

IL PROCESSO EMOSTATICO

Definizione di EMOSTASI: serie di reazioni biochimiche e cellulari, sequenziali e sinergiche, finalizzate a impedire la perdita di sangue dai vasi. (schema 1) E' cioè un meccanismo di difesa deputato al **mantenimento dell'integrità dei vasi sanguigni e della fluidità del sangue**



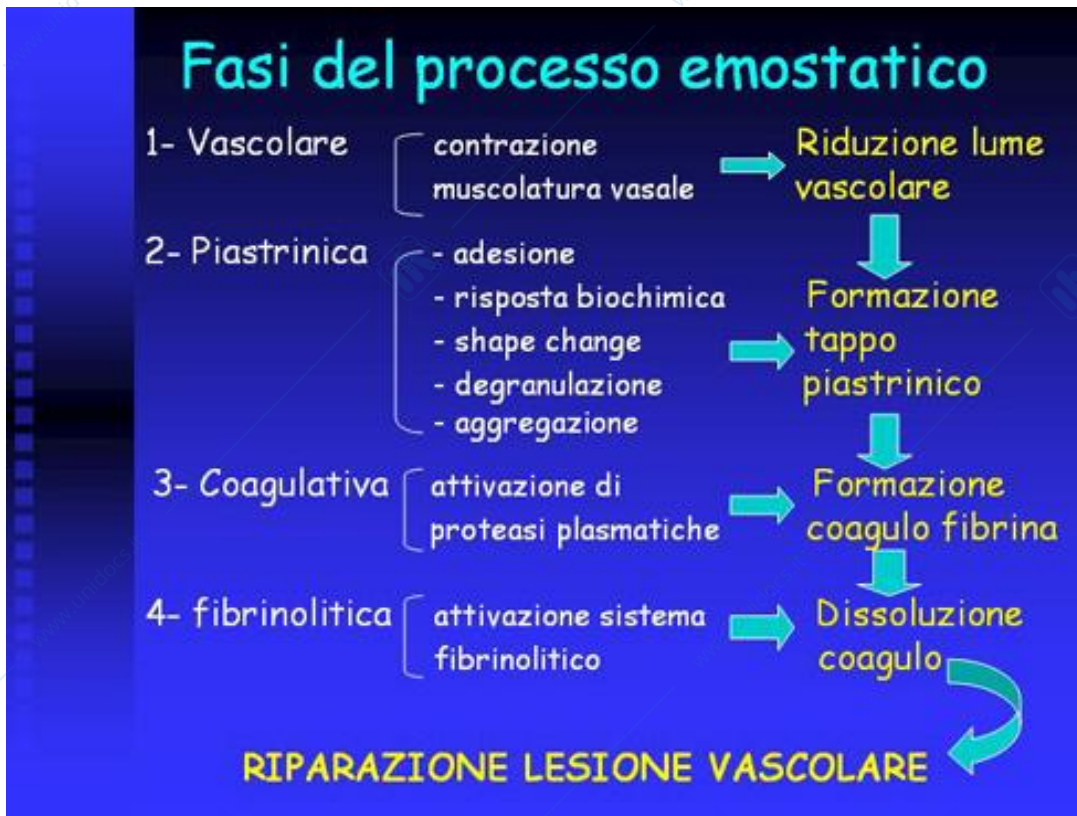
Tappe del normale processo emostatico

Quando si verifica una lesione vascolare, viene attivato il meccanismo dell'emostasi, che è un **meccanismo autoregolato**. I sistemi coinvolti nel processo emostatico sono 4

- 1- vasi e costituenti della parete vascolare
- 2- piastrine
- 3- cascata enzimatica della coagulazione
- 4- sistema fibrinolitico

Il processo emostatico può essere suddiviso in 4 fasi (schema 2), tenendo però sempre presente che i vari sistemi coinvolti si influenzano vicendevolmente e sono intimamente interconnessi. Le 4 fasi sono:

- 1- Fase vascolare
- 2 - Fase piastrinica
- 3- Fase coagulativa
- 4- Fase fibrinolitica



(schema 2)

1- All'inizio c'è un breve periodo di **vasocostrizione** (dovuto a meccanismi neurogeni riflessi e a fattori umorali come l'endotelina, che è un potente vasocostrittore di origine endoteliale). La contrazione vascolare è più evidente nei vasi con parete muscolare ben definita e **serve a ridurre momentaneamente la perdita di sangue.**

2- La lesione delle cellule endoteliali espone il tessuto connettivo sottoendoteliale altamente trombogenico, al quale le **piastrine aderiscono** entrando in uno stato di "attivazione" che comporta un cambiamento nella forma piastrinica e una reazione di esocitosi.

I fattori che si liberano dai granuli piastrinici (ADP, TXA₂, serotonina ed altri) reclutano ulteriori piastrine che **aggregano** sopra le prime, così da formare il **tappo piastrinico**. Tale reazione piastrinica avviene entro **pochi minuti** dalla lesione e, insieme alla vasocostrizione, costituisce la cosiddetta **emostasi primaria**

Se si tratta di lesioni capillari l'emostasi primaria è sufficiente a riparare il danno.

3- Se si tratta di lesioni di vasi di calibro maggiore, l'esposizione di superficie negativa e di fattore tissutale nel sito di lesione, insieme ai fattori piastrinici, attiva il **sistema della coagulazione**, che porta alla formazione di trombina. La trombina converte il fibrinogeno a fibrina, formando il **coagulo di fibrina** e stimolando un ulteriore reclutamento di piastrine. Tutto ciò richiede **più tempo** ed il processo viene definito **emostasi secondaria**. Viene quindi prodotto il **tappo emostatico secondario o permanente**. La fibrina polimerizzata e le piastrine formano una massa solida che tampona l'emorragia nel sito della lesione.

L'emostasi è un processo di emergenza volto ad arrestare le perdite di sangue. E' un meccanismo finemente controllato che tende a localizzare il coagulo nel sito della lesione, prevenendo così una reazione a catena (questa potrebbe provocare un'estesa coagulazione: la coagulazione di 1 ml di sangue produce trombina in grado di far coagulare il fibrinogeno presente in 3 litri di sangue).

4- Una volta che la lesione vascolare è stata riparata si verifica la **dissoluzione del coagulo** stesso mediante il **processo della fibrinolisi**.

Tutti i meccanismi deputati al mantenimento della fluidità del sangue e dell'integrità dell'apparato vascolare, per essere efficaci devono intervenire rapidamente e devono rimanere il più possibile confinati a livello della lesione. Questo obiettivo viene raggiunto mediante un complesso **sistema di controllo** ad opera di **inibitori** specifici sia dei fattori della coagulazione che della fibrinolisi. Tale sistema di controllo è complesso ed estremamente efficace e le concentrazioni plasmatiche delle molecole di controllo sono molto più elevate di quelle dei fattori sui quali agiscono.

Nell'organismo integro vi è sempre una certa attivazione del sistema emostatico. Infatti, anche in condizioni fisiologiche, non esiste un'assoluta integrità vascolare: continui microtraumi determinano minime lesioni endoteliali per cui una parte del fibrinogeno viene continuamente convertito in fibrina, viene cioè innescata la cosiddetta "**emostasi fisiologica**". In uno stato di **equilibrio emostatico funzionale** la fibrina viene continuamente rimossa mediante il processo della fibrinolisi. L'emostasi fisiologica risulta da un equilibrio fra i meccanismi favorenti il processo emostatico nella sua generalità ed i sistemi ad esso antagonisti.

Lo spostamento dell'equilibrio nel senso di un aumento o di una diminuzione dell'attività emostatica ha importanti conseguenze patologiche. Nonostante le **alterazioni dell'emostasi** possano essere dovute a numerose cause e seguire molte vie patogenetiche, le manifestazioni cliniche finali si possono ricondurre a due quadri fondamentali:

- una **incontrollata attivazione intravasale dell'emostasi**, che dà luogo a manifestazioni trombotiche: **MALATTIE TROMBOTICHE**
- un **deficit del sistema emostatico**, che dà luogo a manifestazioni emorragiche: **MALATTIE E SINDROMI EMORRAGICHE**

MECCANISMI FISIOLGICI DELL'EMOSTASI

1- Fase vascolare

Il primo evento che si verifica nell'emostasi è una contrazione vascolare a livello della zona lesa. I meccanismi di vasocostrizione sono più efficienti nei vasi dotati di una spessa tunica vascolare con presenza di cellule muscolari lisce (tunica media), ma avvengono anche a livello dei capillari ad opera di proteine contrattili presenti nelle cellule endoteliali. La vasocostrizione è dovuta a vari fattori: -risposta diretta delle fibrocellule muscolari allo stiramento provocato dal trauma, -riflesso neurovegetativo vasomotore (stimolazione dei *nerva vasorum*), -liberazione locale di sostanze vasocostrittrici ad opera prima delle cellule endoteliali (**endotelina**, polipeptide di 21 aminoacidi, la cui secrezione è inibita dal flusso turbolento del sangue, in condizioni fisiologiche) e, in fase più tardiva, dalle piastrine (liberazione della serotonina contenuta nei granuli delta). Questo processo sarebbe di scarsa utilità se non intervenissero le piastrine, con i processi di adesione, aggregazione e liberazione di vari fattori dai granuli e, in caso di lesioni estese, il sistema della coagulazione.

La fase vascolare è comunque estremamente importante (soprattutto in caso di lesione dei grossi vasi) perché: a) permette di ridurre il deflusso di sangue attraverso il vaso danneggiato, riducendo in tal modo l'entità dell'emorragia; b) favorisce i fenomeni di marginazione delle piastrine, con conseguente loro attivazione (fase piastrinica dell'emostasi); c) favorisce l'accumulo locale dei fattori della coagulazione attivati in seguito alla esposizione del tessuto sottoendoteliale o in seguito alla liberazione della tromboplastina tissutale (fase della coagulazione).

2- Fase piastrinica

L'endotelio veniva in passato considerato come una semplice barriera non trombogenica, negli ultimi anni invece si è dimostrato che **l'endotelio è un tessuto metabolicamente attivo**, che, a seconda del suo stato funzionale, può o favorire o inibire l'emostasi. In stato di quiescenza l'endotelio è in grado di assicurare la fluidità del sangue mediante un complesso meccanismo anticoagulante mentre, in seguito ad una lesione, la perdita della cellula endoteliale costituisce il punto di avvio del processo di emostasi localizzata, attraverso l'induzione coordinata di attività pro-emostatiche che iniziano con l'adesione piastrinica.

Le piastrine o trombociti sono cellule secernenti senza nucleo, a forma discoidale, di dimensioni comprese fra 1 e 4 μ m di diametro e di 1 μ m di spessore, che circolano nei vasi senza aderire alla parete vascolare. Nel soggetto normale il numero delle piastrine varia da 150.000 a 400.000/mm³. Si parla di **piastrinopenia o trombocitopenia** quando il numero delle piastrine è inferiore a 100.000/mm³ e di **piastrinosi o trombocitosi** per valori superiori a 500.000/mm³. Le piastrine sono frammenti citoplasmatici di una cellula progenitrice midollare multinucleata, il **megacariocita**. La trombopoiesi o piastrinopoiesi è regolata da un fattore presente nel siero, la **trombopoietina**, che è in grado di aumentare non solo la produzione di piastrine, ma anche la proliferazione dei megacariociti. Anche l'interleuchina-11 (IL-11) ha attività trombopoietica. La produzione di piastrine può aumentare notevolmente (7-8 volte) in seguito ad attivazione dell'emostasi o a stimolazione del midollo. Le piastrine appena immesse in circolo sono più grandi ed hanno un'attività emostatica maggiore rispetto alle piastrine circolanti mature. Le piastrine sopravvivono in circolo per circa 10-12 giorni (emivita 5-6 giorni) e successivamente vengono sequestrate dagli organi emocateretici (principalmente dalla milza e dal fegato), dove vengono fagocitate dalle cellule del sistema dei fagociti mononucleati. La loro forma è controllata dal citoscheletro e in particolare da un **fascio circonferenziale di microtubuli**, situato all'equatore del disco, e da microfilamenti contrattili ancorati alle membrane cellulari. A parte l'assenza del nucleo, sono presenti tutti i principali componenti subcellulari, mitocondri, granuli di glicogeno, lisosomi. La membrana plasmatica è rivestita all'esterno da un caratteristico strato di polisaccaridi e lipo/glicoproteine, detto **glicocalice**. (schema 4a) Del glicocalice fanno parte i recettori, che mediano le più importanti funzioni piastriniche e tutte le glicoproteine coinvolte nell'adesione e nell'aggregazione)

LE PROTEINE DELLA SUPERFICIE PIASTRINICA

FUNZIONE	classif. elettroforetica	classif. Integrinica
Rec. Collageno	GpIa/IIa	α_2/β_1
Rec. Fibronectina	GpIc/Iia	α_5/β_1
Rec. Vitronectina		α_v/β_3
Rec. Fibrinogeno	GpIIb/IIIa	α_{IIb}/β_3
Rec. Laminina	GpIc/IIa	α_6/β_1
Rec. vWF	GpIb/IX	non integrina
Rec. Collageno o trombospondina	GpIV	non integrina

(schema 4a)

Alla membrana piastrinica è associata una attività procoagulante, il cosiddetto fattore piastrinico 3 (si tratta dei fosfolipidi della membrana piastrinica, i quali forniscono la fase solida sulla quale avvengono le interazioni fra i vari fattori della coagulazione, quando la cascata coagulativa viene attivata). Nelle piastrine la membrana plasmatica si inflette a formare un sistema di invaginazioni, che costituiscono il **sistema canalicolare aperto** (che determina un aumento di superficie per gli scambi con l'esterno e, quindi, rapida via di secrezione dei granuli al momento dell'attivazione piastrinica). Tra le membrane interne è molto importante il reticolo endoplasmatico liscio, detto anche **sistema tubulare denso**, che rappresenta la principale riserva di calcio non mitocondriale coinvolto nella risposta piastrinica.

Le piastrine contengono tre tipi di granuli (schema 4b): **lisosomi**, **granuli densi (detti anche granuli delta)** ed **alfa-granuli**.



(schema 4b)

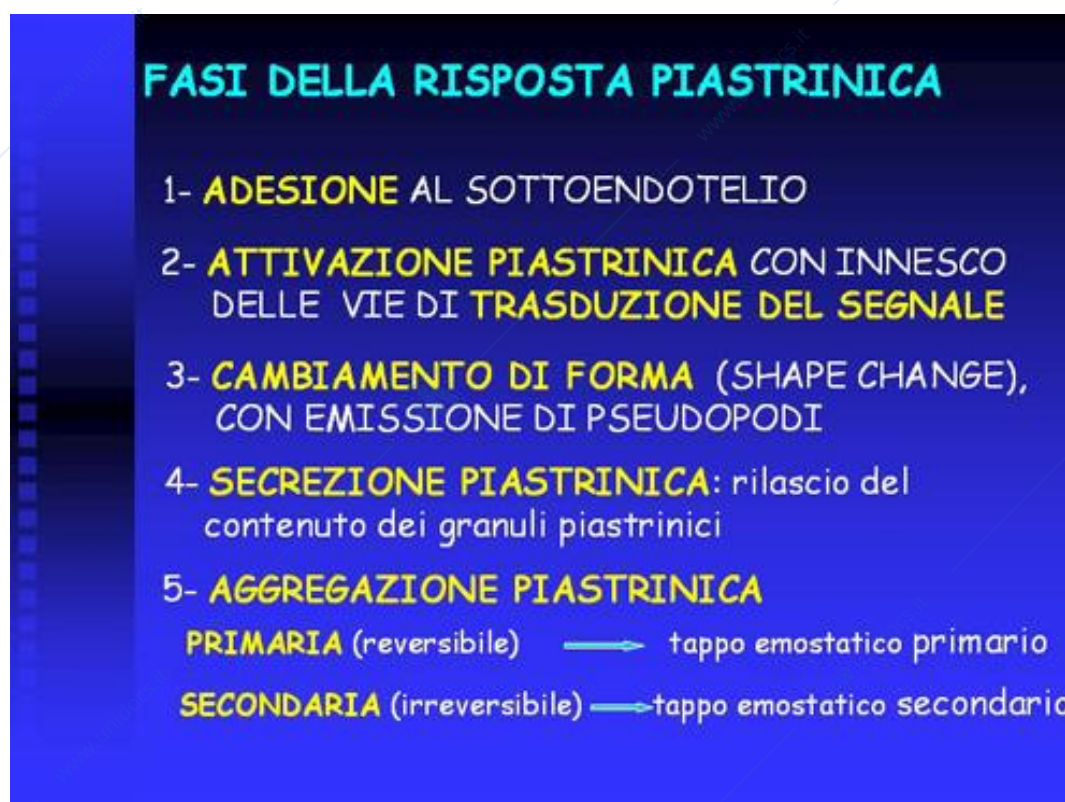
Il contenuto di questi ultimi due viene secreto durante la risposta piastrinica, attraverso il sistema canalicolare aperto o attraverso la membrana plasmatica, direttamente nel microambiente sede dell'aggregazione piastrinica. I granuli densi rappresentano il sito di deposito dei nucleotidi adenilici, contengono anche serotonina e sono meno numerosi degli α -granuli. Questi ultimi contengono proteine specifiche delle piastrine, che possono essere suddivise in proteine adesive, modulatori positivi e negativi della crescita cellulare e fattori della coagulazione e della fibrinolisi. Gli α -granuli contengono anche la beta-tromboglobulina, che è un inibitore della sintesi di prostaciclina endoteliale, rilasciata in fase di attivazione.

Fasi della risposta piastrinica

In seguito al danno vascolare, le piastrine sono esposte al sottoendotelio, cioè collagene, proteoglicani, fibronectina ed altre glicoproteine e questo ne determina l'**attivazione**. La **risposta piastrinica** comporta mutamenti di ordine biochimico, strutturale e morfologico delle piastrine stesse (schema 5).

La risposta delle piastrine ad uno stimolo è dovuta all'intervento coordinato della membrana, dei granuli e del citoscheletro e può essere suddivisa in varie fasi che tendono a sovrapporsi:

- 1- [adesione e attivazione](#)
- 2- [cambiamento di forma \(shape change\)](#)
- 3- [secrezione dei granuli \(release reaction\)](#)
- 4- [aggregazione](#)



Adesione ed attivazione piastrinica

Per adesione si intende la capacità delle piastrine di legarsi al sottoendotelio esposto in seguito al danno endoteliale, essenzialmente al collagene. Ciò determina l'attivazione piastrinica con innesco delle vie di trasduzione del segnale (vedi risposta biochimica).

Le piastrine circolanti, in conseguenza alla riduzione della velocità del flusso sanguigno, secondaria ai fenomeni di vasocostrizione della fase vascolare dell'emostasi, si spostano dal centro alla periferia del vaso ("marginazione delle piastrine") e possono quindi con più facilità aderire alle strutture esposte in seguito alla lesione vasale.

Il processo di adesione, come pure l'aggregazione piastrinica, dipende dalla presenza di molecole di adesione presenti sulla superficie delle piastrine, che, per la maggior parte, appartengono alla superfamiglia delle **INTEGRINE** (schema 4a). Le integrine sono molecole composte da due catene peptidiche unite da un legame non covalente, denominate alfa e beta. Esistono vari tipi sia di catene alfa che di catene beta: la diversità fra le integrine è data dalle varie combinazioni delle differenti isoforme delle due catene. Alcune di queste molecole sono presenti in forma funzionale sulle piastrine circolanti: è il caso dell'**integrina GPIa/GPIIa** (detta anche VLA2: "very late antigen") che ha la capacità di legarsi al collagene. E' quindi funzionalmente inerte quando l'endotelio è

sottolineare che le interazioni tra collagene, proteine adesive (vWF, TSP, fibrinogeno) e superficie piastrinica, vengono “stabilizzate” dal “cross-linking” operato dal fattore XIII della coagulazione.

Cambiamento di forma delle piastrine

Con l'adesione delle piastrine al sottoeンドotelio nel punto di lesione viene generata una cascata di segnali che porta al cambiamento di forma delle piastrine stesse ed alla reazione di rilascio del contenuto dei granuli piastrinici. (schema 7).



(schema 7)

Il **cambiamento di forma** consiste in una veloce trasformazione dalla classica forma discoidale della piastrina circolante a riposo ad una forma irregolarmente sferica, con pseudopodi, dapprima corti, poi sempre più lunghi, fino a rendere possibile il contatto tra piastrine vicine, assumendo un aspetto a sfera spinosa (spiny sphere). In questo fenomeno è coinvolta la maggior parte delle molecole del citoscheletro: si ha la destrutturazione del fascio equatoriale dei microtubuli e la loro parziale depolimerizzazione, seguita da polimerizzazione e contrazione dei filamenti di actina associati alle membrane. Il cambiamento di forma è strettamente dipendente dall'ATP (vedi alterazioni della funzione piastrinica nei soggetti con malattie genetiche che alterano la fosforilazione ossidativa).

Se lo stimolo che ha attivato la piastrina è stato debole o di breve durata, questa riacquista rapidamente la morfologia iniziale ed è del tutto indistinguibile morfologicamente dalla piastrina che non è stata mai attivata. Le piastrine che ritornano allo stato morfologico iniziale possono non rispondere, per un certo periodo di tempo, ad una seconda stimolazione, nemmeno se questa è di maggiore intensità rispetto alla prima (“refrattarietà piastrinica”: probabile meccanismo di controllo, che tende ad autolimitare il processo di attivazione piastrinica). Se invece lo stimolo di attivazione è più forte, al cambiamento di forma seguono altri fenomeni, come la reazione di rilascio del contenuto dei granuli e l'aggregazione. Dal punto di vista funzionale il cambiamento di

forma ha una conseguenza importante: rende “disponibile” a livello della membrana piastrinica il Fattore Piastrinico 3 (F.P.3). Il F.P.3 è un fosfolipide (fosfatidilserina) che, nella piastrina a riposo, è situato principalmente sul versante interno della membrana plasmatica ed è quindi inaccessibile: il cambiamento di forma comporta un riassetto della membrana plasmatica che espone all'esterno il F.P.3 (“flip-flop” delle fosfatidilserine), che è implicato in alcune reazioni della coagulazione: infatti, la membrana piastrinica particolarmente arricchita di fosfatidil-serina costituisce una superficie ottimale per l'assemblaggio dei complessi multimolecolari critici per l'avvio ed il mantenimento del processo di coagulazione (complesso tenasico e complesso pro-trombinasico).

Secrezione dei granuli (release reaction)

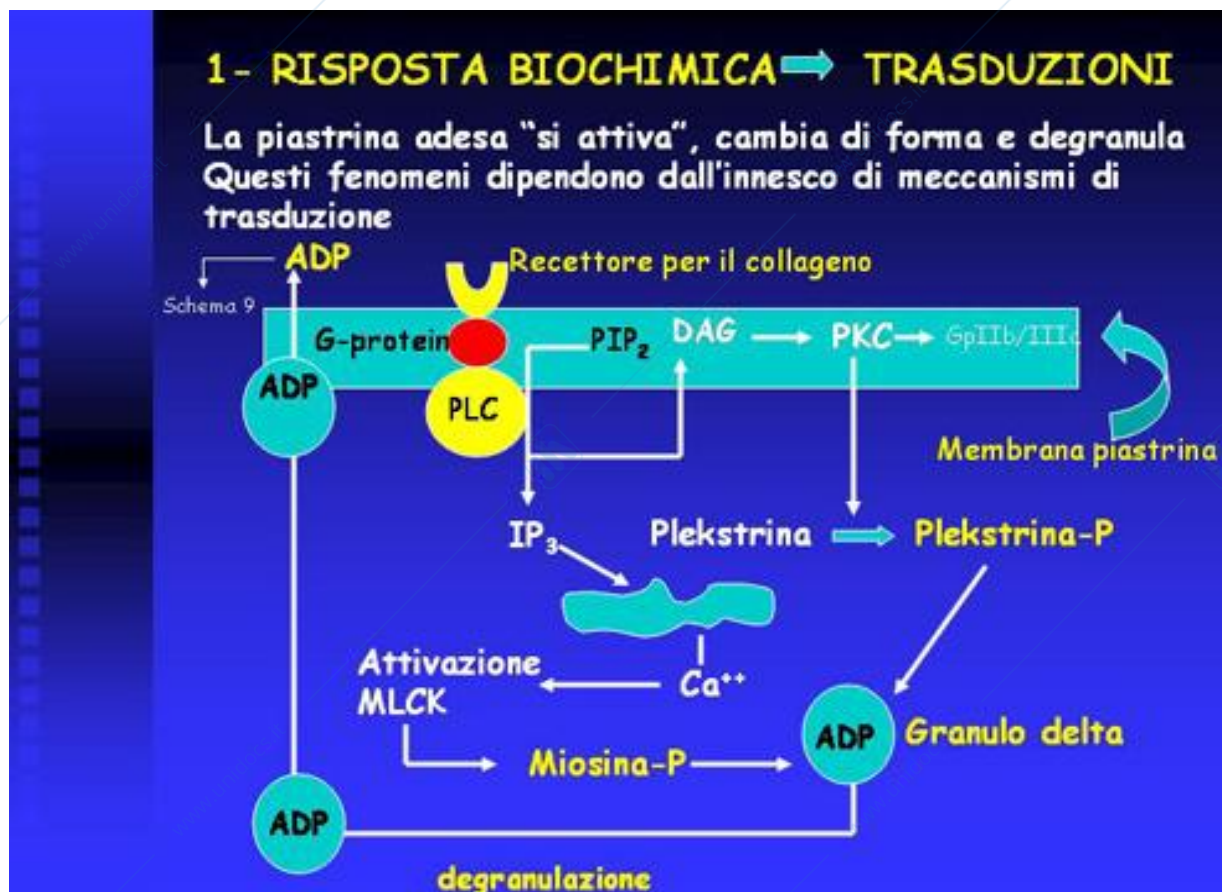
La **secrezione delle piastrine** (schema 7) avviene subito dopo l'adesione ed è un fenomeno attivo (legato anche all'aumento della concentrazione di calcio nelle cellule) che determina il rilascio del contenuto dei granuli piastrinici all'esterno.

Associato ai fenomeni contrattili che danno luogo al cambiamento di forma delle piastrine vi è, infatti, il trasporto dei granuli vicino al sistema canalicolare aperto (**centralizzazione dei granuli**), fusione della membrana del granulo con quella del canalicolo e quindi secrezione del contenuto. Il meccanismo della secrezione dei granuli è dipendente dall'energia (ATP) e dal citoscheletro.

Nei granuli sono presenti in alta concentrazione molecole capaci di mantenere ed amplificare la risposta fin qui limitata a poche piastrine. ADP, Ca^{++} , serotonina, fibrinogeno, trombospondina e la trombina generata dalla contemporanea attivazione della coagulazione, costituiscono tutti dei potenti **agonisti** dell'aggregazione: la superficie piastrinica è infatti dotata di recettori per tali molecole, le quali inducono una potente risposta biochimica (trasduzione del segnale).

Trasduzione del segnale (Risposta biochimica):

Sinteticamente, durante l'attivazione piastrinica vengono attivati sequenzialmente gli enzimi fosfolipasi C e fosfolipasi A₂, che sono situati sul versante interno della membrana piastrinica (schema 8)



(schema 8)

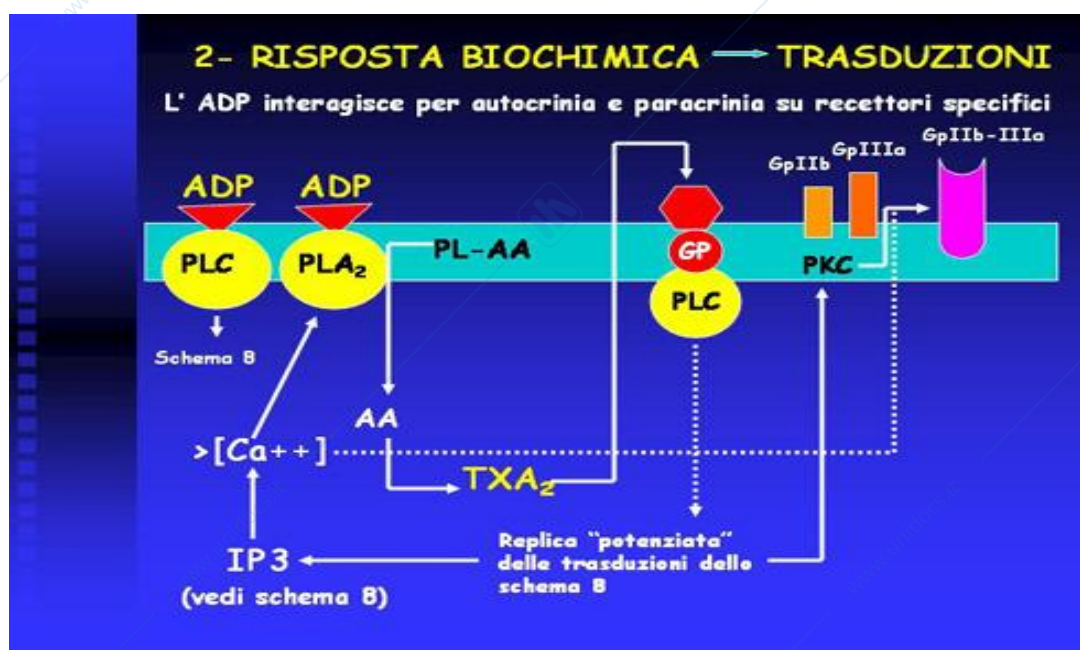
L'interazione del collagene con i recettori della superficie piastrinica attiva l'enzima fosfolipasi C (PLC), accoppiato a tali recettori mediante una proteina G di trasduzione. La stimolazione recettore-dipendente di tale proteina G regola positivamente l'attività della fosfolipasi C, enzima chiave delle vie di trasduzione, a sua volta in contatto con il lato citoplasmatico della membrana piastrinica.

L'attività della **Fosfolipasi C** sul fosfatidilinositolo (PIP_2) genera due mediatori il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo-trifosfato (IP_3). Il DAG attiva la protein-chinasi C (PKC), responsabile della fosforilazione di una proteina di PM 47KD, chiamata **plekstrina**, che regola a sua volta la secrezione dei granuli piastrinici. Sembra inoltre che l'attivazione della PKC sia associata al meccanismo di "fusione" delle integrine GPIIb e GPIIIa (schema 8), le quali formano sulla superficie piastrinica una sola molecola, chiamata "complesso glicoproteico IIb-IIIa", fondamentale per l'aggregazione piastrinica. IP_3 , per il quale esistono recettori sulle membrane di vescicole che contengono i depositi intra-piastrinici di calcio non mitocondriale, induce il rilascio degli ioni calcio nel citosol, con attivazione della cosiddetta "myosin light chain kinase" (MLCK). Ne consegue la fosforilazione delle catene leggere di miosina che, interagendo con l'actina, provocano un accorciamento di queste strutture fibrillari e, conseguentemente, la modificazione di forma delle piastrine e la liberazione all'esterno delle sostanze contenute nei granuli.

Tra queste sono comprese l'ADP e la serotonina, che attivano a loro volta altre piastrine ed accrescono il numero degli elementi coinvolti nell'aggregazione (meccanismo di auto-amplificazione della risposta piastrinica).

Infatti, l'ADP rilasciato dai granuli delta interagisce con propri recettori per autocrinia e paracrinia, innescando al contempo due vie di trasduzione: una accoppiata alla attivazione del ciclo del fosfatidil inositolo (come quella attivata dai recettori del collagene), ed una seconda che consiste nella attivazione "diretta" della fosfolipasi A2. È importante sottolineare che la attivazione della fosfolipasi A2, enzima chiave per il proseguimento della risposta piastrinica, avviene, oltre che per accoppiamento al recettore dell'ADP, anche grazie all'aumento del Ca^{++} intracitoplasmatico che aveva determinato fosforilazione della MLCK. A questo punto ci sono due alternative: se lo stimolo che ha condotto al rilascio di ADP è quantitativamente insufficiente e/o limitato nel tempo, l'inizio della aggregazione piastrinica (ponti di fibrinogeno tra complessi glicoproteici IIb/IIIa delle piastrine attivate) è reversibile e l'iniziale aggregato va incontro a dissoluzione. Se lo stimolo è di maggiore entità, esso determina la liberazione di grandi quantità di ADP ed allora la potente attivazione della fosfolipasi A2 porta alla produzione di grandi quantità di trombossano A2, che innesca cicli di trasduzione che rendono l'aggregazione irreversibile.

L'attivazione della **Fosfolipasi A2** (PLA_2), che è un enzima calcio-dipendente (schema 9)



(schema 9)

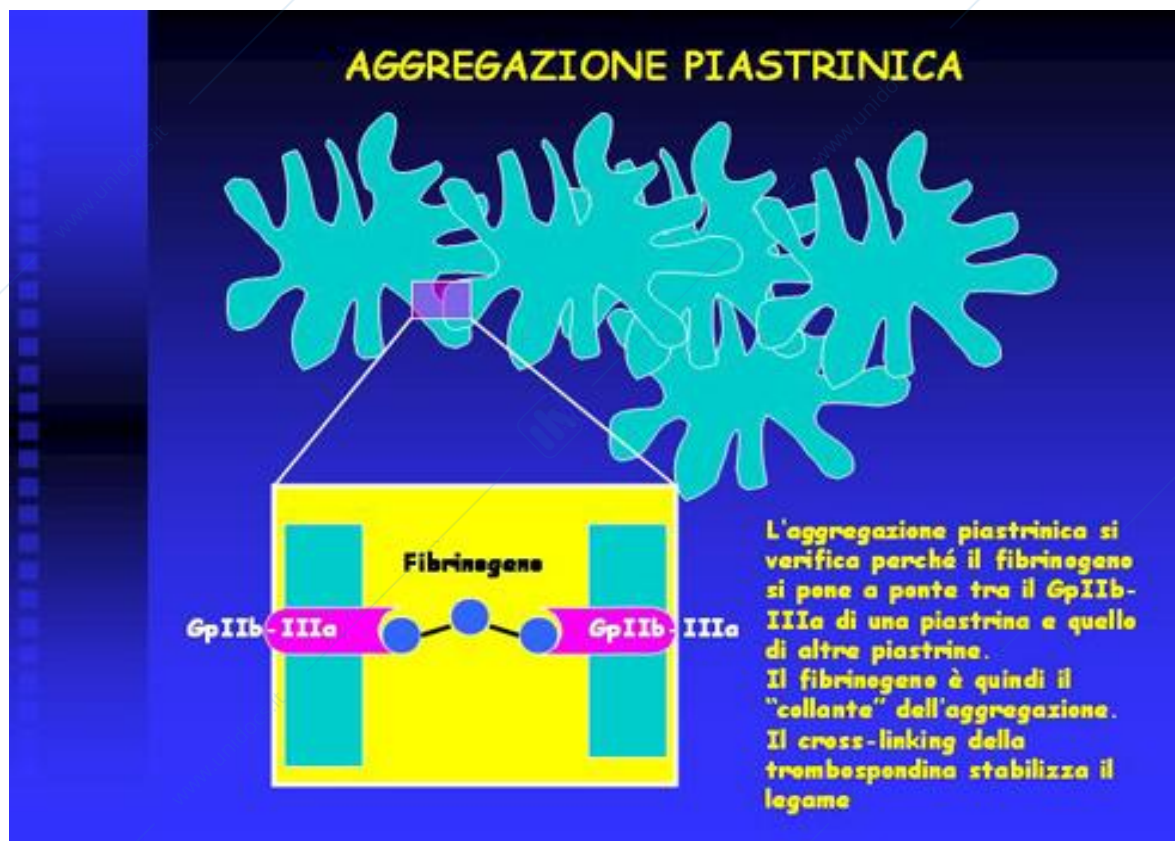
è un evento critico nella attivazione piastrinica e consegue sia all'aumento del calcio citosolico indotto da IP₃, sia al suo accoppiamento diretto con il recettore per ADP. L'attivazione della fosfolipasi A₂ porta alla liberazione di acido arachidonico (AA) dalla posizione 2 dei fosfolipidi di membrana, dal quale nelle piastrine, per azione sequenziale degli enzimi ciclossigenasi e trombossano-sintetasi, ha origine il trombossano A₂ (TXA₂) (poiché nelle piastrine il sistema cicloossigenasico è fondamentalmente una "trombossano-sintetasi", il solo prostanoide prodotto è il TXA₂; qualunque altro prostanoide non può essere prodotto, compresa la prostaciclina, in quanto le piastrine non possiedono l'enzima prostaciclina-sintetasi, presente invece nelle cellule endoteliali, che producono così prostaciclina, con attività biologiche opposte a quelle del trombossano). **Con la produzione di trombossano le piastrine rilasciano il più potente agonista della aggregazione piastrinica, innescando un potente circuito autocrino/paracrino di amplificazione della aggregazione piastrinica.**

Infatti, il TXA₂ interagisce con i propri recettori agonisti sulla superficie piastrinica e innesca la propria via di trasduzione stimolando la fosfolipasi C (come l'ADP), e quindi tutta la cascata di reazioni da essa dipendenti: grazie all'interazione con il recettore specifico si ha una **replica potenziata** dell'attività dell'ADP con attivazione di PKC e quindi l'esposizione quantitativamente rilevante sulla superficie delle piastrine del complesso glicoproteico GPIIb/GPIIIa in forma attiva, che ha affinità con varie molecole circolanti, fra cui la più importante è il fibrinogeno.

Inoltre, il TXA₂, una volta liberato in circolo, determina vasocostrizione locale in sinergismo con ADP, adrenalina ed altri vasocostrittori.

Aggregazione piastrinica

Con questo termine si indica l'adesione fra piastrine attivate e segue immediatamente l'adesione e la secrezione (è necessario sottolineare la differenza con l'**agglutinazione** piastrinica, in cui le piastrine aderiscono l'una all'altra non in seguito ad attivazione, ma per intervento di agenti che talvolta le fanno agglomerare passivamente, quali anticorpi, virus e, soprattutto, la **ristocetina**). Le piastrine attivate possono legarsi fra loro grazie alla esposizione dei complessi glicoproteici GPIIb-IIIa, recettori del fibrinogeno ([schema 11](#)).



(schema 11)

Il fibrinogeno si lega ai recettori di piastrine adiacenti formando dei veri e propri “ponti” tra piastrina e piastrina e porta quindi alla formazione di aggregati piastrinici. Nelle piastrine in condizione di riposo il complesso glicoproteico GPIIb/GPIIIa è presente in forma inattiva in quanto le due glicoproteine IIb e IIIa sono separate. In seguito alla stimolazione da parte di vari agonisti, in presenza di ioni calcio, si forma l'eterodimero GPIIb/IIIa, che rappresenta la forma attiva del complesso (schema 8, 9). Quindi le piastrine attivate espongono questo complesso glicoproteico in forma attiva in grado di legare il **fibrinogeno**, il quale a sua volta si lega ai recettori glicoproteici di piastrine adiacenti in una reazione a catena che amplifica il fenomeno dell'aggregazione piastrinica. La **trombospondina** aumenta le dimensioni degli aggregati piastrinici, ed è stato proposto che essa agisca operando un “cross-linking” e quindi una stabilizzazione degli aggregati di piastrine e fibrinogeno, oppure che agisca in sinergia con il fibrinogeno nel posizionarsi a ponte tra i complessi glicoproteici GPIIb-IIIa sulla superficie piastrinica.

L'aggregazione piastrinica è un fenomeno bifasico e si può distinguere in primaria e secondaria :

L'aggregazione primaria (prima onda di aggregazione), è un'aggregazione **reversibile**, indotta da piccole quantità di agonisti che interagiscono con i loro recettori sulla membrana piastrinica (ADP, collagene, trombina, PAF, ecc.) (a).

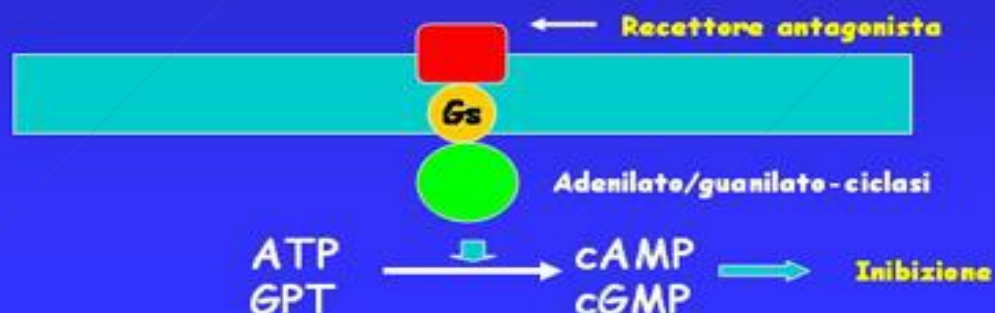
L'aggregazione secondaria (seconda onda di aggregazione) è dovuta invece sia all'interazione di grosse quantità di agonisti con i loro recettori, sia al rilascio di grosse quantità di ADP e quindi di TXA2 da parte delle piastrine attivate da piccole quantità di agonisti molto potenti (a). L'aggregazione primaria può mancare e possiamo avere direttamente un'aggregazione irreversibile quando l'agonista è presente *in vivo* o aggiunto alla sospensione piastrinica *in vitro* (b).

L'attivazione della fosfolipasi C, che è alla base dei meccanismi di trasduzione associati alla aggregazione piastrinica, è condiviso da tutti i cosiddetti “**agonisti della aggregazione**”, i quali possiedono recettori associati alla fosfolipasi C (schema 13, 14).

AGONISTI E ANTAGONISTI DELLA AGGREGAZIONE PIASTRINICA

Quanto riportato negli schemi 8, 9 e 11 si riferisce alla sequenza di reazioni che si verificano con l'interazione tra piastrine e collagene e che culminano nella aggregazione piastrinica. Tutte le sostanze, ancorate ad una matrice o rilasciate in fase liquida, che possiedono recettori sulle piastrine in grado di trasdurre con i meccanismi riportati negli schemi citati, sono capaci di indurre aggregazione piastrinica e vengono definiti **AGONISTI** della aggregazione.

Le sostanze che si oppongono o inibiscono l'aggregazione piastrinica si definiscono **ANTAGONISTI** della aggregazione piastrinica. Tutti gli antagonisti possiedono recettori piastrinici associati a proteine G con funzione stimolatrice (G_s) sulla attività della adenilato/guanilato ciclasti di membrana: l'aumento di nucleotide ciclico inibisce l'aggregazione



(schema 13, 14)

Esiste comunque un'altra classe di recettori agonisti dell'aggregazione, i quali sono associati a proteine di trasduzione **Gi** in grado di inibire la attivazione della adenilato-ciclastasi. Il blocco della formazione di cAMP favorisce la aggregazione piastrinica. Questo meccanismo pro-aggregante è comunque meno rilevante rispetto a quello correlato all'attivazione del ciclo del fosfatidilinositolo. Alcuni agonisti della aggregazione piastrinica (per es. la trombina) hanno recettori associati simultaneamente alla attivazione della fosfolipasi C ed alla inibizione della adenilato-ciclastasi.

Tutti gli **antagonisti** della aggregazione piastrinica possiedono recettori sulla superficie piastrinica associati a proteine di traduzione **Gs**, con attività stimolatoria sulla adenilato-ciclastasi (prostaciclina, prostaglandina D2, adenosina, adrenalina [recettori β]) o sulla guanilato-ciclastasi (ossido nitrico, NO) (schema 13, 14). Il più importante secondo messaggero inibitorio per l'aggregazione piastrinica è quindi il cAMP, il cui livello intracellulare si innalza quando la adenilato ciclastasi è attivata in risposta a segnali extracellulari inibitori. Il cAMP esercita effetti inibitori pleiotropici sulle piastrine, bloccando sia l'iniziazione sia il mantenimento delle risposte stimolatorie. Esso infatti blocca il legame degli agonisti ai loro recettori, inibisce la fosfolipasi C e la conseguente formazione di DAG e IP3, inibisce la proteino-chinasi C ed antagonizza le risposte mediate dal calcio, inclusa la idrolisi dell'acido arachidonico dei fosfolipidi da parte della fosfolipasi A2. Il ruolo della attività inibitoria del cGMP (che si forma, per esempio, dalla stimolazione con l'antagonista NO), non è stato ben stabilito, ma sembra che venga inibita la attivazione della fosfolipasi C.

Si forma dapprima un aggregato piastrinico che prende il nome di **TAPPO EMOSTATICO TEMPORANEO O PRIMARIO**, che è reversibile. Successivamente, dove vi è stata adesione e aggregazione primaria si ha la formazione di un aggregato impermeabile e irreversibile, detto **TAPPO EMOSTATICO SECONDARIO**.

Ruolo dei complessi immuni e del complemento nella adesione e aggregazione piastrinica. I complessi immuni e gli aggregati di IgG inducono adesione, cambiamento di forma, reazione di rilascio ed aggregazione piastrinica. Inoltre, i complessi immuni attivano il complemento interagendo con la componente C1q. Le piastrine possiedono recettori per il frammento Fc delle IgG e recettori per il frammento C1q del complemento, entrambi capaci di trasdurre segnali all'interno delle piastrine. Inoltre, il recettore per il C1q complementare è anche un recettore per il collagene. Queste proprietà spiegano i seguenti fatti: 1) i complessi immuni mediano l'adesione piastrinica; 2) i complessi immuni inducono aggregazione piastrinica in seguito alla reazione di rilascio dei granuli piastrinici; 3) il C1q media ulteriormente l'adesione piastrinica ai complessi immuni e l'aggregazione piastrinica, stimolando la reazione di rilascio dei granuli; 4) poiché il C1q non interagisce con il collagene, esso è in grado di inibire l'adesione delle piastrine al collagene stesso e l'aggregazione indotta da collagene, mediante un legame competitivo ai recettori per il collagene, e può quindi essere considerato come un "modulatore" dell'aggregazione piastrinica. **La capacità dei complessi immuni e del C1q complementare di indurre adesione e aggregazione piastrinica è senza dubbio un momento patogenetico fondamentale nelle lesioni vascolari da deposizione dei complessi antigene-anticorpo a livello degli endoteli vascolari (reazioni di ipersensibilità del III tipo).**

Normalmente l'aggregazione piastrinica viene inibita da alcune sostanze come la prostaciclina (PGI_2) e l'ossido di azoto (NO), di derivazione endoteliale (come tutti gli antagonisti dell'aggregazione piastrinica, anche prostaciclina ed NO agiscono innalzando i livelli di nucleotidi ciclici intra-piastrinici). PGI_2 (di derivazione endoteliale) e TXA2 (di derivazione piastrinica), entrambi derivati dall'acido arachidonico, hanno azioni opposte: il primo inibisce l'aggregazione piastrinica ed è vasodilatatore, il secondo favorisce l'aggregazione ed è vasocostrittore. L'equilibrio fra PGI_2 endoteliale e TXA2 piastrinico costituisce un sofisticato meccanismo che, in condizioni normali, previene l'aggregazione piastrinica intravascolare e la coagulazione, ma, in seguito al danno endoteliale, prevalendo l'attività di TxA2, favorisce la formazione del tappo emostatico. Alcuni farmaci inibitori della aggregazione piastrinica sono tali in quanto inibiscono la formazione del TXA2, inibendo la trombossano-sintetasi piastrinica (l'aspirina, o acido acetil-salicilico, opera

una acetilazione irreversibile della cicloossigenasi, mentre altri farmaci anti-infiammatori non steroidei [FANS] inibiscono le cicloossigenasi in maniera reversibile). Altri farmaci antagonisti dell'aggregazione piastrinica sono tali in quanto antagonizzano il complesso glicoproteico GPIIb/GPIIIa.

3- Fase della coagulazione

Il sistema della coagulazione è il terzo componente del processo emostatico e porta alla formazione del coagulo insolubile di fibrina, derivante dalla trasformazione del precursore plasmatico solubile fibrinogeno (schema 15).

COMPONENTI DEL SISTEMA DELLA COAGULAZIONE

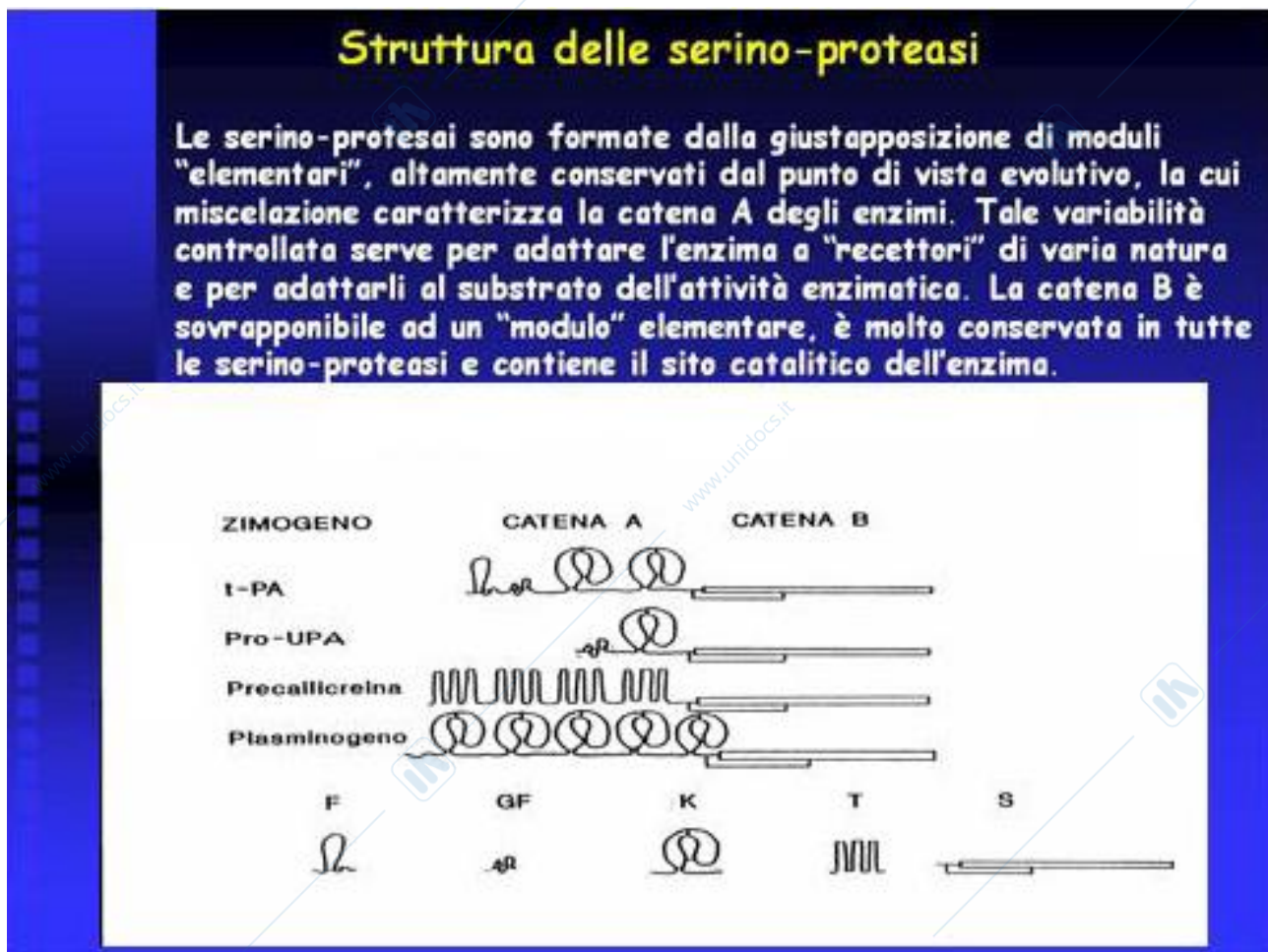
I fattori della coagulazione sono serino-proteasi presenti nel sangue in forma di zimogeni, i quali vengono attivati "a cascata", fino alla formazione della maglia di fibrina. Fanno eccezione il fattore V ed il fattore VIII (cofattori), ed il fibrinogeno, che non sono serino proteasi. Anche se non si tratta di fattori propriamente detti, intervengono in modo critico nel processo coagulativo gli ioni Ca, ed i fosfolipidi delle superfici cellulari: in particolare, i fosfolipidi della superficie delle piastrine che vanno sotto il nome di fattore piastrinico 3 (PF3).

Come tutti i grandi sistemi multi-proteasici dell'organismo (sistema del complemento, sistema fibrinolitico), anche il sistema della coagulazione si "organizza" spazialmente e funzionalmente su "fasi solide" rappresentate dalle superfici cellulari, dove gli ioni Ca hanno la funzione di favorire l'interazione tra enzima, eventuale cofattore e fosfolipidi.

(schema 15)

A questo risultato si giunge grazie all'attivazione sequenziale di una serie di fattori plasmatici (fattori della coagulazione). I fattori plasmatici, ad eccezione della pre-callicreina (PK) e del chininogeno ad alto peso molecolare (high molecular weight kininogen, HMWK), sono numerati progressivamente dall'1 al 13, secondo una nomenclatura internazionale. Tutti i fattori della coagulazione, ad eccezione del fattore III (fattore tessutale), sono normalmente presenti nel plasma in forma inattiva. Questi fattori, quando vengono attivati, vengono designati con lo stesso numero e l'aggiunta di un "a" piccolo in basso a destra.

I fattori della coagulazione sono di varia natura. Per la maggioranza sono proenzimi (zimogeni) che, quando sono attivati, sono in grado di esplicare attività proteasica. Si tratta di **serino-proteasi** (schema 16),



(schema 16)

cioè di enzimi che presentano nel sito catalitico l'aminoacido serina, la cui presenza è critica per l'attività enzimatica. Molti dei sistemi multi-proteasici attivabili "a cascata" sono composti da zimogeni di serino-proteasi (il sistema plasmatico attivabile da contatto, il sistema della coagulazione, il sistema del complemento, il sistema fibrinolitico). Tutte le molecole di questi sistemi sono presenti in forma di precursore: si tratta di molecole a catena singola (zimogeno), che vengono "attivate" in forma cataliticamente attiva da un singolo taglio proteasico, che le trasforma in molecole composte da due catene (catena A e catena B), tenute assieme da un ponte disolfuro. La catena B esprime il sito catalitico ed è altamente conservata nelle serino-proteasi di origine più disparata (dalla "grossolana" pepsina gastrica ai "raffinati" attivatori del plasminogeno). La catena A presenta invece un grado di variabilità "controllata", in quanto è formata dalla unione o dalla ripetizione di uno o più moduli molecolari caratterizzati da alta conservazione evolutiva (schema 16). La varia associazione di tali moduli determina la specificità della catena A di ogni serino-proteasi. Come si nota nello schema 16, la giustapposizione di vari moduli molecolari crea singolari conformazioni steriche di ogni catena A. Sembra che tale "variabilità" controllata serva per permettere alle varie serino-proteasi di interagire con specifici recettori o con sequenze del substrato diverse da quella che contiene la sequenza che deve essere idrolizzata, in modo che il sito catalitico venga orientato sulle sequenze di consenso secondo la posizione e la conformazione più opportune. Agendo "a cascata" queste proteasi possono notevolmente amplificare il processo catalitico "a ventaglio". Altri fattori, come l'VIII ed il V, sono cofattori di natura non enzimatica, che servono a "adattare" complessi multi-proteasici sulle fasi solide delle superfici cellulari e quindi a mantenere in adeguato contatto un enzima con il substrato. Altri componenti fondamentali della coagulazione

sono i fosfolipidi, che costituiscono una adatta superficie di reazione, e infine gli ioni calcio, che favoriscono le interazioni fra enzimi, cofattori e fosfolipidi. Le piastrine, una volta attivate, offrono una superficie fosfolipidica particolarmente adatta a processi di questo tipo (Fattore Piastrinico 3, F.P.3).

La sintesi dei fattori della coagulazione avviene nel fegato, mentre le cellule endoteliali sintetizzano il fattore di von Willebrand (vWF), che veicola nel sangue il FVIII della coagulazione. La vitamina K è essenziale non tanto per la sintesi epatica di alcuni fattori della coagulazione (II, VII, IX e X) e di due glicoproteine, le proteine C ed S con attività anticoagulante, quanto per “completare” la loro struttura mediante l’aggiunta di un carbossile, dopo che la sintesi epatica della proteina è già stata completata. Infatti, la vitamina K interferisce nella via sintetica di questi fattori a livello della carbossilazione dei loro residui di acido glutammico ad acido γ -carbossi-glutammico, che avviene ad opera di una carbossilasi vitamina K-dipendente. In assenza di questa vitamina i fattori continuano ad essere sintetizzati e conservano le loro proprietà immunologiche, ma sono biologicamente inattivi e sono denominati PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence). La presenza dei residui γ -carbossi-glutammici, infatti, è necessaria per il legame di queste proteine agli ioni calcio ed ai fosfolipidi di membrana, condizione fondamentale per un ottimale orientamento della loro attività proteasica.

VECCHIA VISIONE DEL PROCESSO DELLA COAGULAZIONE

Il processo della coagulazione veniva inteso, fino a qualche anno fa, come un semplice **“meccanismo a cascata enzimatica”** che interessava, in modo ordinato e sequenziale, l’attivazione dei vari fattori della coagulazione da una forma inattiva a una forma enzimaticamente attiva (teoria della “cascata” enzimatica, metà anni ’60). Secondo questa teoria, esistono due vie (**intrinseca** ed **estrinseca**) che convergono in una **via comune** quando viene attivato il fattore X.

Critiche:

- non tutti i fattori della coagulazione si comportano come enzimi una volta attivati
- molte reazioni del processo della coagulazione implicano la formazione di complessi multimolecolari piuttosto che l’interazione di singoli fattori plasmatici
- i vari fattori attivati possono esercitare la loro azione enzimatica anche su substrati diversi da quelli considerati come loro substrati tradizionali
- **sono attivi meccanismi di feedback e interazioni fra le varie fasi ed i vari fattori del processo emostatico.**

NUOVA VISIONE DEL PROCESSO DELLA COAGULAZIONE

Attualmente si ritiene che le due vie di attivazione della coagulazione non siano separate, ma interconnesse. Infatti, fattori generati nella via estrinseca vanno poi ad attivare fattori e complessi della via intrinseca. Si ritiene che fisiologicamente la coagulazione all’interno del vaso non inizi con l’attivazione del sistema plasmatico attivabile da contatto, cioè attraverso quella che era definita la via intrinseca (si ritiene attualmente che questa via sia molto più importante nella generazione di mediatori chimici della flogosi di origine plasmatica, che non nell’attivazione della coagulazione), ma dal fattore tissutale (TF), cioè attraverso quella che era definita la classica via estrinseca. Secondo questa moderna teoria è il fattore tissutale, normalmente espresso sulla membrana dei fibroblasti ed esposto ai fattori della coagulazione in seguito al danno endoteliale, ad attivare in vivo la cascata coagulativa. Il TF ha affinità per una proteina plasmatica, il fattore VII, e questo porta alla formazione di un complesso TF-F VIIa, che ha la capacità non solo di attivare direttamente il FX a FXa e quindi proseguire nella via comune (questa rappresenta la classica via estrinseca), ma anche il FIX della via intrinseca (**cross-over**) Risulta quindi chiaro come il complesso TF-FVIIa svolga un ruolo chiave nel processo di coagulazione *in vivo*.

Si continuano comunque ancora a distinguere due vie di attivazione della coagulazione, intrinseca ed estrinseca, tenendo però ben presente che esistono meccanismi di cross-over fra le due vie (schema 17).



(schema 17)

I componenti del **sistema intrinseco** sono tutti presenti nel sangue e l'evento principale è l'attivazione del fattore XII di Hageman, il primo zimogeno di serino-proteasi della cascata. Al **sistema estrinseco**, invece, partecipa una componente di derivazione esterna al sangue, proveniente dal tessuto danneggiato (fattore tessutale) e l'evento principale è l'attivazione del fattore VII. Le due vie convergono nella fase finale, cioè nell'attivazione del fattore X (**via comune**), fino alla trasformazione del fibrinogeno in fibrina.

Infatti, il FXII interagisce con la superficie carica negativamente mediante residui aminoacidici carichi positivamente, il chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK) si comporta nella stessa maniera, posizionandosi in vicinanza del FXII. Sulla superficie non adesiva del HMWK sono legati sia PK, sia FXI, che così vengono “presentati” al FXII. Fino a questo punto nessuna delle molecole del Sistema Plasmatico Attivabile da Contatto (SPAC) si trova nella forma attiva. Si ritiene (schema 22) che quando lo zimogeno FXII si lega al sottoendotelio avvenga una attivazione dello zimogeno a formare α FXIIa a livello della zona di danno endoteliale con meccanismo tuttora ignoto (si è ipotizzata una autoattivazione del FXII, come pure una attivazione “reciproca” tra FXII e zimogeni di PK o FXI legati all’HMWK, dal momento che anche gli zimogeni di serino-proteasi possono essere dotati di una leggera attività enzimatica). Indipendentemente dall’evento scatenante iniziale, nelle fasi successive lo zimogeno FXII è attivato dalla callicreina che si forma nella zona di lesione a partire dalla PK. La PK viene attivata dal α FXIIa a callicreina attiva, la quale a sua volta è in grado di attivare altre molecole di FXII e così via, amplificando l’attivazione del sistema. Il fattore XI funge da substrato del fattore XIIa, diventando FXIa.

Nel processo di attivazione del sistema da contatto si possono distinguere 4 fasi:

- 1- **iniziazione:** le proteine del sistema plasmatico attivabile da contatto si legano alla superficie carica negativamente del sottoendotelio e si attivano
- 2- **amplificazione:** l’attivazione reciproca dei componenti del sistema plasmatico attivabile da contatto amplifica il sistema stesso. Inoltre, si ha liberazione di sostanze attive in senso infiammatorio, come β FXIIa, callicreina e chinine. Sia la callicreina che il fattore XIa possono liberare chinine da HMWK. Il legame alla superficie carica negativamente dei componenti del sistema serve a mantenere un orientamento spaziale ottimale per PK, fattore XII e fattore XI.
- 3- **disseminazione:** rilascio il fase fluida dei componenti attivi che si liberano nella reazione di attivazione da contatto, ad azione pro-infiammatoria
 - β FXIIa: aumento della permeabilità vascolare; attivazione del complemento
 - callicreina: chemiotassi e vasodilatazione per azione sulla frazione C5 del complemento, con formazione del frammento C5a; attivazione della pro-urochinasasi ad urochinasasi attiva;
 - chinine: aumento della permeabilità vascolare - vasodilatazione - dolore
- 4- **regolazione:** il sistema attivabile da contatto viene tenuto sotto controllo da una serie di inibitori specifici dei singoli componenti (schema 23).
 FXIIa (HFa): C1-inibitore (oltre il 90%) ed antitrombina III (ATIII)
 Callicreina: C1-inibitore (circa il 50%); α_2 -macroglobulina (circa il 50%)
 Fattore XIa: α_1 -antitripsina (70%); ATIII

REGOLAZIONE DEL SISTEMA PLASMATICO ATTIVABILE DA CONTATTO	
FATTORE	INIBITORE
HF attivato.....	C1-inibitore (oltre il 90%) Antitrombina III
Callicreina.....	C1-inibitore (circa il 50%) Alfa-2-Macroglobulina (circa il 50%)
Fattore XIa.....	Alfa-1-antitripsina (circa il 70%) Antitrombina III

(schema 23)

Il F.XIa ha la funzione di attivare il **fattore IX (o di Christmas)** della coagulazione (schema 24).



(schema 24)

Tale attivazione deriva dalla scissione in due punti della molecola del FIX, in sequenza. Si forma prima una molecola composta da due catene, dalla quale viene rimosso, mediante un altro taglio proteolitico, un piccolo peptide “di attivazione” dalla più lunga delle due catene: a questo punto il FIX ha acquisito attività enzimatica serino-proteasica.

Il FIX è attivato anche dal complesso formato da fattore tissutale-fattore VIIa (complesso TF-FVIIa) della via estrinseca (cross-over tra via estrinseca e via intrinseca, che è attualmente ritenuto il principale meccanismo di attivazione del fattore IX che entrerà a far parte del complesso tenasico) (schema 17, 25).



(schema 17-25)

Il ruolo del FIXa consiste nella conversione del **fattore X (o di Stuart)** nella sua forma enzimaticamente attiva, FXa.

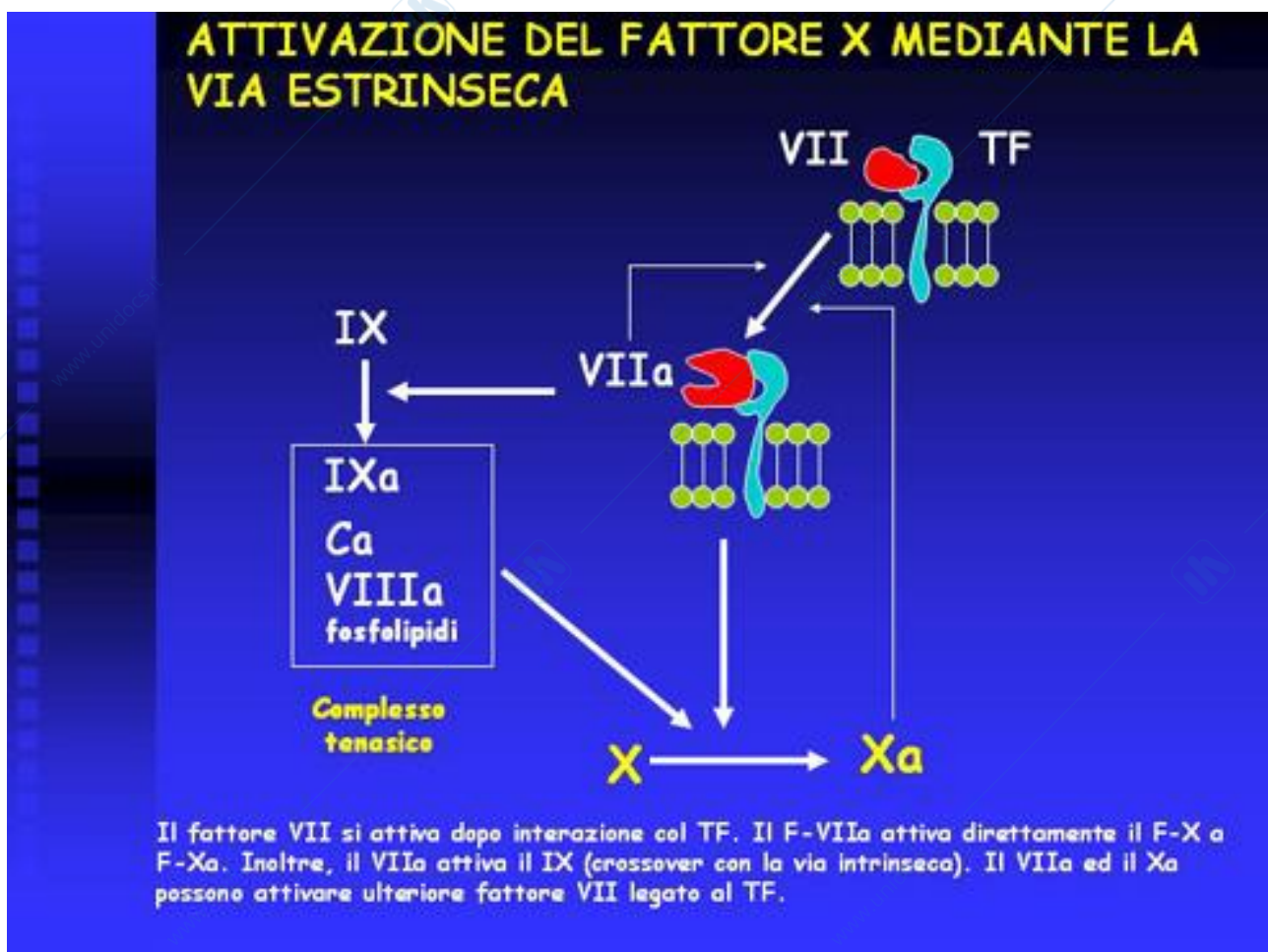
Il FX è una proteina plasmatica la cui sintesi è vitamina K-dipendente. La sua attivazione, mediante due scissioni proteolitiche, si ottiene ad opera di un complesso, detto **COMPLESSO TENASICO**, costituito da: FIXa, fattore anti-emofilico attivato (FVIIIa), ioni calcio e fosfolipidi della membrana cellulare (principalmente quella delle piastrine, ma anche quella degli endotelociti e dei leucociti, soprattutto i macrofagi) (schema 24). Il **fattore VIII** è attivato dalla trombina: poiché la via estrinseca opera inizialmente in modo più veloce della via intrinseca, una certa quota di trombina è sempre presente per l'attivazione del FVIII.

La proteasi responsabile della attivazione proteolitica del FX è il FIXa, il quale interagisce con i fosfolipidi delle superfici cellulari mediante un ponte ionico tra le cariche positive dello ione calcio e quelle negative del suo acido gamma-carbossi-glutammico. Il FVIIIa agisce come cofattore non enzimatico, indispensabile per dirigere l'assemblaggio sulle superfici di tutti gli altri fattori del complesso tenasico. La sua indispensabilità è indicata dalla insorgenza di emorragie legata alla sua mancanza, come nel caso della emofilia A.

Il fattore X attivato è l'enzima direttamente responsabile della formazione della trombina dalla protrombina.

VIA ESTRINSECA DELLA COAGULAZIONE

Quando il sangue viene direttamente a contatto con il tessuto danneggiato viene attivata la via estrinseca della coagulazione, ad opera di un **fattore tissutale, TF** (la cosiddetta **tromboplastina tissutale o fattore III**) presente nei tessuti e da questi esposto in seguito ad un danno cellulare (schema 25).

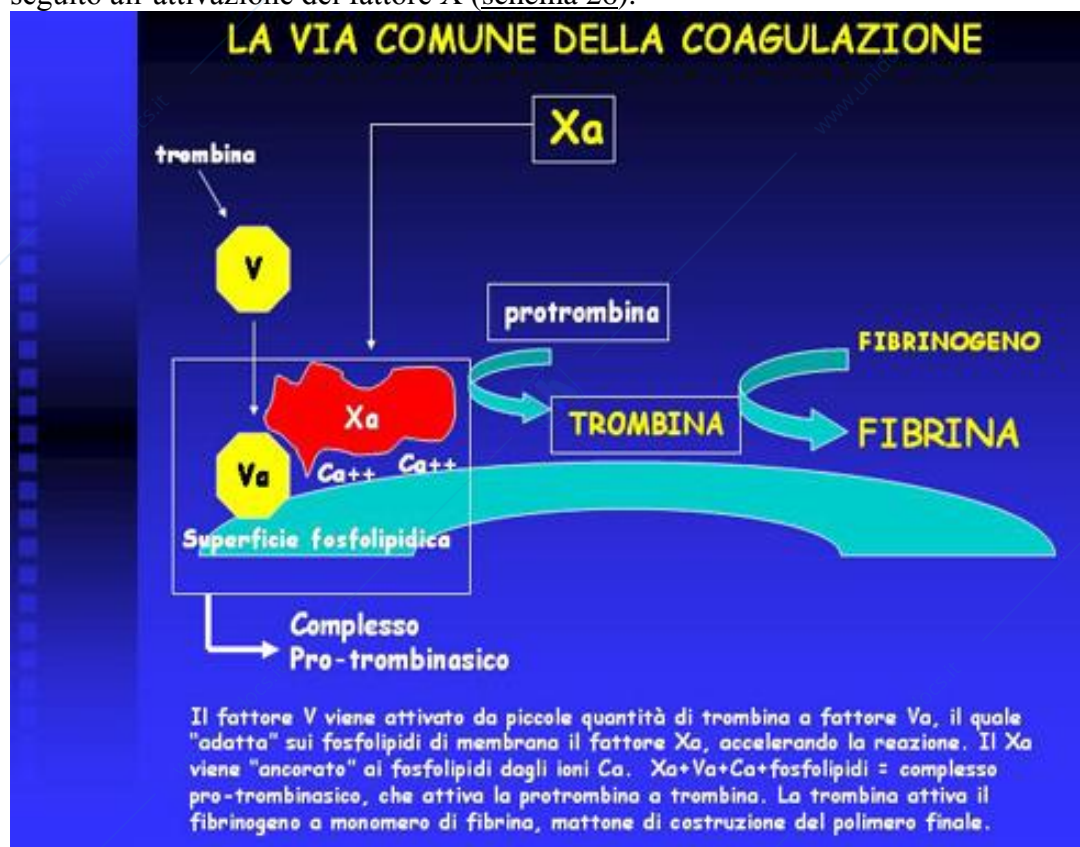


(schema 25)

Il TF è una proteina integrale di membrana, espressa dai fibroblasti delle matrici sottoendoteliali ed è quindi ubiquitario nei tessuti dell'organismo. Può essere anche rilasciato in seguito alla frammentazione delle membrane dei fibroblasti, ed è presente sia nella membrana basale dei vasi, sia nella avventizia vascolare dei vasi di calibro maggiore. Le cellule endoteliali non espongono normalmente il TF sul lato luminale dei vasi, bensì lo contengono come proteina integrale sulla membrana di vescicole intracellulari che vengono normalmente rilasciate sul lato abluminale dell'endotelio. In seguito a lesione dell'endotelio la polarità secretiva di tali vescicole si inverte ed il TF viene esposto sulla superficie luminale dell'endotelio: questo si verifica sia per lesione biochimica (ad opera del TNF e dell'IL-1), sia per lesione meccanica, dove l'endotelio perilesionale, che cioè circonda un'area di denudazione endoteliale del vaso, esprime TF sulla superficie endovascolare. Anche i macrofagi, dopo aver legato endotossina prodotta dai batteri gram-negativi, esprimono sulla loro membrana TF: tale esposizione viene ulteriormente potenziata dall'innesco della "cascata citochinica" (endotossina>TNF>IL-1>IL-6), in quanto tutte le citochine prodotte hanno recettori sulla superficie macrofagica ed endoteliale e la loro interazione con tali recettori porta ad un potenziamento della espressione di TF di membrana. Il TF lega specificamente una proteina plasmatica, il fattore VII (schema 25) e gli ioni calcio, formando un complesso dotato di attività enzimatica. Il **fattore VII** o **proconvertina** è una proteina plasmatica a singola catena, vitamina K-dipendente, sintetizzata dal fegato. Di per sé il FVII non ha attività enzimatica, ma si lega al TF in presenza di ioni calcio che fanno da ponte. Il complesso che risulta (**COMPLESSO TF-FVII-Ca²⁺**) è enzimaticamente attivo, possiede un'alta affinità per il FX e ne catalizza l'attivazione a FXa. Sembra che, all'interno del complesso, l'attività enzimatica sia legata al FVIIa, mentre il TF agirebbe da cofattore. Il FXa è a sua volta in grado di attivare ulteriormente il FVII e quindi di amplificare la via estrinseca della coagulazione (meccanismo di "feed-back"). Il complesso TF-FVII attiva anche il FIX, anzi questo sembra essere il meccanismo fondamentale che porta alla attivazione del fattore IX: **le reazioni del meccanismo estrinseco influiscono sul meccanismo intrinseco.**

VIA COMUNE DELLA COAGULAZIONE

Comprende due fasi: la formazione di trombina e la formazione di fibrina, che si verificano in seguito all'attivazione del fattore X (schema 26).



(schema 26)

a) formazione di trombina

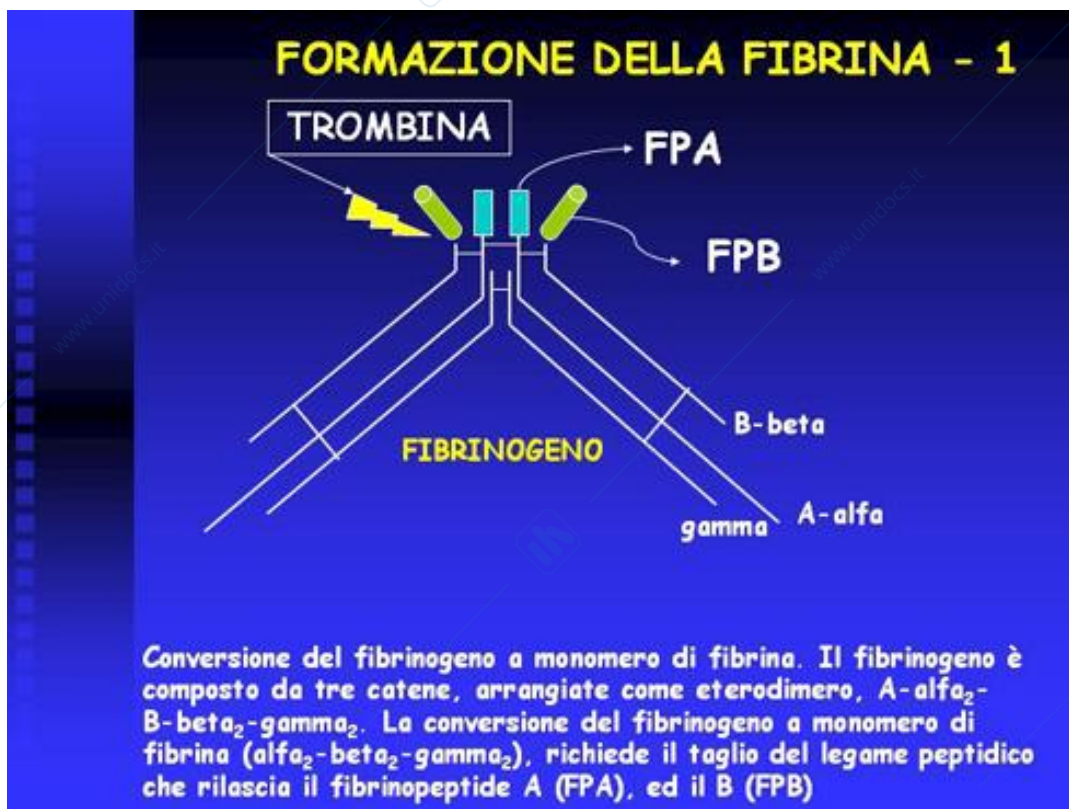
Il fattore Xa, interagendo con il fattore Va, i fosfolipidi (della membrana piastrinica-FP3, endoteliale, leucocitaria) e gli ioni calcio, forma un complesso multimolecolare che prende il nome di **PROTROMBINASI** o **COMPLESSO PROTROMBINASICO**, in grado di agire proteoliticamente sulla protrombina (fattore II) trasformandola in trombina.

Il FV è una glicoproteina ad alto peso molecolare, sintetizzata dal fegato, presente sia nelle piastrine che nel plasma: si lega ai fosfolipidi e viene attivato primariamente dalla trombina a FVa che è in grado di agire da cofattore per l'attivazione della protrombina a trombina.

Nel processo di coagulazione la trombina è un enzima che potremmo definire "multi-purpose": infatti, oltre a determinare la fase successiva di fibrino-formazione per attivazione del fibrinogeno a monomero di fibrina, è in grado di attivare il fattore V, il fattore VIII ed il fattore XIII della coagulazione (è inoltre un potente agonista dell'aggregazione piastrinica).

La **trombina** (FIIa) viene formata a partire dallo zimogeno protrombina (FII) attraverso due tagli proteolitici operati dal FXa. La protrombina è una glicoproteina plasmatica di 582 aminoacidi, la cui sintesi è vitamina K dipendente, e contiene nella sua regione amino-terminale residui di ac. gamma-carbossi-glutammico attraverso i quali si lega, in presenza di ioni calcio che fanno da ponte, al fosfolipide piastrinico. Dopo il primo taglio si formano due frammenti, uno amino-terminale e l'altro carbossi-terminale (pre-trombina 2), a singola catena, contenente un ponte disolfuro. Un secondo taglio all'interno della pre-trombina 2 porta alla formazione di trombina attiva (alfa-trombina) costituita da due catene unite dal ponte S-S.

b) formazione della fibrina (schema 27, 28)



(schema 27, 28)

La formazione di fibrina avviene attraverso 3 tappe sequenziali:

1. scissione proteolitica delle molecole di fibrinogeno in monomeri di fibrina e fibrinopeptidi (FPA, FPB) da parte della trombina
2. polimerizzazione spontanea dei monomeri di fibrina in un gel di fibrina
3. stabilizzazione della fibrina ad opera del fattore XIIIa.

Il fibrinogeno (fattore I)

è una glicoproteina solubile ad alto peso molecolare (340.000 Da) formata da due unità, ognuna costituita da tre catene peptidiche α β γ . Nello spazio, la struttura del fibrinogeno appare costituita da tre catene α β γ poste sulla destra e tre catene uguali poste sulla sinistra; ciascun trimero è unito all'altro a formare un nodo centrale che vede impegnate le catene alfa, beta e gamma, nella parte amino-terminale (ponti disolfuro). Le regioni amino-terminali delle catene alfa e beta sono responsabili della solubilità del fibrinogeno, in quanto, a causa della repulsione di cariche elettriche, tengono separate le singole molecole di fibrinogeno. Evidenze di microscopia elettronica ad altissima risoluzione, hanno dimostrato che la struttura tridimensionale della molecola di fibrinogeno (schema 28)



(schema 28)

è costituita da tre domini globulari, due terminali (domini D, corrispondenti alle regioni carbossi-terminali di ogni molecola) ed uno centrale (dominio E, dove convergono le porzioni amino-terminali dei due trimeri) uniti da una regione di connessione a bastoncino. A livello dei domini E sporgono brevi sequenze polipeptidiche appartenenti alle catene alfa e beta (le porzioni amino-terminali descritte sopra). **La trombina** taglia questi gruppi terminali liberando così 4 fibrinopeptidi a basso PM (2 fibrinopeptidi A, FPA e due B, FPB) ed un **monomero di fibrina** (schema 27).

I monomeri di fibrina così formati (schema 28) hanno una struttura molto simile a quella del precursore nativo fibrinogeno, ma, avendo perso le cariche negative presenti sulle terminazioni

tagliate dalla trombina, interagiscono fra loro con legami non covalenti (legami idrogeno, ionici, interazioni idrofobiche, forze di Van der Waals). La polimerizzazione dei monomeri di fibrina è quindi una reazione spontanea che avviene per tappe intermedie: inizialmente, con il distacco del FPA, si ha la formazione di strutture lineari dovute alla formazione di legami termino-terminali fra domini D di varie molecole; successivamente, con il distacco del FPB, si formano anche legami latero-laterali fra domini D e domini E delle molecole lineari, producendo così un aumento di spessore dei fasci di fibrina.

Questo processo dà origine al **coagulo morbido di fibrina**, ancora fragile, non stabilizzato da interazioni intermolecolari covalenti.

Il coagulo morbido solubile viene quindi stabilizzato e reso insolubile (**coagulo stabilizzato o definitivo**) per azione di un altro fattore plasmatico, il fattore XIIIa. Il **fattore XIII** è una transglutaminasi, presente in forma inattiva nel sangue, che viene attivato dalla trombina. Il FXIIIa determina la formazione di legami peptidici interni fra le catene dei monomeri di fibrina (legami del tipo γ -glutamyl- ϵ -lisina), rendendo stabile il polimero (schema 28).

CONTROLLO DELLA COAGULAZIONE

Affinchè non si abbia l'estensione del coagulo nel sistema vascolare, è necessario che il processo della coagulazione sia finemente controllato e circoscritto nel punto di lesione.

Esistono vari meccanismi di controllo (schema 29):

REGOLAZIONE DELLA COAGULAZIONE

I meccanismi di controllo della coagulazione sono indispensabili per evitare che il sangue coaguli spontaneamente e per impedire eccessi coagulativi sproporzionati rispetto alla lesione vascolare. 1 ml di sangue è potenzialmente capace di indurre in 15 secondi la coagulazione di tutto il sangue

MECCANISMI PRINCIPALI:

- 1- **Flusso sanguigno**
- 2- **Inattivazione delle proteasi e dei cofattori da parte di inibitori fisiologici:**
 - Antitrombina III (AT-III)
 - Proteina C/Proteina S
 - Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)
 - C1-inattivatore
 - alfa2-macroglobulina
 - alfa1-anti-tripsina
- 3- **Demolizione dei prodotti della coagulazione:**
 - Attivazione del sistema fibrinolitico

(schema 29)

1) flusso sanguigno e clearance dei fattori attivati

Il flusso sanguigno è fondamentale nel controllo dell'emostasi in quanto è responsabile dell'allontanamento e della diluizione dei fattori della coagulazione attivati, che vengono poi rimossi dal circolo. La clearance dei fattori della coagulazione attivati avviene a vari livelli: fegato

(uno degli organi maggiormente implicati), il sistema dei fagociti mononucleati (o sistema monocitico/macrofagico) largamente diffuso nell'organismo.

2) **inattivazione delle proteasi attive** che via via si formano. Questo tipo di controllo avviene mediante l'azione degli **inibitori fisiologici**, che sono in grado di inibire i vari fattori della coagulazione ed anche i cofattori attivati. Questi inibitori plasmatici hanno, in genere, uno spettro di azione molto ampio e, in alcuni casi, possono inibire sia gli enzimi del sistema della coagulazione che quelli del sistema fibrinolitico. Si ricorda, a questo proposito, che la catena B di tutte le serino-proteasi presenta una struttura altamente conservata. Si tratta quindi di un sistema di controllo che è in grado di regolare sia la coagulazione (impedendo una eccessiva amplificazione e propagazione del fenomeno: la coagulazione viene circoscritta) sia la fibrinolisi (impedendo un'eccessiva attivazione del sistema fibrinolitico, che potrebbe assumere connotati patologici portando a manifestazioni di tipo emorragico).

Gli inibitori fisiologici più importanti sono la **Antitrombina-III (AT-III)**, il **Cofattore eparinico II (HCII)**, e le **proteine C ed S** ed il **Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)**. Oltre a questi sono importanti la **alfa 1-antitripsina**, **C1 inattivatore** ed **alfa2- macroglobulina** (schema 30).

INIBITORI FISIOLGICI DELLA COAGULAZIONE		
INIBITORE	SUBSTRATO	DEFICIT
ANTITROMBINA III (ATIII) Glicoproteina, PM 58000 Da	trombina, callicreina fatt. Xa, XIa, XIIa, IXa, plasmina	trombosi
COFATTORE EPARINICO III	trombina	trombosi
PROTEINA C/PROTEINA S	fatt. Va e VIIIa	trombosi
TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR (TFPI)	fatt. VIIa	?
ALFA1 ANTITRIPSINA Glicoproteina, PM 55000 Da	tripsina, elastasi, fatt. XIa, trombina, plasmina	enfisema polmonare
C1-INATTIVATORE Glicoproteina, PM 105000 Da	C1 complemento, callicreina, fatt. XIIa, XIa, plasmina	angioedema
ALFA2 MACROGLOBULINA Glicoproteina tetramerica	trombina, callicreina plasmina	(predisposizione tromoembolica)

(schema 30)

3) **inattivazione e/o demolizione proteolitica dei prodotti della coagulazione**. Il principale effettore di questo tipo di meccanismo di controllo è rappresentato dal **sistema fibrinolitico** (schema 29).

INIBITORI FISIOLÓGICI DELLA COAGULAZIONE

Antitrombina III (ATIII)

Glicoproteina (alfa-globulina), peso molecolare 58.000 Da, sintetizzata a livello epatico. La ATIII appartiene alla famiglia delle cosiddette **serpine** (**serine-protease inhibitors**) e forma un complesso stechiometrico, equimolecolare ed irreversibile con la trombina ed alcune altre esterasi seriniche, rendendole inattive. L'interazione fra trombina e AT-III avviene anche spontaneamente, ma in presenza di eparina o di molecole eparino-simili, come le catene laterali di eparan-solfato dei proteoglicani delle cellule endoteliali, la velocità della reazione aumenta di oltre tre ordini di grandezza (1000-3000 volte). L'eparina (HP) interagisce con regioni ricche di aminoacidi carichi positivamente dell'ATIII (siti lisinici). Questa interazione determina una modificazione allosterica dell'antitrombina, che viene resa più affine alla trombina: si forma un complesso stabile mediante il legame tra una arginina dell'antitrombina e la serina del sito attivo della trombina (schema 31).



(schema 31)

L'ATIII è in grado di reagire anche con altri fattori della coagulazione, inibendoli, come il X_a , XI_a , XII_a e IX_a , callicreina e plasmina. In ordine di importanza, la inibizione del fattore X_a viene subito dopo l'inibizione della trombina. Dopo la costituzione del complesso irreversibile ATIII-enzima serinico, l'eparina può dissociarsi da esso e rendersi così disponibile per catalizzare una nuova reazione. Nel plasma si ritrova anche una glicoproteina, la "**glicoproteina ricca di istidina**", che, legando l'HP, può limitarne la quota disponibile per l'interazione ATIII-trombina.

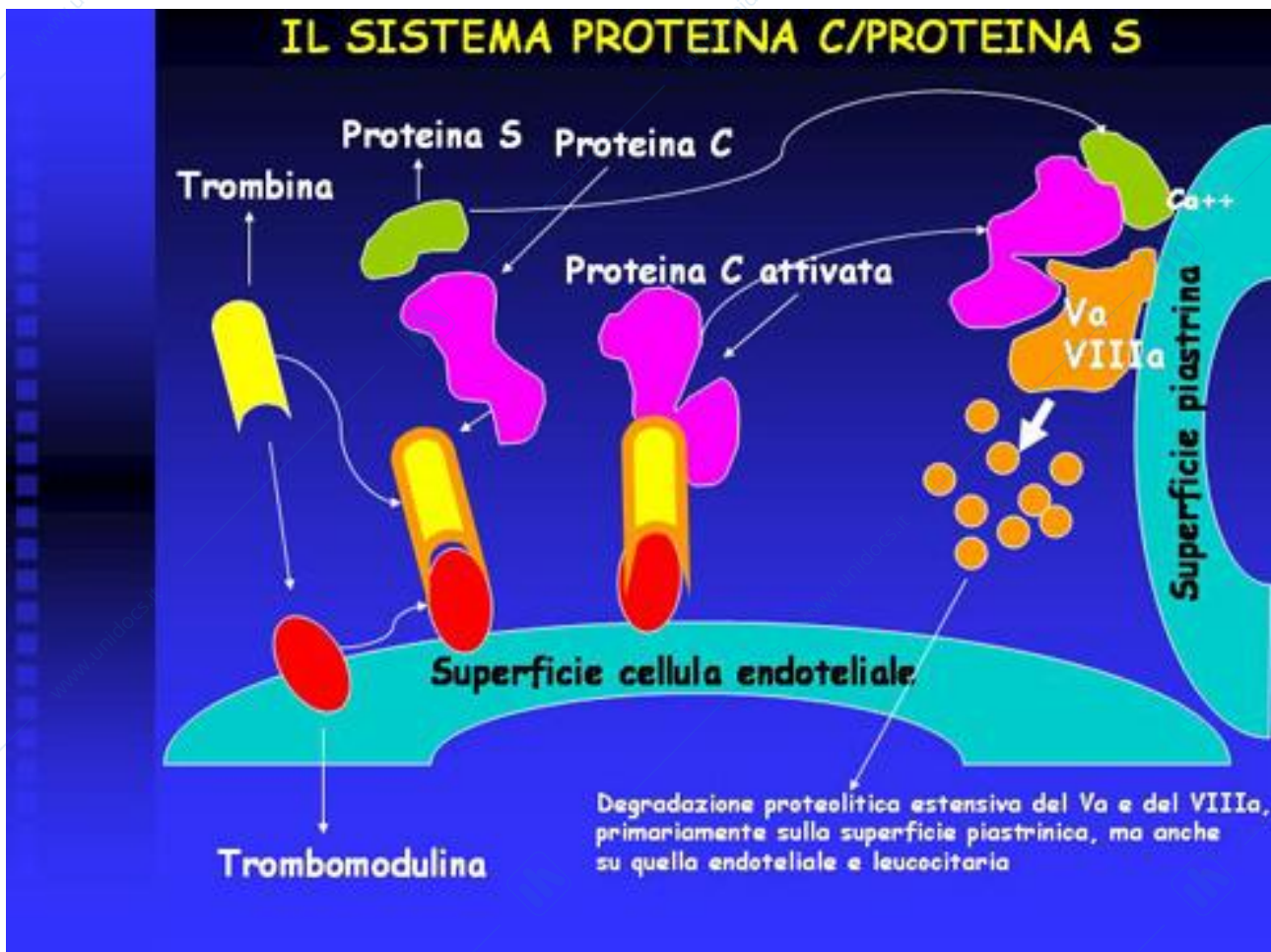
Il deficit ereditario di ATIII predispone a manifestazioni tromboemboliche (schema 30).

Cofattore eparinico-II (HCII)

Inibitore della trombina distinto dalla ATIII. E' una glicoproteina monocatenaria (66.000 Da) che inibisce selettivamente la trombina, mentre ha scarsa azione sulle altre serino-proteasi della coagulazione (schema 30). Come l'ATIII, forma complessi equimolecolari con la trombina, inattivandola. L'aggiunta di HP accelera la reazione, ma un altro polisaccaride, il dermatan solfato (DS), che non ha effetto sull'ATIII, accelera ancora di più la velocità di interazione HCII-trombina. La "glicoproteina ricca di istidina", che lega specificamente l'HP, è in grado di inibire l'interazione fra HCII ed HP e quindi di ridurre l'effetto inibitorio del cofattore eparinico II, ma non l'interazione fra DS e HCII, che quindi conserva la sua attività inibitoria. E' importante anche a livello tissutale in quanto, interagendo con il DS della matrice extracellulare (ECM), limita le reazioni pro-coagulanti della trombina a livello dei tessuti.

Proteina C e proteina S

Questi inibitori fisiologici della coagulazione mettono in luce un ruolo fondamentale dell'endotelio nel controllo dell'emostasi (schema 32).



(schema 32)

La **proteina C (PC)**, glicoproteina di 62.000 Da, composta da una catena leggera ed una pesante, è uno zimogeno di serino-proteasi vitamina K-dipendente (concentrazione ematica 4µg/ml). Per svolgere la sua azione inibitoria la proteina C deve essere attivata. In forma attivata la proteina C (**APC**) è una serino-proteasi ed esercita le sue proprietà anticoagulanti distruggendo proteoliticamente i fattori V e VIII della coagulazione; i fattori attivati (Va e VIIIa) vengono distrutti più rapidamente dei pro-fattori inattivi. L'unico attivatore fisiologico della proteina C è la trombina. Quest'ultima attiva la proteina C soltanto dopo essersi legata ad un cofattore proteico associato alla membrana plasmatica delle cellule endoteliali, la **trombomodulina**, glicoproteina trans-membrana (75-100.000 Da). Il legame della trombina con la trombomodulina determina un

cambiamento conformazionale della trombina stessa tale che l'enzima non è più in grado di svolgere la sua attività pro-coagulante. Questi cambiamenti molecolari, infatti, le fanno perdere la capacità di attivare i fattori V, VIII e XIII della coagulazione, di interagire con la superficie piastrinica formando il complesso pro-trombinasico, di trasformare il fibrinogeno in fibrina:

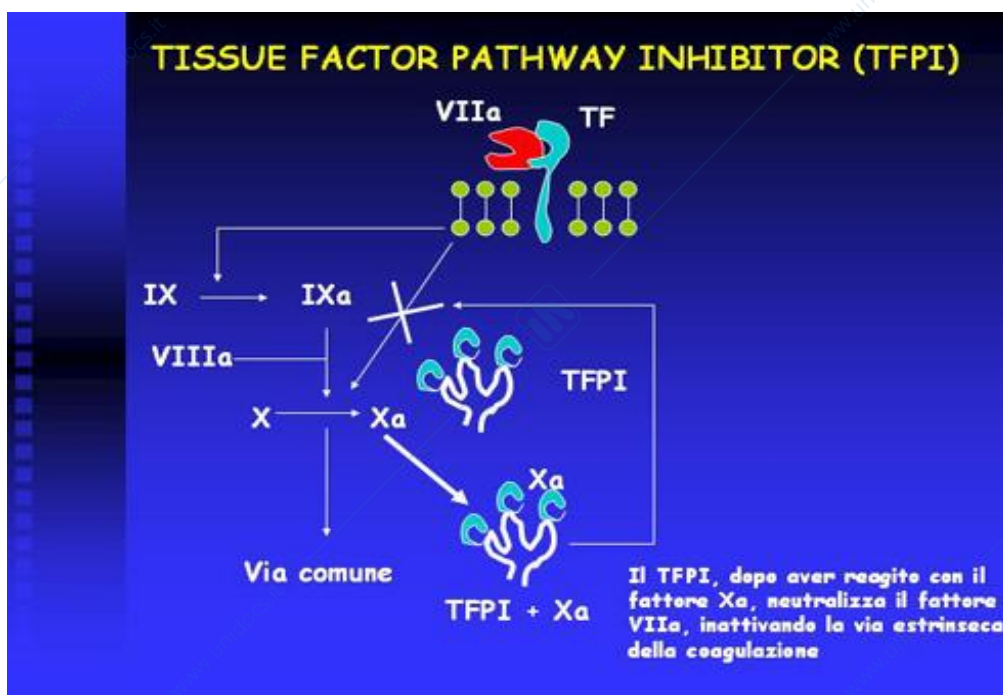
la trombina, quindi, in seguito alla sua interazione con la trombomodulina presente sulle superfici endoteliali, cambia specificità di substrato e, da potente enzima procoagulante, diventa una molecola ad attività anticoagulante, in quanto è in grado di generare APC. In questo cambiamento è determinante il ruolo dell'endotelio per la presenza sulla membrana plasmatica delle cellule endoteliali della trombomodulina, la quale ha anche il ruolo di localizzare l'azione anticoagulante dell'APC.

La proteina C attivata viene a sua volta inibita da uno specifico inibitore (**inibitore della proteina C**). La carenza di proteina C è collegata ad un aumentato rischio di trombosi.

L'azione della proteina C è potenziata dall'interazione con un'altra proteina, la cui sintesi è vitamina K-dipendente, la **proteina S**. Questa proteina plasmatica non è una serino-proteasi e, oltre che dal fegato, può essere sintetizzata in piccole quantità anche dalle cellule endoteliali e dai megacariociti midollari. Essa agisce come cofattore nell'attività anticoagulante della proteina C. La proteina S ha un'alta affinità con i fosfolipidi (in virtù dell'abbondanza dell'acido γ -carbossi-glutammico) in presenza di ioni calcio, favorendo quindi l'interazione fra APC e superfici cellulari. Il complesso APC-proteina S degrada specificamente ed estensivamente i fattori Va e VIIIa legati ai fosfolipidi sulle membrane delle cellule endoteliali e delle piastrine.

L'APC ha una duplice azione: infatti, oltre ad inattivare i fattori Va e VIIIa, stimola la fibrinolisi, agendo sugli inibitori della fibrinolisi. In particolare l'APC protegge l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) dall'inibizione da parte del suo inibitore, il PAI (plasminogen activator inhibitor). L'APC, quindi, è in questo caso un inibitore di un inibitore.

TFPI: tissue factor pathway inhibitor. Il TFPI è una glicoproteina di 33.000 Da, che circola nel plasma complessata alle lipoproteine. E' un inibitore della via estrinseca della coagulazione, è stato individuato di recente e si trova legato, sulla superficie delle cellule endoteliali, ai terminali carichi negativamente dei glicosaminoglicani eparino-simili che rivestono l'endotelio stesso. Tale inibitore è in grado di inibire l'attivazione diretta del fattore X a fattore Xa da parte del complesso TF/fattore VIIa (schema 33).



(schema 33)

Perché la sua azione si possa esplicare è però necessario che esso formi un complesso con il fattore Xa. Si forma cioè un complesso quaternario composto da TFPI-FXa-TF-FVIIa nel quale i siti attivi dei fattori Xa e VIIa sono legati al TFPI e quindi inattivati. Il TFPI può, comunque, bloccare direttamente il complesso TF-FVIIa anche in assenza di FXa. La sua importanza *in vivo* è limitata dal fatto che il complesso TFPI/fattore-Xa non è in grado di inattivare l'attivazione del fattore X a fattore Xa da parte del complesso tenasico della via intrinseca. Attualmente non si conoscono patologie umane correlate ad una carenza di TFPI.

Alfa₁-antitripsina

Glicoproteina monocateneria (55.000 Da) plasmatica in grado di inibire diverse proteasi, particolarmente la tripsina e l'elastasi, ma anche il FXIa e, in minor misura, altri enzimi, come la plasmina e la trombina (schema 30). Il suo ruolo nel modulare le reazioni emostatiche appare di minore importanza e la sua carenza non si associa ad una particolare predisposizione trombo-embolica. La sua azione fisiologica consiste nell'inibizione degli enzimi proteolitici liberati dai leucociti durante il processo infiammatorio. L'alfa₁-antitripsina è uno dei più importanti inibitori naturali di queste attività proteasiche, che, se non fossero inibite, provocherebbero danni estesi nei tessuti. Il deficit di questo inibitore è associato ad una condizione patologica caratterizzata dall'insorgenza precoce di enfisema polmonare e di cirrosi epatica, dovuti alla distruzione del tessuto polmonare ed epatico a causa dell'incontrollata azione degli enzimi leucocitari e successiva sostituzione con tessuto connettivo.

C₁-inattivatore

Glicoproteina monocateneria (105.000 Da) in grado di inattivare non solo la componente C1 del complemento, ma anche numerose proteasi, come plasmina, callicreina, F.XIIa, F.XIa (schema 30). L'inibizione avviene attraverso la formazione di un complesso stechiometrico, equimolecolare con l'enzima, con conseguente inattivazione del sito attivo enzimatico serinico. Nonostante sia capace di inibire le fasi precoci della coagulazione e la fibrinolisi, il deficit di questo inibitore non provoca diatesi emorragiche e/o trombo-emboliche. Il deficit congenito isolato determina nei pazienti il cosiddetto "edema angioneurotico ereditario", malattia caratterizzata dall'accumulo di liquidi a livello della cute e delle mucose, soprattutto laringea (morte per asfissia). Questo è dovuto ad un'attivazione eccessiva del complemento, con conseguente comparsa di sostanze flogogene (C3a, C5a) che inducono l'edema. Inoltre, essendo anche un inibitore della callicreina, la sua mancanza può portare ad un aumento di produzione di chinine, che sono potenti mediatori dell'infiammazione.

Alfa₂-macroglobulina (α₂-M)

Glicoproteina tetrameric (750.000 Da), costituita da 4 identiche subunità polipeptidiche. Può interagire con diverse proteasi, non solo seriniche. Fra gli enzimi della coagulazione inibisce soprattutto trombina e callicreina plasmatica. Interagisce anche con la plasmina. La sua carenza determina una predisposizione trombo-embolica.

Questo inibitore possiede numerose "sequenze esca" per un'ampia gamma di serino-proteasi. Quando la serino-proteasi "morde" tali sequenze, avviene un cambiamento allosterico di ciascun monomero dell'omotetramero e le catene si avvolgono intorno alla serino-proteasi, escludendola dall'ambiente.

4- Sistema fibrinolitico

La formazione della fibrina si verifica nel corso di vari processi, come l'inflammazione, la riparazione delle ferite e, soprattutto, l'emostasi e deve essere limitata nello spazio e nel tempo una volta che lo stimolo scatenante abbia terminato di agire.

La fibrinolisi rappresenta il meccanismo fondamentale attraverso il quale si dissolve il coagulo di fibrina, dopo che ha svolto la sua funzione.

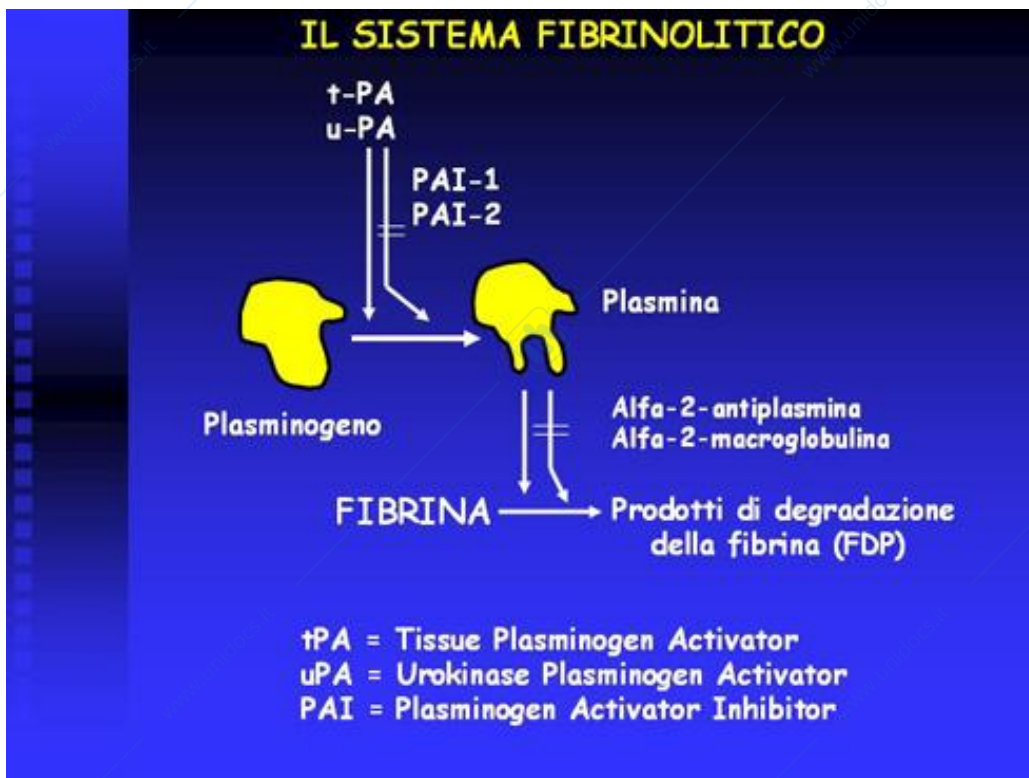
Nel processo emostatico, una volta che il vaso danneggiato è stato riparato, il coagulo deve essere dissolto al fine di evitare ostacoli alla circolazione del sangue. Esistono vari meccanismi di controllo atti a limitare la cascata coagulativa: deplezione dei fattori della coagulazione; clearance degli stessi fattori; inibitori plasmatici; ma il sistema fibrinolitico rappresenta il meccanismo fondamentale.

Il sistema fibrinolitico è un **SISTEMA MULTIENZIMATICO**, che presenta analogie con il sistema della coagulazione. E' infatti costituito da **serino-proteasi** (sito attivo composto da serina-acido aspartico- istidina). Il sito catalitico si trova nella regione C-terminale (catena B), mentre la regione N-terminale (catena A) contiene uno o più domini funzionali, responsabili delle diverse funzioni di queste molecole, come ad es. legame alla fibrina, legame a recettori sulle superfici cellulari, legame al plasminogeno, ecc. Sono enzimi tripsino-simili, cioè agiscono a livello del legame specifico arginina-lisina. Si trovano in forma di zimogeni, che vengono trasformati in enzimi attivi mediante un taglio proteolitico.

La **“reazione centrale”** della fibrinolisi è rappresentata dalla **conversione del plasminogeno (pro-enzima plasmatico, inattivo) nell'enzima proteolitico attivo plasmina**, mediante la scissione di un singolo legame peptidico. La plasmina così prodotta **degrada la fibrina**, dando origine a prodotti di degradazione solubili e quindi alla lisi del coagulo di fibrina (schema 34).

Componenti del sistema fibrinolitico:

1. - attivatori del plasminogeno
2. - (attivatore tissutale o tPA; attivatore di tipo urochinasico o uPA)
3. - plasminogeno
4. - plasmina
5. - inibitori

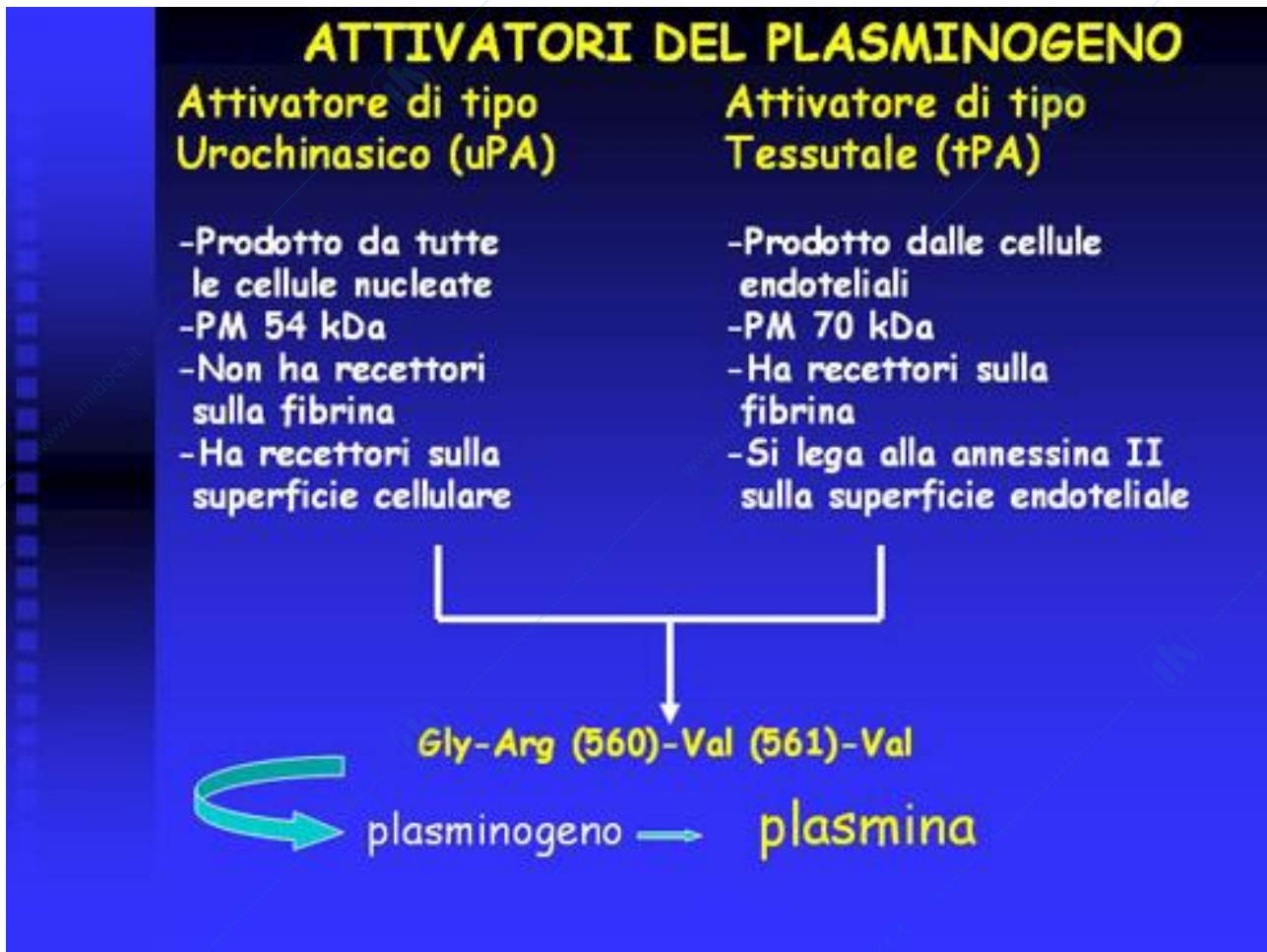


(schema 34)

ATTIVATORI DEL PLASMINOGENO (PAs)

Questo termine si riferisce a molecole in grado di convertire il plasminogeno a plasmina; in forma attiva sono entrambi delle serino-proteasi.

Se ne conoscono due tipi diversi sia da un punto di vista immunologico che funzionale (schema 35)



(schema 35)

Attivatore tessutale del plasminogeno (tPA). E' sintetizzato e secreto dalle cellule endoteliali in forma di catena singola. Concentrazione plasmatica di base: 5-10 ng/ml. La forza di trascimento (shear stress) esercitata dallo scorrimento del sangue sul rivestimento endoteliale vascolare sembra il più importante stimolo alla sua produzione (aumenta in condizioni di stress, dopo lo sforzo fisico: attività più alta negli atleti). Peso molecolare 70.000 Da. Nella sua forma attiva è costituito da due catene: catena A (regione NH₂-terminale) e catena B (regione COOH-terminale), contenente il sito catalitico. La forma a singola catena è convertita nella forma attiva a due catene, tenute insieme da un ponte disolfuro, mediante un taglio proteolitico (arginina 278- isoleucina 279) operato dalla plasmina.

Il tPA presenta alta affinità per la fibrina. Infatti, sulla fibrina esiste un sito di legame per particolari strutture ad "ansa" presenti nella catena A del tPA (attività fibrinolitica localizzata a livello del coagulo di fibrina).

Il tPA, oltre ad interagire con la fibrina, è in grado di legarsi anche a specifici siti di legame presenti sulla superficie delle cellule, **annexin II**. Esiste quindi anche un'attivazione del plasminogeno da parte del t-PA associato alle cellule. Questi "binding sites" sono stati trovati sulla superficie delle cellule endoteliali, che sono quindi in grado di "concentrare" la formazione di plasmina a livello del coagulo presente sulla superficie del vaso lesa.

E' stato dimostrato anche che le piastrine sono capaci di legare il plasminogeno e questo plasminogeno legato alla cellula è molto più suscettibile all'attivazione da parte del tPA: le piastrine

rappresentano una superficie idonea per l'attivazione del plasminogeno a livello del trombo, del quale costituiscono una componente fondamentale.

Attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico o urochinasasi (uPA). Serino-proteasi, isolata per la prima volta nelle urine, dove viene prodotta dalle cellule dei tubuli renali e dove ha la funzione di sciogliere i coaguli di fibrina che potrebbero "intasare" le vie di deflusso renali. Viene sintetizzata da molte cellule del tessuto connettivo, soprattutto fibroblasti, e da cellule epiteliali e macrofagi. E' secreta in forma inattiva (pro-uPA) nel sangue e la sua concentrazione ematica è di circa 8 ng/ml. Peso molecolare: 54.000 Da. La pro-uPA è a singola catena (scuPA, single-chain uPA), con scarsa attività enzimatica. In seguito a limitata idrolisi da parte della plasmina o della callicreina (lys158-ile159) si forma una molecola a doppia catena (tcuPA, two-chain uPA) che rappresenta la forma enzimaticamente attiva. A differenza del tPA, l'urochinasasi non possiede siti di legame sulla fibrina, ma è in grado di legarsi a recettori specifici presenti su tutte le cellule (uPAR, uPA receptor). Sulla membrana plasmatica, inoltre, sono presenti anche recettori per il plasminogeno. uPAR è presente anche su macrofagi e monociti e l'attività catalitica di uPA aumenta notevolmente in seguito all'interazione con uPAR: quando i monociti penetrano nel coagulo, uPA si lega ad uPAR ed attiva il plasminogeno a plasmina, contribuendo alla lisi del coagulo.

L'attività di entrambi gli attivatori del plasminogeno è inibita da inibitori specifici, come il PAI-1, che è largamente diffuso nel plasma ed è presente anche nei tessuti associato ad una proteina di adesione cellulare, la vitronectina.

PLASMINOGENO

Glicoproteina a singola catena di peso molecolare 88.000 Da, sintetizzata nel fegato. La forma nativa ha come aminoacido NH₂-terminale l'acido glutammico (Glu-plasminogeno), e viene facilmente convertita (mediante limitata digestione plasminica) in Lys-plasminogeno (peso molecolare 83.000 Da), in cui l'ultimo aminoacido è rappresentato dalla lisina. Contiene numerosi siti di legame per la lisina, che gli permettono di interagire con il fibrinogeno e la fibrina, per cui, quando si forma il coagulo, molto di questo pro-enzima rimane all'interno dell'ammasso di fibrina. In condizioni normali, solo circa il 60% del plasminogeno circolante è disponibile per essere attivato. Il rimanente è legato, seppure reversibilmente, ad una glicoproteina circolante ricca di istidina (PM 60.000 Da), la cosiddetta "glicoproteina ricca di istidina", che impedisce il legame alla fibrina.

PLASMINA

Il plasminogeno viene convertito nell'enzima attivo, chiamato plasmina, da tPA e uPA. Questo avviene mediante taglio proteolitico di un singolo legame peptidico corrispondente ad Arg560-Val561: si forma così una molecola costituita da due catene, la catena A (NH₂-terminale) e quella B (COOH- terminale, contenente il sito catalitico). Il lys-plasminogeno viene attivato più rapidamente rispetto al glu-plasminogeno.

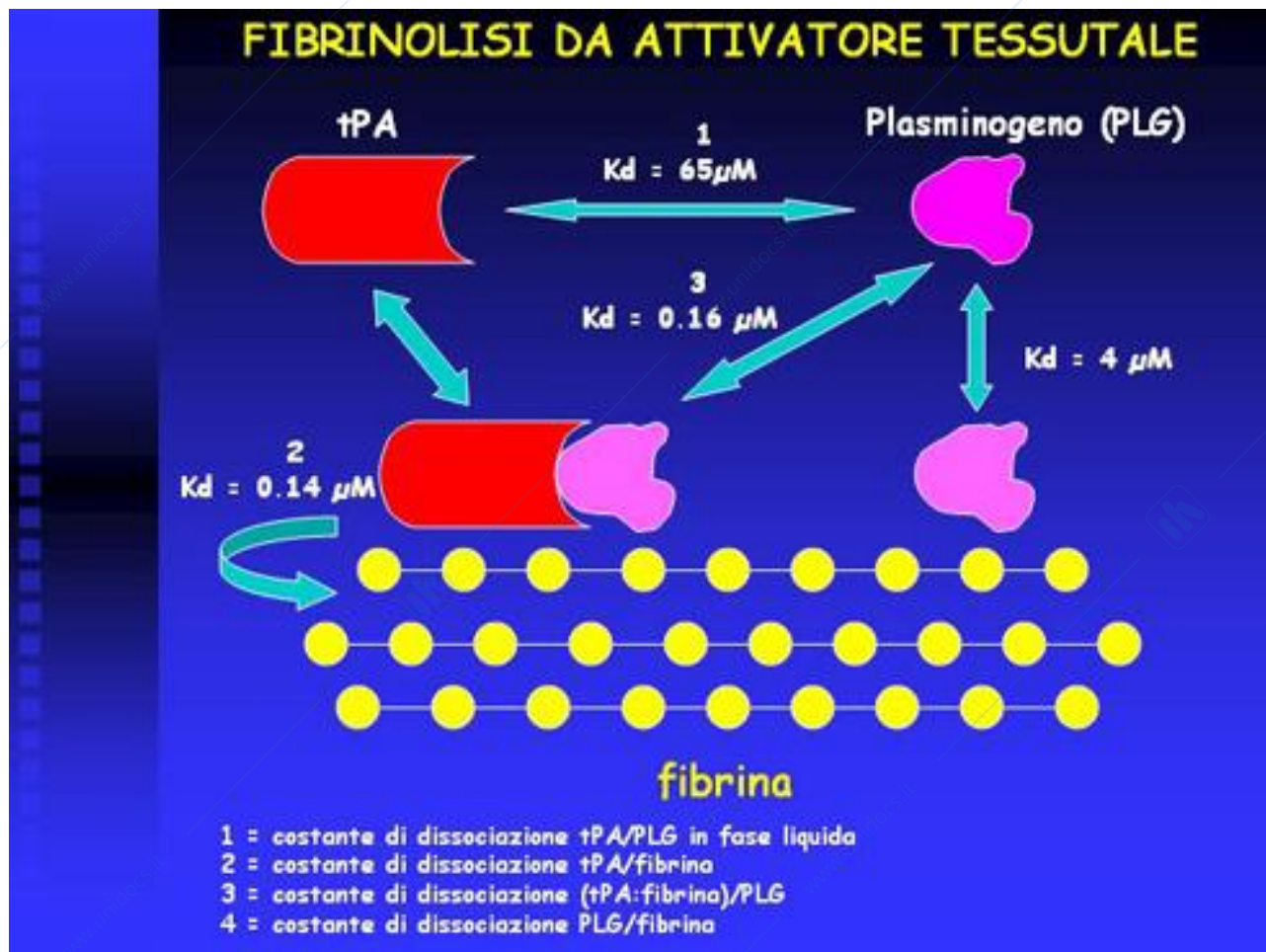
La catena A contiene 5 strutture ad "ansa", detti "kringle", identificabili con i cosiddetti "siti di legame per la lisina", che conferiscono alla plasmina, come pure al plasminogeno, una notevole affinità con la fibrina.

La plasmina può degradare sia il fibrinogeno, sia la fibrina solubile, sia la fibrina stabilizzata quale prodotto finale della coagulazione, formando prodotti di degradazione caratteristici per ogni forma di fibrina, che sono importanti nella diagnosi di varie condizioni patologiche.

MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DELLA FIBRINOLISI

Si distinguono tre differenti vie di attivazione della fibrinolisi :

1- fibrinolisi da tPA. E' la più importante e quella meglio conosciuta (schema 36).



(schema 36)

Il t-PA circolante plasmatico ha una bassa affinità per il suo substrato fisiologico, il plasminogeno ($K_d 65 \mu\text{M}$) [$K_d =$ corrisponde alla concentrazione di enzima necessaria a saturare metà dei siti di legame (plasminogeno); rappresenta quindi una misura della forza del complesso enzima-substrato : un valore elevato indica quindi un debole legame, viceversa un valore basso indica un legame forte] e quindi si ha scarsa attivazione di plasminogeno in fase liquida; il t-PA, tuttavia, ha un legame specifico forte con la fibrina ($K_d 0.14 \mu\text{M}$) e forma un complesso bi-molecolare t-PA/fibrina, che ha un'alta affinità per il plasminogeno ($K_d 0.16 \mu\text{M}$), il quale invece ha una bassa affinità per la fibrina in assenza di t-PA ($K_d 4 \mu\text{M}$). Il plasminogeno si lega quindi preferenzialmente al complesso t-PA/fibrina e viene attivato a plasmina sulla superficie del coagulo di fibrina.

2- via intrinseca, detta anche "fluid phase plasminogen activation" (schema 37).

Questa via dipende dall'azione del fattore XIIa della coagulazione e anche da una serie di proteasi che originano dal sistema plasmatico attivabile da contatto (coagulazione intrinseca). I fattori XIIa, XIa e la callicreina possono attivare direttamente il plasminogeno a plasmina, la quale attiva il plasminogeno a plasmina che opera la fase finale della fibrinolisi.

3- via correlata all'azione dell'urochinasi (schema 37), che deriva dall'attivazione della pro-urochinasi ad opera della callicreina. La pro-uPA può essere convertita a uPA anche dalla plasmina all'interno del coagulo, dove la plasmina, legata alla fibrina, è protetta dalle antiplasmine e può esercitare la sua azione sulla pro-uPA.



(schema 37)

DEGRADAZIONE DI FIBRINOGENO E FIBRINA DA PARTE DELLA PLASMINA

La plasmina è in grado di tagliare ponti peptidici arginina-lisina di molte proteine, compreso il fibrinogeno, la fibrina non stabilizzata e la fibrina insolubile, stabilizzata dal fattore XIII della coagulazione. La sua azione su fibrinogeno e fibrina porta alla formazione dei cosiddetti prodotti di degradazione del fibrinogeno e della fibrina o **F.D.P (fibrinogen-(fibrin) degradation products)**

Il fibrinogeno è una proteina con peso molecolare di 340.000 Da, formata da 3 catene peptidiche che, tridimensionalmente, formano 3 domini globulari (2 terminali ed 1 centrale) uniti da regioni di connessione (a bastoncino). A livello dei domini laterali fuoriescono delle catene laterali polipeptidiche, con terminazione COOH.

La degradazione del fibrinogeno e della fibrina avviene a tappe.

Degradazione del fibrinogeno (schema 38)

FRAMMENTI DI DEGRADAZIONE DEL FIBRINOGENO/ FIBRINA QUALI INDICI DI FIBRINOLISI

- 1) Il **fibrinogeno**, il **monomero di fibrina** ed il **polimero di fibrina instabile** vengono scissi dalla plasmina in modo esaustivo, fino alla formazione di **single** regioni globulari D ed E: FDP, fibrinogen degradation products
- 2) Nel **polimero di fibrina stabile** (tenuto assieme da legami covalenti) (schema 28), le interazioni termino-terminali fra regioni globulari D e quelle latero-laterali fra regioni globulari E, determinano raggruppamenti DD/E, i quali non sono scindibili dalla plasmina e si ritrovano come prodotti finali della fibrinolisi:

FDP: fibrin degradation products
il loro aumento nel siero è indice di fibrinolisi

N.B.: l'aumento nel siero dei fibrinopeptidi A e B (FPA e FPB), ottenuti per azione della trombina sul fibrinogeno, sono indice di attività coagulativa, mentre l'aumento degli FDP (monomeri E e D e dimeri DD/E), sono indice di fibrinolisi

(schema 38)

- 1- rimozione di ϵ B, α parte delle catene laterali, con formazione di tre frammenti (frammenti un frammento grande X)
- 2- degradazione asimmetrica del frammento X, a livello di una regione di connessione = un frammento D (100.000 Da) ed un frammento Y (150.000 Da)
- 3- il frammento Y è un prodotto intermedio e viene successivamente degradato: formazione di un frammento D (100.000 Da) e frammento E (50.000 Da), entrambi espressione delle singole regioni globulari del fibrinogeno.

La degradazione della fibrina non stabilizzata è pressoché identica alla degradazione del fibrinogeno, i frammenti differiscono solo perché i monomeri di fibrina, rispetto al fibrinogeno, hanno perduto i frammenti A e B (FPA ed FPB) ad opera della trombina.

Degradazione della fibrina stabilizzata dal F. XIIIa (schema 38) è più lenta e difficile e non produce frammenti X ed Y. Si ha una iniziale rimozione delle catene laterali con la formazione di polimeri ad alto peso molecolare. Quindi, in seguito a digestione più prolungata, si formano dei polimeri intermedi, contenenti più domini globulari. Infine, in seguito a tagli proteolitici successivi a livello delle regioni di connessione, si formano frammenti solubili DD/E.

INIBITORI DELLA FIBRINOLISI

L'inibizione del sistema fibrinolitico si verifica a vari livelli: inibizione degli attivatori del plasminogeno e della plasmina. Alcuni inibitori fisiologici della fibrinolisi sono gli stessi che sono in grado di inibire alcuni componenti del sistema della coagulazione (schema 39).

INIBITORI DELLA FIBRINOLISI

A) INIBITORI DEGLI ATTIVATORI DEL PLASMINOGENO (PAI)

- appartengono alla famiglia delle "serpins" (serina-protease-inhibitors)
- si trovano nel plasma (50 ng/ml)
- forma complessi covalenti con t-PA e u-PA

B) INIBITORI DELLA PLASMINA

- **alfa2-antiplasmina**, principale inibitore della plasmina
- glicoproteina di 70 kDa
- appartiene alla famiglia delle "serpins"
- concentrazione plasmatica, circa 70 µg/ml
- forma un complesso stechiometrico 1:1 con la plasmina
- inibisce anche XIIa, XIa, trombina, Xa
- la sua carenza è associata con grave diatesi emorragica
- **alfa2-macroglobulina**
- glicoproteina tetramericata di 750 kDa
- non appartiene alla famiglia delle "serpins"
- concentrazione plasmatica: 2.5 mg/ml
- interviene solo dopo la completa saturazione della alfa2-anti-plasmina

(schema 39)

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) È stato identificato per la prima volta nel terreno di coltura di cellule endoteliali umane, successivamente è stato ritrovato nella matrice extracellulare, nel plasma, nelle piastrine, e nei terreni di coltura di varie linee cellulari in vitro. In vivo è prodotto soprattutto dalle cellule endoteliali "attivate". È una glicoproteina a singola catena con peso molecolare di circa 52.000 Da. Appartiene alla famiglia delle serpine. Forma complessi covalenti con tPA a singola e a doppia catena e con uPA a doppia catena (tcu-PA), ma non con la forma a singola catena (scu-PA). La produzione di PAI-1 è modulata da vari fattori di crescita: trombina, IL-1, TNF, TGF-beta ne aumentano la sintesi.

PAI-2 (plasminogen activator inhibitor 2) Isolato dai macrofagi e dalla placenta, esiste in due differenti forme: una forma intracellulare, non glicosilata, con un peso molecolare di circa 47.000 Da ed una forma secreta, glicosilata, con un peso molecolare di circa 70.000 Da. Non è presente normalmente nel plasma, ma compare durante la gravidanza ed è di derivazione placentare. Fa parte della famiglia delle serpine ed inibisce il t-PA e l'u-PA a doppia catena, mentre reagisce meno con le forme a singola catena di entrambi gli attivatori.

Entrambi gli inibitori degli attivatori del plasminogeno presentano nella loro molecola sequenze "esca" simili alle sequenze di consenso per l'attività enzimatica presenti nelle molecole substrato degli attivatori del plasminogeno. In seguito al "morso enzimatico" scatta un meccanismo che porta alla formazione di un legame covalente tra l'inibitore ed un aminoacido del sito catalitico dell'enzima, con conseguente inibizione irreversibile dell'attività enzimatica.

alfa₂ antiplasmina. E' una glicoproteina a singola catena, sintetizzata dal fegato, con un peso molecolare di circa 70.000 Da, contenente il 13% di carboidrati. La sua concentrazione plasmatica è di 70µg/ml, ed eccede di circa 10 volte la quantità di plasmina presente in condizioni normali. Appartiene alla famiglia delle **serpine** (inibitori delle serino-proteasi).

Esiste in due forme, una attiva (70%) ed una inattiva (30%).

Come gli altri inibitori delle proteasi, ha un ampio spettro di inibizione in vitro, ma il suo **ruolo biologico in vivo è quello di inibire la plasmina.**

Forma un complesso stechiometrico 1:1 con la plasmina, legandosi dapprima in modo reversibile ai siti leganti lisina della plasmina stessa e formando successivamente un complesso stabile che inibisce in modo irreversibile l'enzima. Inoltre l'alfa₂-antiplasmina inibisce il legame del plasminogeno alla fibrina, in quanto compete con il plasminogeno stesso per i siti di legame per la lisina, impedendone l'attacco alla fibrina. Lo stesso meccanismo d'azione è utilizzato da un analogo della lisina, l'acido ε-aminocaproico, utilizzato come inibitore della fibrinolisi. L'alfa₂-antiplasmina può inibire anche altre proteasi, come l'uPA, il F.XIIa, XIa, Xa, la callicreina e la trombina.

alfa₂ macroglobulina. E' un inibitore della plasmina che agisce più lentamente ed in tempi successivi rispetto all' α₂-antiplasmina. La plasmina non reagisce con questo inibitore finchè non sono state saturate tutte le molecole dell' α₂-antiplasmina.

E' una glicoproteina di peso molecolare 725.000 Da, contenente l'8% di carboidrati, non appartiene alla famiglia delle serpine.

E' costituita da due unità tenute insieme da legami non covalenti; ogni unità è composta da due catene tenute insieme da ponti S-S. La sua concentrazione plasmatica è correlata all'età : la concentrazione massima si ha da 0 a 3 anni (4.5g/L), poi diminuisce (adulto 2-2.5g/L). Forma complessi anche con altre proteasi, serino-, cisteino- e metallo-proteasi.

Il legame dell' α₂ macroglobulina alla proteasi si accompagna ad un taglio proteolitico dell'inibitore ad opera della proteasi stessa, con eliminazione di un frammento di 85.000 Da. Questo determina un cambiamento conformazionale dell'inibitore tale che l'enzima rimane "intrappolato" all'interno della molecola dell'inibitore. L'inibizione dell'attività enzimatica è dovuta quindi ad un impedimento sterico.

LA "BILANCIA EMOSTATICA ENDOTELIALE"

ACCENNI ALLA STRUTTURA DEI VASI

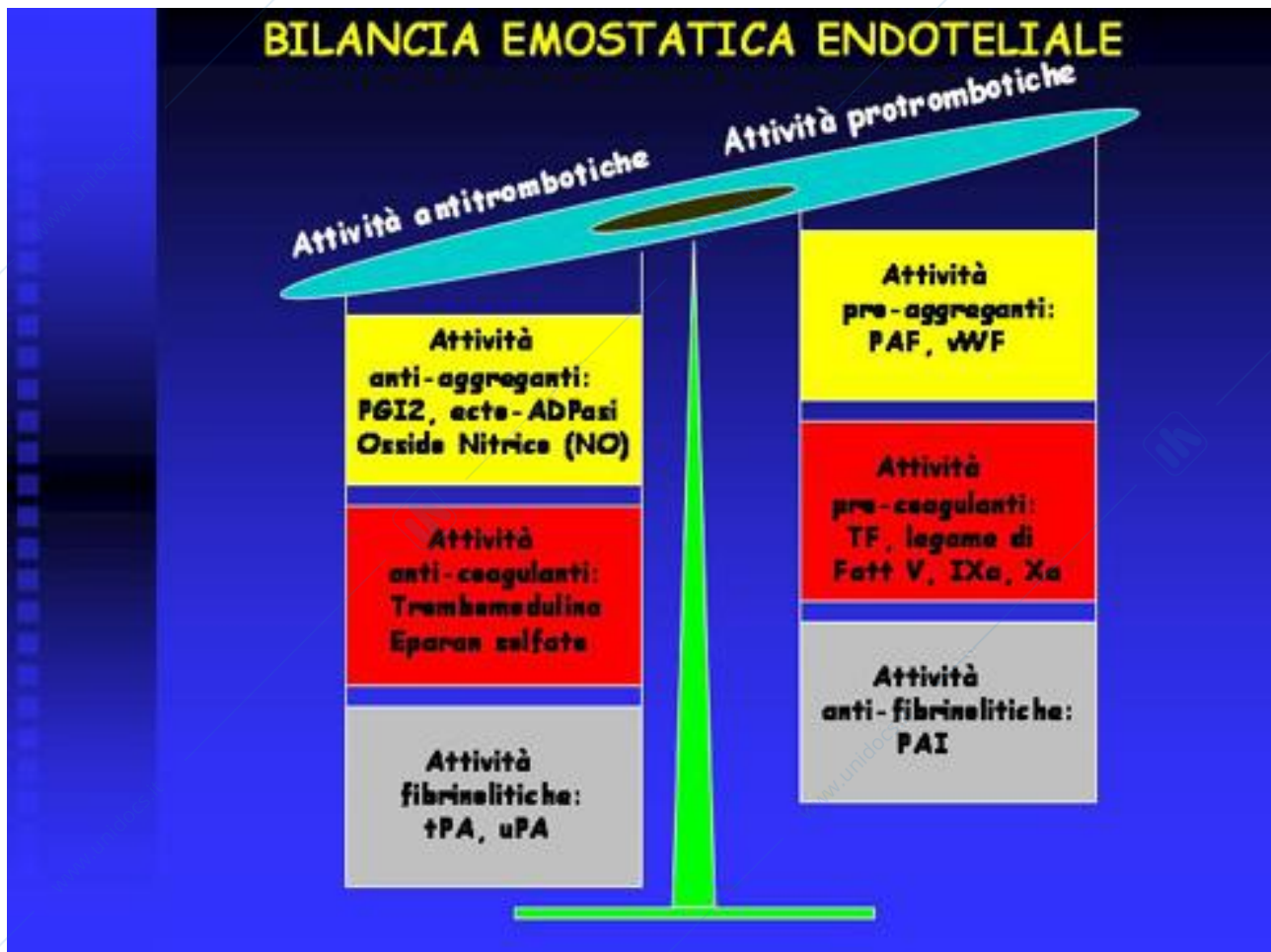
- 1. ARTERIE.** Le arterie sono vasi che si dipartono dal cuore e, ramificandosi, raggiungono tutti gli organi in direzione centrifuga. Le arterie diminuiscono progressivamente di calibro e si distinguono arterie di grosso calibro (con diametro superiore a 7 mm), di medio calibro (con diametro tra 7 mm e 2.5 mm) e di piccolo calibro (con diametro inferiore a 2.5 mm). Le ultime diramazioni, le arteriole, presentano un diametro spesso inferiore ai 100 µm. Secondo la "legge di Bichat", quando un'arteria si divide la somma delle superfici di sezione delle branche di divisione è sempre superiore alla superficie di sezione del tronco originario. Quindi, la capacità del letto arterioso aumenta a mano a mano che ci si allontana dal cuore. La parete delle arterie è costituita da tre strati concentrici, con struttura e spessore variabili secondo le dimensioni del vaso. Si distinguono: a) la **tonaca intima**, rivestita da endotelio, che comprende anche la membrana basale endoteliale e la membrana elastica limitante interna; b) la **tonaca media**, costituita prevalentemente da fibre elastiche (arterie di grosso calibro) o da cellule muscolari lisce (arterie di medio e di piccolo calibro). Essa è limitata esternamente dalla membrana elastica limitante esterna; c) la **tonaca avventizia**, di natura connettivale e contenente sottili vasi sanguigni (vasa vasorum) e filamenti nervosi (nerva vasorum).

2. **VENE.** Le vene provengono dalla periferia dell'organismo e arrivano al cuore destro, quindi in esse la circolazione di svolge in direzione centripeta. Inizialmente sono di piccolo calibro (venule), quindi si riuniscono in tronchi sempre più voluminosi (vene di medio e di grosso calibro), ricalcando più o meno fedelmente l'organizzazione delle arterie. Le tre tonache descritte nelle arterie sono presenti anche nelle vene e la loro struttura varia in rapporto alla dimensione del vaso. In genere le pareti venose sono più sottili di quelle arteriose. Nella tonaca media prevale la componente muscolare nelle vene di tipo "propulsivo", presenti nelle zone declivi del corpo e dove il sangue defluisce in senso contrario alla forza di gravità; il tessuto fibro-elastico prevale invece nella tonaca media delle vene di tipo "ricettivo", caratteristiche delle parti più alte del corpo. Nelle vene di tipo propulsivo le tonaca intima può estroflettersi a formare pieghe con funzione di valvole, che hanno la funzione di impedire il reflusso del sangue, facilitandone il ritorno al cuore. In particolare, le vene degli arti inferiori presentano valvole dislocate ad intervalli regolari, mentre le vene ricettive ne sono completamente prive (vene polmonari, vena cava superiore).
3. **CAPILLARI.** Rappresentano una rete di sottili vasi sanguigni, scoperta nel 1661 da Malpighi. Sono interposti tra arteriole e venule, garantendo la continuità dell'albero circolatorio. Si valuta che nell'organismo siano presenti circa 10 miliardi di capillari, che presentano un diametro medio di circa 8-10 μm , con una superficie totale di circa 700 m^2 ; in certi organi (fegato, surrene, ipofisi, ecc.) hanno calibro irregolare, adattandosi alla disposizione delle lamine o cordoni cellulari epiteliali; in questi casi i capillari prendono il nome di **sinusoidi**. La parete dei capillari è costituita da endotelio, che riposa su una sottile membrana basale, rinforzata spesso da una delicata guaina di fibre reticolari, nel cui spessore sono situati i **periciti**, o "cellule avventiziali", la cui funzione non è ben definita (probabile regolazione del calibro dei capillari per un meccanismo contrattile o per liberazione di sostanze vasomotorie).
4. **ANASTOMOSI ARTERO-VENOSE.** In molti distretti dell'organismo le arterie e le vene sono collegate, oltre che dalle reti capillari, che sostengono il cosiddetto "flusso nutrizionale", anche da particolari canali vascolari diretti (anastomosi artero-venose), i quali rappresentano quindi un cortocircuito fra circolazione arteriosa e venosa e sostengono il cosiddetto "flusso non nutrizionale". Questi canali sono forniti di particolari cuscinetti cellulari sotto-endoteliali che possono regolare l'ampiezza del lume vasale, variando così il flusso sanguigno. In certi casi, come nei polpastrelli delle dita delle mani e dei piedi, l'anastomosi è lunga e convoluta, avvolgendosi con un aspetto glomerulare.
5. **L'ENDOTELIO.** E' rappresentato da un singolo strato di cellule che rivestono omogeneamente la parte più interna del letto vascolare. Le cellule endoteliali hanno forma allungata o poligonale e presentano vescicole pinocitotiche che rappresentano la principale modalità di trasferimento di nutrienti dal lato luminale a quello abluminale (trans-citosi). Contengono nel loro interno i granuli di Weibel-Palade, strutture circondate da membrana che rappresentano organelli di deposito del fattore di von Willebrand (vWF). Tale molecola è importante (oltre che per la funzione dell'endotelio) anche perché anticorpi contro il vWF permettono di identificare dal punto di vista citochimico le cellule endoteliali. Un altro antigene specifico delle cellule endoteliali è il CD31. L'endotelio vascolare era considerato una specie di barriera passiva, la cui unica funzione consisteva nel trasferimento di nutrienti e nel regolare gli scambi di ossigeno e anidride carbonica tra sangue e tessuti. Attualmente esso è considerato un organo vero e proprio, con una superficie totale paragonabile a quella di un campo da calcio ed un peso di circa 250 grammi, dotato di molteplici attività: 1) membrana che regola il passaggio di molecole di piccole e grandi dimensioni attraverso la parete vascolare; 2) modulatore del tono vascolare e del flusso sanguigno; 3) sede di metabolizzazione di alcuni ormoni; 4) controllore dell'interazione dei leucociti e dei linfociti con i vasi e quindi regolatore della risposta infiammatoria ed immunitaria; 5) modifica le lipoproteine depositate nella parete delle arterie, rilasciando radicali tossici dell'ossigeno; 6) rilascia fattori di crescita che regolano la proliferazione e differenziazione delle cellule

muscolari lisce della tunica media; 7) costituisce una superficie che regola i meccanismi emostatici, mantenendo il sangue in stato di fluidità. Quest' ultima proprietà, che ci interessa direttamente per la comprensione della fisiopatologia del processo emostatico, si basa su numerose attività presenti sull'endotelio o secrete in circolo in condizioni di normalità, che nel loro insieme definiscono la cosiddetta bilancia emostatica endoteliale.

LA BILANCIA EMOSTATICA ENDOTELIALE

Come mostrato nello schema 40, la cellula endoteliale presenta sia attività anti-trombotiche, sia attività pro-trombotiche.



(schema 40)

ATTIVITA' ANTI-TROMBOTICHE:

- 1) **Inibizione della aggregazione piastrinica.** La carica elettronegativa della superficie dell'endotelio previene la deposizione e l'adesione spontanea delle piastrine. L'endotelio rilascia un particolare prodotto di elaborazione dell'acido arachidonico, cioè la prostaglandina-I₂ (PGI₂), detta **prostaciclina**, che è un potente antagonista della aggregazione piastrinica ed ha una forte attività di vasodilatazione. Inoltre esso rilascia NO (**ossido nitrico**), precedentemente chiamato EDRF (endothelium-derived relaxing factor), con attività di vasodilatazione ed antagonista della aggregazione piastrinica. Sulla superficie luminale della cellula endoteliale è presente l'enzima **ecto-ADPasi**, il quale idrolizza l'ADP rilasciato dalle piastrine durante la cosiddetta "release reaction", impedendo a tale agonista di innescare le vie di trasduzione del segnale necessarie per la aggregazione piastrinica.
- 2) **Inibizione della coagulazione sanguigna.** Sulla superficie endoteliale è espressa la **trombomodulina**, recettore della trombina: quando la trombina si lega a tale recettore, essa

modifica la sua affinità di substrato (normalmente rappresentati da fibrinogeno, fattore XIII, fattore VIII, fattore V) ed attiva la proteina C, innescando la via della anti-coagulazione controllata da tale serino-proteasi. Inoltre, la superficie endoluminale dell'endotelio esprime grandi quantità di un proteoglicano con catene laterali glicosaminoglicaniche che hanno sequenze simili a quelle anti-coagulanti dell'eparina. Si tratta delle catene di **eparan-solfato**, le quali, oltre a catalizzare l'interazione tra AT-III e trombina, legano anche il TFPI (tissue factor pathway inhibitor), rendendolo disponibile al controllo della attivazione della via estrinseca della coagulazione.

- 3) Promozione della fibrinolisi.** La forza di trascinamento della corrente sanguigna sull'endotelio stimola il rilascio di **attivatore tessutale del plasminogeno (tPA)**, tanto che il cosiddetto "post-exercise plasma" (PEP), cioè il plasma di un individuo che è stato sottoposto ad un esercizio fisico intenso (corsa, bicicletta), enormemente arricchito di tPA, è utilizzato come materiale di partenza per isolare tPA nativo. Le cellule endoteliali producono anche attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPA).

ATTIVITA' PRO-TROMBOTICHE:

- 1) Induzione della adesione ed aggregazione piastrinica.** Le cellule endoteliali costituiscono una delle principali fonti di produzione (ma non l'unica) di **fattore attivante le piastrine (PAF, Platelet Activating Factor)**, fondamentale mediatore infiammatorio dalle molteplici funzioni, il quale è anche un potente agonista dell'aggregazione piastrinica. Inoltre, l'endotelio produce il **fattore di von Willebrand (vWF)**, il principale collante della adesione piastrinica.
- 2) Attivazione della coagulazione sanguigna.** Endotossine batteriche o citochine (TNF, IL-1) o il danno meccanico subito da cellule endoteliali adiacenti, inducono le cellule endoteliali ed espongono il **fattore tessutale**, che innesca la via estrinseca della coagulazione, sulla superficie luminale dell'endotelio. Inoltre, la **superficie fosfolipidica** dell'endotelio viene utilizzata (al pari di quella delle piastrine e dei leucociti) per l'assemblaggio del complesso tenasico della via intrinseca della coagulazione e di quello pro-trombinasi della via comune.
- 3) Inibizione della fibrinolisi.** Le cellule endoteliali rilasciano **inibitori degli attivatori del plasminogeno (PAIs, plasminogen activator inhibitors)**, sia in seguito a danno meccanico della cellula endoteliale, sia in seguito ad un rallentamento del flusso sanguigno, come può verificarsi soprattutto nel compartimento venoso, sia in risposta a citochine infiammatorie (danno biochimico).

Le cellule endoteliali integre servono, in primo luogo, ad inibire l'adesione piastrinica e la coagulazione del sangue. Il danno e l'attivazione delle cellule endoteliali stimola l'espressione di un fenotipo pro-trombotico, che sbilancia l'assetto emostatico dell'endotelio a livello locale (schema 40).