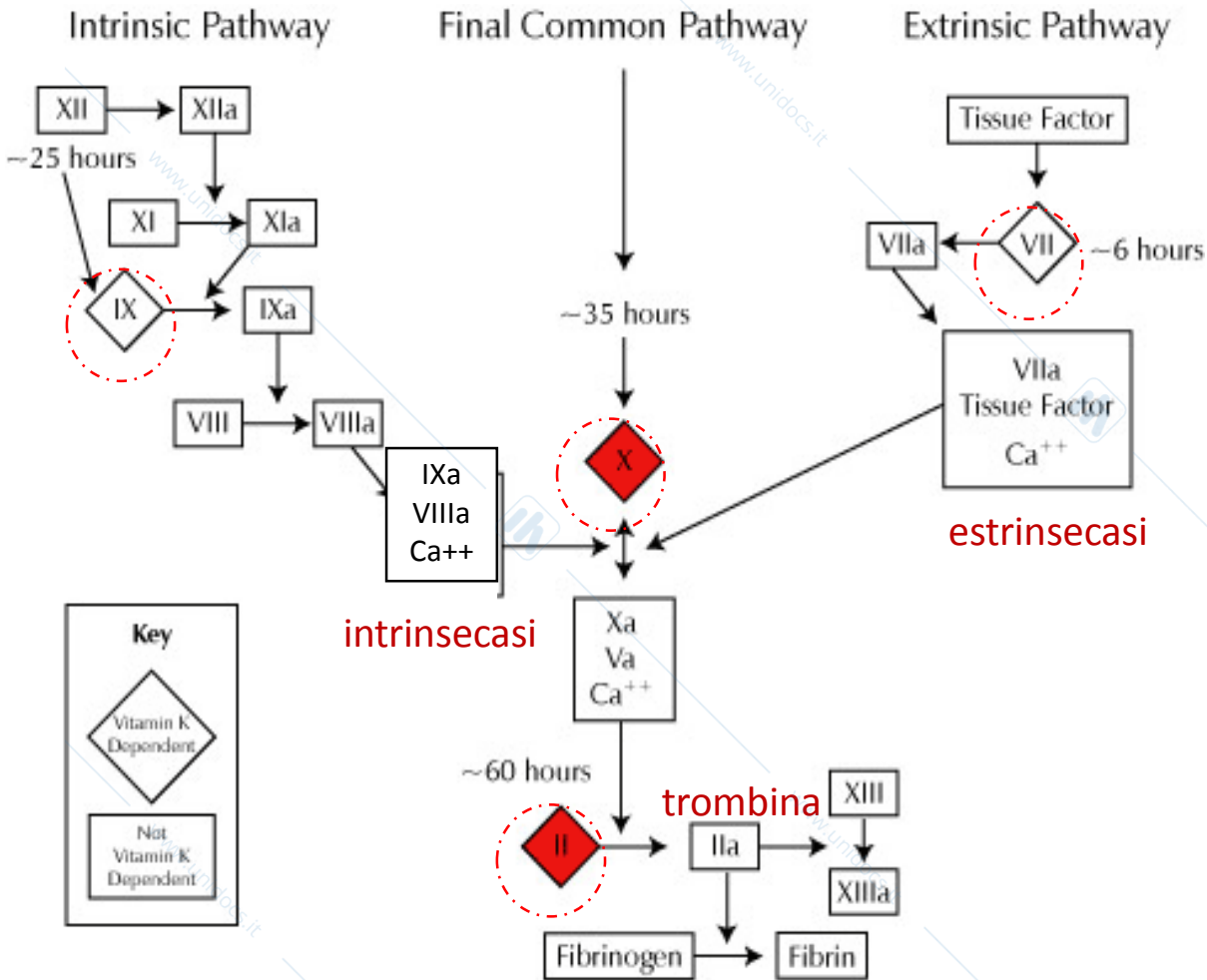
## Sintesi di fattori inattivi

- Forme severe attività < 1%
- Forme moderate 1-5%
- Forme lievi 5-40%
- Deficit asintomatico >40%

## 80 % dei fattori emorragici congeniti sono rappresentati da:

- ✓ Deficit del Fattore di Von Willebrandt (trasmissione autosomica dominante) (stabilizza in circolo il FVIII, **via**
- ✓ Deficit del Fattore VIII (emofilia A) (trasmissione autosomica recessiva, X-linked) (**via intrinseca**)
- ✓ Deficit del Fattore IX (emofilia B) (trasmissione autosomica recessiva, X-linked) (**via intrinseca**)

## Burst della trombina



## EMOSTASTASI SECONDARIA

Generazione del reticolo di FIBRINA

Tissue Factor è rilasciato dall'endotelio dannato

F = fattore proteico, proteine circolanti nel plasma sintetizzate dal FEGATO

1) TF taglia FVII e lo attiva a FVIIa  
Complesso TF-FVIIa = **estrinsecasi**

2) FX attivato a FXa attiva FII (pro-trombina) a FIIa (**trombina**)

3) FIIa (**trombina**) taglia il fibrinogeno (FBG) a fibrina che poi polimerizza

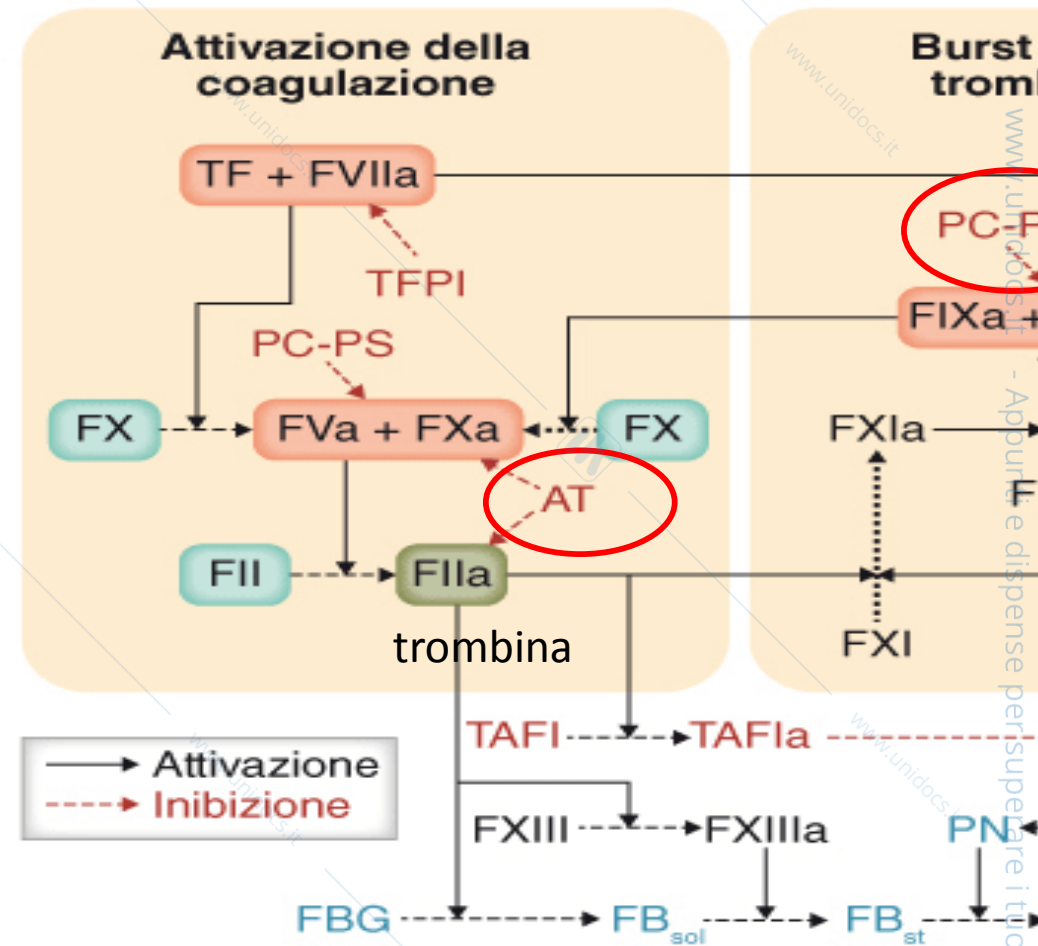
**Burst della trombina:** genera la maggior parte della trombina

**FIXa + FVIIIa = intrinsecasi**, molto più potente nell'attivare FX

# SPEGNIMENTO DELLA COAGULAZIONE

## Inibitori FISIOLGICI della coagulazione

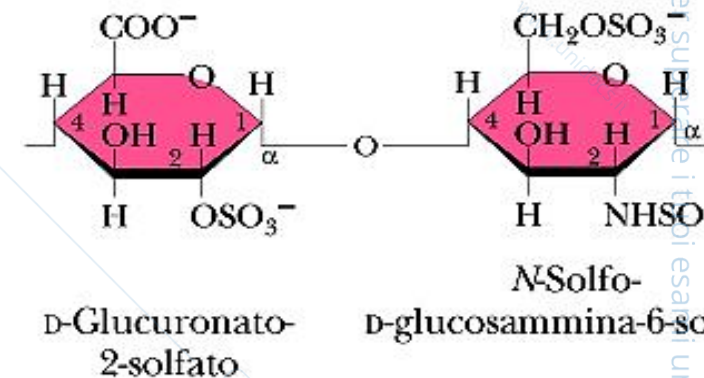
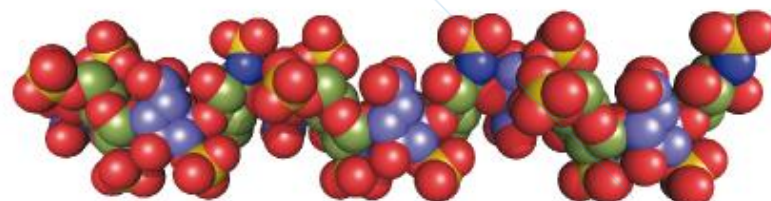
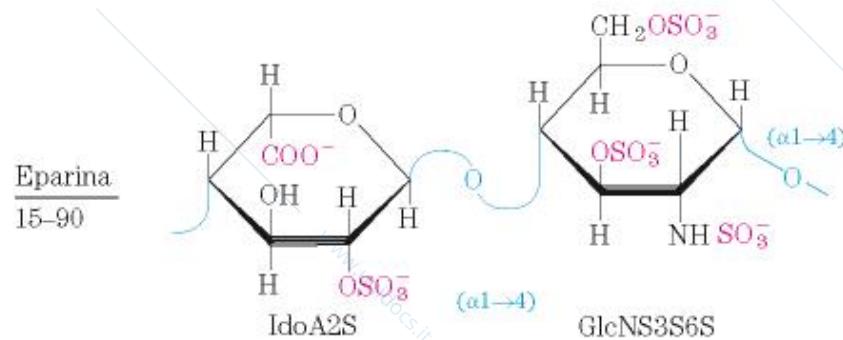
- Antitrombina (AT)
- Complesso proteina C-proteina S (PC-PS)



## ANTITROMBINA (AT): il più importante inibitore fisiologico della coagulazione

- Inibisce soprattutto FXa e trombina
- In presenza di EPARINA la sua attività aumenta di 1000 volte
- Il deficit di antitrombina è associato a trombosi venosa
- Omozigosi per la carenza è incompatibile con la vita

**Eparina:** glicosamminoglicano prodotto dai mastociti, si lega alla antitrombina. Molecola molto negativa per la presenza di numerosi gruppi solfato



**Eparina**



# FIBRINOLISI

## Attivazione del plasminogeno a plasmina

da parte di

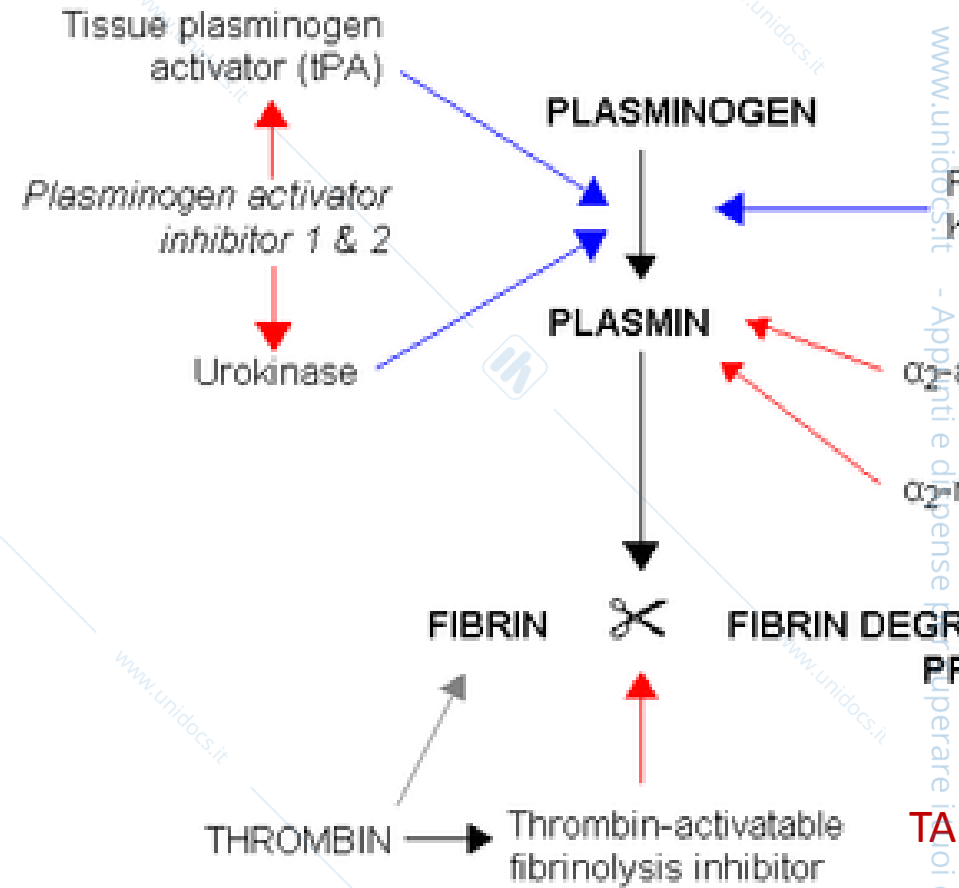
- t-PA (tissue-Plasminogen Activator)
- urochinasi (u-PA)

## Inibizione della fibrinolisi da

- TAFI (thrombin activable fibrinolysis inhibitor)

Una carbossipeptidasi

Collega la cascata coagulativa e la fibrinolisi  
in quanto è attivato da trombina e inibisce la fibrinolisi



## FIBRINOLISI

Il Fattore XIII è una transglutaminasi catalizza il cross-link della fibrina

La plasmina digerisce il polimero di fibrina (fibrinolisi)

D domini laterali della trombina  
E domini centrali della trombina

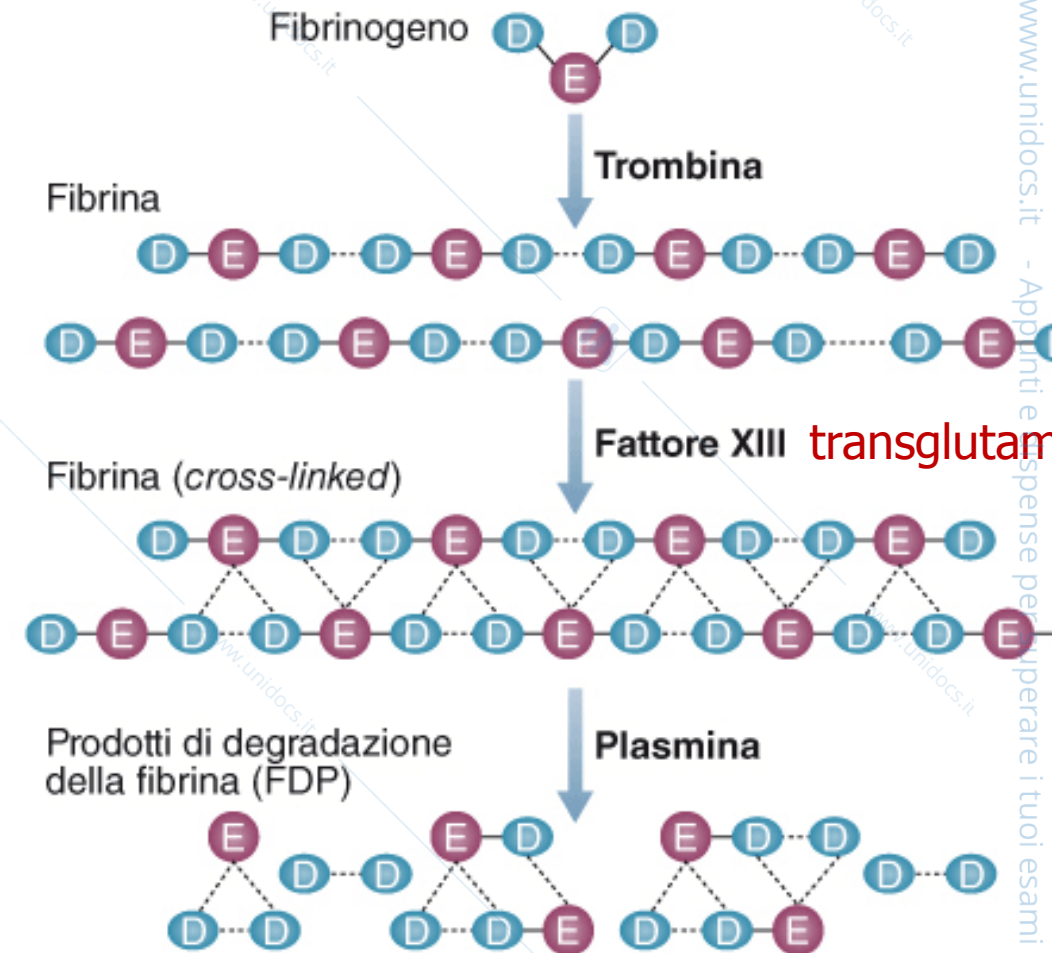


Figura 14.5: Fibrinogenesi e fibrinolisi.

## **PRODOTTI DI DEGRADAZIONE DELLA FIBRINA**

Quando la plasmina taglia la fibrina si liberano marcatori della fibrinolisi

### **Prodotti di degradazione della Fibrina (FDP), solubili**

tra questi

**frammenti contenenti il D-dimero, derivanti dalla fibrina stabilizzata da legami covalenti**

Per la diagnosi delle malattie trombotiche (eccessiva coagulabilità del sangue) es. **trombosi venosa profonda** ed **embolia polmonare**

**Si misurano mediante metodi immunometrici**

**v. r. = 0-500 ng/ml (variabile nei diversi lab.)**

# Sintomi dei disordini dell'emostasi

## Difetto

- Perdita di sangue dal naso
- Gengive sanguinanti;
- Ipermenorrea (flusso mestruale particolarmente abbondante);
- Sangue nelle feci o nelle urine;
- Anemia cronica;
- Ecchimosi ed ematomi.

## Eccesso (formazione di trombi)

- Dolore a una gamba a seguito di intervento, neoplasia, immobilità prolungata
- Dispnea acuta
- Tosse e presenza di sangue nell'espettorato

# Test di laboratorio utilizzati per lo studio dell'emostasi

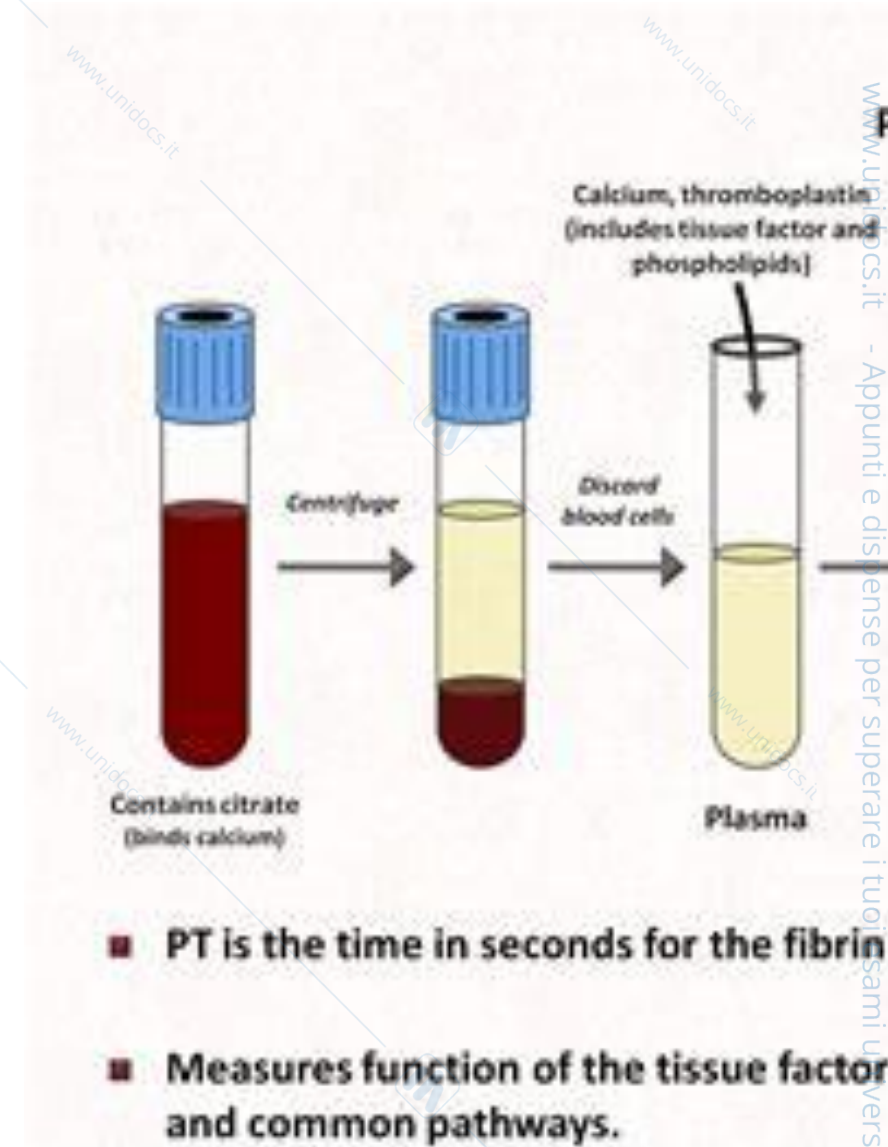
## TEMPO DI PROTROMBINA (PT)

- Per il prelievo si deve usare un anticoagulante reversibile (citrato al 3,2%, sequestra il  $\text{Ca}^{2+}$ )
- Importante il rapporto 9:1, sangue:citrato
- Centrifugazione a 1500 x g per 15 min
- Eliminare le cellule e le piastrine
- Si aggiungono  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolipidi (mimano le piastrine) e fattori tissutali (**tromboplastina ricombinante**)

**PT = PT paziente (sec)**

**v.r. 10-13 sec, 80-128%**

Si misura mediante analizzatori manuali o automatici (coagulometri)



# Oggi il PT si esprime come rapporto = **INR (International Normalized Ratio)**

Il PT può variare in base al tipo di sistema analitico utilizzato in uno specifico laboratorio.

INR rende confrontabili i risultati in diversi laboratori (e nello stesso lab) quando si utilizzano preparazioni commerciali di tromboplastine diverse

- L'OMS ha stabilito la costruzione di una retta di calibrazione usando una tromboplastina standard (**preparazione internazionale di riferimento, IRP**)
- Il valore della pendenza di questa retta di calibrazione è detto **ISI (International Sensitivity Index)**
- Ogni produttore per ogni fattore tissutale che viene fabbricato ed immesso in commercio definisce l'ISI di qu per confronto con il fattore tissutale internazionale di riferimento.
- L'**INR** è il **rapporto** tra il tempo di protrombina del paziente e quello del plasma di controllo, **elevato** al valore di ISI del sistema analitico utilizzato.

$$\text{INR} = \left[ \frac{\text{PT paziente (sec)}}{\text{PT plasma controllo (sec)}} \right]^{\text{ISI}}$$

**INR v.r. 0,8-1; 80%-120%**

Livello di INR elevato (es. INR = 5): alta probabilità di sanguinamento

Livello di INR basso (es. INR = 0,5) : alta probabilità di sviluppare un coagulo

## La misurazione di **INR** (*International Normalized Ratio*)

è richiesta per il follow-up di una terapia anticoagulante orale

(a base di antagonisti della vitamina K, come la warfarin o coumadin)

Ovvero per monitorare pazienti in **TAO** (**T**rattamento **A**nticoagulante **O**rale)

### **ERRORI NELLA VALUTAZIONE DI INR POSSONO DERIVARE DA:**

- ✓ Contaminazione del campione da parte di tromboplastina tissutale.
- ✓ Contaminazione dell'anticoagulante usato nella preparazione del campione
- ✓ Non corretto rapporto sangue - citrato di sodio (esattamente 9:1).
- ✓ Fattori che possono alterare l'analisi della lettura ottica:  
IPERLIPIDEMIA, IPERBILIRUBINEMIA, EMOLISI,  
IPERPROTEINEMIA

Il **PT** è utile per valutare cinque dei dodici fattori della coagulazione (**VII, X, V, II e I, via estrinseca e comune**)  
Quindi non risulta alterato nei pazienti emofiliaci

L'attività degli altri fattori della coagulazione (**XII, XI, IX, VIII, X, V, II I, via intrinseca e comune**) viene rilevata con  
esame ematico di laboratorio definito

## **TEMPO DI TROMBOPLASTINA PARZIALE attivata (aPTT)**

Molto utilizzato e versatile

Si utilizza la tromboplastina parziale (con fosfolipidi, ma priva di fattori tissutali) e agenti attivanti il FXII (ca)

**Si può esprimere**

**aPTT = aPTT paziente (sec)**

**Ratio = aPTT paziente (sec) / aPPT plasma controllo (sec)**

**v. r.**      28-40 secondi  
              0.7 - 1.4 (Ratio)