

# Caleidoscopio

*Italiano*



Fabio M. Pulcinelli, Teresa Maltese,  
Flavia Temperilli

## Piastrine, farmaci antiaggreganti e metodiche di laboratorio

Direttore Responsabile  
Sergio Rasso

# 232

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA



# Caleidoscopio

*Italiano*



**Fabio M. Pulcinelli<sup>1</sup>, Teresa Maltese,  
Flavia Temperilli**

*<sup>1</sup>.Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma.*

## **Piastrine, farmaci antiaggreganti e metodiche di laboratorio**

Direttore Responsabile  
**Sergio Rasso**

# 232

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA



**INFORMAZIONI GENERALI.** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

**TESTO.** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

**FRONTESPIZIO.** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

**BIBLIOGRAFIA.** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

**TABELLE E FIGURE.** Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

**UNITÀ DI MISURA.** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

**ABBREVIAZIONI.** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

**PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA.** I files del testo in formato .doc oppure .rtf, delle fotografie, dei grafici e delle figure in formato .jpeg con una risoluzione di almeno 240 dpi devono essere spediti per posta elettronica al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo e-mail: rahp80@yahoo.it

## Editoriale

Il midollo osseo è un tessuto che produce incessantemente elementi cellulari che hanno una vita limitata. Il numero di questi elementi è determinato da un lato dalla velocità di distruzione, dall'altro da quella di produzione. Il compartimento megacariocitico, uno dei quattro, comprende la serie dalla cellula staminale predestinata verso la serie megacariocitica sino alle piastrine. Durante la maturazione, queste cellule diventano polipoidi ed accumulano una enorme quantità di proteine e membrane. Quindi attraverso un processo guidato dal citoscheletro estendono dei lunghi processi ramificati, chiamati propiastirine, nei vasi sanguigni sinusoidali per subire la fissione e rilasciare le piastrine.

L'essenza dei deficit della emostasi primaria è costituita da sindromi emorragiche con piastrine in numero normale o adeguato, dovute ad alterazioni funzionali delle piastrine, in genere congenite o indotte da farmaci, e da sindromi emorragiche caratterizzate da piastrinopenia. Questa interviene quando il consumo periferico ne superi la capacità di formazione midollare, anche se aumentata.

La produzione scientifica sulle piastrine è tumultuosa ed i campi di ricerca ed applicazione sono enormi e tra loro differenti (si pensi solo agli studi sui nuovi anti-aggreganti piastrinici nella cardiopatia ischemica, alla ricerca incentrata sulla coagulazione intravascolare diffusa neonatale, alle strategie per la prevenzione dello stroke, ai meccanismi della trombosi nell'obesità e tanti altri ancora).

La complessità della tematica sottolinea il valore di questa monografia che costituisce la base sulla quale costruire dei riferimenti certi e ringrazio di questo gli Autori. Dopo una prima parte dedicata alla struttura ed alla funzione delle piastrine, gli Autori passano in esame i farmaci impiegati come anti-aggreganti, illustrano i test di funzionalità piastrinica e per valutare l'efficacia del trattamento antiaggregante, sia quelli tradizionali che i più recenti. Quindi approfondiscono il meccanismo dell'aggregazione piastrinica, i suoi principi ed i test disponibili. Come sottolineano gli Autori, "l'aggregazione piastrinica è l'analisi più versatile; ha lo scopo di valutare la funzionalità "qualitativa" delle piastrine, .... ed è considerato il "gold standard" per studiare eventuali deficit di funzionalità piastrinica sia congeniti che acquisiti, o dipendenti dall'assunzione di farmaci anti-piastrinici" con tutti i dettagli sull'esecuzione, a partire dalla fase pre-analitica. La monografica è completata da una ricca e preziosa bibliografia che la rende quindi un utile strumento di aggiornamento per coloro che vogliono fare il punto della situazione su questo argomento.



---

Il Prof. Fabio M. Pulcinelli lavora presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università La Sapienza a Roma, dove ricopre l'incarico di Professore Associato. Ha conseguito il diploma di Laurea in Scienze Biologiche e quindi il diploma di Laurea in Medicina e Chirurgia svolgendo le funzioni di Dirigente Medico di I Livello presso il Policlinico Universitario "Umberto I". Ha maturato una importante esperienza come Visiting scientist presso il Pharmacology Department and Thrombosis Center, School of Medicine, Temple University, Philadelphia, USA quindi, sino ad oggi, come Adjunct Assistant Professor, Pharmacology Dept., School of Medicine, presso la stessa sede. Autore di numerose ricerche di biochimica funzionale delle piastrine con indagini sui meccanismi di trasduzione del segnale e di attivazione dell'integrina Gp IIb/IIIa, nonché del ruolo dei radicali liberi dell'ossigeno nell'attivazione piastrinica sulla valutazione dei meccanismi fisiopatologici piastrinici coinvolti nella patogenesi di malattie cardio- e cerebrovascolari, negli ultimi anni le sue ricerche si sono focalizzate nello studio della risposta piastrinica ai trattamenti cronici con farmaci antiplastrinici/trombotici. E' Referente Regionale (Lazio) Società Italiana per lo Studio dell'Emostasi e della Trombosi (SISET) 2002-2006. Revisore per finanziamenti di ricerca Nazionale e internazionali; Ireland Health Research Awards 2010, Progetto di Interesse Nazionale (PRIN) MIUR 2009, Progetto di Interesse Nazionale (PRIN) MIUR 2010, Futuro in Ricerca 2010 (FIRB) MIUR. E' ancora Revisore per riviste Internazionali quali Journal Thrombosis and Haemostasis.



La dott.ssa Teresa Maltese ha conseguito la Laurea Triennale in Scienze Biologiche, Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali presso l'Università degli Studi di Siena quindi la Laurea Magistrale in Genetica e Biologia Molecolare nella Ricerca di base e biomedica presso Università La Sapienza di Roma. Attualmente, è Biologo frequentatore e svolge la sua attività di ricerca riguardante la fisiopatologia piastrinica oltre a frequentare il Master in Citogenetica organizzato dall'Università di Roma Tre e Università di Tor Vergata.

La dott.ssa Flavia Temperilli ha conseguito il diploma Laurea presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "La Sapienza" di Roma ed il diploma di Specializzazione in Patologia Clinica II presso la stessa Facoltà. E' stata Visiting Scientist del Molecular Biology Laboratory, diretto dal Dr. Rao Koneti, Sol Sherry Thrombosis Research Center, Temple University, Philadelphia, USA interessandosi di ricerca in Biologia Molecolare. Attualmente, frequenta il Laboratorio di Fisiopatologia Piastrinica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, in qualità di Medico Frequentatore.

**Sergio Rasso**

## Piastrine: struttura e funzione

Le piastrine scoperte da Bizzozzero (Figura 1 disegno originale di Bizzozzero), sono frammenti cellulari, dal diametro di 2-4 micron, prive di nucleo, che derivano dalla frammentazione dei megacariociti. Sono dotate di attività metabolica propria, infatti, parallelamente alle cellule nucleate, sono capaci di generare una risposta in seguito ad uno stimolo. La morfologia di queste cellule appare complessa, all'esterno della membrana plasmatica è presente un glicocalice costituito da numerose glicoproteine di membrana, per la maggior parte recettori per integrine (fibrinogeno, fattore di vonWillebrand, collagene etc.) e recettori per agonisti solubili (ADP, adrenalina, trombosanoA2 etc). Particolarmente abbondante risulta il sistema canalicolare aperto formato dall'invaginazione delle membrane cellulari, che consente di aumentare la superficie di scambio tra l'esterno e l'interno della cellula. Nella parte citoplasmatica microtubuli e microfilamenti costituiscono il citoscheletro, che incastona al suo interno numerosi granuli, distinti in tre gruppi  $\alpha$ , densi e  $\lambda$ . Gli  $\alpha$ -granuli, abbondantemente rappresentati, contengono proteine importanti per la coagulazione e diversi fattori di crescita. Una recente analisi proteomica ha dimostrato che questi granuli contengono più di 100 proteine differenti al loro interno. I granuli densi contengono mediatori chimici necessari per l'amplificazione della risposta piastrinica, quali ADP, ATP, serotonina e adrenalina. I  $\lambda$ -granuli sono identificabili con i lisosomi. La scarsa presenza di mRNA determina una ridotta rappresentazione del reticolo endoplasmatico rugoso, mentre il reticolo endoplasmatico liscio, detto Sistema Tubulare Denso, è abbondantemente rappresentato e risulta responsabile della produzione di radicali superossido e della mobilizzazione del calcio.

Nelle piastrine sono anche presenti i mitocondri e l'apparato di Golgi.

Le piastrine hanno il ruolo fisiologico di attivarsi in seguito ad un danno vascolare e di formare il primo tappo per arrestare la ressi vascolare. In seguito alla rottura dell'endotelio, le piastrine rapidamente aderiscono alle fibre di collagene neo-esposte, con coinvolgimento del fattore di vonWillebrand, si attivano e rilasciano mediatori chimici, ADP (contenuto nei granuli densi) e trombosano (prodotto per mezzo dell'attivazione dell'enzima cicloossigenasi-1, COX-1), che attivano altre piastrine nella sede della lesione, causando la formazione dell'aggregato piastrinico indispensabile per l'arresto del sanguinamento. La concomitante attivazione dei fattori della coagulazione porta al consolidamento e alla stabilizzazione del coagulo.



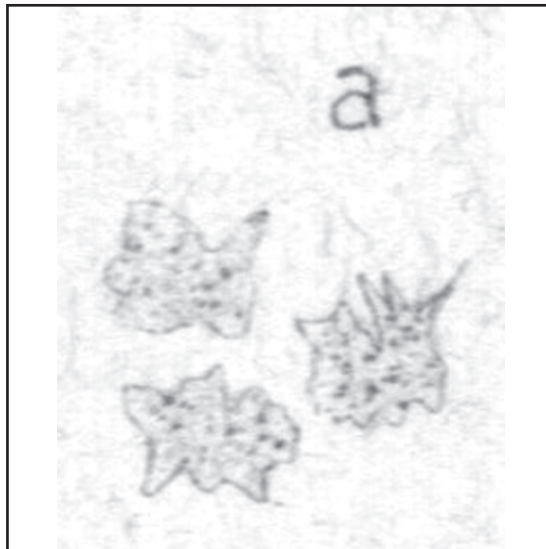


L'attivazione impropria della risposta emostatica gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo delle patologie cardio e cerebrovascolari, che attualmente rappresentano la prima causa di morte nei paesi industrializzati e la quinta causa di disabilità nel mondo [27].

L'attivazione piastrinica che porta all'evento patologico è del tutto simile all'attivazione fisiologica successiva ad un danno vasale, che termina con la formazione del trombo piastrinico.

In un vaso il cui lume è ridotto per la presenza di una placca aterosclerotica nel sottoendotelio, eventi ancora non del tutto identificati, determinano la fissurazione della placca e l'attivazione delle piastrine che, formando l'aggregato all'interno del vaso, impediscono il passaggio di globuli rossi nella porzione di organo perfusa determinando un danno ischemico.

Perciò un'adeguata inibizione farmacologica dell'aggregazione piastrinica, risulta essere un presidio terapeutico fondamentale nei pazienti ad elevato rischio cardiovascolare.



*Figura 1. Piastrine: disegno originale di Bizzozzero (Di un nuovo elemento morfologico del sangue e della sua importanza nella trombosi. Milano Vallardi 1883).*



## Farmaci antiaggreganti

Appartengono alla categoria di farmaci antiaggreganti quelli che hanno la capacità di ridurre il rischio cardiovascolare inibendo la funzionalità piastrinica. Tutti i farmaci antiaggreganti come anche gli anticoagulanti aumentano il rischio di sanguinamenti [20].

I principali farmaci antiaggreganti ad oggi utilizzati appartengono a quattro gruppi, divisi in base al loro meccanismo di azione.

A) Gli inibitori del ciclo di amplificazione del trombossano A<sub>2</sub>, che possono essere divisi a loro volta in inibitori della ciclo ossigenasi, aspirina e ibuprofene, e antagonisti del recettore del trombossano.

B) Gli antagonisti del recettore purinergico P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>, clopidogrel, prasugrel e ticagrelor, che impediscono all'ADP di attivare le piastrine, bloccando il recettore P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>, che svolge un ruolo chiave nei processi di attivazione e di aggregazione piastrinica.



C) Gli inibitori delle fosfodiesterasi, dipiridamolo e cilostazol. La fosfodiesterasi è un enzima piastrinico che riduce le concentrazioni citosoliche dei nucleotidi ciclici, cAMP e cGMP, i più potenti inibitori piastrinici endotelio mediati, che limitano la formazione del trombo piastrinico.

D) Gli antagonisti del recettore della GpIIb/IIIa, eptifibatide, tirofiban e abciximab. Questi farmaci inibiscono il legame della glicoproteina GpIIb/IIIa, al fibrinogeno e ad alcune molecole di adesione, impedendo alle piastrine di aggregarsi tra di loro e di aderire alla parete vasale (Figura 2).

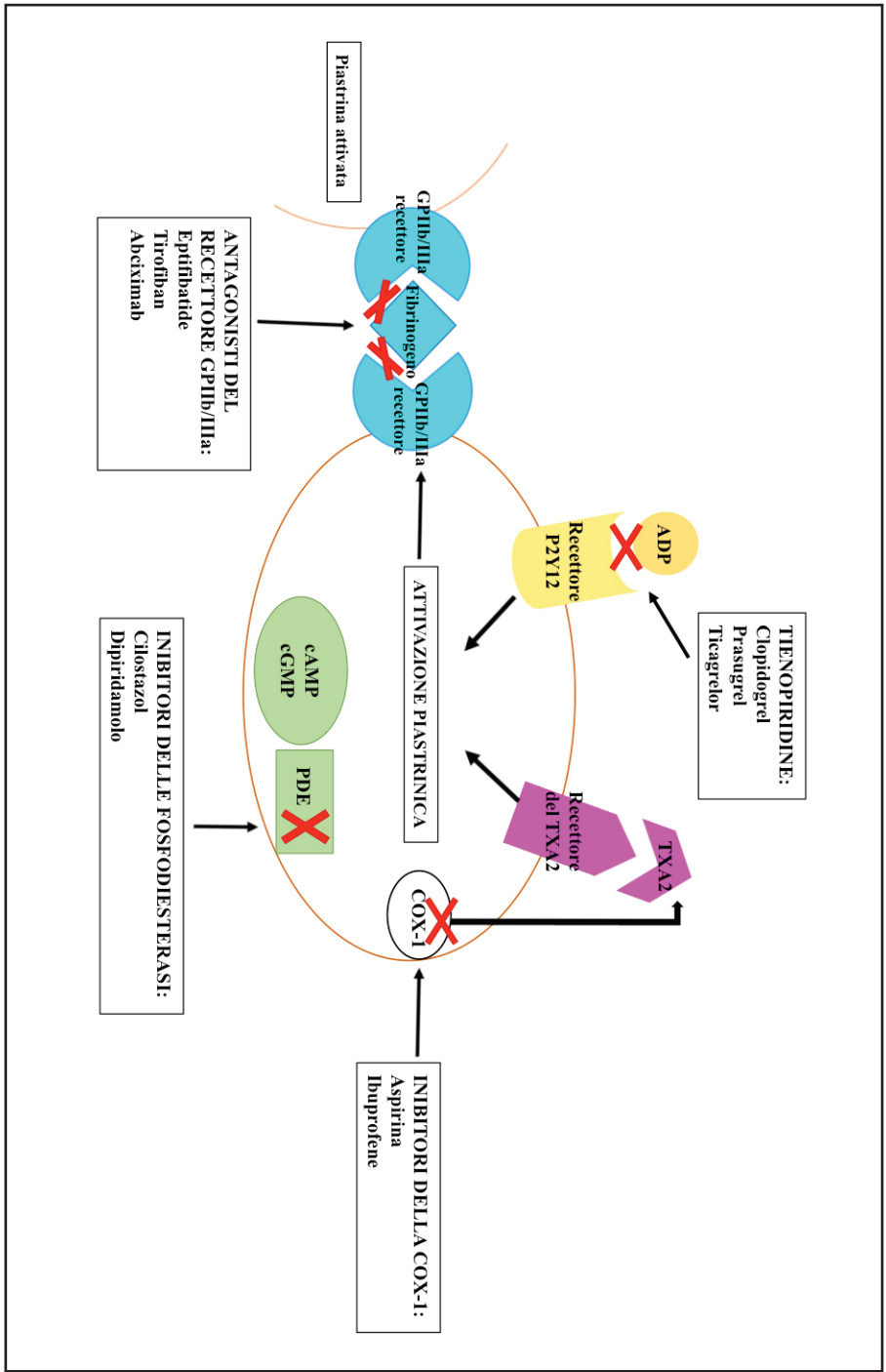


Figura 2. Meccanismo di azione dei farmaci antiplastrinici.  
TXA2= TrombossanoA2; COX-1=Ciclossigenasi; PDE=Fosfodiesterasi; ADP= Adenosina difosfato; cAMP= Adenosina monofosfato ciclico; cGMP= Guanosina monofosfato ciclico



## Aspirina

L'acido acetilsalicilico o ASA (IUPAC: acido 2-(acetilossi) benzoico), meglio conosciuto come aspirina, è un farmaco antinfiammatorio non-steroido (FANS) della famiglia dei salicilati, brevettato nel 1897 dal chimico Felix Hoffman. L'aspirina è un farmaco molto versatile, oltre ad essere usato come antinfiammatorio per il trattamento sintomatico di diverse affezioni come influenza, mal di testa e dolori articolari, è utilizzato come antiaggregante per ridurre l'insorgenza di eventi cardiovascolari.

Nel 1985 la *Food and Drug Administration* ha approvato l'uso dell'aspirina nella prevenzione secondaria dell'infarto acuto del miocardico, da allora, il farmaco è diventato la pietra miliare della terapia antitrombotica (CAD) [55].

Numerosi studi hanno dimostrato che questo farmaco riduce il rischio d'infarto acuto del miocardio o di morte improvvisa in pazienti con angina instabile, con angina cronica stabile [61] e in pazienti con attacchi ischemici transitori [50]. Per questo motivo, le linee guida internazionali raccomandano l'uso dell'aspirina per la prevenzione secondaria dell'infarto acuto del miocardio e di tutte le malattie aorto-coronariche [64].

L'aspirina, nella pratica clinica, viene somministrata ad un dosaggio compreso generalmente tra i 50 mg e i 300 mg/die, questi dosaggi sono in grado di ridurre l'incidenza degli eventi cardiovascolari di circa il 25%, in un range molto ampio di pazienti con alto rischio di complicazioni aterotrombotiche [64] [62] [22].

L'aspirina è un acido debole (pKa 4,4), lipofilo in forma protonata, che viene rapidamente convertito in anione organico in ambiente biologico [64]. Una singola dose giornaliera di aspirina (160 mg/die), inibisce la produzione di TxA<sub>2</sub> nelle piastrine, lo stesso effetto inibitorio può essere ottenuto con la somministrazione cronica di 30-50 mg/die [8].

L'assorbimento per via orale è veloce sia nello stomaco che nel primo tratto dell'intestino tenue. Il picco di concentrazione plasmatica si rileva dopo circa 30-40 minuti dall'ingestione [64].

Il meccanismo di azione dell'aspirina dipende dalla capacità di inibire la cicloossigenasi (COX). La cicloossigenasi è un enzima cellulare indispensabile per la produzione di prostaglandine. Sono state scoperte due isoforme, COX-1 e COX-2, con elevata somiglianza nella sequenza aminoacidica [8].

La COX-1 è costitutivamente espressa in quasi tutte le cellule, incluse le piastrine. E' coinvolta in diverse funzioni cellulari tra le quali l'aggregazione piastrinica. La COX-2 non è fisiologicamente presente nelle cellule ma è inducibile principalmente in risposta a stimoli infiammatori [8].



L'effetto antitrombotico dell'aspirina è dovuto alla sua capacità di inibire irreversibilmente l'enzima COX-1 (acetilazione di un residuo serinico in posizione 529), con il conseguente blocco della produzione di trombossano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), potente vasocostrittore e attivatore piastrinico [47].

La reazione di acetilazione ostruisce il canale idrofobico della cicloossigenasi e impedisce all'acido arachidonico di interagire con il suo sito catalitico (Tyr 385) con conseguente inibizione di tutte le reazioni a cascata che portano alla sintesi delle prostaglandine e del trombossano A<sub>2</sub>.

Le piastrine sono prive di nucleo, perciò una volta inibite dall'aspirina, non possono sintetizzare la cicloossigenasi, quindi la produzione de-novo del TxA<sub>2</sub> dipende dalla generazione di nuove piastrine, che avviene con una velocità del 10% ogni giorno, per via della loro vita media di 10 giorni. Questa è la ragione per cui bassi dosaggi di aspirina sono considerati specifici per inibire la COX-1 piastrinica e non per la COX-1 presente in altre popolazioni cellulari.

Perché l'aspirina esplichi l'effetto antinfiammatorio tramite il blocco della COX-2 sono necessarie dosi più elevate (>300mg/die) e intervalli di somministrazione più brevi, perché l'enzima viene rapidamente risintetizzato dalle cellule nucleate.

I principali effetti indesiderati dell'aspirina sono gastrointestinali (ulcere e sanguinamenti) e l'aumento del rischio di sindromi emorragiche [25].

In prevenzione secondaria le linee guida delle principali società europee di cardiologia, raccomandano l'uso di aspirina ad una dose iniziale di 160-300 mg/die e successivamente ad una dose di mantenimento di 75-100 mg/die.



## Antagonisti del recettore purinergico P2Y<sub>12</sub>

Le Tienopiridine sono i farmaci antiaggreganti più utilizzati dopo l'aspirina. La loro azione farmacologica si esplica attraverso il legame con il recettore purinergico P2Y<sub>12</sub>, che impedisce all'ADP di attivare le piastrine [40]. Il primo farmaco ad essere stato scoperto è la ticlopidina, sostituita successivamente dal clopidogrel, a causa della sua tossicità midollare.

Attualmente il clopidogrel in combinazione con aspirina è la terapia standard nei pazienti con sindrome coronarica acuta (ACS) sottoposti ad intervento di angioplastica coronarica [20].

Il prasugrel, tienopiridina di terza generazione, ha un più rapido inizio di azione, una più potente capacità antiaggregante e una minore variabilità interindividuale rispetto al clopidogrel [44]. Studi clinici hanno dimostrato

che i pazienti, sottoposti ad angioplastica coronarica, in trattamento con prasugrel più aspirina presentano un ridotto rischio di recidiva, ma il rischio di complicanze emorragiche è aumentato [78]. Sia il clopidogrel che il prasugrel sono antagonisti irreversibili del P2Y<sub>12</sub> e essendo pro farmaci necessitano di una attivazione epatica per formare il metabolita attivo.

Il ticagrelor, appartiene ad una nuova classe di agenti antiaggreganti capaci di inibire in maniera reversibile l'attivazione del recettore P2Y<sub>12</sub>, senza bloccare il legame dell'ADP [15]. Non necessita di attivazione metabolica da parte del fegato. Presenta le stesse caratteristiche del clopidogrel nel ridurre il rischio di nuovi eventi cardiovascolari senza un ulteriore aumento del rischio emorragico [15].

## ***Clopidogrel***

Il clopidogrel è un farmaco inattivo che viene rapidamente assorbito a livello dell'intestino. Dopo una doppia trasformazione a livello epatico si produce la molecola attiva [52]. I due processi di attivazione coinvolgono il sistema dei citocromi P450 epatici (principalmente gli isoenzimi CYP2C19 e CYP3A4) [20]. Le molecole attive si legano irreversibilmente al recettore piastrinico purinergico P2Y<sub>12</sub> inibendo uno dei processi fondamentali piastrinici che determinano aggregazione piastrinica [20]. Il principale metabolita del clopidogrel ha una emivita di 8 ore; i primi effetti si osservano dopo 48 ore, utilizzando la concentrazione di 50-100 mg/die, ma per raggiungere l'efficacia terapeutica, cioè l'inibizione del recettore del 50%-60%, sono necessari dai 4 ai 7 giorni di trattamento [20].



Il trattamento con clopidogrel è raccomandato alla dose di 75 mg al giorno in tutti i pazienti con cardiopatia ischemica acuta o cronica che sono intolleranti o allergici all'acido acetilsalicilico [10].

Nei pazienti con sindrome coronarica acuta sottoposti ad angioplastica le linee guida raccomandano di effettuare una singola dose di carico di 300/600mg e successivamente una dose giornaliera di 75mg/die (associata con aspirina 75 mg/die) [3]. La doppia antiaggregazione va proseguita per 12 mesi [3].

I pazienti ad alto rischio cardiovascolare trattati con aspirina più clopidogrel, per un periodo superiore ai 12 mesi, evidenziano a fronte di una leggera riduzione del rischio cardiovascolare un aumento significativo di eventi emorragici fatali e non fatali [3].

Studi clinici hanno osservato che il 30% dei pazienti che assumono clopidogrel presentano una insufficiente risposta al trattamento farmacologico associata ad aumentato rischio di eventi cardiovascolari [37].

## **Prasugrel**

Il prasugrel rappresenta la terza generazione delle tienopiridine è rapidamente idrolizzato dalle esterasi presenti sia nell'intestino che nel sangue, successivamente viene trasformato in farmaco attivo attraverso una singola trasformazione per mezzo dello stesso sistema enzimatico utilizzato dal clopidogrel, il citocromo P450 (principalmente gli isoenzimi CYP3A e CYP2B6). La molecola attiva si lega irreversibilmente al recettore purinergico P2Y<sub>12</sub>, impedendo all'ADP di attivare le piastrine e di agire da cofattore per indurre aggregazione piastrinica [79].

Il metabolita attivo del prasugrel raggiunge il picco plasmatico dopo 30 minuti. L'emivita è di circa 4 ore e l'efficacia terapeutica si ottiene 2-4 giorni dopo l'inizio del trattamento. L'eliminazione è principalmente urinaria [20].

Nei pazienti con sindrome coronarica acuta, sottoposti ad angioplastica, le linee guida raccomandano di effettuare una dose di carico di 60 mg in un'unica somministrazione e successivamente una dose giornaliera di 10 mg/die [49].

Un trial clinico ha evidenziato la migliore efficacia del prasugrel, rispetto al clopidogrel, nel ridurre gli eventi cardiovascolari a fronte di un maggior rischio di eventi emorragici sia fatali che non fatali [79].

## **Ticagrelor**

Il ticagrelor è un antagonista del P2Y<sub>12</sub> reversibile, è un farmaco attivo e non necessita di attivazione metabolica, può essere convertito dal fegato in un metabolita attivo che ha potenza analoga rispetto alla molecola di origine [43].

Il picco plasmatico si ottiene dopo 2 ore, la dose consigliata è di 90 mg/bis in die e l'efficacia farmacologica si raggiunge in 2 – 4 giorni. L'emivita del ticagrelor e del suo metabolita è di 6-9 ore e di 8-12 ore rispettivamente. Dopo aver interrotto il trattamento con il farmaco il recupero della funzionalità piastrinica si ottiene dopo 5 giorni, tempo ridotto rispetto al clopidogrel (5-10 giorni) e prasugrel (7-10 giorni). L'eliminazione del farmaco avviene per un terzo tramite le urine e per due terzi tramite le feci [72].

La maggiore efficacia di questo farmaco rispetto al clopidogrel nel ridurre gli eventi cardiovascolari in pazienti sottoposti ad angioplastica e in trattamento con doppia terapia antiaggregante è stato dimostrato nello studio PLATO, ma solo se il concomitante trattamento con aspirina era inferiore a 150 mg/die [29]. Nello stesso studio è stato visto che non si osserva alcun



aumento degli eventi emorragici sia fatali che non fatali, al contrario di quanto visto con il prasugrel.

Gli effetti avversi dimostrati sono dispnea, aumento asintomatico delle pause ventricolari e aumento dell'acido urico [77].

## **Residua funzione piastrinica in pazienti in trattamento con antiaggreganti**

L'efficacia terapeutica di tutti i farmaci antiaggreganti, inibitori della COX-1 e antagonisti del P2Y<sub>12</sub>, è ben nota tuttavia parte dei pazienti che assumono questi farmaci sono meno sensibili al trattamento e continuano a soffrire di eventi coronarici acuti [32]. Questo fenomeno è denominato fallimento terapeutico.

I fattori alla base di questo fallimento sono molteplici e numerosi studi cercano di identificare i meccanismi responsabili di tale fenomeno. La comprensione di questi meccanismi potrebbe portare alla personalizzazione del trattamento con il vantaggio della riduzione sia degli eventi cardiovascolari che delle complicanze emorragiche.

Nell'era postgenomica l'obiettivo della ricerca nell'ambito della diagnostica di laboratorio si sta spostando lentamente dall' utilizzo delle analisi di laboratorio per confermare il sospetto diagnostico del clinico, verso l'identificazione dei pazienti a più alto rischio per le patologie cardiovascolari, per rendere il trattamento più efficace e specifico.



## **Insufficiente inibizione piastrinica da aspirina**

E' stato stimato che tra il 5% e il 60% dei pazienti in trattamento cronico con aspirina non rispondono appropriatamente alla terapia [38]. Inoltre l'aspirina previene solo il 25% degli eventi coronarici e degli ictus ischemici se usata in prevenzione secondaria [9]. Una metanalisi, condotta prendendo in considerazione studi che avevano correlato differenti test di funzionalità piastrinica con gli eventi cardiovascolari, ha dimostrato che la ridotta efficacia dell'aspirina ad inibire la funzionalità piastrinica è associata ad un aumento degli eventi cardiovascolari [46].



La resistenza all'aspirina può essere definita in due modi: dal punto di vista delle indagini di laboratorio, come inadeguata inibizione della funzionalità piastrinica nonostante il trattamento con aspirina [68], dal punto di vista clinico, come mancata protezione da eventi trombotici, dunque, come un "fallimento terapeutico" [38].

Prendendo in considerazione l'inadeguata inibizione della funzionalità piastrinica, Weber A.A. et al. (2002), hanno classificato la resistenza all'aspirina in tre sottotipi:

- incapacità dell'aspirina di inibire la produzione di trombossanoA2 *in vitro* ma non *in vivo* (farmacocinetica).
- incapacità dell'aspirina di inibire la produzione di trombossanoA2 sia *in vitro* che *in vivo* (farmacodinamica).
- residua risposta piastrinica ad agonisti fisiologici nonostante la soppressione del trombossanoA2 (pseudo-resistenza).

I meccanismi responsabili di questo fenomeno non sono ancora completamente chiari. Sono stati proposti diversi fattori, anche se nessuno di loro spiega pienamente la variabilità trovata nei pazienti, ciò induce a pensare che sia un fenomeno multifattoriale.

I fattori coinvolti nello sviluppo della resistenza all'aspirina si possono suddividere in: fattori correlati con il paziente e fattori correlati con il farmaco.

*I fattori correlati con il paziente sono:*

- **Gravità della malattia cardiovascolare.** Da alcuni studi effettuati da Valles et al. (2007) si evince che dopo 48 ore dall'infarto del miocardio molti pazienti trattati con aspirina raggiungevano un'inibizione ottimale del TxA2, suggerendo che la resistenza all'aspirina che si instaura in questi pazienti potrebbe essere dovuta ad uno stato infiammatorio o pro trombotico presente nel paziente dopo la rottura della placca aterosclerotica [76].

- **Fattori genetici.** E' stato dimostrato che i fattori genetici danno un contributo significativo nella variabilità della risposta all'aspirina. Faraday et al. (2007) hanno condotto uno studio su 500 famiglie di razza Caucasica ed Afro-Americana ed hanno dimostrato che alcuni polimorfismi a livello dell'enzima COX-1 rispondono meno all'aspirina[23].

- **Fattori plasmatici.** Si è ritenuto a lungo che i fattori coinvolti nella variabilità della risposta piastrinica all'aspirina si trovassero esclusivamente all'interno delle piastrine. Invece, studi recenti hanno dimostrato che anche alcuni fattori plasmatici possono regolare la risposta piastrinica all'aspirina [3]. La natura di questi fattori plasmatici non è stata ancora completamente chiarita. Tra questi possiamo indicare l'aumento sia delle concentrazioni plasmatiche di agenti aggreganti (adrenalina, serotonina etc.) sia di agenti pro



aggreganti, sostanze che da sole non hanno la capacità di attivare le piastrine ma se aggiunte ad agonisti piastrinici determinano aumento della risposta piastrinica (citochine etc). Non possiamo inoltre dimenticare che nel plasma l'aspirina viene rapidamente idrolizzata dalle esterasi nel suo metabolita inattivo salicilato. I tempi di questo metabolismo sono critici nella capacità del farmaco ad acetilare la COX1 nel maggior numero possibile di piastrine.

- **Fumo.** Hung J. et al. (1995) hanno dimostrato che il fumo di sigaretta incrementa l'attivazione piastrinica e la formazione del trombo. Inoltre, è stato visto che i fumatori hanno alti livelli di *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) ciò facilita sia l'adesione piastrine-monociti che il rilascio del TxA2.

- **Trasportatori.** Recenti studi hanno evidenziato un ruolo particolare ed ad ampio spettro di alcuni trasportatori proteici, le ABCC-ATP binding cassette [58] la cui capacità di azione estrusiva di numerose sostanze è fondamentale per mantenere intatta l'omeostasi della cellula. Le piastrine possiedono un grande numero di trasportatori, che regolano l'uptake delle molecole e l'eliminazione dei farmaci. Mattiello et al. (2011) hanno dimostrato che l'aspirina è un bersaglio per il trasportatore MRP4 e che nei pazienti sottoposti a by pass aorto-coronarico, l'insufficiente inibizione piastrinica da parte dell'aspirina dipende dalla over-espressione del trasportatore MRP4. La ridotta capacità dell'aspirina ad inibire la COX1 piastrinica sembra essere legata alla capacità dell'MRP4 di ridurre la concentrazione intrapiastrinica del farmaco prima che eserciti la sua azione inibitoria sulla COX1[20].



- **Diabete mellito.** E' una patologia associata ad un aumento del rischio degli eventi cardiovascolari ed ischemici, per questo motivo la terapia preventiva antitrombotica è stata largamente studiata in questa popolazione. In genere le piastrine dei pazienti diabetici presentano maggior sensibilità agli agonisti piastrinici, questa maggiore sensibilità è stata associata con l'alterazione metabolica da stress ossidativo e disfunzione endoteliale. Sono stati proposti vari meccanismi che possono spiegare la variabilità della inibizione piastrinica nei diabetici. 1) Interazione diretta tra glucosio e aspirina, le due sostanze competono per la COX-1 piastrinica. 2) L'aspirina non può inibire in modo efficiente la COX-1 se è glicosilata. Inoltre, 3) Le piastrine dei pazienti diabetici presentano cambiamenti morfologici e biochimici che portano ad un fenotipo pro-trombotico, meno sensibile all'azione dell'aspirina.

- **Iperlipidemia.** La resistenza all'aspirina è stata associata con l'iperlipidemia [24] [31], in questa condizione è presente uno stato infiammatorio e

pro trombotico costante [18]. Tuttavia non è ancora chiaro se i pazienti con elevati livelli di LDL siano meno sensibili al trattamento con aspirina.

- **Turn over piastrinico.** L'aumentato turn over piastrinico è considerato una potenziale causa della variabilità nella risposta all'aspirina. In pazienti che presentano giornalmente un maggior numero di piastrine nuove, l'aspirina non è più in grado di inibire in modo efficiente la COX1, producendo quantità di trombociti sufficienti ad attivare le piastrine.

*I fattori correlati con il farmaco sono:*

- **Compliance alla terapia e interazione con altri farmaci.** Per valutare l'efficacia dell'aspirina bisogna essere certi che i pazienti assumano regolarmente il farmaco, seguendo la prescrizione. In un recente rapporto del *Prospective Urban Rural Epidemiology*, è emerso che solo un quarto dei pazienti assume regolarmente i farmaci. Gli studi che hanno monitorato l'assunzione dell'aspirina hanno dimostrato che in una elevata percentuale di pazienti, la diminuzione dell'effetto dell'aspirina è legata proprio alla mancata assunzione giornaliera del farmaco [19] [66]. Tra le cause della variabilità della risposta all'aspirina vanno ricordate anche le interazioni farmacologiche, in particolare con altri FANS e con inibitori della pompa protonica. A differenza dell'aspirina, la maggior parte degli altri FANS inibisce la COX-1 in modo reversibile. Finché queste molecole sono presenti nel canale della COX-1 l'accesso dell'aspirina al residuo di serina è impedito, quindi la somministrazione di questi farmaci prima dell'aspirina previene l'acetilazione permanente di COX1 da parte dell'aspirina e con essa il suo effetto antiaggregante [53].

Per quanto riguarda i farmaci inibitori di pompa protonica, alcuni studi sembrano dimostrare che l'aumento del pH gastrico, dovuto all'assunzione di questi farmaci, riduca l'assorbimento dell'aspirina.

- **Dosaggio dell'Aspirina.** La relazione tra dose di aspirina somministrata e fenomeno della resistenza all'aspirina è stata a lungo studiata. In passato si era ipotizzato che i pazienti in trattamento con basse dosi di aspirina che presentavano una recidiva potevano aver benefici dall'aumento del dosaggio. Gli studi effettuati hanno invece dimostrato che la sensibilità all'aspirina non è dose-dipendente. Al contrario, è stato visto che l'efficacia del trattamento con aspirina decresce passando dal 35,6% nei pazienti che assumono 100 mg o meno di aspirina al 18,6% nei pazienti che ne assumono 300 mg o più [22].

- **Tachifilassi.** E' stato dimostrato che l'uso prolungato di aspirina può ridurre nel tempo il suo effetto antiplastrinico [39] [68]. Il meccanismo d'azione non è ancora noto.



## Insufficiente inibizione della funzionalità piastrinica da Clopidogrel

Tra le tienopiridine il clopidogrel è il farmaco che presenta la maggiore variabilità di risposta individuale. Studi clinici hanno riportato che tra il 4% e il 30% dei pazienti in trattamento con clopidogrel, presentano una ridotta risposta al farmaco, che è correlata ad un aumento del rischio di eventi ischemici che oscilla tra 1,5 e 5 volte. Ad oggi sono stati scoperti diversi meccanismi responsabili di tale fenomeno [34][4].

I principali meccanismi conosciuti sono:

- **Variabilità funzionale dell'isoenzima CYP450.** Alcuni polimorfismi del citocromo CYP450 (CYP2C19\*2 e CYP2C19\*3) sono associati ad una ridotta funzionalità enzimatica, con conseguente diminuzione della conversione del clopidogrel nel suo metabolita attivo [32]. Tuttavia, solo il 18% dei pazienti insensibili all'azione del clopidogrel risulta positivo alla mutazione genica [32].

- **Interazione con altri farmaci** Un altro meccanismo che coinvolge la ridotta efficacia farmacologica del clopidogrel è la concomitante azione di farmaci che utilizzano lo stesso sistema enzimatico per il loro metabolismo quali statine (atorvastatina a simvastatina) e inibitori della pompa protonica (omeprazolo) [4].

- **Trasportatori.** Varianti genetiche dei trasportatori che modulano l'assorbimento del farmaco nell'intestino. Il trasportatore più importante per tale azione è la glicoproteina P, che over-espressa, come risultato della variante genetica 3435T/T, determina riduzione della biodisponibilità del farmaco, con conseguente aumento del rischio cardiovascolare [29].

- **Fattori clinici.** Pazienti che hanno piastrine iper-reattive sono meno sensibili all'azione del clopidogrel. Altri fattori clinici legati alla riduzione dell'azione del clopidogrel sono l'aumento del body mass index, il diabete mellito e in particolare il diabete insulino-dipendente. Ovviamente anche la ridotta compliance a questo farmaco determina un aumento di rischio cardiovascolare [4].



## Test di funzionalità piastrinica

Un largo numero di test di laboratorio vengono utilizzati per studiare la funzionalità piastrinica e per valutare l'efficacia del trattamento antiaggregante.

Come detto precedentemente, utilizzare dei test appropriati per valutare il monitoraggio della terapia antiaggregante avrebbe il vantaggio di identificare sia i pazienti meno sensibili al trattamento che i pazienti che hanno un aumentato rischio di complicanze emorragiche.

La maggior parte delle linee guida internazionali, però, non raccomanda l'uso dei test di laboratorio in quanto, ad oggi, non c'è consenso sui test da utilizzare e su quali parametri devono essere considerati inoltre mancano trial clinici che dimostrino l'impatto delle modificazioni del trattamento sull'outcome clinico in pazienti resistenti agli antiaggreganti.

A nostro avviso molti di questi problemi sono legati al fatto che la maggior parte dei test di funzionalità piastrinica richiedono personale altamente specializzato sia per l'esecuzione dell'analisi che per l'interpretazione dei risultati ottenuti. Le caratteristiche più importanti che deve avere il personale specializzato, che effettua questi test, inclusi i point-of-care, sono la profonda conoscenza dei principali meccanismi di attivazione piastrinica, dei meccanismi di azione dei farmaci antiaggreganti e specialmente dei principi su cui si basa un test che viene utilizzato a tale scopo.



## Test tradizionali utilizzati per studiare la funzione piastrinica

Il dosaggio del Trombossano e dei suoi metaboliti e l'aggregazione piastrinica secondo il metodo di Born sono al momento i test più accurati e specifici per identificare i pazienti meno sensibili al trattamento con antiaggreganti.

### *Dosaggio del trombossano sierico e del metabolita urinario 11-deidro-trombossano B2*

Il Trombossano B2 (TxB2) sierico e l' 11-deidro-TxB2 urinario sono al momento i test più specifici per valutare l'efficacia dell'aspirina ad inibire la cicloossigenasi piastrinica. L'acido arachidonico nelle piastrine viene convertito rapidamente in TxA2 per azione della cicloossigenasi, l'aspirina inibendo tale enzima riduce di conseguenza la produzione di questa prostaglandina [54].

La misurazione di questo prodotto può essere eseguita o mediante il suo metabolita stabile TxB2 nel siero o mediante il metabolita finale, 11-deidro-

TxB2, che viene eliminato nelle urine [54].

Il dosaggio del TxB2 sierico richiede il trattamento del sangue intero, senza l'aggiunta di alcun anticoagulante, per 1 ora a 37°C immediatamente dopo l'esecuzione del prelievo, in quanto la trombina che si forma in seguito alla formazione del coagulo attiva in modo massimale le piastrine generando il TxB2.

Uno studio effettuato su 700 pazienti in trattamento con aspirina ha dimostrato che i livelli residui di TxB2 sierico superiori a 3,1 pg/ml correlano con futuri eventi cardiovascolari [30].

Il dosaggio dell'11-deidro-TxB2, viene effettuato su campioni di urine e rapportato alla concentrazione urinaria di creatinina. Studi clinici, effettuati su più di 5000 pazienti trattati con aspirina, hanno dimostrato che livelli superiori a 67,9 (ng/mmol creatinine) hanno un aumento del rischio cardiovascolare di 3 volte [55].

## Nuovi test



I nuovi test che misurano la funzionalità piastrinica sono eseguiti con i dispositivi point of care, che possono essere utilizzati al letto del paziente. I più utilizzati sono il VerifyNow<sup>®</sup> (Accumetrics, San Diego, CA, USA) e il PFA-100<sup>®</sup> (Platelet Function Analyzer, Dade Behring, Newark, DE, USA). Questi test vengono usati da circa un decennio, ma ad oggi sono pochi i dati clinici che dimostrano una sicura efficacia nell'identificazione dei pazienti meno sensibili al trattamento con antiaggreganti. Tale difficoltà è maggiormente evidente in caso di pazienti che assumono la doppia terapia antiaggregante [34].

### *VerifyNow*

VerifyNow<sup>®</sup> è una metodica che studia l'efficacia terapeutica degli antiaggreganti attraverso la misurazione dell'aggregazione piastrinica su sangue intero mediante una metodica turbidimetrica.

Per valutare l'efficacia dell'aspirina il sangue intero viene immesso in una cartuccia contenente sfere ricoperte di acido arachidonico e fibrinogeno, le piastrine aderendo alle sfere riducono la torbidità del sangue che viene riportata come ARU (Aspirin Reaction Units).

Il cutoff è di 550 ARU. Valori inferiori a 550 ARU indicano sensibilità all'azione dell'aspirina, in quanto un ridotto numero di piastrine è in grado di attivarsi una volta in contatto con acido arachidonico e di aderire alle sfere

ricoperte di fibrinogeno. Valori superiori a 550 ARU indicano che le piastrine presentano una residua funzionalità piastrinica nonostante il trattamento con aspirina [42].

Il VerifyNow può essere utilizzato anche per verificare l'efficacia del trattamento con Clopidogrel, utilizzando l'ADP come agonista piastrinico. Per aumentare la sensibilità e la specificità di questo test, oltre all'ADP viene aggiunta la PGE1, che è in grado di sopprimere l'attivazione aspecifica del recettore P2Y1. Le risposte vengono riportate come PRU (P2Y12 Reactin Units), il cutoff utilizzato per tale analisi è 240 PRU [65].

### ***Platelet function analyzer***

PFA-100® è una analisi che simula la risposta piastrinica nel processo emostatico. Il sangue intero immesso in una cartuccia viene aspirato da un capillare dal diametro di 150 µm e passa attraverso una membrana ricoperta di collagene più adrenalina, o collagene più ADP [60]. Le piastrine che aderiscono alla membrana riducono il flusso fino all'occlusione. I risultati sono riportati in secondi necessari all'occlusione del flusso. Più il tempo è lungo meno le piastrine reagiscono agli agonisti che ricoprono la membrana. I valori normali per i pazienti trattati con aspirina sono inferiori a 180 sec per la cartuccia adrenalina più collagene e di 120 sec per la cartuccia ADP più collagene.

Ultimamente è uscita una nuova cartuccia ricoperta di ADP e Prostaglandina E1 utilizzata per il monitoraggio del trattamento con Clopidogrel. Affinchè il trattamento si possa definire efficace il tempo di chiusura deve essere superiore a 160 sec [65].





## **Aggregazione piastrinica: Principi analitici e utilità diagnostica**

Il corretto studio dell'emostasi legata alla risposta piastrinica dovrà necessariamente riguardare le analisi di laboratorio capaci di determinare le alterazioni quantitative e qualitative delle piastrine.

Mentre per il conteggio delle piastrine è sufficiente effettuare l'emocromo, e, ove necessario, il conteggio al microscopio ottico, per quanto riguarda la funzionalità piastrinica sono state sviluppate diverse metodiche. L'aggregazione piastrinica è l'analisi più versatile; ha lo scopo di valutare la funzionalità "qualitativa" delle piastrine, cioè la loro capacità di attivazione, mediante la formazione di aggregati piastrinici in seguito a stimoli. E' considerata il "gold standard" per studiare eventuali deficit di funzionalità piastrinica sia congeniti che acquisiti, o dipendenti dall'assunzione di farmaci anti-piastrinici.

Il principio di valutazione dell'aggregazione piastrinica, secondo il metodo di Born, è di tipo turbidimetrico: quando le piastrine si trovano in agitazione alla temperatura di 37°C, l'aggiunta di un agonista determina la formazione di aggregati piastrinici rendendo più limpida la soluzione; un fotometro valuterà nel tempo la riduzione della resistenza al passaggio della luce. La trasmittanza, inversamente proporzionale al grado di torbidità della soluzione, è relazionata al grado di aggregazione.

Il test aggregometrico risultante sarà una rappresentazione grafica della reazione, nella quale vengono indicate sul piano delle ordinate il tempo che trascorre dall'aggiunta dell'agonista e sul piano delle ascisse il grado di aggregazione.

La determinazione dell'attivazione piastrinica in vitro, mediante il metodo di Born evidenzia più di una fase di attivazione piastrinica, lo shape change, l'aggregazione primaria e l'aggregazione secondaria. Lo shape change è la rappresentazione grafica del cambiamento di forma delle piastrine che da discoidi diventano rotonde e viene evidenziata come diminuzione della trasmittanza; l'aggregazione primaria è espressione della sola interazione tra l'agonista e il suo recettore; l'aggregazione secondaria è espressione della completa attivazione delle piastrine e necessita del rilascio di entrambi i mediatori chimici di attivazione che possono agire sia sinergicamente, a basse concentrazioni di agonista, che singolarmente, a più alte concentrazioni di agonista (Figura 3).

La versatilità della metodica risiede nel fatto che nel test possono essere utilizzati differenti agonisti delle piastrine in grado di evocare un'aggrega-



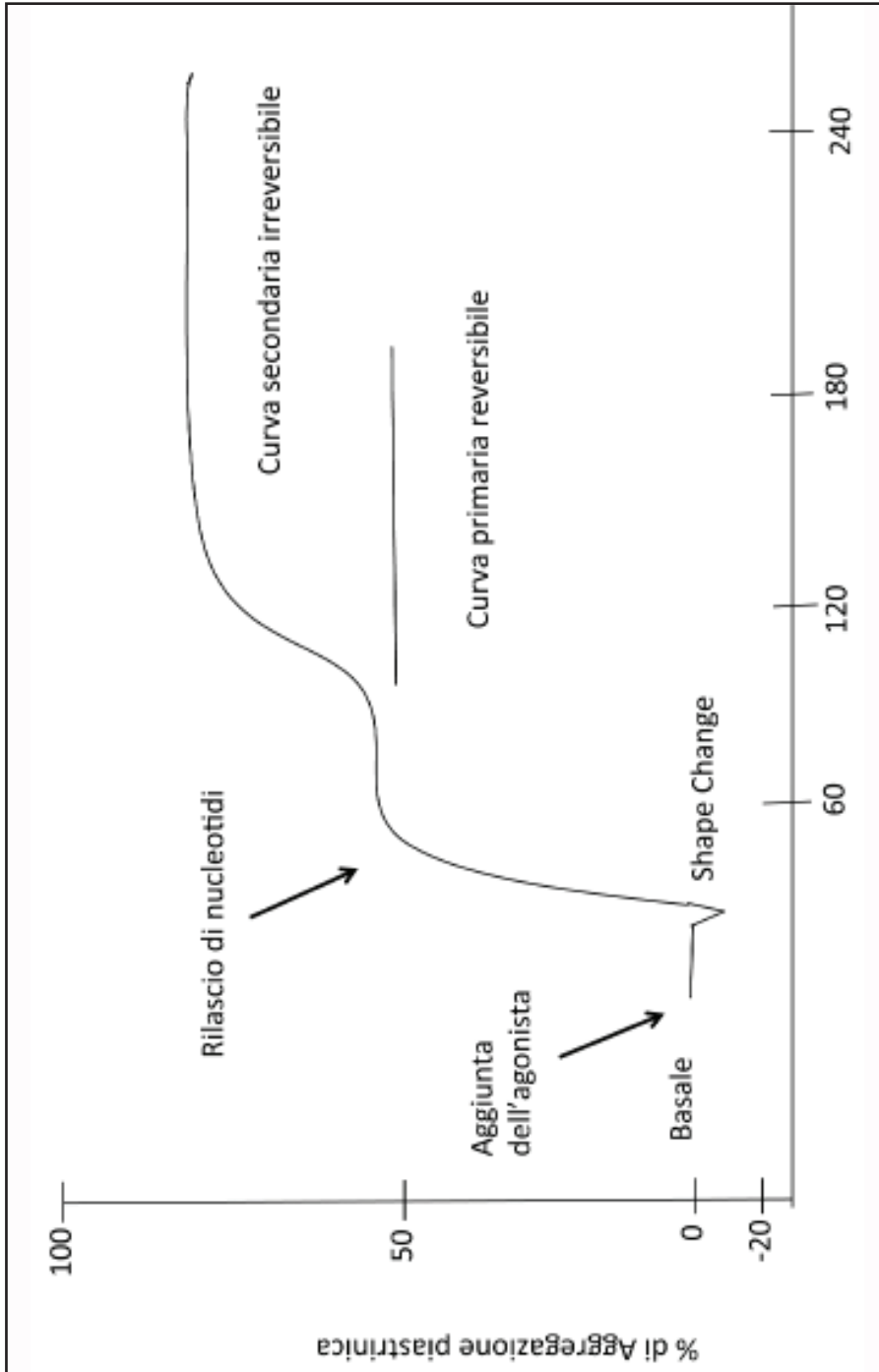
zione e che fornisce la possibilità di valutare più di una fase dell'attivazione piastrinica. L'aggregometro ha anche la capacità di mantenere continuamente la sospensione di piastrine in agitazione, con una temperatura costante di 37°C, mantenendo quindi le piastrine a temperatura e condizione di turbolenza fisiologiche.

Le indicazioni per l'esecuzione del test di aggregazione piastrinica sono principalmente legate a deficit congeniti o acquisiti della funzionalità piastrinica.

Le recenti linee guida della Società Britannica di ematologia suggeriscono che nei pazienti con conclamata sindrome emorragica acuta, con normali parametri della coagulazione e numero delle piastrine è necessario eseguire l'aggregazione piastrinica. Se eseguita in laboratori specialistici questo test è in grado di indicare la piastrinopatia di cui è affetto il paziente [12].

Negli ultimi anni un crescente numero di lavori evidenzia l'interesse verso l'aggregazione piastrinica per valutare l'efficacia biologica dei farmaci antiaggreganti, sia inibitori della sintesi del trombossano, che degli antagonisti del recettore dell'ADP o del recettore per il fibrinogeno.





*Figura 3. Rappresentazione grafica dei risultati dell'aggregazione piastrinica secondo il metodo di Born.*



## Esecuzione del test

L'aggregazione piastrinica è soggetta a numerosi fattori di variabilità tra i laboratori, che possono influenzare il raggiungimento dei risultati, generando talvolta confusione ed errori. A questo riguardo dobbiamo evidenziare che la metodica è poco standardizzata tra i differenti laboratori, che non esistono linee guida e che non viene valutata la qualità sia all'interno del laboratorio che tra laboratori differenti. Un lavoro pubblicato recentemente su una importante rivista internazionale riporta nei metodi che per poter eseguire l'aggregazione piastrinica secondo il protocollo dello studio, i responsabili dell'esecuzione del test dei vari centri hanno effettuato un corso per uniformare la metodica e le procedure necessarie per garantire la qualità dei test. Hanno inoltre evidenziato l'importanza di riportare in un foglio tutte le variabili pre-analitiche e analitiche che influenzano la risposta piastrinica [78].



Scopo principale di questa manuale sarà pertanto quello di fornire le competenze necessarie per la preparazione del campione, per l'esecuzione dell'analisi e per l'interpretazione dei risultati ottenuti.

## Informazioni da dare al paziente prima dell'esecuzione del test

Il paziente deve presentarsi a digiuno e non assumere farmaci occasionali nella settimana precedente l'esecuzione del test, specialmente quelli ad azione antiplastrinica. Il maggior pericolo di alterazione della risposta piastrinica è rappresentato dall'azione di farmaci che vengono assunti occasionalmente. Come è possibile vedere dalla tabella 1, la categoria di farmaci che possono influenzare maggiormente la funzionalità piastrinica sono i farmaci antiinfiammatori sia steroidei che non steroidei, il cui largo uso occasionale è noto.

<b>Antinfiammatori non steroidei:</b> Aspirina Indometacina Ibuprofene Naproxen Piroxicam COXib Acido mefenamico Acido meclofenamico Diflunisal Sulindac	<b>Farmaci Cardiovascolari:</b> Farmaci $\beta$ -adrenergici Nitrati (es. Nitroprusside, Nitroglicerina) Bloccanti dei canali del calcio ACE inibitori Antagonisti del recettore dell'Angiotensina II Antiarritmici (es. Quinidina)
<b>Antibiotici</b> Antibiotici $\beta$ -lattamici (es. Penicillina, Cefalosporine) Altri antibiotici e antifungini (es. Nitrofurantoina, Idrossichinolone, Amfotericina, Miconazolo)	<b>Agenti psicotropici e anestetici:</b> Antidepressivi triciclici (es. Imipramina) Fenotiazine (es. Clorpromazina) Inibitori della Ricaptazione della Serotonina Anestetici e narcotici (es. Benzocaina)
<b>Anticoagulanti:</b> Eparina Coumadin Lepirudina Argatroban Bivalirudina	<b>Antagonisti del recettore dell'ADP</b> Ticlopidina e Clopidogrel
<b>Agenti trombolitici:</b> Streptochinasi Urochinasi Attivatori del plasminogeno tissutale	<b>Antagonisti del recettore GP IIb/IIIa</b> Aciximab Tirofiban Eptifibatide
<b>Agenti Chemioterapici</b> Mitramicina Daunorubicina Carmustina	<b>Antidiarroici</b> Quinidina
<b>Inibitori delle Fosfodiesterasi</b> Dipiridamolo Cilostazol Sildenafil Caffeina Teofillina Aminofilline	<b>Cibo e Integratori alimentari</b> Aglio Cumino Acidi grassi omega3 Cipolla Alcool Melatonina
<b>Farmaci Ipocolesterolemizzanti</b> Inibitori della HMG-CoA reduttasi (es. Atorvastatina, Fluvastatina) Fibrati (es. Colfibrato, Etofibrato)	<b>Plasma expanders</b> Dextrano
<b>Antistaminici</b>	<b>Mezzi di contrasto radiografici</b>

Tabella 1. Farmaci che interferiscono con la funzionalità piastrinica.

## **Prelievo**

Il sangue non deve essere soggetto a turbolenze di nessun tipo, che potrebbero favorire il rilascio di ADP generando attivazione piastrinica. È necessario non protrarre l'uso del laccio per un tempo prolungato, onde evitare una stasi venosa con conseguente diminuzione del pH, ulteriore fattore di attivazione piastrinica.

Dovranno essere evitate manovre di ricerca della vena ed altri danni endoteliali.

In caso di prelievo con siringa, occorre dispensare il sangue nelle provette soltanto dopo aver tolto l'ago, allo scopo di evitare l'emolisi dei globuli rossi che potrebbe influire con la conta delle piastrine e potrebbe attivare la coagulazione.

Finito il prelievo, il sangue del paziente deve essere tempestivamente mescolato con l'anticoagulante. Per il test di aggregazione, l'anticoagulante d'elezione risulta essere il sodio citrato al 3,2% o 3,8%, ma può essere anche utilizzato l'ACD formula A-NIH, entrambi sono chelanti del calcio; permettono di ottenere ottimi risultati con questo test, in quanto mantengono le piastrine in condizioni ottimali. Devono essere utilizzati con un rapporto di 1:10 (V:V).

Evitare un mescolamento troppo energico che potrebbe determinare un'adesione piastrinica alle pareti della provetta con conseguente attivazione delle stesse.

## **Trasporto**

Le provette di sangue ottenute devono essere mantenute e trasportate a temperatura ambiente, in meno di un ora.

Nella fase di trasporto è importante non generare urti, vibrazioni o altri traumi alle provette che potrebbero provocare emolisi con successiva alterazione dell'attivazione piastrinica.



## **Preparazione del plasma ricco di piastrine (PRP) e plasma povero di piastrine (PPP)**

I campioni di sangue in sodio citrato, in provette da 10 ml, devono essere centrifugati a  $180-200 \times g$  ( $1000-1100 \text{ rpm}$  in centrifuga da banco con rotore da 14,5 cm di raggio e  $880-927 \text{ rpm}$  in centrifuga con rotore da 20,7 cm di raggio) per 15 minuti utilizzando preferenzialmente un rotore a bracci oscillanti; tale centrifugazione permette la separazione delle piastrine dalle altre componenti cellulari del sangue. Il sovranatante ottenuto dopo la centrifugazione sarà costituito da PRP. L'utilizzo di provette con volumi differenti da 10 ml necessitano la standardizzazione dei parametri di centrifugazione.

Di estrema importanza è la processazione dei campioni nel minor tempo possibile. Nella norma è importante separare i globuli rossi dalle piastrine entro 1 ora dal prelievo ed effettuare l'analisi entro 4 ore dal prelievo. Il rispetto di tali norme limita gli errori diagnostici strettamente correlati con il tempo che intercorre tra la fase pre-analitica e analitica propriamente detta.

Da questa fase in poi, le manipolazioni dovranno essere estremamente delicate, in quanto nel PRP è contenuta un'altissima concentrazione di piastrine che ne favorisce la collisione ed eventualmente attivazione.

La provetta contenente i globuli rossi e l'anello leucocitario viene sottoposta ad una successiva centrifugazione per 10 minuti a  $2000 \times g$ , in modo da ottenere un plasma povero di piastrine (PPP).

Nel caso in cui lo strumento dovesse evidenziare un numero di piastrine elevato sarà importante effettuare una conta delle piastrine nel plasma ricco con un contaglobuli e, dove necessario (superiore a  $500.000 \times \text{mm}^3$ ), diluire il PRP con una soluzione tampone a pH fisiologico. Evitare di diluire il PRP con il PPP in quanto è ricco di prodotti rilasciati dalla lisi dei globuli rossi durante la centrifugazione che riducono la funzionalità piastrinica [17].

Effettuare la taratura dello strumento mediante le norme riportate dal manuale d'uso dello strumento. Utilizzare esclusivamente cuvette di vetro siliconato o di plastica.



## **Agonisti piastrinici**

ADP, adrenalina, collagene e acido arachidonico sono gli agonisti più utilizzati per gli studi aggregometrici. E' da tener presente che ogni laboratorio dovrebbe effettuare una serie di test, su almeno 20 volontari sani, necessari per identificare i valori di riferimento del laboratorio. Per uno studio ottimale



dell'aggregazione piastrinica è necessario effettuare gli studi con più di un agonista utilizzando più di una concentrazione per ciascuno.

Di seguito sono riportati gli agonisti e le curve standard:

#### **ADP**

Viene comunemente utilizzato a concentrazioni comprese tra 0,4 e 10 microM. E' un agonista piastrinico che induce shape change, aggregazione piastrinica primaria a basse concentrazioni (da 0,4 a 1 microM), primaria e secondaria ad alte concentrazioni che sarà registrata come bifasica fino alla concentrazione di 4 microM (Figura 4).

#### **Adrenalina**

Utilizzato alle concentrazioni comprese tra 0,2 e 15 microM. Come l'ADP è un agonista piastrinico che induce aggregazione sia primaria (da 0,2 a 0,5 microM) che secondaria (> 0,5 microM), con la differenza che non induce shape change e che l'aggregazione primaria non è reversibile (Figura 4).

#### **Collagene**

Utilizzato alle concentrazioni comprese tra 1 e 4 microg/ml. Il collagene non induce aggregazione primaria. Dopo la tipica variazione da shape change si osserva aggregazione secondaria irreversibile (Figura 4). A basse concentrazioni è molto dipendente sia dalla secrezione di ADP che dalla produzione di trombossano.

#### **Acido Arachidonic**

Utilizzato alle concentrazioni comprese tra 0,5 e 1,3 mM. E' un agonista che determina aggregazione solo secondaria con tracciati del tutto simili a quelli ottenuti da piastrine attivate con il collagene (Figura 4). L'aggregazione è dipendente dalla produzione di trombossano e quindi la più sensibile al trattamento con aspirina.

#### **Ristocetina**

È un antibiotico che altera la conformazione del fattore di vonWillebrand e ne facilita la sua adesione alle piastrine determinando agglutinazione e non aggregazione. E' utile per la sola diagnosi della malattia di vonWillebrand e per la Sindrome di Bernard Soulier. Per la diagnosi di queste patologie è necessario effettuare gli studi utilizzando almeno quattro concentrazioni differenti di ristocetina di cui una deve essere la concentrazione sub soglia e una deve essere una concentrazione capace di determinare sicuramente agglutinazione. Per le procedure necessarie alla diagnosi delle differenti Malattie di vonWillebrand, si veda la letteratura specializzata.



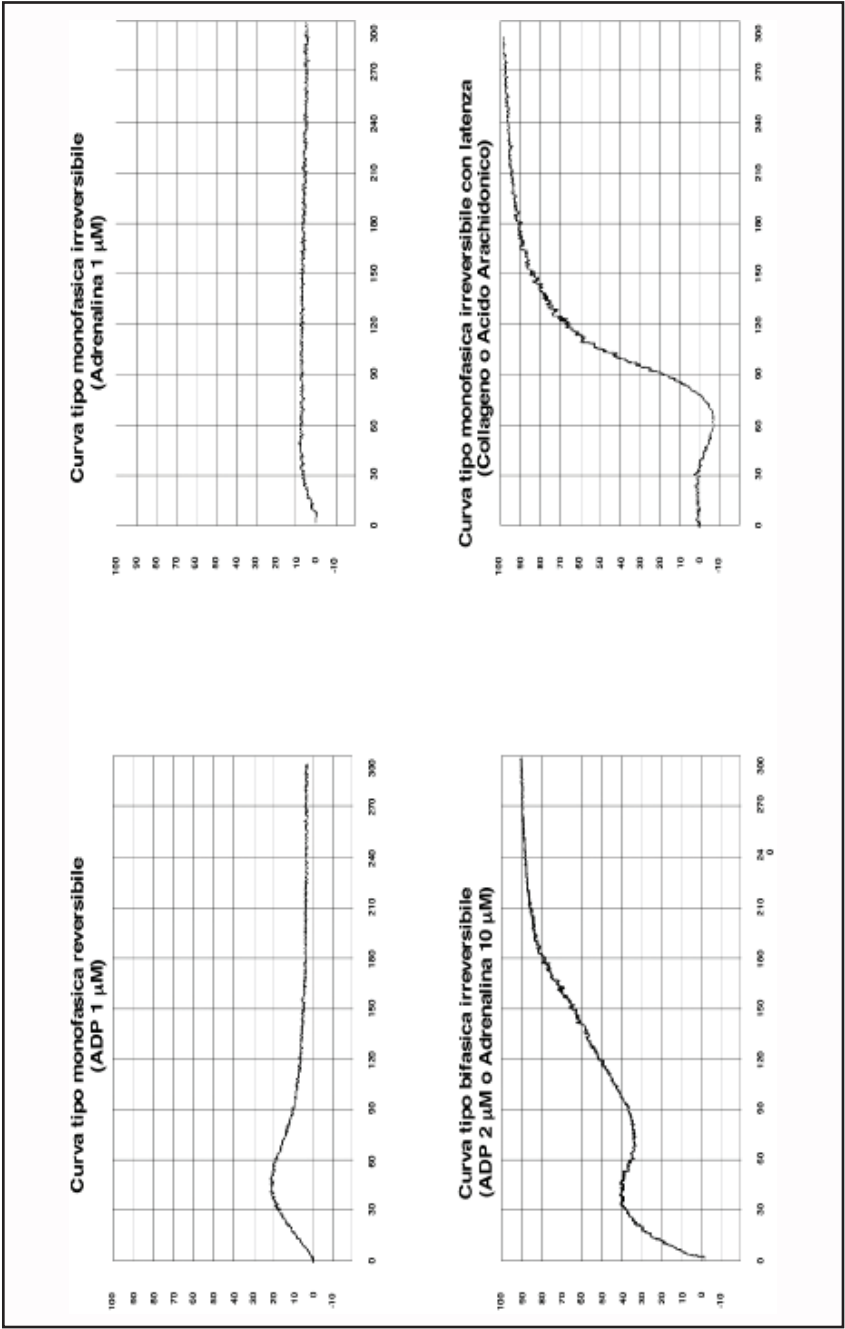


Figura 4 Tracciati aggregometri esemplificativi in risposta a differenti agonisti piastrinici.



## Preparazione agonisti

Gli agonisti piastrinici devono essere preparati secondo le norme riportate dalla casa. E' importante ricordare che le concentrazioni di lavoro devono essere preparate evitando di aggiungere al PRP volumi di agonista molto differenti tra le varie concentrazioni. A tale fine sarebbe opportuno preparare ciascuna concentrazione di lavoro 10 volte più concentrata rispetto alla soluzione che si intende studiare e di aggiungere l'agonista con un rapporto di 1/10 (solitamente 25 microL di agonista + 225 microL di PRP). Per la conservazione e la stabilità delle soluzioni stock bisogna attenersi alle notizie riportate nei fogli procedurali, le soluzioni di lavoro devono essere preparate quotidianamente e mantenute in ghiaccio fino alla completa esecuzione di tutti i test.



## Risposta dell'aggregazione piastrinica-parametri

La grande versatilità del test e la capacità di evidenziare più di una fase della risposta piastrinica fanno sì che i parametri che possono essere utilizzati per la refertazione del test siano diversi.

I principali parametri che gli strumenti sono in grado di riportare sono: massima percentuale di aggregazione; percentuale di aggregazione ad un tempo indicato; percentuale di aggregazione alla fine del tempo impostato; slope, che rappresenta la tangente nel punto di massima pendenza della curva secondaria; tempo di latenza, che è il tempo che intercorre tra l'aggiunta dell'agonista e l'inizio dell'aggregazione piastrinica; tempo necessario per il raggiungimento della massima percentuale; concentrazioni soglia per l'aggregazione sia primaria che secondaria.

I parametri che sono maggiormente utilizzati sono la massima percentuale di aggregazione sia primaria che secondaria, per ADP e adrenalina, per il collagene e l'acido arachidonico la massima percentuale di aggregazione e il tempo di latenza (vedi tracciati esemplificativi riportati in Figura 4). Negli ultimi tempi gli studi effettuati per la valutazione dell'efficacia terapeutica alle tienopiridine hanno evidenziato la reversibilità della risposta secondaria all'ADP (Figura 5) in pazienti in trattamento cronico con questi farmaci. Per evitare ulteriori parametri da aggiungere alla risposta, che creano solo confusione, è possibile utilizzare la percentuale di aggregazione a 4 min (Figura 6).

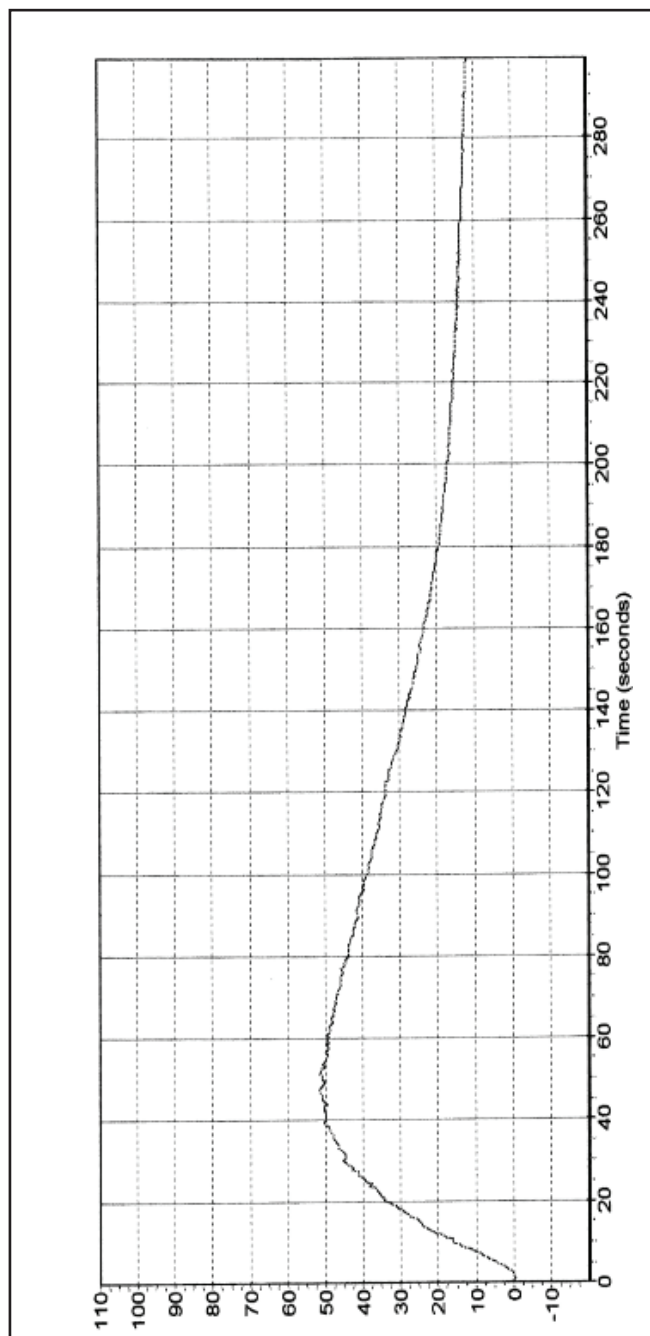


Figura 5. Tracciato aggregometrico rappresentativo di disaggregazione spontanea ad ADP.



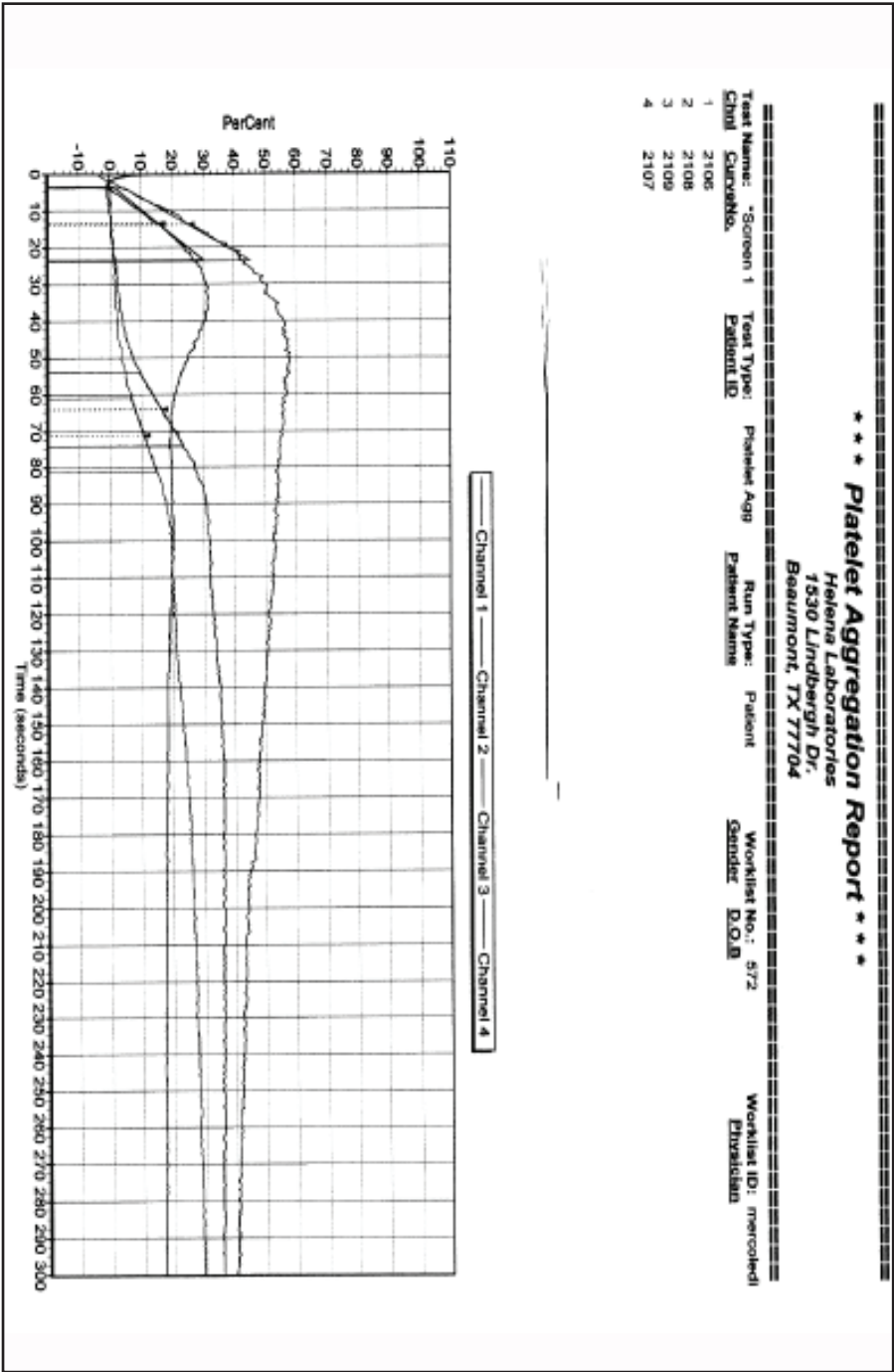


Figura 6. Valutazione della percentuale di aggregazione a 4 minuti.



Questo parametro ha anche il vantaggio di eliminare errori dovuti a massime aggregazioni di tipo primario in tracciati aggregometrici dove non sia particolarmente chiaro se la risposta è primaria o secondaria.

Avendo presente che, come detto in precedenza, ogni laboratorio dovrebbe standardizzare i propri parametri di normalità eseguendo i test in almeno 20 volontari sani, l'esperienza del nostro laboratorio ci ha permesso di riportare le risposte nel seguente modo.

- ADP percentuale di aggregazione a 4 min utilizzando le concentrazioni 0,8 e 2 microM.
- Adrenalina percentuale di aggregazione a 4 min in risposta a 0,5 e 10 microM.
- Collagene 1 e 2 microg/ml tempo di latenza e percentuale di aggregazione a 4 min.
- Acido arachidonico 0,50 e 0,75 mM percentuale di aggregazione a 4 min.

Nella 2 sono riportati le risposte aggregometriche ottenute in pazienti che non avevano assunto farmaci antiplastrinici (N=290).



## **Risposte aggregometriche in pazienti che assumono farmaci antiaggreganti**

### **Aspirina**

Ridotta percentuale di aggregazione dopo 4 min dall'aggiunta dell'agonista in risposta sia ad ADP che ad adrenalina, aumento del tempo di latenza e riduzione della percentuale di aggregazione dopo l'aggiunta dell'agonista in risposta al collagene fino alla concentrazione di 2 microg/ml. Assenza della risposta all'acido arachidonico in larga parte dei pazienti anche alla concentrazione di 0,75 mM.

Nella tabella 2 sono riportati le risposte aggregometriche ottenute in pazienti che avevano assunto aspirina (75-330 mg/die) da almeno 30 gg (N=327).

Agonisti	CONTROLLI (n=290)	ASPIRINA (n=327)	CLOPIDOGREL (n=84)
ADP 0,8 microM % (mean±DS)	15±31	7±19	3±15
ADP 2 microM % (mean±DS)	66±34	40±29	23±35
Adrenalina 0,5 microM % (mean±DS)	32±40	7±19	30±35
Adrenalina 10 microM % (mean±DS)	77±30	36±30	68±35
Acido Arachidonico microM 0,50 % (mean±DS) % pz con Acido Arachidonico assente	92 ±12 15%	26±39 88%	88±14 10%
Acido Arachidonico 0,75 % (mean±DS) % pz con Acido Arachidonico assente	95±9 6%	28±33 72%	91±12 6%
Collagene 1 microg/ml % (mean±DS) Collagene1 microg/ml Lat. (mean±DS)	81±23 63±28	17±25 135±56	70±26 59±30
Collagene 2 microg/ml % (mean±DS) Collagene2 microg/ml Lat. (mean±DS)	89±15 52±22	47±24 72±38	81±17 54±26

*Tabella 2. Risposte aggregometriche ottenute in pazienti che non assumono farmaci antiaggreganti e in pazienti in terapia con aspirina e con clopidogrel da almeno 30 giorni. In giallo sono riportati gli agonisti che maggiormente evidenziano l'efficacia terapeutica al farmaco antiaggregante.*



## **Tienopiridine**

Categoria di farmaci che sono antagonisti di un recettore per l'ADP, il P2Y<sub>12</sub>, necessario per il mantenimento dell'aggregazione piastrinica. Riduzione della percentuale di aggregazione dopo 4 min dall'aggiunta dell'agone sia ad ADP, che a basse concentrazioni di collagene e acido arachidonico.

Nella tabella 2 sono riportati le risposte aggregometriche ottenute in pazienti che avevano assunto clopidogrel (75 mg/die) da almeno 30 gg (N=84).

Nella tabella 3 sono riportate schematicamente le notizie importanti per eseguire una corretta aggregazione piastrinica e le notizie necessarie per effettuare un valido controllo di qualità.



Metodica	Controllo di qualità In corsivo facoltativi
<b>Informazioni generali del paziente</b>	
<input type="checkbox"/> Dati anagrafici. <input type="checkbox"/> Verificare che il paziente sia a digiuno. <input type="checkbox"/> Riportare farmaci assunti nelle ultime due settimane e indicare la posologia. <input type="checkbox"/> Anamnesi patologica (con particolare riferimento alla patologia emostatico coagulativa, a precedenti eventi cardiovascolari ed alle recenti infezioni).	<input type="checkbox"/> Dati anagrafici. <input type="checkbox"/> Il paziente è a digiuno. <input type="checkbox"/> Farmaci e relativa posologia assunti nelle ultime due settimane. <input type="checkbox"/> <i>Anamnesi patologica.</i>
<b>Informazioni sul campione di sangue</b>	
<input type="checkbox"/> Riportare ora del prelievo. <input type="checkbox"/> Prelievo eseguito evitando stasi venosa e con un ago di almeno 21 gauge. <input type="checkbox"/> Il sangue aggiunto al sodio citrato al 3,8% o ACD formula-A. <input type="checkbox"/> I campioni non devono presentare emolisi.	<input type="checkbox"/> Ora prelievo. <input type="checkbox"/> Prelievo difficoltoso.
<b>Processazione</b>	
<input type="checkbox"/> Mantenere i campioni alla temperatura di 20/25 °C e preparare il PRP entro un'ora dal prelievo. <input type="checkbox"/> Preparare il PRP centrifugando il campione a 180-200 g per 10 min. <input type="checkbox"/> Preparare il PPP centrifugando il campione a 2000g per 10 minuti. <input type="checkbox"/> Controllare che la concentrazione delle piastrine nel PRP sia nel range dello strumento. <input type="checkbox"/> Se no, diluire il PRP con tampone adeguato. <input type="checkbox"/> Effettuare periodicamente un aggregazione di controllo con PRP da volontario sano.	<input type="checkbox"/> Campione trasportato. <input type="checkbox"/> Ora di preparazione del PRP. <input type="checkbox"/> <i>Tempo e velocità di centrifugazione per la preparazione PRP e PPP.</i> <input type="checkbox"/> Indicare se è stato diluito PRP e con quale tampone. <input type="checkbox"/> È stato introdotto un controllo nel processo?
<b>Strumento per il test diagnostico</b>	
<input type="checkbox"/> Verificare che lo strumento sia settato secondo le istruzioni della casa. <input type="checkbox"/> Utilizzare solo cuvette di vetro silconato o plastica e verificare che siano prive di alterazioni. <input type="checkbox"/> Ricostituire i reagenti secondo le direttive del Kit e mantenere le soluzioni di lavoro in ghiaccio. <input type="checkbox"/> Pre riscaldare i campioni secondo le direttive della casa.	<input type="checkbox"/> <i>Cuvette utilizzate.</i> <input type="checkbox"/> <i>N. lotto agonisti.</i> <input type="checkbox"/> <i>Soluzione stock dell'agonista del.</i> <input type="checkbox"/> <i>Eventuali problemi riscontrati.</i>

Tabella 3. Parametri da rispettare per una corretta esecuzione del test di aggregazione piastrinica.

## Bibliografia

- 1] Abergel E, Nikolsky E. Ticagrelor: an investigational oral antiplatelet treatment for reduction of major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome. *Vasc Health Risk Manag* 2010;6:963-77.
- 2] Adebayo GI, Williams J, Healy S. Aspirin esterase activity - Evidence for skewed distribution in healthy volunteers. *Eur J Intern Med* 2007. 18(4):299-303.
- 3] Anger KE, Szumita PM, Baroletti SA, Labreche MJ, Fanikos J. Evaluation of dexmedetomidine versus propofol-based sedation therapy in mechanically ventilated cardiac surgery patients at a tertiary academic medical center. *CritPathwCardiol* 2010. 9(4):221-6.
- 4] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am CollCardiol* 2007;49:1505-16.
- 5] Angiolillo DJ, Gibson CM, Cheng S, et al. Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies. *ClinPharmacolTher* 2011;89:65-74.
- 6] Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy in type 2 diabetes mellitus. *CurrOpinEndocrinol Diabetes Obes* 2007;14:124-31.
- 7] Antithrombotic Trialists Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Collins R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2009;373:1849-60.
- 8] Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2003; 101:1206-1218.
- 9] Baigent C, Patrono C. Low-dose aspirin, coxibs, and other NSAIDs: a clinical mosaic emerges. *Mol Interv* 2009 9(1):31-9.
- 10] Binazon O, Dubois-Gauche A, Nanau RM, et al. Efficacy and safety of platelet inhibitors. *J Pharm Pharm Sci* 2013;16:1-39
- 11] Bochner F, Lloyd JV. Aspirin for myocardial infarction. Clinical pharmacokinetic considerations. *ClinPharmacokinet* 1995;28:433-8.
- 12] Bolton-Maggs. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *British Journal of Haematology*, 135, 603-633
- 13] Born GV. Observations on the rapid morphological reaction of platelets to aggregating agents. *SerHaematol*; 1970 3(4):114-20.
- 14] Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927-9.



- 15] Cannon CP, Harrington RA, James S, et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. *Lancet* 2010;375:283-93.
- 16] CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348:1329-39.
- 17] Cattaneo. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica*, 2007; 92: 694-697
- 18] Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M. (2002). Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia. Effects of statin therapy. *Circulation* 2002. 106(4): 399-402.
- 19] Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A. Lack of aspirin effect: Aspirin resistance or resistance to taking aspirin ? *Am. Heart J* 2004. 147(2): 293-300.
- 20] Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz I. Antiplatelet drugs: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence- Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012. 141:89S-e119S.
- 21] Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e89S-119S.
- 22] Eikenboom JC, Tjernerberg P, Van Marion V, Heering KJ. . Acquired von Willebrand syndrome: diagnostic problems and therapeutic options. *Am J Hemato* 2008.182(1):55-8.
- 23] Faraday N, Becker DM, Becker LC. Pharmacogenomics of platelet responsiveness to aspirin. *Pharmacogenomics* 2007. 8(10):1413-25.
- 24] Faraday N, Becker DM, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Segal JB, Moy T, Bray PF, Becker LC. Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *Am. J. Cardiol* 2006; 98(6): 774-779.
- 25] Farrell B, Godwin J, Richards S, Warlow C. The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J NeurolNeurosurg Psychiatry* 1991;54:1044-54.
- 26] Faught RW, Satti SR, Hurst RW, Pukenas BA, Smith MJ. Heterogeneous practice patterns regarding antiplatelet medications for neuroendovascular stenting in the USA: a multicenter survey. *J NeurointervSurg* 2014. Jan 3 Epub ahead of print]



- 27] Finegold J.A., Asaria P., Francis D.P. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organization and United Nations. *International journal of cardiology* 2012; 934-945
- 28] Fitzgerald DJ. Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion. *Neurology* 2001;57:S1-4.
- 29] Floyd CN, Ferro A. Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacol Ther* 2014;141:69-78.
- 30] Frelinger AL 3rd, Li Y, Linden MD, et al. Association of cyclooxygenase-1-dependent and -independent platelet function assays with adverse clinical outcomes in aspirin-treated patients presenting for cardiac catheterization. *Circulation* 2009;120:2586-96.
- 31] Friend M, Vucenik I, Miller M. (2003). Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ*. 326(7380): 82-83.
- 32] Garabedian T, Alam S. High residual platelet reactivity on clopidogrel: its significance and therapeutic challenges overcoming clopidogrel resistance. *Cardiovasc Diagn Ther* 2013;3:23-37.
- 33] Gorog DA, Fuster V. Platelet function tests in clinical cardiology: unfulfilled expectations. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:2115-29.
- 34] Gorog DA, Sweeny JM, Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 2: laboratory resistance to antiplatelet drugs-fact or artifact? *Nat Rev Cardiol* 2009;6:365-73.
- 35] Grinstein J, Cannon CP. Aspirin resistance: current status and role of tailored therapy. *Clin Cardiol* 2012;35:673-81.
- 36] Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:961-5.
- 37] Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003;107:2908-13.
- 38] Hankey G.J., Eikelboom J.W. Aspirin resistance. *Lancet* 2006; 367: 606-17.
- 39] Helgason C.M., Bolin K.M., Hoff J.A., Winkler S.R., Mangat A., Tortorice K.L., Brace L.D. (1994). Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke*; 25:2331-2336.
- 40] Herbert JM, Savi P. P2Y12, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Semin Vasc Med* 2003;3:113-22.
- 41] Hung J, Lam JYT, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995;92:2432-6.



- 42] Hussein HM, Emiru T, Georgiadis AL, Qureshi AI. Assessment of platelet inhibition by point-of-care testing in neuroendovascular procedures. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34:700-6.
- 43] Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S, Sandset PM, Wickens M, Peters G. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y<sub>12</sub> antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J* 2006;27:1038-47.
- 44] Janssen PW, ten Berg JM. Platelet function testing and tailored anti-platelet therapy. *J CardiovascTransl Res* 2013;6:316-28.
- 45] Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *ThrombHaemost* 2009;102:248-57.
- 46] Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008;336:195-8.
- 47] Kulbertus H. Aspirin: recent advances in cardiovascular prevention. *Rev Med Liege* 2004; 59: 695- 703.
- 48] Kuzniatsova N, Shantsila E, Blann A, Lip GY. A contemporary viewpoint on 'aspirin resistance'. *Ann Med* 2012;44:773-83.
- 49] Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Circulation* 2011;124:2574-609.
- 50] Lindblad U., Rastam L., Ranstam J. Acute myocardial infarction in patientstrated for hypertension in the Skaraborg Hypertension Project. *Eur Heart J* 1993; 14:291-6.
- 51] Linnemann B, Schwonberg J, Rechner AR, Mani H, Lindhoff-Last E. Assessment of clopidogrel non-response by the PFA-100 system using the new test cartridge INNOVANCE PFA P2Y. *AnnHematol* 2010;89:597-605.
- 52] Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X. Pharmacokinetic profile of 14C-labeled clopidogrel. *SeminThrombHemost* 1999;25(Suppl 2):29-33.
- 53] Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H<sub>2</sub> synthase. *Nat Struct Biol* 1995. 2(8):637-43.
- 54] Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2007;28:1702-8.



- 55] Lordkipanidze M. Advances in monitoring of aspirin therapy. *Platelets* 2012;23:526-36.
- 56] Madsen EH, Schmidt EB, Maurer-Spurej E, Kristensen SR. Effects of aspirin and clopidogrel in healthy men measured by platelet aggregation and PFA-100. *Platelets* 2008;19:335-41.
- 57] Maree AO, Curtin RJ, Dooley M, et al. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am CollCardiol* 2005;46:1258-63.
- 58] Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J ClinPharmacol* 2002. 42(6):620-43.
- 59] Mattiello T, Guerriero R, Lotti LV, et al. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *J Am CollCardiol* 2011;58:752-61.
- 60] Michelson AD, Frelinger AL 3rd, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006;98:4N-10N.
- 61] Muller JE, Jimenez AH, Strubbs MF, Tofler GH, Winther K, Williams G.H. Rapidity and duration of platelet suppression by enteric-coated aspirin in healthy young men. *Am J Cardiol* 1992;69:914-921.
- 62] Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005; 353:2373-83.
- 63] Patrono C, Baigent C, Hirish J, et al. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133:199-233.
- 64] Patrono C, Andreotti F, Arnesen H, Badimon L, Baigent C, Collet JP, De Caterina R, Gulba D, Huber K, Husted S, Kristensen SD, Morais J, Neumann FJ, Rasmussen LH, Siegbahn A, Steg PG, Storey RF, Van de Werf F, Verheugt F. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis. *Eur Heart J* 2011.32(23):2922-32.
- 65] Patti G, Barcsi G, Orlic D, et al. Outcome comparison of 600- and 300-mg loading doses of clopidogrel in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction: results from the ARMYDA-6 MI (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty-Myocardial Infarction) randomized study. *J Am CollCardiol* 2011;58:1592-9.
- 66] Peace A, McCall M, Tedesco T, Kenny D, Conroy RM, Foley D, Cox D. The role of weight and enteric coating on aspirin response in cardiovascular patients. *J ThrombHaemost* 2010. 8(10):2323-5.
- 67] Pulcinelli FM, Biasucci LM, Riondino S, et al. COX-1 sensitivity and thromboxane A2 production in type 1 and type 2 diabetic patients under chronic aspirin treatment. *Eur Heart J* 2009;30:1279-86





- 68] Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestini A, Riondino S, Gazzaniga PP, Violi F. Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am CollCardiol* 2004;43:979-84.
- 69] Riondino S, Trifiro E, Principessa L, et al. Lack of biological relevance of platelet cyclooxygenase-2 dependent thromboxane A2 production. *Thromb Res* 2008;122:359-65.
- 70] Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007;100:1673-85.
- 71] Shantsila E, Lip GY. 'Aspirin resistance' or treatment non-compliance: which is to blame for cardiovascular complications? *J Transl Med* 2008;6:47.
- 72] Siller-Matula JM, Trenk D, Krahenbuhl S, Michelson AD, Delle-Karth G. Clinical implications of drug-drug interactions with P2Y12 receptor inhibitors. *J ThrombHaemost* 2014;12:2-13.
- 73] Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167:1593-9.
- 74] Task Force for Diagnosis and Treatment of Non ST-Segment Elevated Acute Coronary Syndromes of European Society of Cardiology, Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, , et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007;28:1598-660.
- 75] Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *ClinPharmacolTher* 2006;80:486-501.
- 76] Valles J, Santos MT, Fuset MP, Moscardo A, Ruano M, Perez F, Piñon M, Breña S, Aznar J. (2007). Partial inhibition of platelet thromboxane A2 synthesis by aspirin is associated with myonecrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 99(1):19-25
- 77] Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1045-57.
- 78] Wiviott et al Aggregation Prasugrel Compared With High Loading- and Maintenance-Dose Clopidogrel in Patients With Planned Percutaneous Coronary Intervention: The Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 Trial. *Circulation.* 2007;116:2923-2932
- 79] Wiviott SD, Antman EM, Braunwald E. Prasugrel. *Circulation* 2010;122:394-403.
- 80] Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001-15.





- 81] Zahno A, Brecht K, Bodmer M, Bur D, Tsakiris DA, Krahenbuhl S. Effects of drug interactions on biotransformation and antiplatelet effect of clopidogrel in vitro. *Br J Pharmacol* 2010;161:393-404.
- 82] Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003;108:542-7.



## Indice

Editoriale .....	pag. 3
Piastrine: struttura e funzione.....	" 5
Farmaci antiaggreganti .....	" 7
Aspirina .....	" 9
Antagonisti del recettore purinergico P2Y <sub>12</sub> .....	" 10
Clopidogrel .....	" 11
Prasugrel .....	" 12
Ticagrelor .....	" 12
Residua funzione piastrinica in pazienti in trattamento con antiaggreganti .....	" 13
Insufficiente inibizione piastrinica da aspirina .....	" 13
Insufficiente inibizione della funzionalità piastrinica da Clopidogrel .....	" 17
Test di funzionalità piastrinica .....	" 17
Test tradizionali utilizzati per studiare la funzione piastrinica .....	" 18
Dosaggio del trombossano sierico e del metabolita urinario 11-deidro-trombossano B <sub>2</sub> .....	" 19
Nuovi test.....	" 19



VerifyNow .. .. .	"	20
Platelet function analyzer .. .. .	"	20
Aggregazione piastrinica: principi analitici e utilità diagnostica .. .. .	"	21
Esecuzione del test.. .. .	"	24
Informazioni da dare al paziente prima dell'esecuzione del test.. .. .	"	24
Prelievo .. .. .	"	26
Trasporto. ....	"	26
Preparazione del plasma ricco di piastrine (PRP) e plasma povero di piastrine (PPP) .. .. .	"	27
Agonisti piastrinici .. .. .	"	27
Preparazione agonisti .. .. .	"	30
Risposta dell'aggregazione piastrinica-parametri .. .. .	"	30
Risposte aggregometriche in pazienti che assumono farmaci antiaggreganti .. .. .	"	33
Bibliografia .. .. .	"	37
Indice. ....	"	44



# Caleidoscopio

Italiano

...il futuro ha il cuore antico.  MEDICAL SYSTEMS SpA

1. Rattu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rattu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rattu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rattu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rattu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D., Girelli M.E., Zanatta G.P., Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La  $\beta$ -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rattu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.

32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.

69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radio-nuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodel-lamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da prin-cipi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella dia-gnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.:

*Malattie a trasmissione sessuale. Maggio '96.*

- 103.Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
- 104.Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
- 105.Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.
- 106.Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
- 107.Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
- 108.Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
- 109.Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
- 110.Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
- 111.Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
- 112.Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
- 113.Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
- 114.Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
- 115.Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
- 116.Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
- 117.Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
- 118.Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
- 119.Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
- 120.National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.
- 121.Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
- 122.Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.
- 123.Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.
- 124.Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (I)*. Luglio '98.
- 125.Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo I*. Novembre '98.
- 127.Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II)*. Dicembre '98.
- 128.Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica*. Gennaio '99.
- 129.Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.
- 130.Castello G., Silvestri I.: *Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.
- 131.Aiello V., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata*. Aprile '99.
- 132.Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.
- 133.Rossi R.E., Monasterolo G.: *Eosinofili*. Giugno '99.
- 134.Fusco A., Somma M.C.: *NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*. Luglio '99.
- 135.Chieffi O., Bonferraro G., Fimiani R.: *La menopausa*. Settembre '99.
- 136.Giglio G., Aprea E., Romano A.: *Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi*. Ottobre '99.



- 137.Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: *Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati*. Novembre '99.
- 138.Giovanella L.: *Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*. Dicembre '99.
- 139.Paladino M., Cerizza Tosoni T.: *Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*. Gennaio 2000.
- 140.La Vecchia C.: *Come evitare la malattia*. Febbraio 2000.
- 141.Rossi R.E., Monasterolo G.: *Cellule dendritiche*. Marzo 2000.
- 142.Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I)*. Aprile 2000.
- 143.Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II)*. Maggio 2000.
- 144.Croce E., Olmi S.: *Videolaparoscopia*. Giugno 2000.
- 145.Martelli M., Ferraguti M.: *AllergoGest*. Settembre 2000.
- 146.Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: *TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici*. Gennaio 2001.
- 147.Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: *L'umanizzazione dei servizi sanitari*. Febbraio 2001.
148. Giovanella L.: *I tumori della tiroide*. Marzo 2001.
- 149.Dessi-Fulgheri P., Rappelli A.: *L'ipertensione arteriosa*. Aprile 2001.
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: *Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*. Settembre 2001.
- 151.Dominici R.: *Riflessioni su Scienza ed Etica*. Ottobre 2001.
- 152.Lenziardi M., Fiorini I.: *Linee guida per le malattie della tiroide*. Novembre 2001.
- 153.Fazii P.: *Dermatofiti e dermatofitosi*. Gennaio 2002.
- 154.Suriani R., Zanella D., Orso Giaccone G., Ceretta M., Caruso M.: *Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*. Febbraio 2002.
155. Trombetta C.: *Il Varicocele*. Marzo 2002.
- 156.Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: *Ambiente e polmone*. Aprile 2002.
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: *I Markers tumorali*. Maggio 2002.
158. Loviselli A., Mariotti S.: *La Sindrome da bassa T3*. Giugno 2002.
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giaccone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte*. Ottobre 2002.
160. Canini S.: *Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato*. Novembre 2002.
161. Atzeni M.M., Masala A.: *La  $\beta$ -talassemia omozigote*. Dicembre 2002.
162. Di Serio F.: *Sindromi coronariche acute*. Gennaio 2003.
163. Muzi P., Bologna M.: *Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*. Febbraio 2003.
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: *Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*. Marzo 2003.
165. Magri G.: *Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*. Aprile 2003.
166. Rapporto dello Hastings Center: *Gli scopi della medicina: nuove priorità*. Maggio 2003.
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: *Il sonno e le sue alterazioni*. Giugno 2003.
168. Macchia V., Mariano A.: *Marcatori tumorali nel cancro della vescica*. Luglio 2003.
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: *La Turbercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.



170. Aebischer T.: *Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*. Settembre 2003.
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: *Il manuale della sicurezza*. Ottobre 2003.
172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione*. Novembre 2003.
173. La Brocca A. Orso Giacone G. Zanella D. Ceretta M.: *Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee*. Dicembre 2003.
174. Savron G.: *Le Fobie*. Gennaio 2004.
175. Paganetto G.: *Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*. Febbraio 2004.
176. Giovanella L.: *Iperparatiroidismo e tumori paratiroidi*. Marzo 2004.
177. Severino G., Del Zompo M.: *Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata"*. Aprile 2004.
178. Arigliano P.L.: *Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie*. Maggio 2004.
179. Bruni A.: *Malattia di Alzheimer e Demenza Frontotemporale*. Giugno 2004.
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: *Eziopatogenesi e diagnostica allergologica*. Luglio 2004.
181. Franzoni E., Gualandi P. Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare*. Agosto 2004.
182. Grandi G., Peyron F.: *La toxoplasmosi congenita*. Settembre 2004.
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A.: *Patogeni emergenti e resistenze batteriche*. Ottobre 2004.
184. Tosello F., Marsano H.: *Scientific English Handout*. Novembre 2004.
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: *Iperensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
186. Paganetto G.: *Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*. Gennaio 2005.
187. Savron G.: *La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*. Febbraio 2005.
188. Magrì G., Baghino E., Floridia M., Ghiara F.: *Leishmania*. Marzo 2005.
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., Pasina L.: *Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: *Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*. Maggio 2005.
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonese G.: *Aerobiologia ed allergopatie*. Giugno 2005.
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.: *Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12*. Luglio 2005.
193. Zepponi E.: *Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*. Settembre 2005.
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: *La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi*. Ottobre 2005.
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: *Doping e antidoping nello sport*. Novembre 2005.
196. Lozzi M.: *La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*. Dicembre 2005.
197. Bracco G.: *Progettare un Laboratorio di Analisi*. Gennaio 2006.

198. Angelucci A.: *Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*. Febbraio 2006.
199. Commissione Tecnica sul Rischio Clinico: *Risk management in Sanità. Il problema degli errori*. Marzo 2006
200. Casati G., Marchese E., Roberti V., Vichi M.C.: *La gestione dei processi clinico assistenziali per il miglioramento delle prassi*. Aprile 2006.
201. Zanella D., Ceretta M., Orso Giaccone G.: *Peptidi natriuretici: nuove frontiere in cardiologia?* Maggio 2006.
202. Cicala M., Dal Lago U., Vinci P., Maggiorotti M.: *L'accusa di malpractice in ambito medico*. Giugno 2006.
203. Martino R.: *Manuale Qualità UNI EN ISO 9001*. Luglio 2006.
204. Mazzarello M.G., Arata M., Perfumo M., Marchese A., Debbia E.A.: *Tubercolosi e micobatteri*. Settembre 2006.
205. Matrullo R.: *Anoressia: la negazione della sessualità come difesa narcisistica*. Ottobre 2006.
206. Crotti D.: *Le parassitosi intestinali ed uro-genitali*. Novembre 2006.
207. Orso Giaccone G., Zanella D., Ceretta M.: *Il referto interpretativo in infettivologia*. Dicembre 2006.
208. Baghino E., Magrì G., Nicoletti L., Novaro G., Vignale C., Mazzei C.: *Stato dell'arte delle aneuploidie fetali, dall'indagine clinica prenatale alla diagnosi anatomo-patologica*. Gennaio 2007.
209. Mazzarello M.G., Brunetti R., Perfumo M., Torriglia A.M., Montresor G.: *Principali Tecniche Analitiche in uso nei Laboratori di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche*. Febbraio 2007.
210. Orso Giaccone G., Zanella D., Ceretta M.: *Celiachia dalla A alla Z*. Marzo 2007.
211. Cingolani M., Sparviero E.: *Decidere ora per allora: il testamento biologico (dichiarazioni anticipate di trattamento)*. Aprile 2007.
212. Barletta G., Pastacaldi V., Peracino A.P.: *La misura dei processi nella medicina di laboratorio*. Maggio 2007.
213. Rassu S., Masia L., Delussu P., Chessa P., Demartis M.G., Moroso G.: *Manuale per il supporto vitale di base e la defibrillazione precoce (BLS-D)*. Giugno 2007.
214. Anchisi R., M. Gambotto Dessy: *Il Burnout del personale sanitario*. Marzo 2008.
215. Gulletta E., Orrico F., Foti D.P.: *Clinical Governance nel Laboratorio Biomedico*. Aprile 2008.
216. Rochira V., Scaltriti S., Zirilli L., Carani C.: *Il ruolo degli estrogeni nel maschio*. Maggio 2008.
217. Gulletta E., Foti D.P., Corsi M.M., Galliera E.: *Citochine e Chemochine*. Giugno 2008.
218. Zambotto F.M.: *La biotecnologia transgenica utilizzata nella produzione degli alimenti di origine vegetale*. Settembre 2008
220. Morra A., Odetto L., Bozza C., Bozzetto P., Agostinis S., Bariona M.: *Compendio di Medicina delle Grandi Emergenze*. Novembre 2008
221. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *I Microarray*. Dicembre 2008

- 222. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: Applicazioni dei microarray (1). Marzo 2009**
- 223. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: Applicazioni dei microarray (2). Giugno 2009**
- 224. Di Carlo A., Mariano A., Macchia V.: Struttura e Funzioni delle Matrix Metallo-Proteinasi (MMPs). Settembre 2009**
- 225. Torricelli F. Giuliani C.: Farmacogenetica: aspetti diagnostici, applicazioni cliniche e prospettive future. Febbraio 2010.**
- 226. Montagnana M., Lippi G., Salvagno G.L, Guidi G.C.: Vecchi e nuovi marcatori di Sindrome Coronarica Acuta. "Ischemia Modified Albumin": Storia di un marcatore "cardiaco". Marzo 2010.**
- 227. Coghe F., Coni P., Orrù G., Gavino G.: Determinazione molecolare del KRas. Giugno 2013.**
- 228. Tozzoli R., D'Aurizio F.: L'Immunochemiluminescenza nella Diagnostica di Laboratorio. Gennaio 2014.**
- 229 Giavarina D.: Evidence Based Medicine: impiego dei test di laboratorio. Luglio 2014.**
- 230 Fiore E., Latrofa F., Provenzale M. A., Vitti P.: Tiroidite Cronica Autoimmune. Settembre 2014.**
- 231. Crapanzano C.: Vitamina D. Ottobre 2014.**

**Caleidoscopio**  
*Rivista mensile di Medicina*  
anno 33, numero 232

**Direttore Responsabile**

Sergio Rassu  
Tel. mobile 338 2202502  
E-mail: [sergiorassu@yahoo.it](mailto:sergiorassu@yahoo.it)

**Progettazione e Realizzazione**



Restless Architect  
of Human Possibilities s.a.s.

**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

**Responsabile Ufficio Acquisti**

Giusi Cunietti

**Segretaria di Direzione**

Maria Speranza Giola

**Servizio Abbonamenti**

Laura Cecchi

**EDITORE**

*...il futuro ha il cuore antico.*  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)  
Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);  
Telefax 010/8340310- 809070.  
Internet URL: <http://www.medicalsystems.it>

**Stampa**

Tipolitografia Nuova ATA  
Via Gelasio Adamoli, 281 - Genova  
Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - [info@nuovaata.com](mailto:info@nuovaata.com) - [www.nuovaata.com](http://www.nuovaata.com)

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996  
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989  
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Aprile 2015  
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.



