

## Fisiopatologia della coagulazione: nuove acquisizioni

Franco Manzato<sup>1</sup>, Giuseppe Lippi<sup>2</sup>, Massimo Franchini<sup>3</sup>, Gian Cesare Guidi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Carlo Poma, Mantova.

<sup>2</sup>Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona

<sup>3</sup>Centro di Immunoematologia e Trasfusione, Azienda Ospedaliera di Verona, Verona

### Abstract

#### Physiopathology of blood coagulation: recent acquisitions

Haemostasis is a field of clinical biochemistry in constant evolution; technical progresses joined to recent scientific discoveries, promote the comprehension and characterization of the mechanisms that regulate the delicate balance of the haemostatic system. After endothelial damage, following activation of primary haemostasis, secondary haemostasis, known also as blood coagulation, develops. Blood coagulation involves a series of coordinated and calcium-dependent conversions of proenzymes to the respective serine proteases, culminating in the conversion (activation) of prothrombin to thrombin. Activation, amplification of the coagulation cascade and stabilization of the blood clot are rigorously modulated by a balanced activity of specific proteases and respective allosteric or enzymatic inhibitors, which proper function is essential to ensure the correct development of the system.

### Riassunto

L'emostasi è una branca della biochimica clinica in costante evoluzione; il susseguirsi dei progressi tecnologici e delle scoperte scientifiche hanno consentito di comprendere e caratterizzare i meccanismi che regolano il delicato bilancio delle forze emostatiche. A seguito di danno endoteliale, dopo l'attivazione dell'emostasi primaria, si sviluppa l'emostasi secondaria, nota anche come coagulazione. La cascata coagulativa coinvolge una serie di conversioni enzimatiche coordinate e calcio-dipendenti, di proenzimi nelle rispettive proteasi seriniche, culminanti nella conversione (attivazione) della protrombina a trombina. Attivazione, amplificazione della cascata e stabilizzazione del coagulo sono rigorosamente modulate dal bilancio tra l'attività di proteasi specifiche e dei rispettivi inibitori allosterici ed enzimatici, il cui corretto funzionamento è essenziale per garantire l'appropriato funzionamento del sistema.

### Introduzione

La coagulazione è uno dei meccanismi chiave del processo emostatico, il cui evento centrale è la formazione della trombina. Essa consiste in una serie straordinariamente complessa d'eventi, che coinvolgono numerose molecole. La semplicità con cui è possibile riconoscere la manifestazione clinica di un difetto del sistema coagulativo e la facile disponibilità di un tessuto come il sangue hanno portato all'incredibile quantità di informazioni accumulate in quasi 150 anni di indagini. Per questo motivo, la coagulazione è tradizionalmente descritta mediante modelli. Un modello è un modo per semplificare, ridurre a concetto e rendere comprensibile un sistema complesso. Il modello tradizionale della coagulazione è quello a "cascata", proposto pressoché contemporaneamente da due gruppi di ricerca nella prima metà degli anni '60 (1, 2). Esso rappresenta la coagulazione come una serie di reazioni proteolitiche, in ognuna delle quali un precursore inattivo (zimogeno) di un enzima proteolitico è convertito in forma attiva (proteasi) che, a sua volta, è in grado di attivare la proteasi successiva della serie. Poiché le singole reazioni sono catalizzate da un enzima e poiché la molecola di un enzima può catalizzare la formazione di un numero molto grande di molecole, si comprende facilmente l'enorme

potenziale d'amplificazione efficacemente descritto dal modello "a cascata".

Il successo della "cascata" dipende in larga misura dall'ottima rappresentazione che il modello fa dei due test tradizionali di screening della coagulazione, il tempo di protrombina (PT) e il tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT), i quali raffigurano la via estrinseca e la via intrinseca, rispettivamente. Malgrado il modello ben s'adatti alla descrizione di quanto succede *in vitro*, è assolutamente inadeguato per spiegare i complessi eventi che portano all'emostasi *in vivo*. L'osservazione clinica mette in evidenza che i deficit di FXII, Chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK), Precallicreina (PK) non causano diatesi emorragica ed è pertanto discutibile che l'attivazione dalla coagulazione avvenga tramite la via intrinseca. Né si comprende perché l'attivazione del FX da parte della via estrinseca non compensi la carenza di FVIII e IX, componenti essenziali per l'emostasi, giacché i loro difetti caratterizzano l'emofilia. D'altra parte, pur essendo il FXI tradizionalmente considerato una proteina centrale della via intrinseca, molti pazienti con carenza di FXI manifestano un sanguinamento eccessivo solo dopo un forte impegno emostatico, mentre sono rari i sanguinamenti spontanei, suggerendo una via d'attivazione per questo zimogeno indipendente da quella di contatto. In un modello più

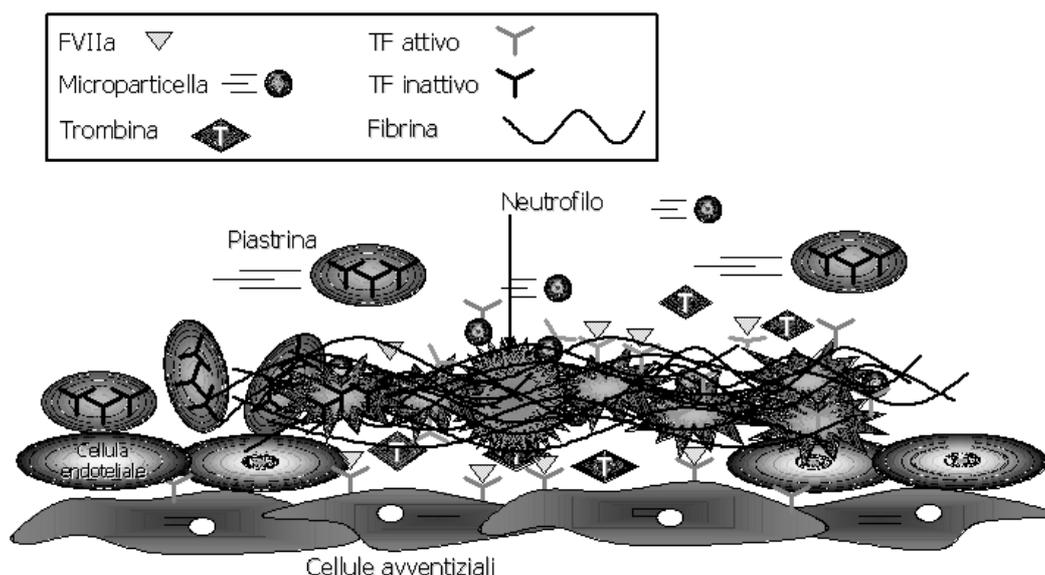
attuale, la coagulazione può essere descritta in fasi:

- a. Innesco della coagulazione; l'evento chiave iniziale è l'esposizione del Fattore Tessutale (TF) legato ad opportuna membrana;
- b. Propagazione della trombina; questa fase è caratterizzata dall'estesa formazione di complessi enzimatici, dalla realizzazione di un coagulo stabile con conseguente contenimento della perdita ematica;
- c. Spegnimento della coagulazione da parte degli anticoagulanti naturali, per limitare gli eventi procoagulanti e prevenire l'eccessiva formazione di coagulo;
- d. Eliminazione/dissoluzione del coagulo (fibrinolisi);
- e. Riparazione e rigenerazione dei tessuti.

### L'innesco della coagulazione

Il TF è la proteina responsabile dell'innesco della coagulazione. E' una glicoproteina di membrana espressa sulla superficie di molte cellule; le più ricche sono quelle localizzate immediatamente sotto l'endotelio, come i fibroblasti e le cellule muscolari lisce. Le cellule endoteliali quiescenti non esprimono il TF alla loro superficie, ma molti stimoli come le citochine o le proteasi della coagulazione, alterando la regolazione dei fattori che ne controllano la trascrizione (3), inducono una notevole espressione della proteina sulla superficie endoteliale, trasformando quest'ultima in un fenotipo protrombotico. E' quanto accade in molte condizioni fisiopatologiche, come la sepsi, il diabete, la sindrome coronaria, nelle quali si ha la presenza contemporanea in circolo di trombina e mediatori dell'infiammazione. A seguito di un danneggiamento della parete dei vasi, il TF, a contatto con il plasma, si lega con alta affinità e specificità al FVIIa, innescando in tal modo la coagulazione. Poiché il TF è una proteina transmem-

brana, è improbabile che sia rilasciato in circolo, a meno che non si verifichi un enorme danno tessutale; la convizione generale è pertanto che esso permanga *in situ*. Tuttavia, in seguito alla soluzione di continuità dell'endotelio o alla rottura di una placca, il TF avventiziale innesca la coagulazione. Il trombo, nella maggior parte dei casi, cresce nella direzione del lume del vaso. La distanza tra i fattori della coagulazione generati dal TF e la superficie del trombo diventa troppo grande per consentire che altra fibrina si aggiunga al trombo. Inoltre lo strato di piastrine che aderisce in seguito all'esposizione del collagene ed il rilascio da parte delle stesse dell'inibitore della via del fattore tessutale (TFPI), costituisce una solida barriera alla diffusione dei fattori attivati dal TF della parete vascolare (Figura 1). E' pertanto evidente che deve esistere un meccanismo alternativo in grado di generare FXa, e quindi trombina, relativamente lontano dalla parete del vaso, vicino alla superficie del trombo (4). In passato è stata più volte osservata la presenza di basse concentrazioni di TF antigene nel plasma umano; le concentrazioni aumentano drammaticamente durante la coagulazione intravascolare disseminata (DIC), in alcuni tumori ed in molte altre condizioni associate ad alto rischio trombotico. E' stato documentato, attraverso modelli di trombosi sia *in vivo* sia *ex vivo*, che questo TF circolante è incorporato nel trombo in crescita (Figura 1) (5). Il TF non ha quindi solo il ruolo di iniziare la formazione del coagulo sulla superficie cellulare, ma anche quello di guidarne l'espansione (6). L'ipotesi più accreditata sull'origine del TF circolante è la sua presenza all'interno di microparticelle cellulari; si tratta di piccole vescicole di membrana rilasciate da cellule stimolate o in apoptosi. Le microparticelle circolanti costituiscono una popolazione eterogenea, differente per origine cellulare, grandezza, composizione antigenica, proprietà



**Figura 1**

*Le prime fasi della coagulazione*

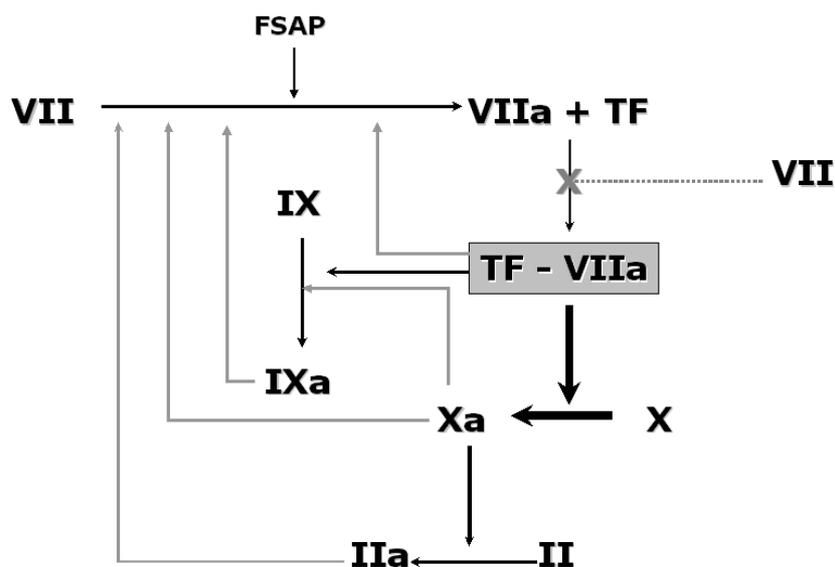
*In seguito a soluzioni di continuo dell'endotelio, il fattore tessutale (TF), presente alla superficie delle cellule avventiziali, si trova esposto al sangue circolante e forma un complesso con il fattore VIIa che porta alla formazione di trombina e fibrina. Le piastrine aderiscono velocemente alla sede del danno, promuovendo la formazione della fibrina e la localizzazione del trombo.*

funzionali, derivanti soprattutto da piastrine, ma anche da leucociti, linfociti, eritrociti, cellule endoteliali. Possono sostenere la coagulazione esponendo fosfolipidi a carica negativa e TF (7, 8), possono trasferire molecole bioattive da una cellula all'altra, in quanto possono aderire, essere catturate o fondersi tra di loro o con altre cellule, comprese le piastrine. Nelle piastrine, all'interno degli  $\alpha$ -granuli e nel sistema canalicolare aperto, è stata dimostrata la presenza di una forma inattiva, preformata di TF che, in seguito all'attivazione piastrinica con agonisti come collagene o trombina, è esposto sulla superficie piastrinica (9). Inoltre, il TF è secreto dalle piastrine attivate all'interno di microvescicole. Secondo un modello proposto di recente, l'attivazione del TF intravascolare avverrebbe in seguito all'adesione di piastrine attivate e microparticelle ai neutrofili o monociti; il rilascio da parte di questi ultimi di prodotti di secrezione, come le specie reattive dell'ossigeno, ma anche serin proteasi, attiverrebbero il TF latente (Figura 1) (10, 11). Malgrado molte domande irrisolte, il TF circolante rimane l'interessante oggetto di molte ricerche.

Il FVIIa è presente in circolo in quantità pari al 1-2% della quantità totale di FVII (12). La maggior parte del FVII circola come zimogeno a singola catena (10 nmol/l), e solo tracce nella forma attiva a doppia catena. La conversione da singola a doppia catena si realizza per clivaggio a livello dell'Arg152. A concentrazioni fisiologiche ed in assenza di TF, il FVIIa è virtualmente inattivo, sia nei confronti del FX, sia del FIX (13). L'interazione proteina-proteina FVIIa-TF "accende" il sito attivo del FVIIa, aumentando la velocità d'attivazione del FX di quattro ordini di grandezza (14). Nel plasma, il FVIIa è inaccessibile alle varie serpine, compresa l'antitrombina (AT); per questo motivo, nonostante l'ambiente "sangue" sia ricco d'inibitori, il FVIIa gode di emivita

relativamente lunga, a differenza delle forme attivate degli altri fattori (15). Il FVII zimogeno funziona da inibitore dell'innesco della coagulazione, competendo con FVIIa per il legame con TF stesso (Figura 2) (16). L'azione inibitoria del FVII era stata ipotizzata da Bauer (17), avendo osservato che l'infusione di FVIIa ricombinate provocava un cospicuo aumento di Fibrino Peptide A (FPA), ad indicare l'attivazione della coagulazione, in un paziente con <1% di FVII, ma non innalzava i livelli di FPA in un altro paziente, il cui FVII attività era del 3% e FVII antigene del 16%. Poiché si tratta di un'inibizione di tipo competitivo, è evidente come l'effetto si perda ad alte concentrazioni di TF e/o di FVIIa.

Il FVII è attivato, con meccanismo a *feedback*, da molte delle proteasi prodotte durante la coagulazione (14), tuttavia la quantità di trombina prodotta è fortemente dipendente dalla preesistente concentrazione di FVIIa plasmatica e di TF esposto (Figura 2) (18). Al momento, non esiste descrizione convincente del meccanismo con cui è prodotto e circola il FVIIa plasmatico (19). Recentemente, è stata identificata ed isolata una nuova serin proteasi in grado di attivare non solo il FVII zimogeno (per questo chiamata *factor VII-activating protease* o FSAP) (20), ma anche l'attivatore del plasminogeno a singola catena (21) (Figura 2). FSAP sembra pertanto il principale candidato al mantenimento dei livelli circolanti di FVIIa e il legame tra coagulazione e fibrinolisi lo rende un interessante oggetto di studio per la comprensione dei fenomeni aterotrombotici. Recentemente sono stati pubblicati i risultati di uno studio prospettico, in cui un comune polimorfismo di questa proteina, il polimorfismo *Marburg 1*, caratterizzato da una diminuita capacità di attivare la pro-urochinasi, non correlava con l'aterogenesi precoce, ma risultava essere



**Figura 2**

*Innesco della coagulazione*

L'evento chiave è l'esposizione del fattore tissutale (TF) che si complessa con preesistente fattore VIIa. Il FVII zimogeno compete con il FVIIa per il legame con il TF fungendo da inibitore. Il complesso TF-VIIa attiva il fattore IX e, più efficacemente, il fattore X. Il FVII zimogeno può essere attivato da molte proteasi (trombina, fattore Xa, fattore IXa, complesso TF-VIIa); tuttavia, il principale candidato

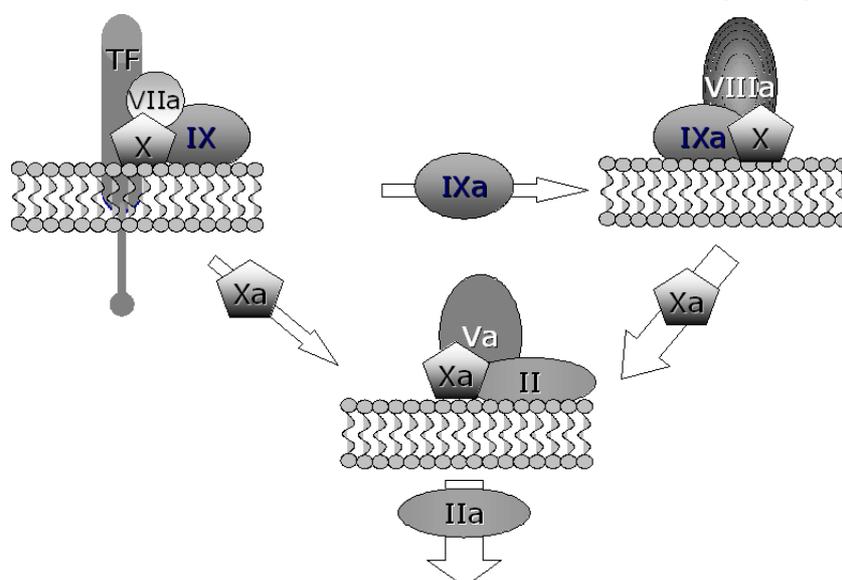
un forte ed indipendente fattore di rischio per la progressione della stenosi carotidea (22).

Il complesso TF-VIIa (complesso estrinsecasi) catalizza l'attivazione del FIX e FX, essendo quest'ultimo il substrato più efficiente (Figura 3). Perciò, il prodotto iniziale del complesso estrinsecasi è FXa. Il FIX compete con il FX per il complesso TF-FVIIa e richiede, per l'attivazione, il clivaggio a livello delle arginine 145 e 180. Il complesso TF-VIIa è in grado di scindere entrambi i legami, ma il FXa, su opportuna superficie, è in grado di aumentare la velocità di generazione del FIXa operando il clivaggio a livello dell'Arg140 e producendo un intermedio (FIXa) la cui attivazione è poi completata dal TF-FVIIa (23). L'iniziale

FXa, legato ad opportuna membrana, produce, anche se con pochissima efficienza, minute quantità di trombina (nanomoli/litro) (24), in grado di attivare il "burst" secondario, la fase di propagazione della trombina.

### Fase di propagazione della trombina

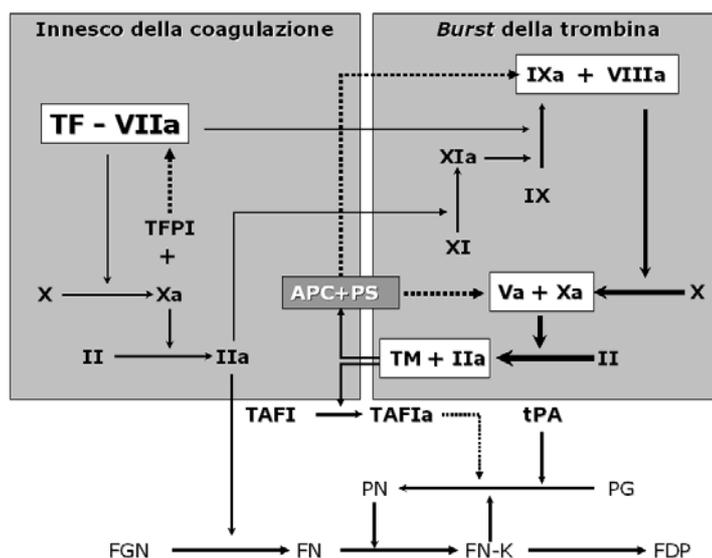
Poco dopo l'esposizione al TF, in un intervallo definito "innescò della coagulazione", sono prodotte minuscole quantità di trombina. Questa è essenziale per accelerare il processo coagulativo attivando le piastrine, il fattore XIII, i cofattori V e VIII, e iniziando il clivaggio del fibrinogeno per la produzione del coagulo (Figura 4). Come recente-



**Figura 3**

*Attivazione della trombina*

Le minime quantità di trombina prodotte dal complesso TF-VIIa (estrinsecasi) portano alla formazione dei complessi intrinsecasi (FIXa-VIIIa) e protrombinasi (Fxa-Va). Il complesso intrinsecasi è 50 volte più efficiente di quello estrinsecasi nell'attivare il fattore X.



**Figura 4**

*Rappresentazione schematica della coagulazione.*

mente dimostrato (25), l'attivazione delle piastrine avviene per concentrazioni di trombina pari a 0.5 nmol e la formazione del coagulo per concentrazioni pari a 10-30 nmol, cioè solo quando 0.06% e 3-5% rispettivamente della trombina si è formata. La maggior parte della trombina (96%), è generata dopo la formazione del coagulo nella fase detta di "propagazione della coagulazione". Poiché l'*end point* dei test per la valutazione dell'emostasi, a partire dal PT e APTT, è la generazione del coagulo, è evidente come la maggior parte della formazione della trombina sia ignorata dai test in uso per la valutazione del rischio emorragico o trombotico (26).

Non appena prodotto dalla trombina iniziale, il FVIIIa si combina sulla membrana delle piastrine attivate con il FIXa, generato dal complesso TF-FVIIa, per dar luogo al complesso detto "intrinsecasi" (FVIIIa-FIXa). L'intrinsecasi attiva il FX con un cinetica  $10^5$ - $10^6$  superiore rispetto al FIXa da solo, e 50-100 volte superiore rispetto all'"estrinsecasi" (27). Inoltre, il TFPI spegne la formazione del FXa da parte del complesso TF-FVIIa (Figure 3-5). E' pertanto evidente che la maggior parte del FXa è prodotto dal complesso FVIIIa-FIXa e come nell'emofilia A e B ci sia un significativo deficit della trombina prodotta (28). La diagnosi d'emofilia si basa sull'allungamento dell'APTT, probabile conseguenza di un artefatto *in vitro*. Al contrario, questi difetti non sono evidenziati dal PT, anche se questo test è innescato dall'aggiunta di TF. Eppure, se da un lato l'emofilia è caratterizzata da diatesi emorragica, dall'altro la via del TF è essenziale per l'emostasi. Quest'apparente contraddizione è dovuta al fatto che nel PT s'impiegano alte concentrazioni di TF (20 nmol/l circa) in grado di produrre, attraverso il complesso TF-FVIIa, una quantità di FXa sufficiente a mascherare il contributo dei fattori VIII e IX. Utilizzando concentrazioni più basse di TF il tempo di coagulazione nell'emofilia s'allunga (18). Il difetto maggiore rimane comunque quello associato all'assenza della fase di propagazione, in quanto manca la quota di produ-

zione di FXa sostenuta dal complesso FVIIIa-FIXa.

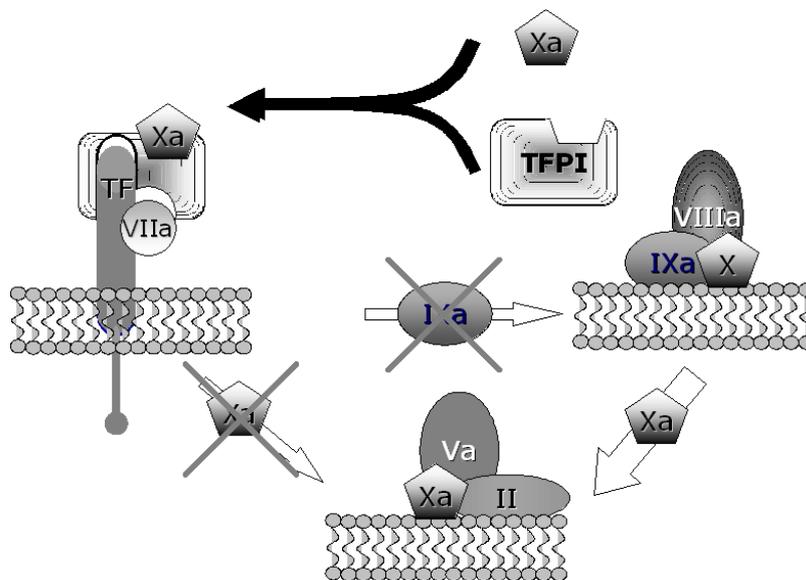
Il FXa si combina a sua volta con il FVa su opportuna superficie (membrana delle piastrine attivate), per costituire il complesso protrombinasi,  $10^5$ - $10^9$  volte più attivo del FXa nel catalizzare l'attivazione della trombina (Figura 3) (29). La fase di propagazione della trombina è pertanto contraddistinta dall'ampia formazione di complessi. Anche se questi sono caratterizzati da forte specificità per un substrato, presentano delle caratteristiche comuni:

- Ogni complesso è costituito da una serinproteasi K-dipendente, e da un cofattore proteico;
- Ogni complesso è costituito da componenti strutturalmente simili che necessitano di requisiti analoghi per assemblarsi e funzionare;
- I complessi sono strutturalmente analoghi;
- L'assemblaggio comporta un sostanziale aumento ( $10^5$ - $10^9$  volte) dell'efficienza catalitica nei confronti del substrato naturale.

Comuni sono anche gli eventi necessari alla loro formazione:

- Gli zimogeni vitamina K-dipendenti necessitano di conversione nelle corrispondenti serinproteasi;
- I cofattori proteici possono essere procofattori plamatici (FV e FVIII) o cofattori di membrana (TF e Trombomodulina); nel primo caso devono essere attivati per azione proteolitica, nel secondo è sufficiente la loro esposizione/espressione su opportuna membrana;
- La presentazione di un'appropriata superficie di membrana con fosfolipidi a carica negativa sulla quale, in presenza di  $Ca^{++}$ , possono formarsi i complessi enzimatici.

L'enzima chiave della coagulazione è la trombina (30) (Figura 4). La coagulazione rappresenta un'evoluzione del sistema del complemento e della risposta immunitaria; la moltitudine delle funzioni biologiche che la trombina è in grado di svolgere è testimonianza della sua evoluzione e non deve sorprendere se molte delle caratteristiche che



**Figura 5**  
Funzione del TFPI nell'inibizione del complesso estrinsecasi.

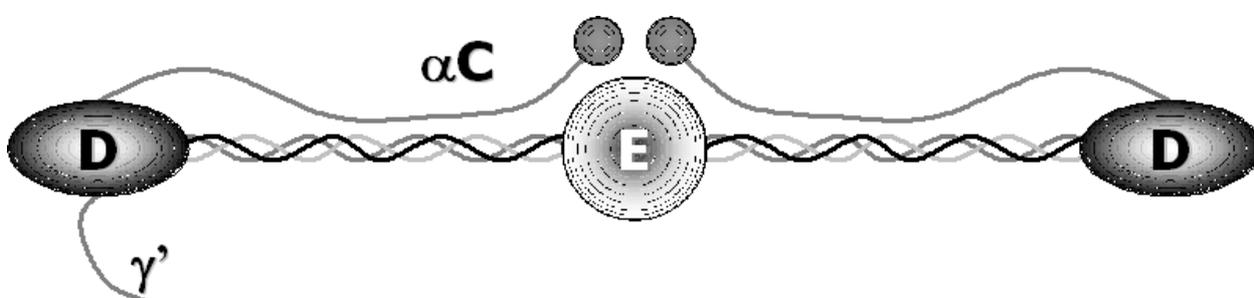
questa proteina mantiene sono peculiari dei fattori di crescita (31). Nei topi la mancanza del gene per la protrombina è incompatibile con la vita; al contrario, modelli con carenza di piastrine o di fibrinogeno non si presentano con caratteristiche altrettanto gravi. È evidente come la gravità del quadro non dipenda solo dalle funzioni svolte dalla trombina nell'ambito della coagulazione. La trombina, agendo direttamente come fattore di crescita o mediandone la secrezione, agisce come un potente mitogeno, influenzando le cellule muscolari lisce, i macrofagi, l'endotelio. È responsabile del rilascio di citochine e di altre componenti vasoattive e chemiotattiche; promuove l'adesione dei neutrofili all'endotelio, induce la contrazione delle cellule muscolari lisce. È coinvolta nell'angiogenesi, nella crescita e nelle metastasi dei tumori, nel riassorbimento osseo, nella sopravvivenza o apoptosi cellulare. Attiva i recettori delle proteasi attivate (PARs) ed è coinvolta nell'infiammazione e nell'aterosclerosi (31).

Anche nell'ambito della coagulazione, la trombina è in grado di giocare più ruoli, spesso contrastanti fra di loro:

- **Come pro-coagulante:** la trombina attiva le piastrine, la cui funzione indispensabile è quella di fornire la superficie di membrana su cui si ancorano i complessi K-dipendenti; catalizza la sua stessa produzione promuovendo la trasformazione di zimogeni (FVII, FXI) e procofattori (FV, FVIII) nelle corrispondenti forme attivate necessarie alla formazione dei complessi; trasforma il fibrinogeno in fibrina ed attiva il FXIII per la formazione della rete di fibrina stabilizzata.
- **Come anticoagulante:** la trombina, in seguito al legame con la trombomodulina (TM), catalizza l'attivazione della proteina C (PC).
- **Come antifibrinolitico:** il complesso trombina-TM attiva il *thrombin activated fibrinolysis inhibitor* (TAFI).

L'insieme di tutti questi processi, l'intensità con cui le singole reazioni sono attivate o inibite, concorrono a regolare il processo emostatico. Una delle azioni più eclatanti

della trombina è sicuramente la trasformazione di una proteina solubile, come il fibrinogeno, in un gel insolubile, il coagulo di fibrina. Il tutto avviene secondo una sequenza d'eventi che l'evoluzione della molecola del fibrinogeno ha perfezionato nel corso di milioni di anni. Anche il fibrinogeno e la fibrina sono in grado di svolgere più ruoli: nell'ambito della coagulazione, della fibrinolisi, nelle interazioni cellula-matrice, nella riparazione della ferite, nell'infiammazione, nelle neoplasie, ecc... (32). Il fibrinogeno è una proteina plasmatica composta da due subunità identiche ognuna delle quali è costituita da tre catene polipeptidiche, chiamate  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , tenute assieme da più ponti disolfuro (Figura 6). Tale nomenclatura si deve al fatto che le catene  $\alpha$  e  $\beta$ , per azione trombinica, rilasciano due piccoli fibrinopeptidi A e B (FPB) e formano le catene  $\alpha$  e  $\beta$  della fibrina. Le catene  $\gamma$  non sono clivate dalla trombina. Le porzioni N-terminali di tutte le sei catene sono raccolte al centro della molecola, in una regione detta dominio E, mentre le porzioni carbossi-terminali delle catene  $\beta$  e  $\gamma$  costituiscono due identiche regioni globulari distali, dette dominio D (32). La catena  $\alpha$  protrude dalla regione D con un dominio particolarmente flessibile, detto  $\alpha$ C, che finisce con una regione globulare posizionata vicino alla regione centrale E della molecola, quasi a costituire una quarta fibra di connessione tra la regione E e quelle D. L'azione della trombina sulla molecola di fibrinogeno comporta il rilascio dei due FPA e FPB e la formazione del monomero di fibrina. Il rilascio del FPA è rapido ed espone una sequenza di legame (Gly-Pro-Arg) sul dominio E che si lega, tramite un legame non covalente, ad un sito complementare sulla catena  $\beta$  della regione D di un monomero di fibrina adiacente. La sovrapposizione delle molecole di fibrina, in cui il dominio centrale di una si lega al laterale dell'altra, determina la formazione di protofibrille a doppio filo. Il rilascio del FPB è più lento; espone un altro sito di legame sul dominio E che si lega al proprio sito complementare sulla catena  $\beta$  della regione D, favorendo l'aggre-



**Figura 6**  
Rappresentazione schematica della molecola del fibrinogeno.

gazione laterale delle protofibrille e promuovendo così la formazione di fibre più grosse. In quest'azione sono coinvolte le interazioni tra domini C delle singole molecole di fibrina che promuovono il formarsi delle diramazioni e dell'impalcatura definitiva del coagulo di fibrina (33).

La fibrina è stabilizzata per azione del FXIII (34). Il fattore XIII (FXIII) plasmatico è un tetramero costituito da due subunità A e due subunità B; il FXIII piastrinico, responsabile del 50% dell'attività stabilizzante la fibrina, è invece un dimerico costituito solo dalle subunità A. Sono queste ultime subunità, sintetizzate da epatociti, monociti e megacariociti, che contengono il sito attivo. Le subunità B, la cui funzione è di trasporto, sono di sintesi epatica; secrete come monomeri, si legano alle A libere nel plasma. L'attivazione avviene per azione della trombina che stacca dalle subunità A i peptidi di attivazione; in presenza di  $Ca^{++}$  e di fibrina, si ha la dissociazione delle subunità A dalle B con esposizione del sito attivo. Il FXIIIa si lega alla fibrina a livello del dominio  $\alpha C$  ed è probabilmente quest'interazione che ne favorisce la dissociazione delle subunità. Il FXIIIa introduce nel coagulo una serie di legami stabili, dei quali il primo è fra le catene  $\gamma$  di due molecole di fibrina adiacenti. Più lenti sono i legami covalenti tra le catene  $\alpha$ , che tuttavia sembrano giocare un ruolo importante nella regolazione della fibrinolisi, interferendo con l'azione della plasmina nella regione intermedia tra domini D ed E. Il FXIII regola inoltre la rottura della fibrina, legando l' $\alpha 2$ -antiplasmina, l'inibitore più importante della plasmina, alle catene della fibrina (34).

E' sempre più evidente come l'architettura del coagulo sia coinvolta nella patogenesi dell'aterosclerosi e della trombosi. Numerosi studi clinici hanno messo in risalto l'associazione fra elevati livelli plasmatici di fibrinogeno ed aterosclerosi. S'è osservato che l'aumento del fibrinogeno si associa alla formazione di un coagulo più denso e resistente alla fibrinolisi (35). Anche aumentati livelli di protrombina/trombina sono responsabili di un'alterata struttura del coagulo e quindi di un aumentato rischio trombotico (36). Sono stati recentemente identificate alcune varianti genetiche del fibrinogeno e del FXIII in grado di influenzare l'architettura del coagulo. Approssimativamente 8-15% del fibrinogeno plasmatico contiene una variante delle catene  $\gamma$ , dovuta ad una traduzione alternativa del trascritto; il risultato è la sostituzione dei 4 aminoacidi carbossiterminali della catena  $\gamma$  con 20 residui differenti (catena  $\gamma'$ ) (Figura 6). Praticamente tutte le catene  $\gamma'$  che si trovano in vivo sono eterodimeri ( $\gamma A/\gamma'$ ). E' importante osservare che la concentrazione del fibrinogeno  $\gamma A/\gamma'$  correla con il rischio trombotico (37). Il fibrinogeno  $\gamma'$  contiene dei siti di legame per la subunità B del FXIII e per la trombina. Il primo sito di legame può portare ad un aumento del FXIII all'interno del coagulo con conseguenze fisiologiche che possono spiegare l'aumentato rischio trombotico. Quanto alla trombina, il legame con il fibrinogeno  $\gamma'$  è probabilmente responsabile del ritardo nel rilascio del FPB con conseguente deficit nell'aggregazione laterale delle protofibrille e formazione di un coagulo alterato con fibre più sottili, più ramificate, più resistenti alla fibrinolisi (38).

Sono stati identificati 5 polimorfismi per la subunità A del FXIII; uno di questi, caratterizzato dalla sostituzione di un aminoacido in posizione 34 (Val34Leu), è particolarmente frequente raggiungendo una prevalenza nella razza bianca di circa 0.25-0.30. Una recente pubblicazione (39), ha evidenziato che, ad alte concentrazioni di fibrinogeno, il FXIII Leu34 risulta avere un effetto protettivo, in quanto condiziona la formazione di un coagulo a fibre più spesse, a maglie più larghe e più permeabile di quanto non avvenga in presenza di FXIII Val34. Ancora una volta s'osserva come il rischio cardiovascolare possa essere influenzato dalle complesse interazione gene-gene, gene-ambiente (34, 39).

### Spegnimento della coagulazione

La coagulazione è regolata in modo estremamente preciso da meccanismi d'inibizione, sia stechiometrici, sia dinamici. I principali inibitori stechiometrici sono il TFPI e l'AT, mentre il sistema della PC è responsabile di un'inibizione di tipo dinamico.

Il TFPI è l'inibitore per eccellenza della fase d'innescio della coagulazione (Figura 5). Esso forma dapprima un complesso bimolecolare con il FXa, e quindi, in presenza di  $Ca^{++}$ , blocca il complesso TF-FVIIa, neutralizzando il complesso estrinsecasi ed eliminando la produzione da parte di questo sia del FXa, sia del FIXa, in modo tale che l'unica via per la produzione di FXa rimane il complesso FIXa-FVIIIa. Il TFPI ha una bassa concentrazione plasmatica (circa 2.5 nmol/l), che può solo ritardare la reazione emostatica. Tuttavia, in seguito alla somministrazione di eparina, il TFPI è rilasciato da cellule endoteliali e piastrine, ed è pertanto probabile che sotto l'azione di stimoli particolari possa raggiungere alte concentrazioni locali.

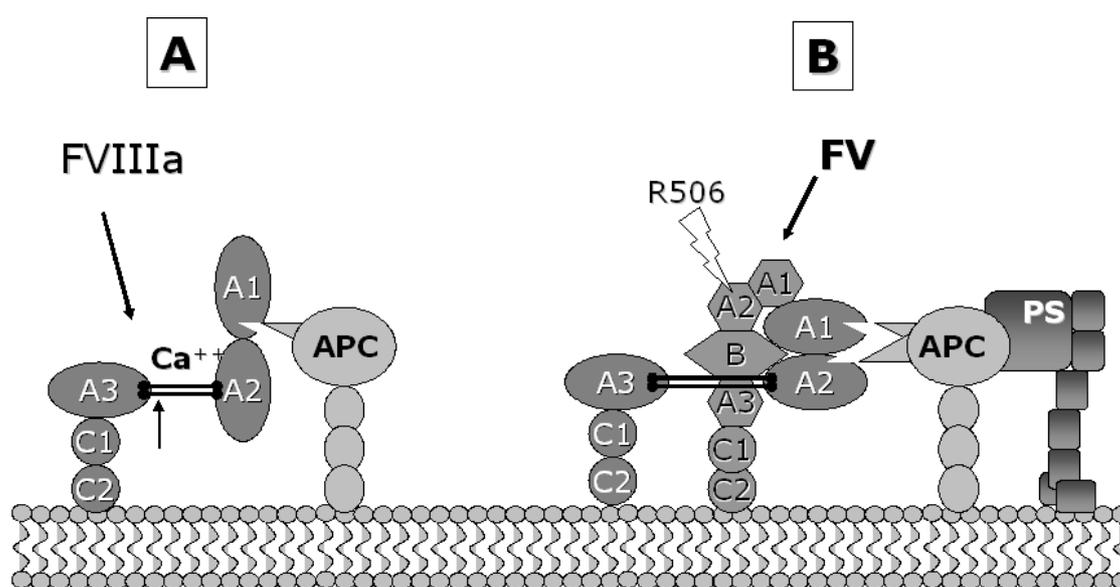
L'AT è il più importante inibitore delle proteasi seriniche (serpine) e dimostra una omologia del 30% circa nella sequenza aminoacidica con le altre serpine, come l' $\alpha 1$ -antitripsina, l'ovoalbumina, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1). E' presente nel plasma ad una concentrazione più che doppia (3.2  $\mu$ mol/l) rispetto a qualsiasi altro fattore della coagulazione generato dalla via del TF, ed è in grado di neutralizzare molte delle proteasi della coagulazione, anche se la sua azione è rivolta principalmente ad inibire il FXa e la trombina. L'azione sinergica di TFPI e AT genera una soglia cinetica che lo stimolo derivante dall'esposizione del TF deve necessariamente superare. Una concentrazione di TF inferiore a tale soglia non è in grado di promuovere la generazione di una significativa quantità di trombina; viceversa, concentrazioni che superino detta soglia portano ad una notevole e pressoché equivalente produzione di trombina (40). Il TFPI ed il sistema dinamico della PC cooperano in modo analogo: in questo caso, il primo rallenta la fase d'innescio della coagulazione, il secondo controlla attraverso la modulazione proteolitica dei FVIIIa e FVa due importanti reazioni: l'attivazione del FX e della protrombina (41).

L'importanza dell'AT è dimostrata dalla consistente associazione tra deficit e trombosi venosa, dall'incompa-

tibilità con la vita per lo stato omozigote, dall'efficacia della terapia eparinica. L'effetto anticoagulante dell'eparina è soprattutto dovuto all'attivazione dell'AT che però non è l'attivatore fisiologico. Ad interagire con l'AT *in vivo*, per assicurare la fluidità del circolo, sono gli eparan-solfati (HS) che, strettamente imparentati con l'eparina, rivestono la superficie vascolare. Gli HS sono in grado d'influenzare numerose molecole, tipi di cellule e processi di fondamentale importanza per l'infiammazione; la loro interazione con superfici cellulari, citochine, chemiochine, proteine della matrice, è in grado d'influenzare il "rolling" leucocitario sull'endotelio, la loro adesione, la diapedesi. La maggior fonte di HS sulla superficie di tutti i tipi di cellule sono i proteoglicani transmembrana, appartenenti alla famiglia dei *Syndecans* (42). L'AT, legandosi attraverso il sito di legame per l'eparina con uno di questi glicosaminoglicani (syndecan-4), è in grado di inibire l'adesione dei neutrofilii all'endotelio, la loro migrazione, la produzione di radicali dell'ossigeno; promuove il rilascio di prostaciclina endoteliale e quindi, in definitiva, controlla l'infiammazione. Anche attraverso l'inibizione del FXa e della trombina, l'AT previene la loro interazione con cellule ed il conseguente rilascio di mediatori pro-infiammatori. L'AT è pertanto una molecola complessa con diverse proprietà biologicamente importanti (43).

Il sistema della PC comprende, oltre allo zimogeno circolante che è attivato nella serin proteasi anticoagulante (APC), numerose altre proteine che non solo regolano la coagulazione, ma che possiedono anche importanti funzioni anti-infiammatorie ed anti-apoptotiche (44). La PC è una proteina K-dipendente e come tale comprende una regione caratterizzata dalla presenza di residui carbossilati dell'acido glutammico (Gla) indispensabile per il legame con il  $Ca^{++}$ , necessario, quest'ultimo, per la conformazione che la proteina deve assumere per poter funzionare.

Affinché la PC possa esplicare le attività anticoagulanti, la regione Gla si deve legare a superfici con fosfolipidi a carica negativa. La TM è una proteina transmembrana costituita da una regione *C-lectin like*, da 6 regioni *epidermal growth factor (EGF)-like*, da una regione ricca in serina/treonina, da una porzione transmembrana e da una corta coda citoplasmatica. Presente sulla superficie di tutte le cellule endoteliali, ha una concentrazione particolarmente elevata sull'endotelio che riveste il letto capillare. La trombina si lega con alta affinità alla TM e cambia la sua specificità di substrato; non riconosce più il fibrinogeno ma catalizza la trasformazione dello zimogeno PC in un enzima, l'APC che si libera in circolo dove svolge le funzioni di anticoagulante (Figura 7) (45). Il Recettore Endoteliale della PC (EPCR) è un'altra proteina di membrana del sistema della PC; è in grado di stimolare l'attivazione della PC legando la regione Gla della stessa per presentarla al complesso Trombina-TM. La Proteina S (PS) è una proteina K-dipendente che circola nel plasma in due forme: quella libera (30-40%), in grado di fungere da cofattore di APC, e quella complessata al C4BP (60-70%), proteina di regolazione del complemento. Il legame con il C4BP comporta la perdita di attività come cofattore della APC. Durante l'apoptosi, le cellule espongono sulla loro superficie fosfolipidi a carica negativa. Analogamente alle altre proteine K-dipendenti, la PS ha un'alta affinità per le membrane con fosfolipidi a carica negativa e quindi, legandosi con alta affinità ad esse, esercita sulle membrane delle cellule apoptotiche la sua azione anticoagulante (PS libera) ed antinfiammatoria attraverso la regolazione del complemento (PS complessata con C4BP). E' stato inoltre dimostrato che il legame della PS alla superficie delle cellule apoptotiche stimola la fagocitosi delle stesse da parte dei macrofagi. Quindi, la PS, grazie all'azione regolatrice del C4BP sull'attivazione del complemento, agisce



**Figura 7**  
Struttura e funzione del sistema della Proteina C Attivata.

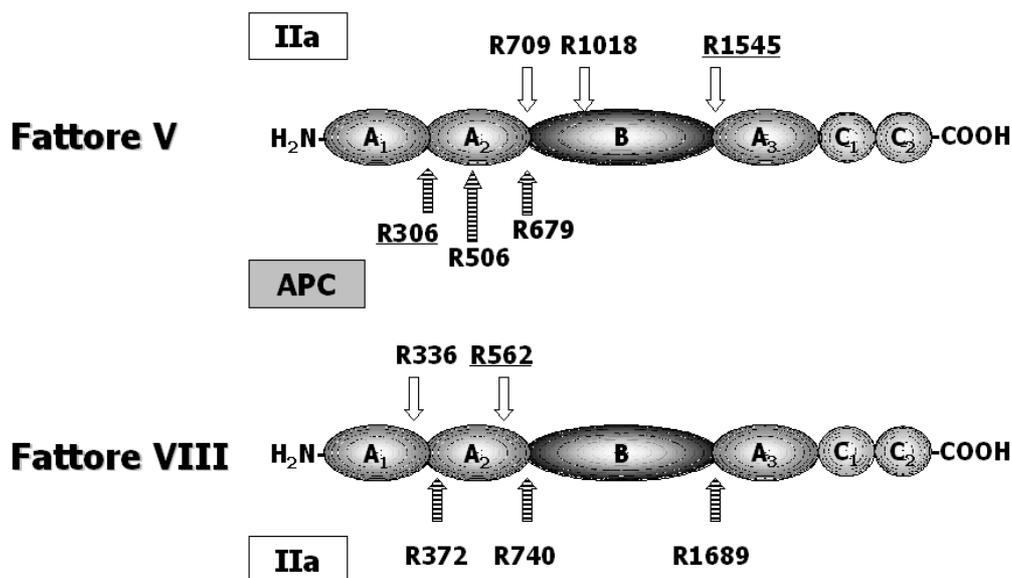
da ponte tra coagulazione ed infiammazione (46). Esperimenti condotti su colture con diversi tipi di cellule hanno dimostrato molti effetti antinfiammatori e antiapoptotici dell'APC. L'azione antinfiammatoria sembra mediata dal legame con EPCR. Il complesso sembra bloccare la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B, requisito essenziale per la produzione di citochine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), di molecole d'adesione, e l'esposizione di TF sulla superficie delle cellule mononucleate (47). L'attività antinfiammatoria dell'APC su endotelio e monocito/macrofagi sembra dipendere dalla presenza, oltre che dell'EPCR, anche dal recettore per le proteasi attivate (PAR-1), un recettore transmembrana la cui attivazione, che avviene per proteolisi della porzione extracellulare, si traduce in un'interazione della porzione citoplasmatica con la proteina G. Uno dei più potenti attivatori del PAR-1 è la trombina, la cui azione si traduce in una risposta proinfiammatoria. Come possa la proteolisi del PAR-1 mediata da trombina e APC dare effetti opposti, non è ancora chiaro.

I due cofattori circolanti della coagulazione, FV e FVIII, dimostrano una forte omologia; in entrambe le proteine i domini sono arrangiati secondo lo schema A1-A2-B-A3-C1-C2, in entrambe l'attivazione da parte della trombina (o del FXa) comporta il rilascio del dominio B (Figura 8). In particolare, il FV è convertito nella forma attiva per clivaggio a livello delle Arginine in posizione 709, 1018 e 1545, con formazione di un eterodimero costituito da una catena pesante (A1-A2) e da una catena leggera (A3-C1-C2) tenute assieme da Ca<sup>++</sup> (48, 49). Il FVa forma con il FXa un complesso (protrombinasi) legato a membrane, fornite principalmente dalle piastrine attivate, che espongono fosfolipidi a carica negativa. Il FVa è inattivato dall'APC che taglia la molecola a livello delle Arginine 306, 506 e 679, tutte sulla catena pesante. Anche queste reazioni avvengono su membrane presentanti fosfolipidi a carica negativa e sono stimulate dalla PS. Tuttavia, il

clivaggio a livello di Arg506 è meno dipendente dalla presenza dei fosfolipidi e della PS e da luogo ad una forma intermedia di FVa che conserva buona parte delle proprietà procoagulanti. Solo la rottura a livello dell'Arg306 determina la completa perdita di attività del FVa. La presenza di PS aumenta sia l'affinità della APC per le membrane, sia la velocità di clivaggio (di circa 20 volte) a livello di Arg306 (50). La regolazione del FVIIIa da parte di APC è ancora più complessa, probabilmente a causa della più bassa concentrazione in vivo di questo cofattore e della necessità di regolare il complesso estrinsecasi in presenza di un surplus di FV/FVa. Quando è legato al Fattore von Willebrand (VWF), il FVIII è protetto dall'APC. Tuttavia, durante la coagulazione, il FVIII è attivato dalla trombina ed è rilasciato dal VWF. Il FVIIIa è particolarmente labile in circolo ma una volta associato con il FIXa, a formare il complesso estrinsecasi, è piuttosto resistente all'azione dell'APC, a meno che non siano presenti opportuni cofattori. L'inattivazione del FVIIIa avviene per clivaggio della molecola a livello delle Arginine 336 e 562, ma solo la rottura a livello di Arg562 ne garantisce la completa inattivazione (Figura 8).

La presenza della PS e del FV intatto (per funzioni associate al dominio B), garantisce la migliore efficienza della reazione proteolitica. L'attivazione del FV da parte della trombina, con conseguente rimozione del dominio B, comporta la perdita completa delle funzioni anticoagulanti del FV. Viceversa, la rottura del legame Arg506 da parte di APC è fondamentale affinché il FV "anticoagulante" (FVac) possa svolgere la sua attività di cofattore della APC nella degradazione del FVIIIa. Il FV è pertanto un Giano bifronte, le cui attività pro- od anti-coagulanti sono regolate, per proteolisi, da enzimi pro- (trombina e FXa) od anti-coagulanti (APC) (51).

Il fattore di rischio congenito per tromboembolismo venoso con prevalenza maggiore è legato alla presenza



**Figura 8**  
Attività della Proteina C Attivata sui fattori V ed VIII della coagulazione.

della mutazione G→A in posizione 1691 sul gene del FV. Tale mutazione è responsabile della sostituzione dell'Arginina in posizione 506 con la Glicina (FV<sup>Leiden</sup>) e determina il fenotipo conosciuto come "resistenza alla APC". L'aumento del rischio trombotico associato al FV<sup>Leiden</sup> è pari a 5-10 volte per gli eterozigoti e quasi 80 volte per gli omozigoti. Sono due i meccanismi che giustificano l'ipercagulabilità causata dal FV<sup>Leiden</sup>: il primo è la mancanza di uno dei tre siti di clivaggio dell'APC sul FV<sup>Leiden</sup>, il secondo è la necessità di clivaggio del FV in posizione Arg506 da parte di APC al fine di garantire l'attività anticoagulante nella degradazione del FVIIIa. Sono state recentemente descritte due varianti del FV in cui l'importante sito di clivaggio Arg 306 è sostituito con Tirosina (FV<sup>Cambridge</sup>) o Glicina (FV<sup>Hong Kong</sup>); la prima è molto rara, la seconda è relativamente più frequente fra la popolazione Cinese. Entrambe s'associano ad un basso rischio trombotico. Le due varianti, riprodotte *in vitro* con la tecnica del DNA ricombinante, manifestano risposta all'APC intermedia tra FV e FV<sup>Leiden</sup> (52). In uno studio recente, un FVa ricombinante con tutti e tre i siti di clivaggio mutati (Arg306, Arg506, Arg679) subiva ancora inattivato da APC, giustificando l'inaspettata lieve resistenza all'APC osservata nei fenotipi FV<sup>Hong Kong</sup> e FV<sup>Cambridge</sup> (53). Nei rarissimi casi di doppia eterozigosi per FV<sup>Leiden</sup> e deficit di FV, un difetto dovrebbe compensare l'altro. In realtà, pur essendo pochi i casi descritti, questi "pseudo" omozigoti per FV<sup>Leiden</sup>, si comportano come omozigoti per FV<sup>Leiden</sup> (51). E' stato dimostrato che alti livelli dell'omologo FVIII (ma anche di FII, FIX, FXI), sono associati ad aumentato rischio trombotico: tale relazione non solo non esiste per il FV, ma alti livelli di FV non modificano il rischio associato con alti livelli di FVIII (54). Tutto ciò fa supporre che la principale causa del rischio trombotico associato al FV<sup>Leiden</sup> sia l'incapacità del fattore mutato di fungere da cofattore della APC nella lisi del FVIIIa.

## La fibrinolisi

Coagulazione e fibrinolisi sono due processi in costante attività, sia per proteggere l'organismo dalle perdite di sangue, sia per mantenere il sangue fluido. Per ottemperare a queste funzioni fisiologiche, deposizione e rimozione della fibrina devono essere finemente controllate. Qualsiasi sbilanciamento in un senso o nell'altro si manifesta con una tendenza all'emorragia o alla trombosi. Endotelio, piastrine, proteine del sistema coagulativo e fibrinolitico partecipano in maniera integrata alla regolazione dei processi, spesso, come nel caso del complesso trombina/TM, potendo agire su piani contrapposti. I maggiori componenti del sistema fibrinolitico sono rappresentati dal plasminogeno che è attivato a plasmina dai due attivatori del plasminogeno, il tessutale (t-PA) e l'urochinasi (u-PA). La Plasmina è la responsabile della degradazione della fibrina a prodotti di degradazione della stessa (FDP) (Figura 4). Il sistema fibrinolitico è regolato da inibitori delle proteasi; gli attivatori del plasminogeno sono inibiti dal PAI-1 e la plasmina è regolata da  $\alpha_2$ -Antiplasmina e  $\alpha_2$ -Macro-

globulina. Al formarsi del coagulo, il t-PA è rilasciato dall'endotelio ed il plasminogeno è intrappolato all'interno della rete di fibrina. Il plasminogeno legato alla fibrina è un miglior substrato per il t-PA, ed è il responsabile della fase iniziale della fibrinolisi. Infatti, legandosi alla fibrina, plasminogeno e t-PA formano un complesso ternario che aumenta la capacità catalitica di generazione della plasmina. La plasmina comincia la digestione della fibrina catalizzando la rottura delle catene  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  dopo un residuo di arginina o di lisina. Con il progredire della digestione, si vengono a creare residui di lisina C-terminali (Fn-K) in grado di attivare il plasminogeno a plasmina molto più efficacemente della fibrina intatta, accelerando in tal modo la lisi della fibrina. Si generano in tal modo ulteriori residui carbossi-terminali di lisina, che rappresentano siti di legame aggiuntivi per plasminogeno e relativo attivatore (56). L'aumentata concentrazione di plasminogeno e del suo attivatore, soprattutto alla superficie del coagulo, accelera la formazione della plasmina e quindi la lisi della fibrina. La fibrina, quindi, non solo rappresenta il substrato finale del sistema fibrinolitico, ma è anche coinvolta nella regolazione della sua stessa lisi, favorendo un'azione fibrinoselettiva del t-PA, proteggendo la plasmina dagli inattivatori circolanti ( $\alpha_2$ -Antiplasmina e  $\alpha_2$ -Macroglobulina) e aumentando la velocità della sua stessa lisi, mano a mano che procede la sua degradazione.

Recentemente è stata descritto un nuovo inibitore della fibrinolisi. E' una metalloproteasi (contiene uno ione zinco importante per l'azione catalitica) di sintesi epatica, attivata dalla trombina e che è per questo chiamata *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor* (TAFI) (57). Essa circola nel plasma con una concentrazione che può variare da 20 a 400 nM; c'è una forte variazione interindividuale determinata fondamentalmente dal genotipo. Il TAFI attivato (TAFIa) catalizza la rimozione dei residui carbossi-terminali di lisina ed arginina, prevenendone il legame ad alta affinità con il plasminogeno (Figura 4). In assenza di questo legame, la velocità di generazione di plasmina da parte del t-PA rimane bassa. Il TAFIa, in definitiva, inattiva la fibrina parzialmente degradata che è un cofattore essenziale per un'efficiente produzione di plasmina, eliminando in tal modo il feedback positivo e quindi rallentando la fibrinolisi. Il TAFIa regola inoltre la concentrazione della plasmina, rendendola più suscettibile all'inibizione da parte dell'  $\alpha_2$ -Antiplasmina (58). Analogamente alla PC, il principale attivatore del TAFI è il complesso trombina-TM. La trombina necessita da sola di alte concentrazioni per poter attivare il TAFI; la presenza della TM aumenta l'efficienza catalitica di quasi 1250 volte. Anche la plasmina è in grado di attivare (poco efficacemente) il TAFI; la presenza dei glicosaminoglicani porta l'efficienza di questa reazione ad 1/10 di quella sostenuta da trombina-TM. E' quindi probabile che anche la plasmina giochi un ruolo importante *in vivo* nella regolazione del TAFI (59). E' interessante osservare che lo stesso complesso trombina-TM attiva sia la PC, sia il TAFI. La TM gioca quindi un duplice ruolo: da una parte spegne la produzione di trombina, dall'altra aumenta l'efficacia della trombina stessa nell'attivare il TAFI, rallentando la fibrinolisi e proteggendo

da lisi precoce il coagulo prodotto da basse concentrazioni di trombina, come nei deficit dei fattori VIII, IX, XI. Secondo quanto riportato da Mosnier, è la concentrazione della TM che determina l'effetto finale (60). Anche se le due attivazioni possono avvenire simultaneamente, a basse concentrazioni di TM è favorita l'attivazione del TAFI e quindi l'inibizione della fibrinolisi, ad alte concentrazioni è favorita l'attivazione del sistema della PC e quindi la fibrinolisi. Poiché la distribuzione della TM non è omogenea, ma aumenta col diminuire del diametro dei vasi, quest'ultimo può essere un fattore importante nell'indirizzare l'azione della trombina. Un ruolo importante sembra giocare la metionina in posizione 388 sulla molecola della TM. Questo residuo è molto sensibile all'ossidazione, una reazione che di solito è favorita dall'infiammazione. L'ossidazione di questo residuo riduce l'attivazione della PC del 90%, ma non interferisce con l'attivazione del TAFI. L'osservazione suggerisce l'ipotesi che in un ambiente caratterizzato dall'infiammazione, la TM perda le proprietà anticoagulanti, conservando però inalterate quelle antifibrinolitiche (61). Poiché la trombina è il principale attivatore del TAFI, si può affermare che il sistema della coagulazione regola quello della fibrinolisi e che qualsiasi difetto nella produzione della trombina comporti un aumento della fibrinolisi. Il primo difetto ad essere investigato è stata la carenza di FXI. E' noto che questo difetto si associa a diatesi emorragica variabile, scarsamente prevedibile e comunque, a carico soprattutto di tessuti ad alto potere fibrinolitico, come il tratto urinario, il naso, le tonsille, il cavo orale. Il ruolo che il FXI gioca nella coagulazione è tuttora oscuro. In passato s'ipotizzò che il deficit di FXI avesse un qualche ruolo nella lisi del coagulo; in effetti, s'è dimostrato che il tempo di lisi si prolunga in presenza di FXI e che tale allungamento è TAFI dipendente (62). Questi risultati sono compatibili con il modello della coagulazione proposto da Bouma (63) e con quanto finora descritto: la trombina prodotta nella fase d'innescio della coagulazione è più che sufficiente a produrre il coagulo ma, per l'attivazione del TAFI, sono necessarie alte concentrazioni di trombina che derivano dalla fase "di propagazione" della trombina (detta anche *burst* secondario) (Figura 4). Quindi, l'attivazione del FXI da parte della trombina e la conseguente amplificazione da parte dell'intrinsecasi sono importanti per generare la quantità di trombina necessaria per l'attivazione del TAFI. Anche una difettosa attivazione del TAFI può contribuire alla severità della diatesi emorragica nelle emofilie A e B: questi pazienti manifestano non solo una risposta emostatica inadeguata, ma anche una rapida dissoluzione della fibrina, che amplifica in ultimo la diatesi emorragica.

Teoricamente, anche una diminuzione del TAFI può contribuire alla diatesi emorragica per accelerata dissoluzione del coagulo. Viceversa, un aumento del TAFI/TAFIa e tutte le condizioni che portano ad un aumento della trombina (aumento dei fattori XI, IX, VIII) possono favorire la trombosi. In effetti, alti livelli dei fattori sopra elencati sembrano associarsi ad un rischio aumentato di tromboembolismo venoso (TEV). E' stata anche descritta una correlazione tra elevati livelli di TAFI e rischio di TEV e

angina stabile. Tuttavia, in altri studi, s'è osservato paradossalmente un effetto protettivo del TAFI nell'infarto miocardico acuto (IMA). In realtà la concentrazione plasmatica del TAFI è fortemente influenzata dal controllo genetico. Inoltre, sono descritti numerosi polimorfismi, i cui effetti sull'attività della proteina non sono noti. E' quindi opportuno considerare la reattività geneticamente determinata del TAFI prima di trarre conclusioni definitive (64).

## Conclusioni

Il modello della coagulazione non stupisce tanto per la sua complessità o per l'incredibile e sempre maggior numero di proteine coinvolte, ma per come, durante l'evoluzione, queste proteine si sono adeguate a svolgere ruoli differenti, spesso contrastanti. E' sempre più palese, con la progressiva comprensione della complessità dei processi biologici, come sistemi diversi, quali coagulazione, fibrinolisi ed infiammazione, siano strettamente legati tra loro, e gli attori siano spesso gli stessi. E' auspicabile che, analogamente a quanto già avvenuto in passato, la mole d'informazioni derivanti dall'analisi della funzionalità di questi complessi sistemi, delle loro interpolazioni e dal dosaggio dei principali effettori, possa essere d'aiuto per la comprensione di patologie complesse e multifattoriali, favorendo un ulteriore progresso della scienza medica nella prevenzione e nella terapia.

## Bibliografia

1. MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964;202:498-9.
2. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964;145:1310-2.
3. Liu Y, Pelekanakis K, Woolkalis MJ. Thrombin and TNF- $\alpha$  synergistically stimulate tissue factor expression in human endothelial cells: Regulation through c-Fos and C-Jun. *J Biol Chem* 2004;279:36142-7.
4. Hathcock J. Vascular biology-the role of tissue factor. *Semin Hematol.* 2004; 41(1 Suppl):30-4.
5. Giesen PLA, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor :Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:2311-5.
6. Morrissey JH. Tissue Factor: A Key Molecole in Hemostatic and Nonhemostatic System. *Int J Hematol* 2004; 79:103-8.
7. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2003;1:2561-8.
8. Diamant M ,Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004;34:392-401.
9. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002;13:247-53.
10. Engemann B, Luther T, Muller I. Intravascular tissue factor pathway-a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 2003;89:3-8.
11. Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgen-

- stern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003;17:476-8.
12. Morrissey JH, Macik JB, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993;81:734-44.
  13. Komiyama Y, Pedersen AH, Kiesel W, Proteolytic activation of human factor IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry* 1990;29:9418-25.
  14. Butenas S, Mann KG. Kinetics of human factor VII activation. *Biochemistry* 1996;35:1904-10.
  15. Lawson JH, Butenas S, Ribarik N, Mann KG. Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *J Biol Chem* 1993; 268:767-70.
  16. van't Veer C, Mann KG. The regulation of factor VII-dependent coagulation pathway: rationale for the effectiveness of recombinant factor VIIa in refractory bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:367-72.
  17. Bauer KA, Mannucci PM, Gringeri A, Tradati F, Barzegar S, Kass BL, ten Cate H, Kestin AS, Brettler DB, Roseberg RD. Factor IXa-factorVIIIa-cell surface complex does not contribute to the basal activation of the coagulation mechanism in vivo. *Blood* 1992;79:2039-47.
  18. Cawtern KM, van't Veer C, Lock JB, DiLorenzo ME, Branda RF, Mann KG. Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C. *Blood* 1998;91:4581-92.
  19. Mann KG. Factor VII-Activating protease- Coagulation, Fibrinolysis, and Atherothrombosis? *Circulation* 2003;107:654-5.
  20. Romisch J, Feussner A, Vermohlen S, Stohr HA. A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:471-9.
  21. Romisch J, Vermohlen S, Feussner A, Stohr H. The Factor VII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis* 1999;29:292-9.
  22. Willeit J, Kiechl S, Weimer T, Mair A, Santer P, Wiedermann CJ, Roemisch J. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation* 2003;107:667-70.
  23. Lawson JH, Mann KG. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem* 1991;266:11317-27.
  24. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The Dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:17-25.
  25. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002;100:148-152.
  26. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003;1:1504-14.
  27. Hockin MF, Jones KJ, Emerse SJ, Mann KG. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation *J Biol Chem* 2002;277:18322-33.
  28. Mann KG. Thrombin formation. *Chest* 2003;124:4S-10S.
  29. Butenas S, Mann KG. Blood Coagulation. *Biochemistry (Moscow)* 2002;67:3-12.
  30. Mann KG. Thrombin - Can't live without it; probably die from it. *Chest* 2003;124:1S-3S.
  31. Di Cera E. Thrombin interactions. *Chest* 2003;124:11S-17S.
  32. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:11-30.
  33. Weisel JW, Medved L. The structure and function of the alpha C domains of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:312-27.
  34. Ariens RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 2002;100:743-54.
  35. Fatah K, Hamsten A, Blomback B, Blomback M. Fibrin gel network characteristics and coronary heart disease: relation to plasma fibrinogen concentration, acute phase protein, serum lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Tromb Haemost* 1992;68:130-5.
  36. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood* 2003;101:3008-13.
  37. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood* 2003;101:3008-13.
  38. Cooper AV, Standeven KF, Ariens RA. Fibrinogen gamma-chain splice variant gamma' alters fibrin formation and structure. *Blood* 2003;102:535-40.
  39. Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 2003;361:1424-31.
  40. van't Veer C, Mann KG. Regulation of tissue factor initiated thrombin generation by the stoichiometric inhibitors tissue factor pathway inhibitor, antithrombin III and heparin cofactor-II. *J Biol Chem* 1997;272: 4367-77.
  41. van't Veer C, Golden NJ, Kalafatis M, Mann KG. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* 1997;272: 7983-94.
  42. Gotte M. Syndecans in inflammation. *FASEB J* 2003;17:575-91.
  43. Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, Wiedermann CJ. Antithrombin: a new look at the actions of a serin protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:657-70.
  44. Dahlback B. Progress in the Understanding of the Protein C Anticoagulant Pathway. *Int J Hematol* 2004; 79:109-16.
  45. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003;124:26S-32S.
  46. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 2004;103:1192-201.
  47. Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004;109:2698-704.
  48. Nicolaes GAF, Dahlback B. Factor V and Thrombotic Disease. Description of a Janus-Faced Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:530-8.
  49. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood* 2003;101: 20-30.
  50. Norstrom EA, Steen M, Tran S, Dahlback B. Importance of Protein S and Phospholipid for Activated Protein C-mediated Cleavages in Factor Va. *J Biol Chem* 2003;278:24904-11.
  51. Nicolaes GAF, Dahlback B. Factor V and thrombotic disease. Description of a Janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:530-8.
  52. Norstrom E, Torelli E, Dahlback B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood* 2002;100:524-30.

53. van der Neut Kolfschoten M, Dirven RJ, Vos HL, Tans G, Rosine J, Bertina RM. J Biol Chem 2004;279:6567-75.
54. Kamphuisen PW, Rosendaal FR, Eikenboom JC, Bos R, Bertina RM. Factor V antigen levels and venous thrombosis: risk profile, interaction with factor V Leiden, and relation with factor VIII antigen levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:1382-6.
55. Rijken DC, Sakharov DV. Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. Thromb Res 2001;103:S41-S49.
56. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. Thromb Haemost 2003;89:409-19.
57. Bazar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. J Biol Chem 1995; 270:14477-84.
58. Schneider M, Bruffatto N, Neill E, Nesheim M. Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor reduces ability of high molecular weight fibrin degradation products protect plasmin from antiplasmin. J Biol Chem 2004;279:13340-5.
59. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and antifibrinolytic pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:2511-8.
60. Mosnier LO, Meijers JC, Bouma B. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. Thromb Haemost 2001;85:5-11.
61. Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis Chest 2003;124:33S-39S.
62. von dem Borne PAK, Bajzar L, Meijers JCM, Nesheim M, Bouma BN. Thrombin-mediated activation of Factor XI results in a Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. J Clin Invest 1997;99:2323-7.
63. Bouma BN, von dem Borne PAK, Meijers JCM. Factor XI and protection of the fibrin clot against lysis - a role for the intrinsic pathway of coagulation in fibrinolysis. Thromb Haemost 1998; 80:24-7.
64. Bouma BN, Meijers JCM. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). J Tromb Haemost 2003;1:1566-74.