

FISIOPATOLOGIA**RUOLO DELLE PIASTRINE E DEI FATTORI DELLA COAGULAZIONE****SIMONA BARTIMOCCIA, FRANCESCO VIOLI****Introduzione**

Le piastrine sono piccoli elementi cellulari anucleati che si originano per frammentazione citoplasmatica dei megacariociti. Sono presenti nell'organismo in numero variabile da 150.000 a 450.000 μ l, il tempo medio di sopravvivenza in circolo è di 7-10 giorni e la loro rimozione avviene ad opera del sistema reticolo endoteliale della milza, del fegato e del midollo osseo.

In condizioni fisiologiche, le piastrine non aderiscono né si attivano sull'endotelio intatto, tuttavia, eventi infiammatori come quelli che si osservano nelle prime fasi del processo aterosclerotico, portano all'attivazione endoteliale che, a sua volta, può stimolare l'adesione e l'attivazione piastrinica (1). Le piastrine, infatti, svolgono un ruolo chiave nella patologia aterosclerotica in quanto sono coinvolte nel processo di occlusione dell'arteria nel sito di rottura della placca, dove, aderendo al sub-endotelio, contribuiscono alla crescita del trombo (2).

L'interazione e l'attivazione delle piastrine all'endotelio danneggiato è attribuita ai seguenti processi:

- a) riduzione dei meccanismi implicati nel mantenimento delle proprietà antitrombotiche dell'endotelio;
- b) specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate dai fattori di rischio aterosclero-

tici (ipertensione, ipercolesterolemia, fumo e il diabete, sono tutti fattori di rischio che correlano con un'aumentata attivazione piastrinica);

- c) un aumento dei mediatori pro-trombotici e pro-infiammatori.

La rottura della placca aterosclerotica determina, inoltre, l'attivazione della cascata della coagulazione, inducendo, insieme all'attivazione piastrinica, il cosiddetto processo aterotrombotico (1).

Ruolo delle piastrine nell'aterosclerosi

L'attività delle piastrine nei siti di rottura della placca aterosclerotica consiste in tre diverse fasi: adesione, attivazione e reclutamento di ulteriori piastrine sulla superficie vascolare esposta (*Figura 1*).

La fase iniziale consiste quindi nell'adesione piastrinica alla matrice extracellulare, durante questa fase le piastrine rotolano, aderiscono e si diffondono sulla matrice di collagene per formare un monostrato piastrinico attivato.

L'adesione primaria e l'attivazione delle piastrine nei siti di lesione della parete vascolare avvengono mediante un processo a più fasi che coinvolge l'interazione dei recettori piastrinici con componenti della matrice extracellulare sub endoteliale ricca di

molecole ad alto potere trombogenico che, grazie anche ai cambiamenti del flusso ematico generati dalla vasocostrizione, permettono alle piastrine circolanti di aderire alla sede di lesione e di dar vita al primo tappo emostatico.

L'esposizione di molecole adesive sub endoteliali quali il fattore di von Willebrand (vWF), il collagene, la fibronectina, la trombospodina e la laminina, è il movente iniziale dell'adesione piastrinica. L'interazione delle piastrine con la matrice extracellulare coinvolge il recettore piastrinico per il fattore di vWF, GPIb/V/IX e il recettore per il collagene GPVI.

L'importanza di vWF nell'aterogenesi è stata affermata attraverso un modello di topi *knock-out* per vWF, nei quali si è osser-

vato che sviluppano lesioni più piccole rispetto ai topi *wild-type* (3). Il GPVI, attraverso l'attivazione della catena FcR γ , induce processi di segnalazione intracellulari che promuovono l'attivazione di integrine quali $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) o $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa). L'attivazione delle integrine determina un'adesione forte delle piastrine alla parete del vaso lesa e la formazione di un monostrato piastrinico.

Durante la fase successiva dell'attivazione piastrinica, si forma un tappo piastrinico attraverso il reclutamento di ulteriori piastrine dalla circolazione e la loro aggregazione mediata dall'integrina GPIIb/IIIa. Questo recettore, esposto ed attivato sulla membrana plasmatica delle piastrine durante l'attivazione è in grado di legare il fi-

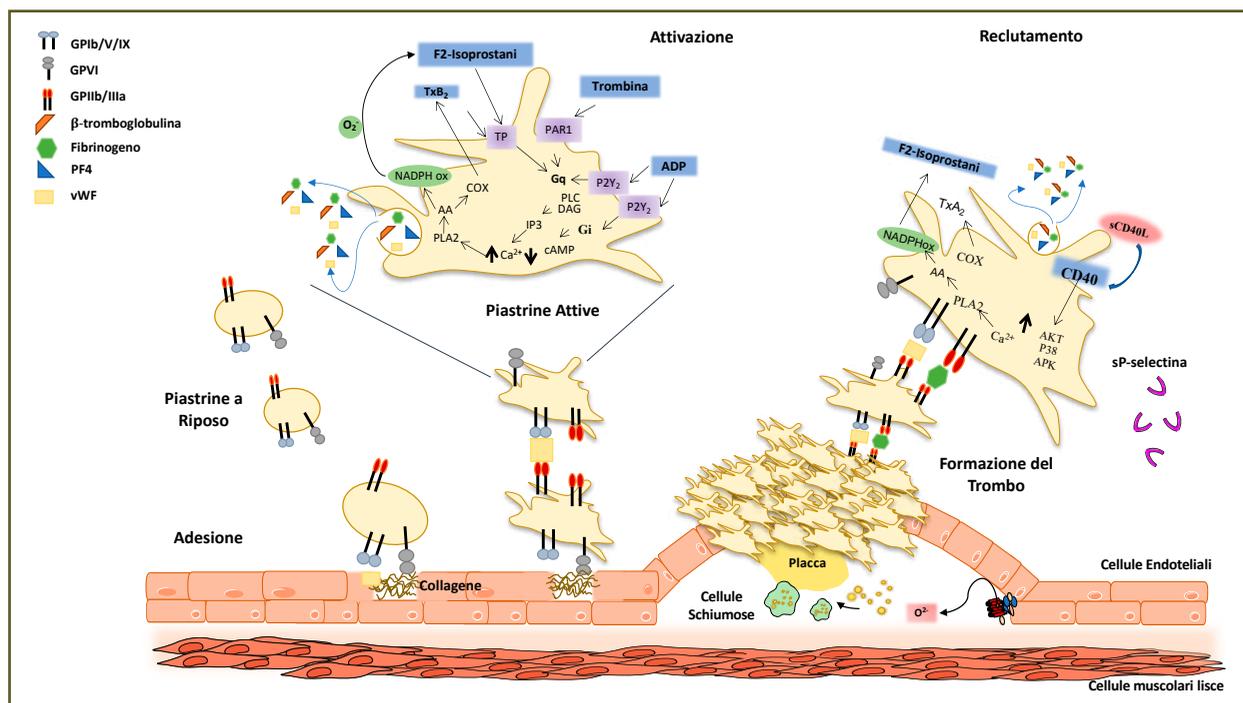


Figura 1 - Il reclutamento delle piastrine nel sito del danno vascolare è caratterizzato da diversi meccanismi comprendenti l'adesione, l'attivazione e il reclutamento di ulteriori piastrine. L'adesione piastrinica nel sito del danno è mediata da recettori piastrinici che legano componenti della matrice extracellulare quali vWF e collagene. Una volta adese le piastrine rilasciano e diffondono il contenuto dei loro granuli che contengono molecole pro-infiammatorie e pro-aggreganti. L'interazione di tali molecole con recettori specifici espressi sulle piastrine induce la propagazione e il reclutamento di ulteriori piastrine.

brinogeno e di permettere la formazione di ponti di fibrinogeno tra piastrine adiacenti. A seguito di questi legami, che permettono alle piastrine di aggregarsi, le piastrine rilasciano e diffondono il contenuto dei loro granuli che contengono molecole pro-aggreganti e pro-infiammatorie. Questo porta all'interazione di alcuni agonisti con i loro specifici recettori espressi sulla superficie delle piastrine che inducono la propagazione dell'attivazione piastrinica.

Durante questa fase, l'attivazione piastrinica sembra essere mediata soprattutto grazie dall'azione di tre agonisti: gli eicosanoidi quali il Trombassano A_2 (TxA_2) e l'adenosina difosfato (ADP), secreti o rilasciati dalle piastrine attive, e la trombina prodotta sulla superficie delle piastrine.

Gli eicosanoidi sono mediatori importanti dell'aggregazione piastrinica, infatti, una volta prodotto dalle piastrine adese, il TxA_2 amplifica le risposte di adesione piastrinica attraverso il legame con i suoi recettori $TP\alpha$ and $TP\beta$ ampiamente distribuiti nelle piastrine, nelle cellule infiammatorie circolanti e nella parete vascolare favorendo quindi l'attivazione piastrinica, la vaso-costrizione e promuovendo la progressione della placca aterosclerotica.

Il TxA_2 è sintetizzato dall'Acido Arachidonico (AA) grazie alla fosfolipasi A_2 (PLA₂), che idrolizzando i fosfolipidi di membrana libera AA. L'AA attraverso l'azione dell'enzima Ciclossigenasi-1 (COX-1) da origine al TxA_2 il quale a sua volta può attivare la fosfolipasi C (PLC). Questo enzima induce la formazione del secondo messaggero inositolo trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG), aumento dei livelli citoplasmatici di calcio e attivazione delle protein chinasi C intracellulari (PKC).

L'analisi dell'escrezione urinaria dell'11-dehydro- TxB_2 (il metabolita stabile del TxA_2) è tra i test più affidabili per valutare l'attivazione piastrinica in vivo. Infatti, il do-

saggio dell'11-dehydro- TxB_2 è stato utilizzato per scopi clinici in pazienti che presentavano fattori di rischio aterosclerotici quali il diabete mellito, l'ipertensione e l'ipercolesterolemia e in pazienti con patologie cardiovascolari acute e croniche. In tutte queste circostanze cliniche l'11-dehydro- TxB_2 urinario risultava essere elevato, suggerendo un'aumentata attivazione piastrinica nei pazienti a rischio o con aterosclerosi conclamata (4).

L'ADP è presente ad elevate concentrazioni nei granuli densi delle piastrine e viene rilasciata in seguito all'attivazione piastrinica. Una volta rilasciata, l'ADP è in grado di legarsi ai recettori $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$ presenti sulla superficie delle piastrine i quali a loro volta attivando la PKC modulano e sostengono l'attivazione piastrinica.

La trombina è la principale proteasi effettrice del sistema della coagulazione ed è tra i più efficaci attivatori delle piastrine. La formazione di trombina inizia dall'esposizione del fattore tissutale (Tissue Factor-TF) ai fattori della coagulazione del sangue in seguito al danno vascolare ed avviene sulle superfici cellulari, compresa quella delle piastrine attivate. La produzione di trombina sulla superficie piastrinica rappresenta un meccanismo importante con cui le piastrine attivate stimolano i processi coagulativi. La trombina inoltre può facilitare l'attivazione delle piastrine legandosi ai recettori dei *Protease-Activated Receptor* (PARs) costitutivamente espressi sulla membrana plasmatica delle piastrine. Le piastrine umane esprimono i recettori PAR1 e PAR4 e vari studi hanno dimostrato che PAR1 induce l'attivazione piastrinica a basse concentrazioni di trombina, mentre PAR4 contribuisce all'attivazione piastrinica solo ad elevate concentrazione di trombina (5).

L'attivazione piastrinica può essere inoltre sostenuta dai ROS, capaci di ossidare i

fosfolipidi di membrana e generare metaboliti derivati dall'AA. Infatti, la perossidazione dei fosfolipidi di membrana da parte dei ROS porta alla formazione di un'altra famiglia di ecosanoidi, denominata F2-isoprostani che interagendo con i recettori del TxA_2 modulano l'attivazione piastrinica (2). Gli F2-isoprostani sono prodotti dall'AA con un meccanismo mediato dai radicali liberi probabilmente prodotti dall'attivazione della NADPH Ossidasi 2 (Nox2). Infatti, è stato dimostrato che i pazienti con deficit ereditario di gp91phox (core catalitico della Nox2) presentano una ridotta formazione di F2-isoprostani piastrinici (6).

Tutti questi eventi portano al reclutamento di ulteriori piastrine, che a loro volta si attiveranno nel sito di crescita del trombo. Una volta attivate le piastrine sono in grado di influenzare la progressione della placca aterosclerotica supportando la risposta infiammatoria in diversi modi quali l'aumento dell'espressione delle molecole come la P-selectina e il CD40L.

La P-Selectina immagazzinata nelle vescicole migra verso la membrana esterna delle piastrine durante la fase di adesione, lega il recettore P-Selectina GP1 espresso sui leucociti e consente a questi ultimi di rotolare, aderire e infine trasmigrare nella parete vascolare. La P-selectina agevola inoltre l'adesione dei monociti all'endotelio e l'accumulo di macrofagi nella parete del vaso.

Il CD40L viene clivato in CD40L solubile (sCD40L) appena raggiunge la superficie piastrinica ed è in grado di promuovere diverse risposte infiammatorie da parte delle cellule endoteliali quali la produzione di specie reattive dell'ossigeno, chemochine e citochine (IL-6 e TF) e l'espressione di molecole di adesione cellulare (VCAM-1, ICAM-1 e E-Selectina). Inoltre, il CD40L è direttamente responsabile del reclutamento dei neutrofilo ed è in grado di modulare

il *pool* di linfociti T nella placca aterosclerotica (7).

Elevati livelli di CD40L e P-Selectina possono avere un valore prognostico nelle malattie cardiovascolari, infatti è stato dimostrato che elevati livelli di P-Selectina possono predire il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari sia in soggetti sani che in soggetti con ischemia miocardica, mentre elevati livelli di CD40L si sono osservati in pazienti con angina instabile (8, 9) (*Figura 1*).

Attivazione della cascata della coagulazione

La coagulazione consiste in una complessa e ordinata sequenza di reazioni enzimatiche che avvengono a livello della lesione vascolare e portano alla generazione di trombina, responsabile della trasformazione di una proteina plasmatica solubile, il fibrinogeno, in un polimero insolubile, la fibrina, che imbriglia e consolida il tappo emostatico (*Figura 2*).

Le proteine della cascata della coagulazione generalmente circolano nel plasma come zimogeni inattivi, che, vengono convertiti in fattori della coagulazione attivi sulla superficie di cellule attivate.

L'avvio della cascata della coagulazione avviene con l'esposizione del dominio extracellulare del fattore tissutale, (Tissue Factor-TF), al flusso sanguigno (10). Una volta esposto al flusso sanguigno il TF è il principale fattore trombogenico non fibrillare nel core lipidico della placca aterosclerotica ed è considerato come il principale fattore di regolazione della cascata coagulativa e della trombogenesi in vivo.

Il TF è una glicoproteina integrale di membrana di 47 KDa costituita da un dominio extracellulare di 219 aminoacidi, una regione trans membrana idrofobica di 23 aminoacidi e una regione intracellulare di

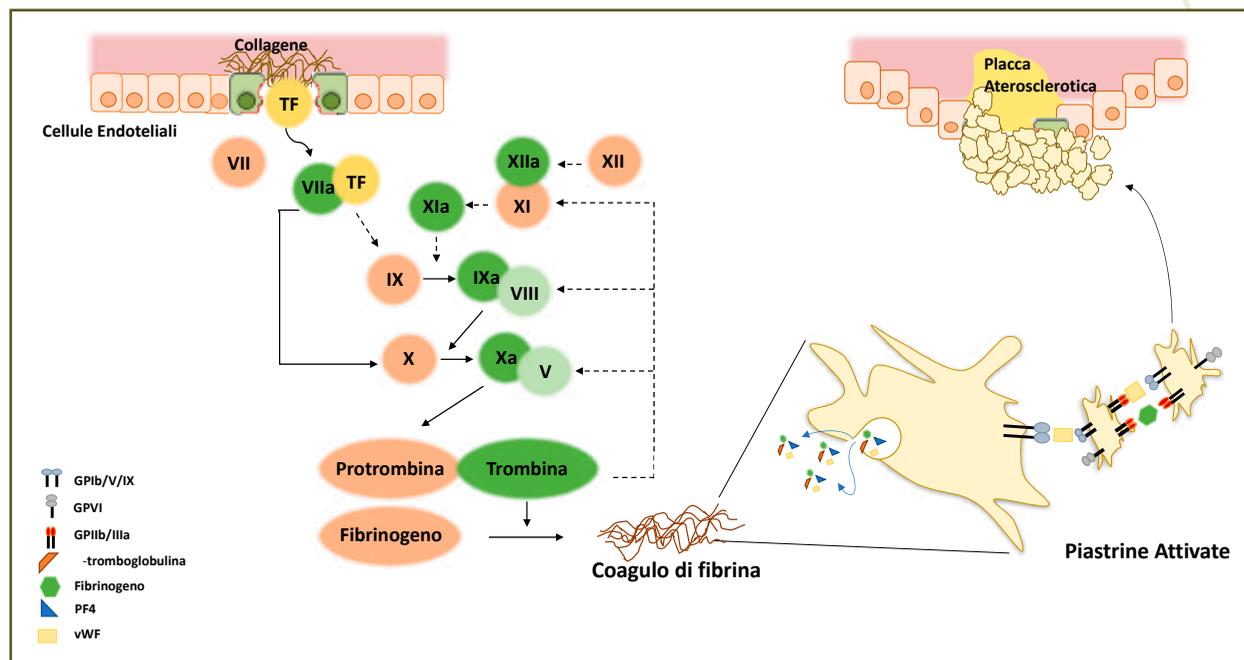


Figura 2 - L'attivazione della cascata della coagulazione ha un ruolo chiave nel processo aterosclerotico. Il sistema della coagulazione include diverse proteasi attivate, come una "cascata", che infine portano alla trasformazione del fibrinogeno in fibrina che imbriglia e consolida il trombo.

21 aminoacidi. La regione extracellulare svolge la funzione di recettore per il fattore plasmatico (F) VII/VIIa della coagulazione.

Il complesso TF-VIIa può essere attivato dal fattore VIIa circolante o dallo stesso complesso TF-VIIa, mediante un meccanismo di autoattivazione, o attraverso un'attivazione a *feedback* positivo da parte di altre proteasi (Xa, IXa, trombina). I substrati fisiologici di tale complesso sono i fattori IX e X, che si legano reversibilmente ai fosfolipidi anionici di membrana. Il fattore X può essere attivato sia attraverso il complesso VIIa-TF, sia attraverso il complesso IXa-VIIIa-fosfolipidi-Ca⁺⁺. Il fattore IXa si assembla sui fosfolipidi di membrana e in presenza del suo cofattore, il fattore VIIIa, catalizza l'attivazione del fattore Xa, che in ultimo induce attivazione piastrinica e formazione di un coagulo insolubile di fibrina.

Il FXa e il suo cofattore FVa scinde la protrombina (FII) inattiva e la trasforma

nella sua forma attivata, la trombina (FIIa). La trombina, quindi scinde il fibrinogeno in fibrina e attiva anche il fattore transglutaminasi XIII promuovendo così la reticolazione della fibrina e stabilizza ulteriormente il trombo ricco di piastrine (10, 11).

Piastrine e coagulazione

Tra le piastrine e la cascata della coagulazione c'è un importante "*crosstalk*", infatti uno dei primi eventi che avvengono dopo il danno vascolare e complementare all'attivazione piastrinica è l'attivazione della cascata della coagulazione.

Vari studi hanno dimostrato che il TF è presente costitutivamente negli Alpha-granuli delle piastrine ed in seguito all'attivazione piastrinica viene rilasciato ed esposto sulla superficie piastrinica. Questo fenomeno favorisce la crescita del trombo, poiché i fattori IXa e Xa iniziali, prodotti dalla via

estrinseca della coagulazione, potrebbero essere generati sulle vescicole contenenti TF a livello della superficie piastrinica. Quindi appare plausibile che la trombosi sia innescata dal TF esposto sul lume vasale, come dopo rottura della placca aterosclerotica, ma che la propagazione e la stabilizzazione del trombo dipendano anche dall'esposizione di TF sulle piastrine e sulle microparticelle circolanti.

L'espressione altamente selettiva del TF rappresenta un "espediente" emostatico, pronto ad attivare la cascata coagulativa solo quando l'integrità vascolare viene persa.

Molti mediatori infiammatori coinvolti nella formazione e nella progressione della placca aterosclerotica sono in grado di indurre l'espressione del TF nelle cellule della placca e la sua liberazione in microparticelle apoptotiche di membrana, determinando complicazioni trombotiche associate all'aterosclerosi (12).

Infine, vari studi hanno dimostrato che i ROS e la loro principale sorgente enzimatica, la Nox2, sono importanti promotori dell'attivazione della cascata della coagulazione. In particolare, uno studio sperimentale ha dimostrato che i ROS prodotti dalla Nox2 hanno un ruolo cruciale nell'up-regolazione del TF di origine endoteliale, effetto che veniva significativamente inibito dall'incubazione delle cellule con antiossidanti (13).

Conclusioni e prospettive future

L'aterosclerosi è un processo patologico diffuso che provoca cambiamenti strutturali nella parete dei vasi arteriosi dovuti principalmente all'accumulo di colesterolo e all'infiammazione indotta dalle cellule infiammatorie.

La rottura della placca aterosclerotica può portare all'attivazione e aggregazione

piastrinica nella sede del danno e insorgenza di episodi trombotici.

Lo studio dei meccanismi molecolari che coinvolgono le piastrine nello sviluppo e progressione della placca aterosclerotica e nell'attivazione della cascata coagulativa potrebbe migliorare la stratificazione del rischio cardiovascolare permettendo di iniziare tempestivamente le misure preventive nei soggetti ad alto rischio.

Inoltre, questi studi serviranno per lo sviluppo di strategie di intervento farmacologico più accurate, sicure e potenti per inibire selettivamente le vie più rilevanti nel processo della malattia aterosclerotica.

Bibliografia

1. Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Hear J Acute Cardiovasc Care.* 2012; 1: 60-74.
2. Violi F, Loffredo L, Carnevale R, Pignatelli P, Pastori D. Atherothrombosis and Oxidative Stress: Mechanisms and Management in Elderly. *Antioxidants Redox Signal.* 2017; 27: 1083-1124.
3. Methia N, André P, Denis CV, et al. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* 2001; 98: 1424-148. i
4. Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, et al. Incomplete Inhibition of Thromboxane Biosynthesis by Acetylsalicylic Acid: Determinants and Effect on Cardiovascular Risk. *Circulation.* 2008; 118: 1705-1712.
5. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006; 99: 1293-1304.
6. Pignatelli P, Carnevale R, Di Santo S, et al. Inherited Human gp91phox deficiency is associated with impaired isoprostane formation and platelet dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 423-34. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.217885>.
7. Davi G, Patrono C. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2482-2494.
8. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation.* 2001; 103: 491-495.
9. Aukrust P, Müller F, Ueland T, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 li-

- gand in patients with unstable angina: Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999; 100: 614-620.
10. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014; 276: 618-632.
 11. K. Freynhofer M, Bruno V, Wojta J, Huber K. The Role of Platelets in Athero-Thrombotic Events. *Curr Pharm Des*. 2012; 18: 5197-5214.
 12. Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson Y. The unstable atherosclerotic plaque: Clinical significance and therapeutic intervention. *Thromb. Haemost.*, vol. 78, Schattauer GmbH. 1997; 247-255.
 13. Herkert O, Diebold I, Brandes RP, et al. NADPH oxidase mediates tissue factor-dependent surface procoagulant activity by thrombin in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2002; 105: 2030-2036.