

ALTERAZIONI DELL'EMOSTASI IN PAZIENTI AFFETTI DA EPATOPATIA
CRONICA E CIRROSI EPATICA : INDIVIDUAZIONE DI NUOVI INDICATORI
PROGNOSTICI.

MARIA CRISTINA LUCCHETTA

DOTTORATO DI RICERCA IN EPATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA

DIPARTIMENTO DI ANATOMIA UMANA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

COORDINATORE: PROF. EUGENIO GAUDIO
TUTORE SCIENTIFICO: PROF. ANTONIO FRAIOLI

DOCENTI ESAMINATORI:

PROF. DOMENICO ALVARO, PROF. MARIA ADELAIDE CONTINENZA, PROF.
GIUSEPPE RICCIARDI

ABSTRACT

Scopo della ricerca è stato quello di individuare parametri emostatico-coagulativi con valore predittivo sull'evoluzione del processo cirrotico e sulla mortalità. A tal fine abbiamo indagato in quali termini valori di P selectina plasmatici (sP-sel) possano riflettere l'attivazione piastrinica in vivo in pazienti affetti da epatopatia cronica e cirrosi, biopticamente accertata ed HCV correlata. I risultati ottenuti ci permettono di avanzare l'ipotesi che la trombocitopenia associata ad epatopatia cronica HCV correlata potrebbe essere dovuta non soltanto ad un meccanismo di tipo autoimmunitario, ma anche ad una condizione di attivazione piastrinica in vivo causata direttamente dall'infezione virale. L'attivazione piastrinica in vivo che si verifica nei pazienti con epatite cronica C sembra correlata con la gravità della malattia; tuttavia per nessuno dei parametri studiati è stato provato un valore predittivo.

INTRODUZIONE

Il fegato occupa un ruolo chiave nel funzionamento del sistema emostatico; infatti tutti i fattori del sistema coagulatorio e fibrinolitico sono prodotti dal fegato tranne il fattore di von Willebrand, che è prodotto dalle cellule endoteliali . Il fattore di von Willebrand è la fonte più importante del fattore VIII, ma poiché la milza è un'altra fonte, i livelli di fattore VIII possono essere normali o persino aumentati nelle malattie epatiche, tranne che in presenza di CID. Le cellule epatiche sintetizzano anche proteine come l'antitrombina III (AtIII), le proteine C e S, l'inibitore del fattore Xa, che hanno effetto inibente sui fattori della coagulazione attivati. Inoltre a livello epatico sono sintetizzati il plasminogeno, gli inibitori della plasmino e l'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1). Infine il sistema reticolo endoteliale epatico contribuisce in larga misura alla clearance dei fattori della coagulazione attivati . E' intuibile quindi alla luce di questa caratteristica fisiologica, che quando si instaura un danno cronico epatocellulare il primo effetto sulla via coagulatoria sia una riduzione della sintesi dei fattori coagulatori che ne costituiscono la cascata. La stretta relazione tra riduzione di attività e danno epatocellulare è dimostrata da una serie di dati sperimentali acquisiti nell'uomo, che dimostrano, in maniera inequivocabile, che maggiore è il danno cellulare e più marcata sarà la riduzione della protidosintesi e quindi dell'attività dei fattori coagulatori circolanti. La disfunzione del sistema emostatico è una caratteristica importante del paziente con cirrosi epatica: la ridotta sintesi dei fattori della coagulazione è strettamente associata al grado di insufficienza epatica .

**PRINCIPALI ALTERAZIONI PIASTRINICHE
E COAGULATORIE NELLA EPATOPATIA CRONICA**

<p>Trombocitopenia</p> <p>Trombocitopatia</p>	<p>a) da aumentato sequestro splenico</p> <p>b) da consumo</p> <p>a) da Fattori Estrinseci</p> <ul style="list-style-type: none"> • elevato titolo FDP • pofibrinogenemia • elevato contenuto Apo E nelle LDL <p>b) da Fattori Intrinseci</p> <ul style="list-style-type: none"> • ridotto volume medio piastrinico • alterazioni dei fosfolipidi di membrana
<p>Diminuita sintesi dei fattori della Coagulazione</p> <p>Disfibrinogenemia</p> <p>Sindrome Iperfibrinolitica</p>	<p>a) iperfibrinolisi primaria (da alterazione della bilancia fibrinolitica)</p> <p>b) iperfibrinolisi secondaria (da attivazione coagulatoria intra- e/o extra-vasale)</p>

La turba coagulatoria ha un peso prognostico nella storia naturale del paziente con cirrosi epatica. Infatti, essa si accompagna a due eventi fondamentali: l'exitus per scompenso epato-funzionale e l'emorragia gastrointestinale. Numerosi studi, hanno individuato in alcuni tests coagulatori ed in alcuni fattori della coagulazione degli indici prognostici specifici per la sopravvivenza del paziente con cirrosi epatica. Studi prospettici hanno messo in evidenza che il fattore VII, fattore vitamina K dipendente a breve emivita (2 ore), rappresenta un importante fattore prognostico a breve termine per la insufficienza epatica acuta e cronica .

Peraltro, l'associazione tra turba coagulatoria ed emorragia gastrointestinale, per quanto ovvia, è a tutt' oggi oggetto di studio.

La storia naturale del paziente con cirrosi epatica trova nell'emorragia gastrointestinale uno degli eventi più drammatici che pregiudicano la speranza di vita di questo tipo di paziente. I primi studi osservazionali (36) hanno dimostrato che nel paziente cirrotico quest'evento è osservabile in circa il 16% dei casi. Tuttavia, la frequenza di quest'associazione è molto variabile come si evince dal fatto che alcune casistiche riportano fino al 60% di sanguinamento. Questa grande variabilità è verosimilmente legata sia al tipo di casistica sia al differente grado di insufficienza epatica dei pazienti esaminati. Un secondo aspetto clinico che va tenuto in considerazione è che il sopraggiungere di un evento emorragico è a sua volta un fattore di rischio di una imminente recidiva.

In uno studio di **Lebrec**, che aveva seguito per un anno pazienti cirrotici con varici esofagee, diagnosticate radiologicamente, si osservò una recidiva nel 28% dei casi, di cui il 70% era dovuta a rottura di varici ed il 29% a gastrite erosiva. Una simile incidenza di recidiva era stata già osservata da **Graham** che, durante un follow-up di sei settimane, aveva osservato il 32% di recidive. La precocità delle recidive è stata in seguito confermata da altri Autori e, in particolare, da uno studio prospettico italiano (61).

L'emorragia digestiva dell'epatopaziente è prevalentemente dovuta a rottura delle varici presenti a livello del terzo inferiore dell'esofago. Nelle varie casistiche si ha una frequenza di rottura compresa tra il 44% ed il 93%.

Altre cause frequenti di sanguinamento sono la gastrite erosiva e la gastrite congestizia. Uno studio eseguito da un gruppo di ricercatori italiani riporta che una severa gastropatia congestizia può associarsi al sanguinamento in circa il 45% dei casi.

L'importanza dell'evento emorragico nella storia naturale della cirrosi epatica è sottolineata dalla frequente associazione tra emorragia gastrointestinale e morte. Le prime osservazioni cliniche, che risalgono già ai primi del 1900, riportano una fortissima associazione tra questi due eventi: il 33% delle morti dell'epatopaziente, nello studio di **Preble**, erano dovute ad

emorragia. Dallo studio di **Ratnoff** in poi, tutte le casistiche concordano nel ritenere l'emorragia gastrointestinale un evento premonitore di una morte imminente. La riduzione dell'attesa di vita del paziente cirrotico in presenza di un evento emorragico è ben rappresentata dallo studio di **Saunders** in cui è messo in evidenza che i pazienti con encefalopatia o con emorragia hanno una drammatica riduzione della sopravvivenza rispetto ai pazienti ben compensati. Il rischio di morte dopo un episodio d'emorragia è del 50% nei sei mesi seguenti il sanguinamento e dopo tre anni dal sanguinamento solo il 30% dei pazienti è ancora vivo .

Queste osservazioni mettono in risalto che prevenire un evento emorragico nel paziente cirrotico rappresenta una importante prospettiva clinica. E' quindi evidente come, la conoscenza dei fattori di rischio e degli eventi fisiopatologici che portano all'emorragia, assumono un ruolo chiave nella storia naturale del paziente cirrotico. Come in precedenza riportato l'episodio emorragico è nella maggior parte dei casi dovuto alla rottura delle varici esofagee, che, pertanto, sono considerate un importante fattore predisponente specialmente se di stadio avanzato. Altro fattore di rischio è lo stato ipertensivo portale; alla sua riduzione è infatti addebitata la proprietà dei beta-bloccanti nel ridurre il rischio di recidive dopo un primo episodio emorragico.

Il rischio emorragico è inoltre maggiore nei pazienti con più grave danno epatocellulare. Infatti, pazienti con danno severo (classe C della classificazione di Child-Pugh) hanno una frequenza di emorragia superiore a quella osservabile in pazienti con funzionalità epatica più conservata (classe A e B).

Classe A	paziente in pieno compenso
---------------------------	----------------------------

Classe B	paziente con una cirrosi in evoluzione (candidato ideale al trapianto di fegato)
Classe C	paziente scompensato non responsivo alle comuni terapie.

Classe A 5-6 punti
Classe B 7-9 punti
Classe C 10-15 punti

La causa dell'aumento del rischio di sanguinamento in pazienti con grave danno epatico non è ancora ben chiara. E' verosimile che in tale categoria siano raggruppati pazienti con maggiore grado d'ipertensione portale e più grandi varici, ma va tenuto in considerazione che, proprio in questo stadio di danno epatocellulare, il grado di compromissione funzionale è particolarmente grave, condizionando il manifestarsi di complesse turbe coagulatorie come la trombocitopenia e la trombocitopatia e la sindrome iperfibrinolitica. Le turbe coagulatorie più caratteristicamente associate all'evento emorragico del paziente cirrotico sono principalmente: la sindrome iperfibrinolitica, la trombocitopatia e la trombocitopenia.

Sindrome iperfibrinolitica

La turba coagulatoria nel paziente cirrotico, conseguente alla riduzione di attività sia dei fattori della coagulazione sia degli inibitori, diventa più complessa man mano che lo scompenso epatofunzionale si fa più grave. Infatti, nel paziente grave si viene frequentemente a configurare un quadro d'iperfibrinolisi che, come è noto, tende a peggiorare ulteriormente il quadro coagulatorio attraverso il consumo di alcuni fattori . Per la frequente associazione tra grave scompenso epatico ed iperfibrinolisi alcuni studi hanno

valutato se fosse osservabile un'associazione tra tale anomalia coagulatoria ed evento emorragico. Fin dal 1964 sono stati riportate osservazioni cliniche e studi su pazienti ospedalizzati che mettevano in evidenza una possibile relazione tra cirrosi epatica, grave danno epatico, accelerata fibrinolisi e emorragie gastrointestinali. Tutti gli Autori concordano che i pazienti che mostravano una maggiore tendenza ad avere complicanze emorragiche avevano segni sistemici di iperfibrinolisi .

Uno studio di Autori italiani del 1992, con un follow-up medio di tre anni, condotto in pazienti cirrotici scompensati, ha messo in evidenza come i pazienti con iperfibrinolisi *presentano* un rischio relativo di fare emorragie otto volte superiore di quello presente nei pazienti senza segni sistemici di iperfibrinolisi e che elevati livelli dei frammenti di degradazione del fibrinogeno (FDP > 10 µg/ml) sono all'analisi multivariata il fattore dotato di migliore predittività nei confronti dell'evento emorragico .

Trombocitopatia e Trombocitopenia

Studi osservazionali hanno messo in evidenza nel paziente cirrotico una turba funzionale piastrinica che è maggiormente evidente nel paziente con grado severo d'insufficienza epatocellulare. Nei pazienti in classe C di Child sono, infatti, presenti una più bassa conta piastrinica e un più lungo tempo d'emorragia . Poiché le anomalie della funzione piastrinica sono più frequenti quanto l'insufficienza epatica è più grave, è verosimile che più di un meccanismo possa essere responsabile dette anomalie dell'attivazione piastrinica. Uno studio retrospettivo a tre anni condotto da Autori italiani (29) riporta una stretta associazione tra pregressa emorragia gastrointestinale, allungamento del tempo di emorragia (> 10 minuti) e bassa conta piastrinica (<100.000/ µl) senza comunque attribuirgli un ruolo casuale. Tali dati indicano che una turba funzionale piastrinica è maggiormente presente in pazienti con storia clinica d'emorragia e farebbero presupporre che la trombocitopenia e/o la trombocitopatia possano giocare un ruolo durante la fase acuta dell'evento emorragico.

Tuttavia, a tutt'oggi non sono disponibili studi prospettici sulla relazione tra emorragia gastrointestinale e disfunzione piastrinica. Diverse ipotesi sono state fatte per spiegare il meccanismo che porta all'anomalia funzionale dette piastrine nei pazienti con epatopatia cronica, tuttavia né la natura del meccanismo né il suo significato clinico è stato pienamente compreso. In letteratura, ad esempio, non vi è accordo sul meccanismo che porta all'aggregazione piastrinica *in vivo* nei pazienti affetti da epatopatia cronica **Laffi** e coll., infatti, hanno suggerito che il difetto dell'aggregazione piastrinica nei cirrotici è dovuto ad un'alterazione della via dei messaggeri transmembrana e che l'incremento dell'escrezione urinaria del Trombossano A₂ (TXA₂) può essere correlata con una aumentata distruzione piastrinica a livello splenico.

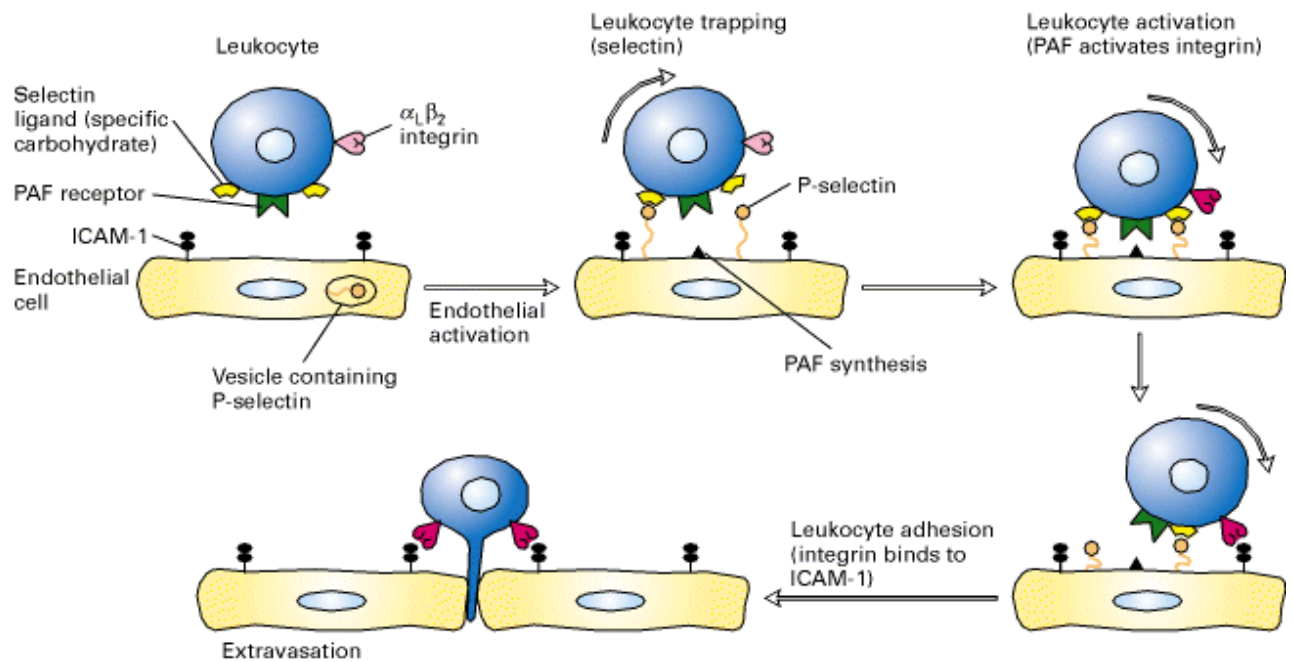
Al contrario, **Davi** et al. hanno riscontrato una significativa correlazione tra l'escrezione urinaria di 2,3 dinor- TXB₂ e il frammento protrombinico 1+2 (F 1+2) suggerendo che l'attivazione della cascata coagulatoria possa in parte spiegare l'attivazione piastrinica nei pazienti cirrotici. *Recentemente, la P-selectina solubile (sP-Seleltina) è stata proposta come un marker di attivazione piastrinica in vivo; tuttavia non esistono in letteratura dati disponibili riguardo il comportamento di questa molecola nell'epatopatia cronica, sebbene siano sempre più numerosi gli studi sulle molecole di adesione e sul loro ruolo fisiopatologico.*

Le molecole di adesione appartengono ad una grande superfamiglia di proteine di membrana suddivisa in quattro sottoclassi sulla base delle somiglianze strutturali: le integrine, le immunoglobuline, le selettine e i carboidrati. In assenza di stimoli l'endotelio esprime solo alcune molecole di adesione (ICAM 1 e 2) che assicurano il "tono adesivo" alla base del reclutamento iniziale durante l'infiammazione. In seguito al contatto con stimoli diversi vengono espresse nuove molecole adesive; alcune di queste sono neo-sintetizzate: compaiono solo dopo diverse ore e persistono per periodi relativamente lunghi (24-48 ore); altre molecole sono immagazzinate in granuli citoplasmatici e sono trasportate sulla superficie

cellulare dopo pochi minuti dalla stimolazione. Fino ad ora l'unica molecola ad espressione rapida sicuramente identificata è la P-selettina, mentre le molecole ad induzione lenta sono: selettina E, ICAM-1, VCAM-1.

ICAM-1 e VCAM-1 sono due proteine con una struttura omologa tra loro e appartengono alla famiglia delle immunoglobuline. Sono espresse solo a bassa concentrazione sulle cellule endoteliali a riposo, ma la loro attivazione aumenta di diverse volte dopo attivazione dell'endotelio con stimoli infiammatori come IL-1 e TNF. Sono entrambe riconosciute dai monociti e dai linfociti, mentre i polimorfonucleati legano solo ICAM-1. I recettori di queste due molecole sono due proteine che appartengono alla famiglia delle integrine: LFA-1 o CD11a/CD18 è il recettore per ICAM-1, $\alpha 4\beta 1$ VLA-4 è il recettore per VCAM-1.

L'endotelio esprime in condizioni di riposo anche ICAM-2 una molecola omologa ad ICAM-1. L'espressione di questa molecola non è aumentata da stimoli infiammatori ed il suo contro recettore è lo stesso di ICAM-1. Infine bisogna considerare un altro fosfolipide sintetizzato dalle cellule endoteliali: il PAF. Questa molecola non è espressa in condizioni basali, ma soltanto dopo stimoli infiammatori. Il PAF può promuovere l'adesione dei polimorfonucleati. Strutturalmente P-selettina ed E-selettina appartengono alla stessa famiglia. L' E-selettina è espressa solo dalle cellule endoteliali ed è integrale di membrana. Non è espressa in condizioni normali ma solo dopo attivazione dell'endotelio con stimoli infiammatori come interleuchina 1 (IL-1) e TNF. E' riconosciuta essenzialmente dai polimorfonucleati, monociti, linfociti T di memoria, ai quali si lega tramite un carboidrato sialilato noto come base di Lewis a. La selettina E si ritrova in vivo nelle venule post-capillari essenzialmente in condizioni infiammatorie ma anche nelle venule dei linfonodi in diverse condizioni patologiche come le linfadenite reattive e i linfomi.



Da: *Molecular Cell Biology* Integrating Cells into Tissues par.22.1. Cell-Cell Adhesion and Communication

P-selectina

La P-selectina (Cd62P) è una glicoproteina di membrana di 140 kDa e appartiene alla super famiglia delle molecole di adesione, in particolare alla famiglia delle selectine analogamente alla E-selectina e alla L-selectina. Queste molecole presentano un dominio omologo alle lectine di tipo C (calcio-dipendenti) di fondamentale importanza per la propria attività adesiva ma una differente distribuzione tessutale. La P-selectina è una proteina ricca in cistina, contenente numerosi complessi N-legati a catene di oligosaccaridi. La sua porzione extracellulare presenta a livello della regione amminotermine un dominio, costituito da 120 amminoacidi, di tipo C lectina, seguito da un dominio di tipo Epidermal Growth factor (EGF), 9 domini costituiti da circa 60 amminoacidi simil complemento-regolatori. In aggiunta alla porzione extracellulare, la P-selectina presenta un dominio trans-membrana e una corta coda intracitoplasmatica.

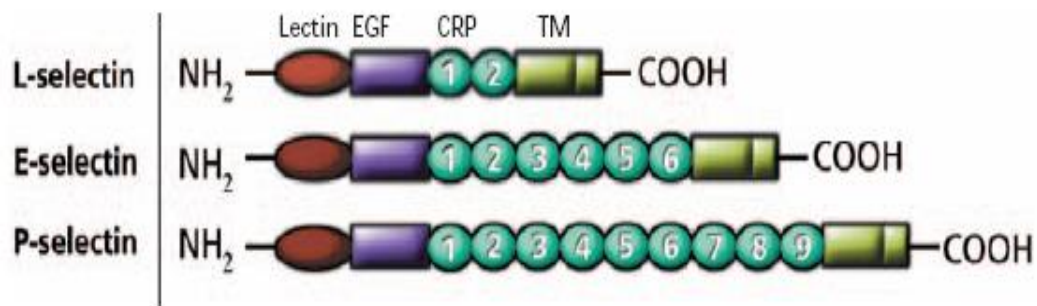


Figura 1. Struttura delle selectine
 Da: <http://www.bdbiosciences.com>

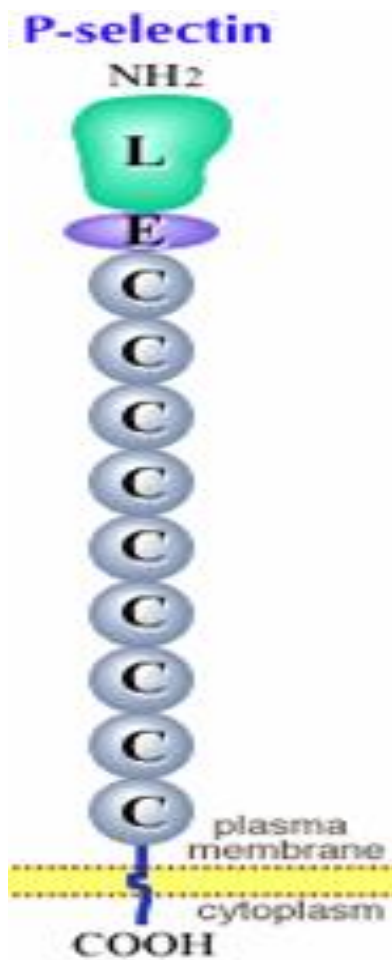


Fig.2 : Struttura P-selectina Da: <http://www.bdbiosciences.com>

La P-selectina è stata così denominata perché contenuta nei granuli α delle piastrine che contengono anche la β -tromboglobulina e il fattore piastrinico 4. Inoltre la P-selectina è un componente di membrana dei corpi di Weibel- Palade, organuli a forma di sigaro, presenti nelle

cellule endoteliali che contengono oltre alla P-selectina, il fattore di von Willebrand e altri modulatori vascolari; questi giocano un ruolo sia nell'emostasi che nella flogosi .



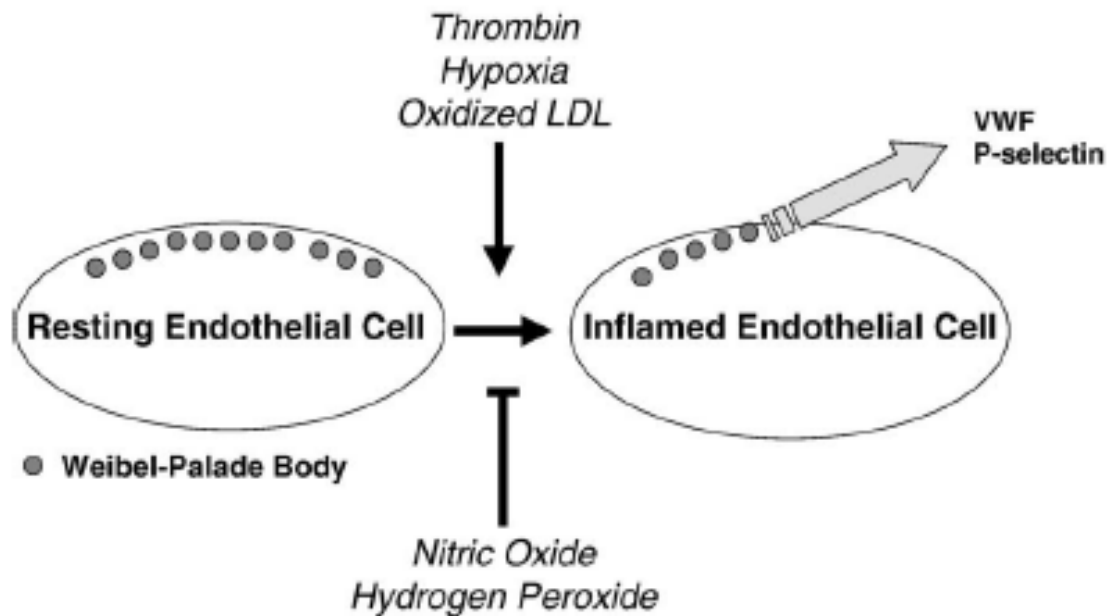
Fig 3: Corpi di Weibel Palade

Da : Michaux G. et al. Analysis of storage and regulated secretion of three human variants of von Willebrand factors provides new insights into von Willebrand disease . Blood 2003; 102: 2452-58

Table 1. Contents of WPBs

<i>WPB contents</i>	<i>Vascular function</i>	<i>Mechanism</i>
VWF	Thrombosis	Links platelets to injured vessel wall
Factor XIIIa	Thrombosis	Transglutaminase cross-links fibrin
Tissue plasminogen factor	Fibrinolysis	Proenzyme that degrades fibrin
P-Selectin	Inflammation	Supports leukocyte and platelet rolling
IL-8	Inflammation	Attracts and activates neutrophils
Eotaxin	Inflammation	Recruits and activates eosinophils
α 1,3-fucosyltransferase VI	Inflammation	Synthesis of selectin ligands
CD63 (Lamp3)	Unknown	Unknown
Endothelin 1	Vasoconstriction	Interacts with endothelin receptor B
Endothelin-converting enzyme	Vasoconstriction	Cleaves big endothelin 1 into endothelin 1
Calcitonin-gene-related peptide	Vasodilation	Increases NO synthesis

Fig. 4: Modulatori vascolari contenuti nei corpi di WP Da: Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. Trends Cardiovasc Med. 15: 302-308, 2005.



A variety of agonists trigger resting endothelial cells to release the contents of WPBs into the blood stream, activating vascular inflammation and thrombosis. NO and H₂O₂ are inhibitors of exocytosis.

Fig 5: Inibitori e attivatori delle cellule endoteliali che contengono e rilasciano i corpi di WP. Da: Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. Trends Cardiovasc Med. 15: 302-308, 2005.

Le cellule endoteliali attivate secernono i corpi di Weibel –Palade in risposta al danno vascolare rilasciando il fattore di von Willebrand che attiva il “rolling” delle piastrine e l’esternalizzazione della P-selectina sulla membrana citoplasmatica che a sua volta attiva il traffico dei leucociti. Questo processo è molto rapido: raggiunge il picco di espressione in 10-15 minuti ed è reversibile in circa un'ora. Le piastrine sembrano essere i maggiori produttori di P-selettina in circolo negli individui sani. La p-selectina agisce legandosi ad un recettore specifico PSGL-1 che possiede determinanti antigenici sialilati denominati base di Lewis x. La PSGL-1 è espressa da tutti i leucociti: neutrofili, NK, monociti, T-linfociti ed è coinvolta nell’interazione tra leucociti ed endotelio, tra piastrine e neutrofili, e tra piastrine ed endotelio. La PSGL-1 è una proteina di 240 kDa che presenta, nella porzione NH₂

terminale, O-glicani e tre residui di tirosina funzionalmente importanti per il legame con la P-selectina .

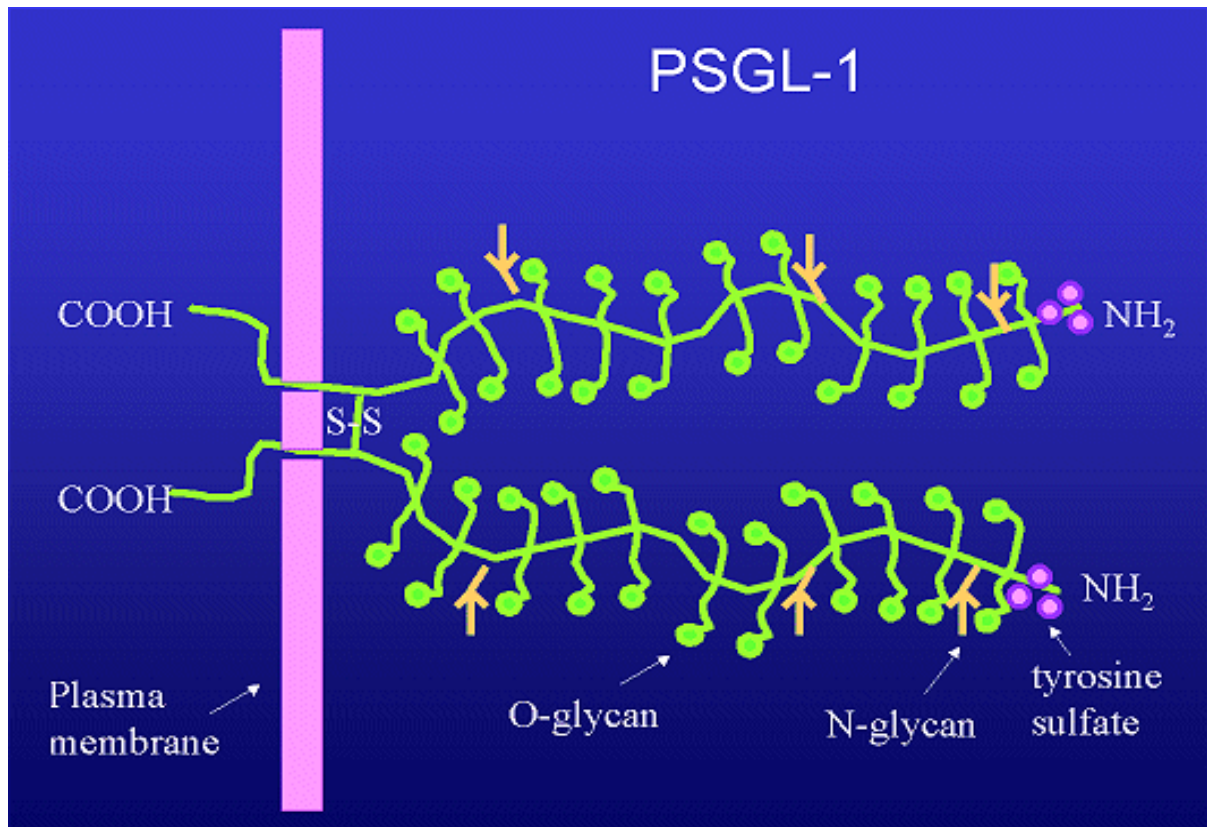


Fig. 4 : Struttura del ligando della P-selectina, PSGL-1.

Da: Andrew D. Blann* et Al. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. European Heart Journal 2003; 2166-2179

Perché la PSGL-1 si possa legare alla P-selectina sono necessarie infatti delle specifiche modificazioni: gli O-glicani devono essere α (1,3) fucosilati e α (2,3) sialilati, e i tre residui di tirosina che si trovano in prossimità degli O-glicani devono andare incontro a solfatazione .

Il legame P-selectina- PSGL-1 comporta a livello delle cellule che esprimono tale ligando, la fosforilazione della tirosina di molte proteine citoplasmatiche che a sua volta comporta l'attivazione del recettore MAC-1 (CD 11b/CD 18) che media una più forte adesione dei leucociti .

La P-selectina infatti è espressa dalle cellule endoteliali e dalle piastrine ed è una molecola d'adesione che ha due principali ruoli fisiologici: nell' infiammazione, P-selectina viene ridistribuita sulla superficie delle cellule endoteliali attivate ove media il “rolling” dei leucociti; nel processo trombotico, la P-selectina espressa nelle piastrine attivate presenti nel trombo contribuisce al reclutamento dei leucociti .

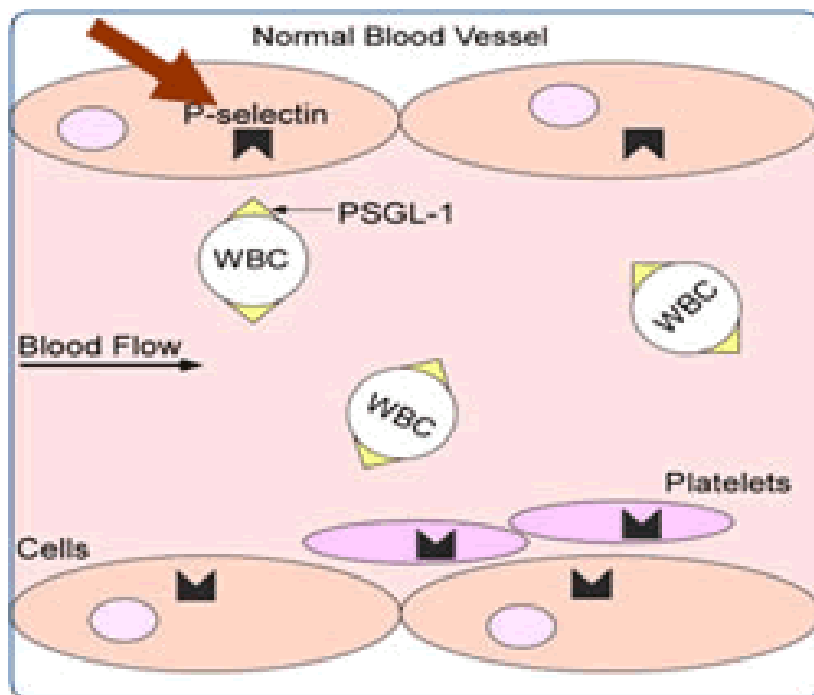


Fig 6: Localizzazione P-selectina Da: <http://www.bdbiosciences.com>

Alternativamente la P-selectina può essere prodotta, mediante una variazione nella fase dello "splicing" dell' RNA o per azione di un enzima proteolitico, come molecola solubile (sP-selectina) e ritrovarsi in circolo, dove in condizioni normali presenta una concentrazione plasmatica media di circa 120 ng/ml.



Il clivaggio della P-selettina con cui si genera sP-selectina avviene a livello del secondo dominio C (complemento regolatore). Hartwell et al, 1998

Fig. 7 : Piano di clivaggio della P-selectina
Da: <http://www.bdbiosciences.com> modificata

Elevati livelli di P-selettina sono stati osservati in varie condizioni patologiche come nell'angina instabile, nell'infarto del miocardio, nelle patologie vascolari, nella porpora trombotica trombocitopenica e nel seno coronarico dopo spasmo vasale. Diversi studi hanno indicato che sP-selettina costituisce un attivatore endogeno del processo coagulativo mediante la generazione di microparticelle (MPs) circolanti nel plasma. Livelli bassi di microparticelle derivanti da piastrine, leucociti, e cellule endoteliali sono stati trovati nel plasma di individui sani, e un numero elevato di microparticelle circolanti nel sangue dei pazienti con sindromi coronariche acute e meningite. Le microparticelle sono fonte di attivazione pro-coagulante mediante l'espressione di attività protrombinica nelle loro

membrane. Secondo, le microparticelle derivanti dai monociti attivano le cellule endoteliali in vitro, con espressione di TF. **Broijersen** e i suoi collaboratori nel 1998 hanno dimostrato che la lipemia alimentare può modificare l'espressione della P-selettina sulla membrana piastrinica.

Hanno, infatti studiato sedici soggetti sani valutando l'espressione della P-selettina dopo un pasto ricco di grassi: hanno osservato che questo parametro si modificava aumentando del 40% a 3 ore e del 51% a 6 ore dal pasto. Anche le LDL ossidate possono modificare l'espressione di P-selettina nelle piastrine e nelle cellule endoteliali. In uno studio effettuato *in vitro* su cellule endoteliali aortiche umane si è dimostrato un aumento di 2-3 volte della produzione di P-selettina in queste cellule in seguito a trattamento con LDL.

Non si osservava, però, un analogo aumento della espressione superficiale di questa molecola, evento che, invece si verificava rapidamente (dopo circa 15 minuti) dopo trattamento delle stesse cellule con LDL ossidate.

PARTE SPERIMENTALE

Il fegato sintetizza la maggior parte dei fattori del sistema coagulatorio e fibrinolitico, fatta eccezione per il fattore von Willebrand. Per quanto riguarda il sistema fibrinolitico, il fegato sintetizza il plasminogeno, gli inibitori della plasmina e l'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1). Infine, il sistema reticolo-endoteliale epatico contribuisce, in larga misura, alla clearance dei fattori della coagulazione attivati e degli attivatori del plasminogeno. Ciò sottolinea l'importanza della relazione funzionale tra fegato e coagulazione, e chiarisce perché molti pazienti con cirrosi epatica presentano importanti turbe coagulatorie dovute alla ridotta sintesi proteica epatocellulare dei fattori della

coagulazione. Accanto al deficit coagulatorio dovuto ad una ridotta protidosintesi epatica, possono essere riscontrate altre anomalie coagulatorie quali i disordini funzionali delle piastrine e l'iperfibrinolisi che possono contribuire a peggiorare la storia clinica del paziente cirrotico. L'identificazione del paziente cirrotico con breve aspettativa di vita rappresenta un importante traguardo clinico e socioeconomico. La possibilità di sviluppare nuovi metodi di valutazione del grado di insufficienza epatica rappresenta a tutt'oggi uno dei principali obiettivi della ricerca clinica nel paziente cirrotico. Negli ultimi anni, è stato messo in evidenza il ruolo predittivo sulla mortalità del paziente cirrotico dei livelli plasmatici del Fattore VII uno dei fattori della coagulazione sintetizzato dalla cellula epatica che ha una breve emivita (circa due ore) ed è quindi molto sensibile al grado di insufficienza epatica. Ulteriori studi hanno evidenziato come altri parametri emostatico-coagulatori (P-selettina, fattore di von Willebrand, D-Dimero, ecc.) siano correlati allo stadio di insufficienza epatica sebbene ancora non siano stati validati come parametri di tipo prognostico. Alla luce delle osservazioni clinico-fisiopatologiche è possibile ipotizzare un ruolo chiave prognostico di alcuni dei parametri emostatico-coagulatori sia sull'evento emorragia/trombosi che sull'identificazione precoce del paziente cirrotico candidato al trapianto.

Pertanto lo **scopo della ricerca** è stato quello di identificare parametri emostatico-coagulativi con valore predittivo sull'evoluzione del processo cirrotico e sulla mortalità. A tal fine abbiamo indagato in quali termini valori di P selectina plasmatici (sP-sel) possano riflettere l'attivazione piastrinica in vivo di pazienti affetti da epatopatia cronica e cirrosi , biopticamente accertata ed HCV correlata. Inoltre, alla luce delle alterazioni a carico del pattem lipidico nei pazienti con epatopatie croniche è stata condotta una analisi di correlazione tra livelli plasmatici di P selectina, profilo lipidico, carica virale ed altri indici di danno epatico.

PAZIENTI E METODI

Popolazione in studio

In questa parte dello studio sono stati studiati 61 pazienti affetti da epatopatia cronica HCV correlata (39 con epatite cronica e 22 con cirrosi in fase pre-ascitica). Il gruppo di controllo è stato un campione di 25 volontari sani omogenei per sesso e per età ai pazienti in studio. Tutti soggetti avevano dato il consenso informato per l'inclusione allo studio che era stato approvato da Comitato Etico Istituzionale. I riscontri biotipici sono stati valutati considerando l'interessamento necrotico della membrana limitante, l'infiammazione portale e globulare e la fibrosi in accordo con il punteggio di Scheuer (classe 1: n=29; classe 2:= 16; classe 3: n=11; classe 4: n=5.)

Nessun soggetto del gruppo di controllo aveva una storia d'etilismo o d'abuso di droghe. Sono stati esclusi dallo studio tutti i pazienti che erano stati sottoposti in precedenza a trattamento con Interferon- α , i soggetti HbsAg positivi, i portatori di epatocarcinoma o altre neoplasie non correlate, epatopatie colestatiche, vasculopatie cardio-cerebrali e periferiche, epatite acuta o altre infezioni.

Nessun paziente aveva assunto terapia steroidea, antinfiammatori o antiaggreganti piastrinici nelle due settimane precedenti lo studio.

Dopo un digiuno di 12 ore e dopo un breve riposo di 20 minuti, i pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematico utilizzato per i test di laboratorio. Questi test comprendevano un esame emocromocitometrico completo, biochimica sierica e coagulazione

L'HCV-RNA sierico è stato valutato mediante DNA-PCR usando i primer derivati dalla regione 5' UTR. In tutti i pazienti è stata dosata l' α -fetoproteina sierica, e tutti sono stati sottoposti ad ecografia epatica e/o tomografia computerizzata.

Le immunoglobuline G piastrino-associate sono state determinate con analisi fluocitometrica. I valori di colesterolo totale (TC), HDL-colesterolo (HDL-C) sono stati misurati per mezzo di un analizzatore automatico (CX5 Beckman, USA).

Le LDL-C sono state calcolate con la formula di Friedwald [colesterolo totale-HDL-C-(trigliceridi/5)].

Il fibrinogeno plasmatico è stato determinato con il metodo Clauss (Determinazione Quantitativa del Fibrinogeno, Strumentazioni Laboratoristiche Spa Milano, Italia); l'attività protrombinica (PA) determinata con RecombiPlas Tin (Strumentazioni Laboratoristiche Spa, valori di rif. 70-120%).

L'attività plasmatica del Fattore VIIc è stata determinata usando reagenti e plasma fattore VII-privato (Strumentazioni Laboratoristiche Spa). I risultati sono stati espressi in percentuale di quelli standard del plasma. Il coagulometro KoaguLab 32-S è stato usato per la determinazione del fibrinogeno, attività protrombinica e Fattore VIIc.

Le analisi di laboratorio includevano anche un esame emocromocitometrico completo (contacellule Hemalaser II SEBIA) e la biochimica sierica (misurata tramite un analizzatore automatico di laboratorio).

La sP-selectina (marker di attivazione piastrinica *in vivo*) è stata misurata utilizzando un determinante immuno-enzimatico su campioni di plasma citrato (R&D System, Minneapolis USA), seguendo le indicazioni di utilizzo. Tranne che diversamente specificato, i valori sono stati espressi come femtogrammi di P-selectina per piastrina in modo tale da superare l'inconveniente della trombocitopenia, spesso riscontrabile nei pazienti con epatopatia cronica.

Il Fattore von Willebrand (vWF, marker di attivazione delle cellule endoteliali) è stato misurato su plasma citrato per mezzo di un determinante immuno-enzimatico (Imubind vWF ELISA, American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA).

La misurazione della sP-selectina e dell'antigene vWF è stata effettuata in cieco. Tutti i campioni sono stati testati due volte, e quelli oltre la curva standard sono stati ritestati con appropriate diluizioni.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecografia epatica e/o Tc.

ANALISI STATISTICA

I dati sono elaborati mediante analisi statistiche parametriche appropriate. Il test di Student e di Pearson sono stati utilizzati per le variabili che presentavano una normale distribuzione. Test non parametrici (Mann Whitney U test e Spearman Rank correlation test) sono stati utilizzati per tutte le altre variabili. I dati sono stati presentati come media \pm DS, o mediana e range. Solo valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutti i calcoli sono stati effettuati usando un software (Statistica 4.5, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RISULTATI

La **tabella 1** riassume le principali differenze osservate tra il gruppo di pazienti (epatite cronica HCV correlata e cirrosi in fase pre-ascitica) ed i soggetti di controllo.

Come è osservabile, i valori di colesterolo totale, delle HDL e delle LDL sono risultati più bassi nei pazienti rispetto ai controlli, mentre i valori dei trigliceridi sono simili in entrambi i gruppi (tab.1) .

Tab 1.

Valori di laboratorio nei pazienti e nei soggetti di controllo

		Controlli (n=25)	Pazienti (n=61)	<i>P value</i>
Piastrine (x 10 ³ /μl)	Mean ± SD	250.6 ± 70.1	177.4 ± 77.8	< 0.0001
TCh (mg/dl)	Mean ± SD	197.4 ± 24.7	173.9 ± 36.6	< 0.005
LDL-Ch (mg/dl)	Mean ± SD	127.0 ± 23.3	114.2 ± 31.1	< 0.05
Trigliceridi (mg/dl)	Mean ± SD	96.3 ± 36.8	93.9 ± 40.4	NS
HDL-Ch (mg/dl)	Mean ± SD	50.1 ± 10.1	42.3 ± 9.5	< 0.001
Albumina (g/L)	Mean ± SD	4.2 ± 0.5	4.0 ± 0.4	< 0.05
PA (%)	Mean ± SD	89.8 ± 7.3	87.4 ± 10.1	NS
Fattore VIIc (%)	Mean ± SD	100.8 ± 8.4	91.5 ± 14.3	< 0.01
Fibrinogeno (mg/dl)	Mean ± SD	271.1 ± 89.3	306.6 ± 85.7	NS
sP-selettina (fg/platelet)	Median (range)	0.17 (0.09 - 0.56)	0.39 (0.11 - 1.13)	< 0.0001
vWF (U/dl)	Median (range)	122.0 (74.0 - 1029.8)	1006.2 (548 - 1112.5)	< 0.0001

TCh: Colesterolo totale

LDL-Ch : LDL colesterolo

HDL-Ch : HDL colesterolo

vWF: Fattore di von Willebrand

PA: attività protrombinica

I livelli sierici di vWF erano significativamente aumentati nei pazienti rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.001$). Peraltro, i parametri della protidosintesi, albumina e Fattore VII, sono risultati ridotti nei pazienti rispetto ai controlli.

L'attività protrombinica ed il fibrinogeno plasmatici non mostravano significative differenze tra i due gruppi di soggetti (tab 1).

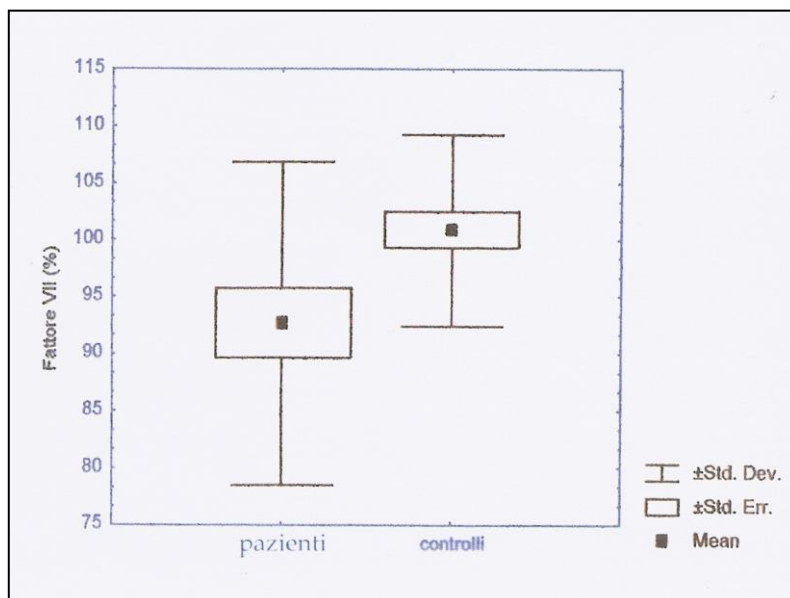


Fig 8. Livelli di fattore VII nei pz e nei controlli

Bassi livelli di conta piastrinica caratterizzavano i pazienti rispetto ai controlli (tab 1) . In particolare, otto dei 61 pazienti (20.5%) avevano una conta piastrinica inferiore a $110 \times 10^3/\mu\text{l}$ (valore medio dei controlli – 2 deviazioni standard).

I valori di P-selectina plasmatici sono risultati più alti nei pazienti rispetto ai controlli [mediana (range): 69.4 ng/ml (32.9-219.8), vs 44.8 ng/ml (14.3-121.1); Mann Whitney U test: $p < 0.001$].

Inoltre nessuna correlazione è stata riscontrata tra i valori di P-selectina (marker di attivazione piastrinica *in vivo*) e quelli di vWF (marker di attivazione delle cellule endoteliali), suggerendo così l'origine piastrinica della sP-selectina .

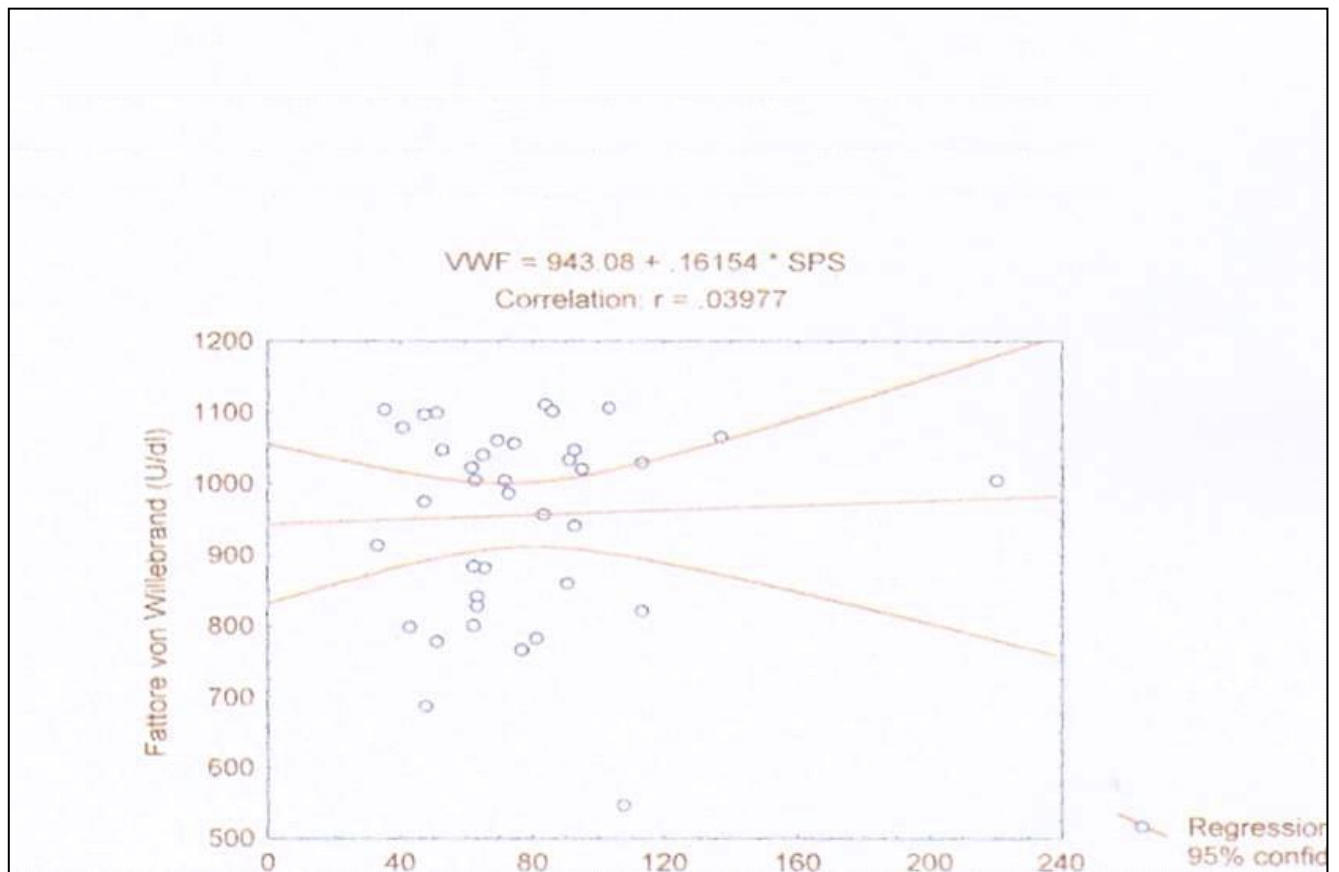


Fig 9: Correlazione tra i livelli di P-selettina e il fattore di von Willebrand

Per evitare lo scarto dovuto alla trombocitopenia nel gruppo dei pazienti, per una corretta valutazione dei livelli di sP-sel tutte le analisi sono state eseguite dopo correzione dei livelli plasmatici di questa molecola per il numero assoluto di piastrine e i valori riportati sono espressi in fentogrammi di sP-sel/piastrina.

Dopo tale correzione, i valori di P-selectina sono ancora risultati più alti nei pazienti rispetto ai controlli e differenze significative sono state riscontrate in relazione al grado d'insufficienza epatica .

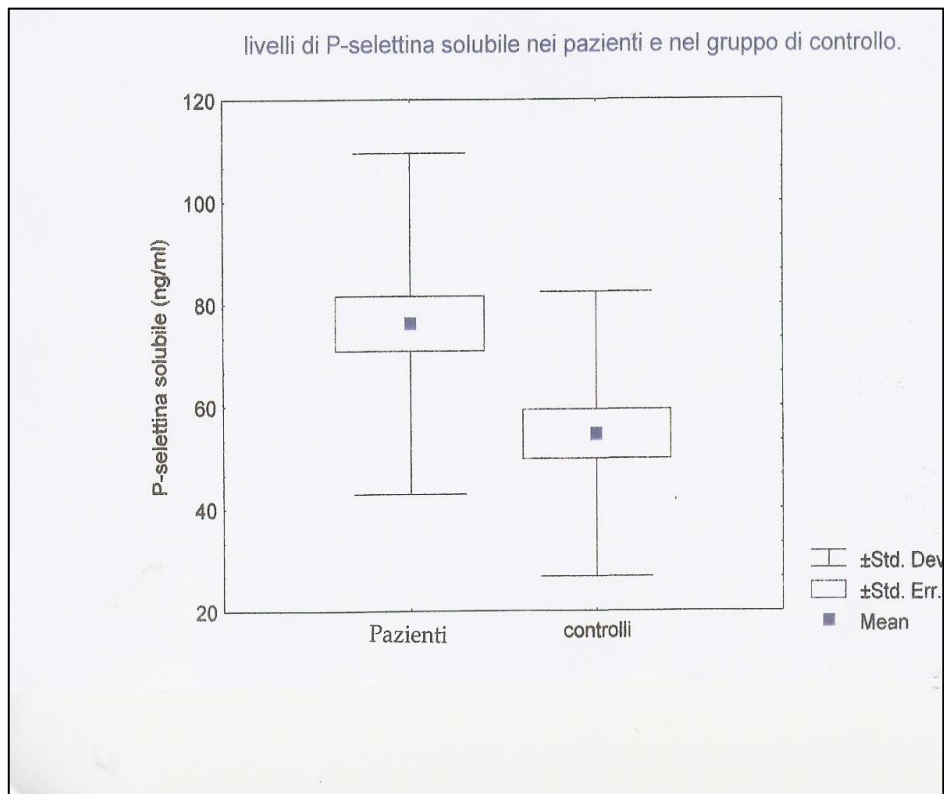


Fig 10. Livelli di P-selettina solubile nei pz e nei controlli

Infatti, i valori di P-selectina riscontrati nei pazienti appartenenti al gruppo 1 o 2 della classificazione di Scheuer si dimostrano più alti rispetto a quelli dei controlli [0.41 fg/piastrina (0.11 – 1.13) vs 0.17 fg/piastrina (0.09 – 0.56); Mann Whitney U Test: $p < 0.005$], e significativamente più bassi rispetto a quelli riscontrati nei pazienti appartenenti al gruppo 4 [0.70 fg/piastrina (0.64 – 1.10); Mann Whitney U Test: $p < 0.01$]

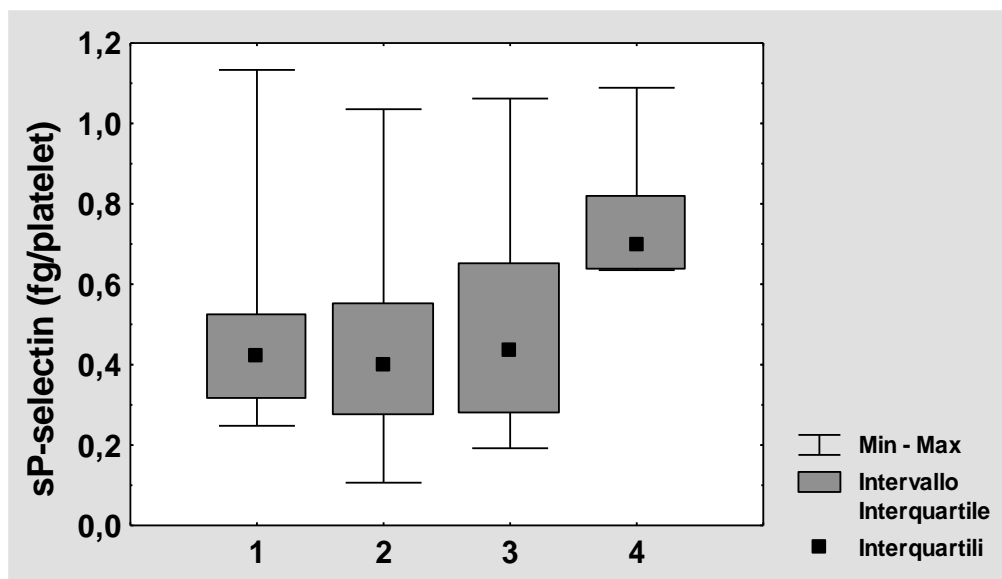


Fig 11. Contenuto intrapiastrinico di P-selettina in pazienti con epatite cronica HCV-correlata stratificati sulla base dello score di Scheuer: Classe 1 (n = 29), Classe 2 (n = 16), Classe 3 (n = 11) or Classe 4 (n = 5); Analisi di correlazione ($r=0,34$, $p<0.05$), ANOVA di Kruskal Wallis e Test delle Mediane: $H = 6.8$, $p = 0.07$.

Una riduzione del numero delle piastrine si è confermata sia in pazienti affetti da epatite cronica che in pazienti con cirrosi rispetto al gruppo di controllo (ANOVA: $F= 138$, $P<0,0001$)

In contrasto, l'analisi della distribuzione dei livelli di P-selectina ha messo in evidenza la presenza di livelli più elevati in pazienti con epatite cronica ($0,52 \pm 0,27$ fg/plt) rispetto ai pazienti con cirrosi ($0,33 \pm 0,16$ fg/plt) e rispetto ai controlli ($0,20 \pm 0,09$ fg/plt) (ANOVA: $F=20,3$ $p< 0,0001$).

Pertanto, tale parametro non mostrava un particolare aumento nei confronti della classificazione di Child-Pugh.

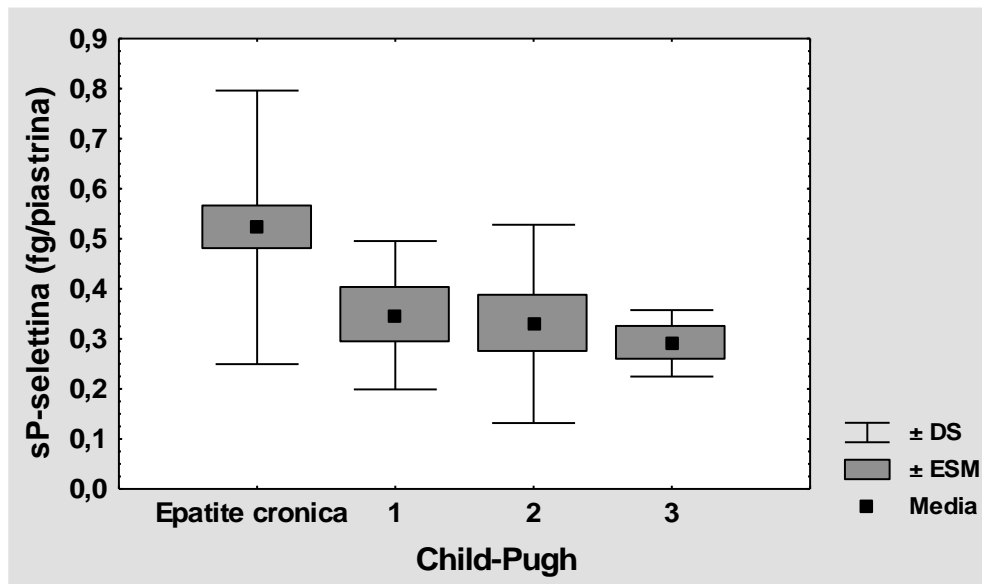


Fig 12. Non si sono osservate modificazioni statisticamente significative dei livelli di sP-selettina in rapporto alle diverse classi funzionali di Child-Pugh nei pazienti cirrotici.

L'analisi della distribuzione dei valori di sP-selectina nei pazienti con conta piastrinica inferiore ai valori limite stabiliti come riferimento di $110 \times 10^3/\mu\text{l}$, ha evidenziato che questi pazienti (Classe 1: n=1; Classe 2: n=2; Classe 3: n=2; Classe 4: n=3) avevano valori più alti di P-selectina [0.76 fg/piastrina (0.64 – 1.09)] in confronto a quelli dei pazienti con conta piastrinica normale [0.41 fg/piastrina (0.11 – 1.13); Mann Whitney U Test: $p < 0.001$], i quali a loro volta presentavano valori di sP-selectina più alti rispetto ai controlli (Mann Whitney U Test: $p < 0.001$; Kruskal Wallis ANOVA e Median Test tra i tre gruppi: $H=34.4$, $p < 0.0001$)

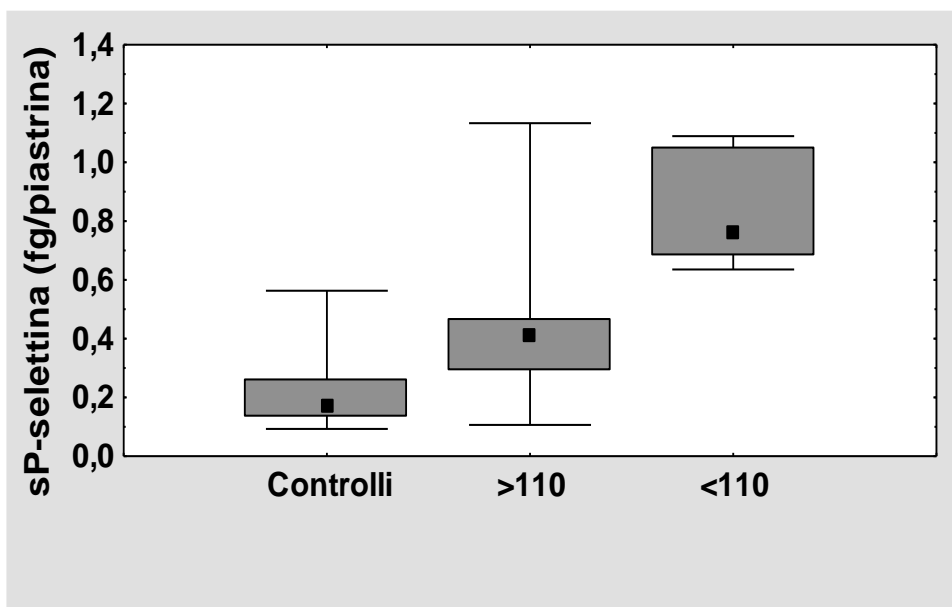


Fig 13. Contenuto intraplastrinico di sP-selettina in pazienti con epatopatie croniche. Differenze tra il gruppo di controllo e pazienti con o senza trombocitopenia (conteggio

delle piastrine inferiore a $110 \times 10^3/\text{ml}$); ANOVA di Kruskal Wallis e test delle Mediane: $H = 34.4$, $p < 0.0001$.

E' interessante notare che i valori di P-selectina non correlano con la presenza di PAIgG. Un incremento delle PAIgG, infatti, è stato riscontrato in dodici dei 61 pazienti (30.8%): la mediana dei valori di P-selectina in questo gruppo era 0.56 fg/piastrina, (range: 0.19 – 1.06) in confronto a 0.41 fg/piastrina (range: 0.11 – 1.13; $p=0.14$) dei pazienti PAIgG negativi .

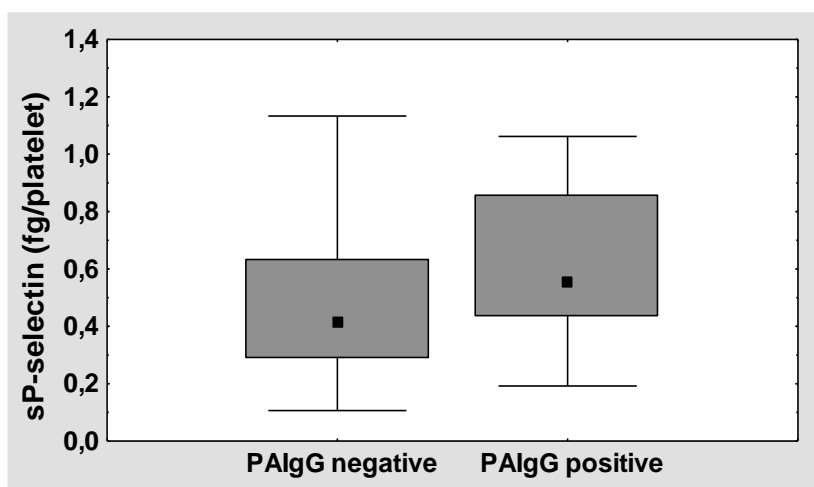


Fig 14. Differenze osservate nel contenuto intrapiastrinico in pazienti con o senza positività per gli anticorpi antiplastrine. Test U di Mann Whitney: $P=0.14$.

L'analisi di correlazione di Spearman ha messo in evidenza una correlazione diretta, ma non statisticamente significativa, tra i livelli plasmatici di P-selectina e i valori di HCV-RNA ($Rho=0.28$, $p<0.08$)

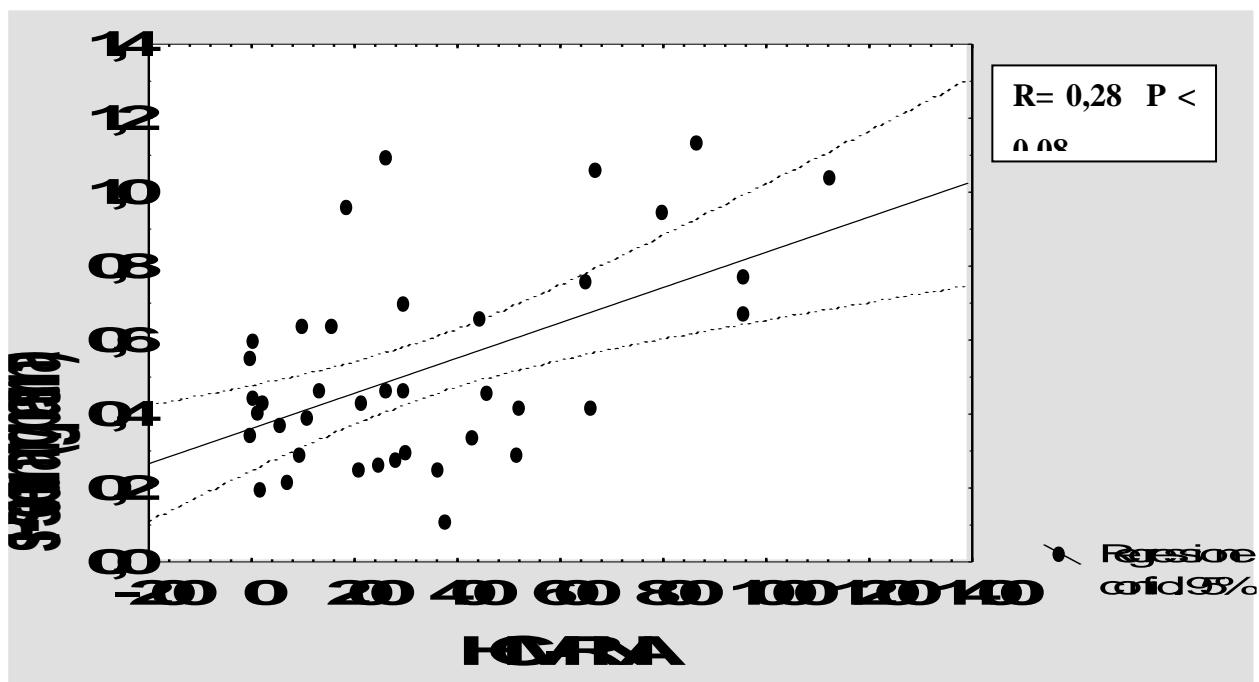


Fig 15. Correlazione tra P-selettina e HCV RNA

Inoltre è stata riscontrata una correlazione inversa tra P-selectina e conta piastrinica ($Rho = -0.598$, $p < 0.001$), colesterolo totale ($Rho = -0.301$, $P = 0.06$), HDL-colesterolo ($Rho = -0.308$, $p = 0.06$), LDL-colesterolo ($Rho = -0.294$, $p = 0.07$) e Fattore VIIc ($Rho = -0.633$, $p < 0.005$)

Nessuna correlazione è stata osservata tra P-selectina, albumina, attività protombinica e volume della milza.

I valori di HCV-RNA erano correlati con conta piastrinica ($Rho = -0.32$, $p < 0.05$), colesterolo totale ($Rho = -0.340$, $p < 0.05$), colesterolo LDL ($Rho = -0.384$, $P < 0.05$), Fattore VIIc ($Rho = -0.291$, $P < 0.05$).

Una correlazione diretta è stata inoltre osservata tra conta piastrinica, Fattore VIIc ($Rho = 0.611$, $P < 0.005$) e volume splenico ($Rho = -0.42$, $P < 0.01$).

I risultati ottenuti ci permettono, pertanto, di avanzare l'ipotesi che la trombocitopenia associata ad epatopatia cronica HCV correlata potrebbe essere dovuta non soltanto ad un meccanismo di tipo autoimmunitario, ma anche ad una condizione di attivazione piastrinica in vivo causata direttamente dall'infezione virale.

DISCUSSIONE

A tutt'oggi è ancora oggetto di studio come e se l'attivazione piastrinica e la successiva presenza in circolo di "piastrine consumate" si presentino nell'insufficienza epatica cronica. Inoltre la maggior parte degli studi riportati in letteratura prende in considerazione pazienti cirrotici, e poche sono le evidenze a disposizione delle alterazioni a carico dell'emostasi nei pazienti affetti da epatite cronica. I risultati emersi dal presente studio mettono in evidenza una condizione di attivazione piastrinica *in vivo* riscontrabile nell'epatite cronica HCV correlata. Valori plasmatici elevati di sP-selectina, un nuovo marker di attivazione piastrinica *in vivo*, sono stati riscontrati in pazienti con epatite cronica HCV correlata e possono essere correlati con il grado di malattia come espresso dalla correlazione con la classificazione di Scheuer. Tali osservazioni sono in accordo con quanto riportato da **Rubin** e coll. Questi Autori hanno dimostrato che anomalie dell'aggregazione piastrinica, in risposta all'adenosin di fosfato, si possono evidenziare in pazienti con insufficienza epatica cronica, e si correlano con il grado di disfunzione epatocellulare ma non con l'eziologia dell'epatopatia. La perdita progressiva di parenchima epatico nei pazienti con epatopatia cronica si associa ad un decremento progressivo dei livelli plasmatici dei fattori della coagulazione, in primo luogo come risultato di una ridotta produzione. Tra i fattori vitamina K-dipendenti, il Fattore VII è quello più sensibile all'insufficienza epatica, evidentemente per la sua breve emivita. D'altro canto anche i livelli sierici di colesterolo totale e soprattutto il colesterolo LDL tendono a diminuire progressivamente con l'aumentare del grado di gravità dell'insufficienza epatica. In questo studio sono stati valutati l'attività coagulatoria e il profilo lipidico di pazienti affetti da epatite cronica HCV correlata. In complesso è stato riscontrato un decremento sia del Fattore VIIc che del colesterolo (misurato come colesterolo totale, colesterolo HDL e colesterolo LDL) nel gruppo dei pazienti; tuttavia non è stata osservata una correlazione significativa con lo stadio di malattia, anche se una tendenza alla riduzione dei valori è stata rilevata nei gradi più avanzati di progressione di malattia. D'accordo con l'opinione generale, i valori di fibrinogeno plasmatici non si discostano da quelli dei controlli.

I livelli di P-selectina solubile sono risultati strettamente correlati con il Fattore VIIc, mentre una debole correlazione è stata trovata tra la prima e il colesterolo totale, il colesterolo HDL e il colesterolo LDL. È interessante notare che tutti questi parametri si correlano significativamente con la carica virale. Inoltre l'HCV-RNA si correla direttamente con i

valori di sP-selectina; una correlazione diretta è stata trovata anche tra HCV-RNA e l'antigene del vWF, un marker riconosciuto di disfunzione endoteliale. D'altro canto la carica virale è risultata inversamente correlata con la conta piastrinica, con il colesterolo totale ed LDL ed il Fattore VIIc, suggerendo un ruolo del virus dell'epatite C nelle modificazioni biochimiche osservate in questi pazienti.

Alcuni studi hanno riportato che esiste un legame del virus dell'epatite C alle lipoproteine. Di recente è stato ipotizzato che il complesso costituito dal virus con le VLDL o le LDL possa permettere l'endocitosi del HCV tramite il recettore per le LDL. Effettivamente, le LDL sieriche possono regolare il legame dello HCV a questo bersaglio, e l'incremento provocato *in vivo* dalla lovostatina dell'espressione dei recettori per le LDL si verifica su cellule infette sia provenienza epatocitaria che non di detta provenienza .

Evidenze sulla presenza di un ligando per le LDL sulle piastrine sono state riportate da molti anni (91,92) ed è stato suggerito che il CD36 (recettore di membrana per una grande varietà di ligandi incluse le particelle di LDL modificate) è probabilmente coinvolto nel riconoscimento delle particelle LDL native e modificate.

E' inoltre logico ipotizzare che i recettori piastrinici per le LDL, così come quelli dei megacariociti, possano costituire un mezzo d'entrata per l' HCV all'interno di queste cellule. Effettivamente, Nagamine et coll., hanno dimostrato che l'HCV-RNA può essere dimostrato tramite la RT-PCR delle piastrine in un'alta percentuale di pazienti affetti da epatite cronica C .

Ciò in accordo con quanto riscontrato da **Bordin** et coll., che ha riscontrato infezione megacariocitaria e ridotta produzione piastrinica in pazienti con trombocitopenia associata a infezione da HCV.

Questa osservazione ha portato gli autori ad argomentare contro l'ipotesi che la trombocitopenia dei pazienti affetti da epatite da HCV sia dovuta esclusivamente ad un processo autoimmune e ha suggerito un possibile coinvolgimento diretto dell'HCV nell'esaurimento midollare.

Sebbene in questo studio non sia stata trovata nessuna evidenza della presenza dell'HCV nelle piastrine, tuttavia la correlazione riscontrata HCV-RNA e conta piastrinica (inversa) e P-selettina (diretta), supporta l'ipotesi che l'infezione da HCV possa essere direttamente responsabile di una condizione di attivazione piastrinica in vivo e della trombocitopenia riscontrata.

Questa ipotesi è inoltre supportata dal fatto che la P-selectina riscontrata nei pazienti con anticorpi anti-piastrine (PAIgG) non si discosta sostanzialmente da quella dei pazienti senza

PAIgG, inoltre entrambi i sottogruppi di pazienti mostrano valori di P-selectina più alti rispetto ai controlli. Inoltre, l'analisi dei valori di P-Selectina dei controlli e dei pazienti senza e con trombocitopenia ha evidenziato che i valori di questi ultimi sono significativamente più alti, suggerendo che l'attivazione e la degranulazione piastrina può giocare un ruolo preminente nella successiva rimozione dalla circolazione. D'altro canto una significativa correlazione è stata riscontrata tra dimensioni spleniche e conta piastrinica, e sei degli otto pazienti con trombocitopenia presentavano infatti splenomegalia, suggerendo che l'aumentato sequestro splenico possa in parte spiegare il basso numero di piastrine riscontrato. In conclusione, questo studio dimostra che l'attivazione piastrinica in vivo si verifica nei pazienti con epatite cronica C e sembra correlata con la gravità della malattia; per nessuno dei parametri studiati è stato provato un valore predittivo, anche in relazione alla durata del follow-up

BIBLIOGRAFIA

1. Agnholt J, Mikkelsen JH, Bud M, Moller-Petersen J, Rasmussen SN, Oyeberg J. Plasma prekallikrein as a prognostic indicator in chronic liver insufficiency. *Scand. JGastroenterol.*1990; 25: 40-44
2. Andrew D. Blann, Sunil K. Nadar and Gregory Y.H. Lip The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European Heart Journal* 2003; 24: 2166-2179
3. Andrew D. Blannet Al. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European Hert Journal* 2003; 2166-2179
4. Andrews HE., Aitken JW., Hassall DG., Skinner VO., Bruckdorfer KR. Intracellular mechanisms in the activation of human platelets by row-density lipoproteins. *Biochem J.* 1987; 242: 559-564
5. Balsano F, Violi F, Ferro D, Davì G, Alessandri C, Luliano L, Basili S, Leo R, Quintarelli C, Saliola M. La turba coagulatoria nelra cirrosi epatica. *Atti Congresso Nazionale SIMI. Roma,1993.*
6. Bertaglia M., Belmonte P., Vertolli V., Azzurro M., Martines D. Bleeding in cirrhotic patients: a precipitating factor due to intravascular coagulation or to hepatic failure. *Haemostasis* 1983; 13: 328-334
7. Biggs R., Denson K.WE. Natural and pathological inhibitors of blood coagulation. In R. Biggs: *Human blood coagulation, haemostasis and trombosis.* Blackwell, Oxford, 1976.
8. Biland L, Duckert F, Prisender S, Nyman D. Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease. The diagnostic and prognostic value of factor XIII, factor V and plasmtnogen. *Thromb. Haemost.* 1978; 39: 646-656
9. Bircher J. Assessment of prognostic in advanced liver disease: to score or to measure, that' s the questiono *Hepato/ogy* 1986; 6 1036-1037
10. Blann AD., Lip GY. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* 1997; 128: 135-138
11. Bocks AL., Brommer ZJP., Schalm SW., Van Vliet HHDM. Hemostasis and fibrinolysis and their relation haemorrhage. *Hepatology* 1986;, 6: 79-86
12. Broijersen A., Karpe F., Hamsten A., Goodall AH., Hjendahl P. Alimentary lipemia enhances the membrane expression of platelet P-selectin without affecting other markers of platelet activation. *Atherosclerosis* 1998; 137: 107-113
13. Burroughs A., Mezzanotte G., Philips A., Mc Comick A., Mc Intyre N. Cirrhosis with variceal hemorrhage: the importance of time interval between admission and the start of analysis for survival and rebleeding rates. *Hepatology* 1989; 9: 801-806
14. Carr JM. Disseminated intravascular coagulation in cirrhosis. *Hepatology* 1989; 10: 103 110
15. Christensen E, Schlichting P, Fauerholdt L, et al. Prognostic value of Child-Turcotte criteria in medically treated cirrhosis. *Hepato/ogy* 1984; 4: 430-435.
16. Christensen E, Schlichting P, Kragh Andersen P, et al. Updating prognosis and therapeutic effect evaluation in cirrhosis with Cox's regression model for time dependent variables. *Scand. J. Gastroenterol.* 1986; 79: 163-74.
17. Christensen E., Krintal JJ., Hansen JM., Johansen JK., Juhl E. Prognosis after the first episodi of gastrointestinal bleeding or coma in cirrhosis. *Scand. J.*

- Gastroenterol. 1988; 24: 99-106
18. Cicognani C., Malavolti M., Morselli-Labate AM., Zamboni L., Sama C., Barbara L. Serum lipid and lipoprotein patterns in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis. *Arch. Intem. Med.* 1997; 157: 792-796
 19. Cordova C, Violi F, Alessandri C, Ferro D, Saliola M, Musca A, Balsano A. Prekallikrein and factor VII as prognostic index of liver failure. *Am. J. Clin. Pathol* 1986; 85: 579-82.
 20. Cordova C., Violi F., Alessandri C., Ferro D., Saliola M., Musca A., Balsano F. Prekallikrein and factor VII as prognostic indexes of liver failure. *Am. J. Clin. Patho.* 1986; 85: 579-582
 21. Curtiss LK., Plow EF. Interaction of plasma lipoproteins with human platelets. *Blood* 1984; 64: 365-374
 22. D'Amico G., Montalbano K., Traina M., Pisa R., Menozzi M., Spano C., Pagliaro L., and the liver study group of V. Cervello Hospital. Natural history of congestive gastropathy. 1990; 99: 1558-1564
 23. D'Amico G, Morabito A, Pagliaro E, Marchini E. Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 1983; 37: 468-475.
 24. Degos F., Rueff B., Benhamon JP. The natural history of gastrointestinal bleeding in patients with alcoholic cirrhosis: definition of a subgroup of patients with high risk of bleeding recurrence (abstract). *Digestion* 1986; 14: 664
 25. Dymock IW, Tucker JS, Wolf IL, Poler L, Thompson JM. Coagulation studies as a prognostic index in acute liver failure. *Br.J. Haematol* 1975; 29: 385-95
 26. Eisenberg PR., Sherman LA., Perez J., Jaffe AS. Relationship between elevated plasma levels of crosslinked fibrin degradation products (XL-FDP) and the clinical presentation of patients with myocardial infarction. *Thromb. Res.* 1987; 46: 109-120
 27. Emers JJ, Van Den Hooger CM, Jense D. Hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator in rats. *Thromb Haemost* 1985; 54: 661-664
 28. Ferro D, Saliola M, Quintarelli C, Alessandri C, Basili S, Cordova C, Bonavita M.S., Violi F. 1-year survey of patients with advanced liver cirrhosis. Prognostic value of clinical and laboratory indexes identified by the Cox regression model. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27:852 -856.
 29. Ferro D., Quintarelli C., Saliola M., Alessandri C., Basili S., Bonavita S., Violi F. Prevalence of hyperfibrinolysis in patients with liver cirrhosis. *Fibrinolysis* 1992; 6: 1-4
 30. Ferro D., Saliola M., Quintarelli C., Alessandri C., Basili S., Cordova C., Bonavita MS., Violi F. 1-Year survey of patients with advanced liver cirrhosis. Prognostic value of clinical and laboratory indexes identified by the Cox regression model. *Scand. J. Gastroenterol.* 1992; 27,852-856
 31. Forman W.B, Barnhart MI. Cellular site for fibrinogen synthesis. *JAMA* 1964; 187: 1298.
 32. Francis RB., Feinstein DI. Clinical significance of accelerated fibrinolysis in liver cirrhosis. *Hemostasis* 1984; 14: 460-465
 33. Franco D., Durandy Y, Deporte A., Bismuth H. Upper gastrointestinal hemorrhage in hepatic cirrhosis: causes and relation to hepatic failure and stress. *Lancet* 1977; 1: 218-220
 34. Ginés P, Quintero E, Arroyo V. et al. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 1987; 7: 122-128
 35. Graham D.Y., Davis R.E. Acute upper gastrointestinal hemorrhage: an observation of an old problem. *Am. J. Dig* 1978; 23: 76-84
 36. Graham DY, Smith JI. The course of patients after variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 1981; 80: 800-809.

37. Green G, Poiler I, Thomson SM, Dymock IW. Factor VII as a marker of hepatocellular syntetic function in liver disease. *J. Clin. Pathol.* 1976; 29: 971-5.
38. Hensen A., Loekinger E.a Antitrombin III: its metabolism and its function in blood coagulation. *Tromb. Diath. Haemorrh* 1993; (suppl. I) 9: 1.
39. Heresbach D., Bretagne J.F., Raoul J.L., Chaparon J., Piette C., Siprondhis L., Gastard J., Gosselin M. Prognostic et fecteurs pronostiques de l'hemorragie par rupture de varice chez le cirrotique a l'ere de la scleroendoscopique. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1991; 15: 838-844
40. Hersch SL., Kunelis T., Frandis RB. The pathogenesis of acceierated fibrinolysis in liver cirrhosis: a criticaï role for tissue plasrninogen activator inhibitor. *Blood* 1987; 69: 1315-9
41. Infante-Rivard C, Esnaola S, Villneuve JP. Clinical statistica I validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotic. *Hepato/ogy* 1987; 7: 660-664
42. Johansson S. Studies on blood coagulation factors in a case of liver cirrhosis. *Acta Med. Scand.* 1964; 175: 177-183
43. Joist HJ.: Hemostatic abnormalities in liver disease. In Colman RW., Hirsh J., Marder VJ., Salzman EW., eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principel and clinical practice.* 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott Company 1994: 906-920
44. Joist HJ: Hemostatic abnormalities in liver disease. In Colma n RW, Hirsh J, Marder VJ, Alzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principle and clinical practlce.* 3^{fd} ed. Philadelphia, Lippincott
45. Kleber G., Sauerbruch T., Ausari M., Paumgartner G. Prediction of variceal hemorrhage in cirrhosis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 1991; 100: 1332-1337
46. Lasierra J., Aza MJ., Vilades E., Poblet S., Barrao F., Bayon F., Gonzales J. Tissue plasminogen activator and plasminogen actlvator Inhlbltor In patlents wlth Ilver cirrhosis. *Fibrinolysis* 1991; 5: 117-20
47. Lebrec D. Pharmacology prevention of variceal bleeding and rebleeding. *J. Hepatol.* 1993; 17: 529-33
48. Lebrec D., De Fleury P., Rueff B., Nahum M., Benhamou J. P. Portal hypertension, size of oesophageal varices, and risk of gastrointestinal bleeding in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1980; 79: 1139-1144
49. Lebrec D., Paynard T., Millon P., Benhamou J.P. Propanolol for prevention of recurrent gastrointestinal bleeding in patients with corrhosis. *N. Engl. J. Med.* 1981; 305: 1371-1374
50. Leebeek FWG., Kluft C., Knot EAR., De Maat MPM., Wilson JHP. A shift in balance between profibrinolytic and antifibrinolytic factor causes enhanced fibrolysis In cirrhosis. *Gastroenterogy* 1991; 101: 1382-90
51. Lehr HA., Olofsson AM., Carew TE., Vajkoczy P., von Andrian UH., Hubner C., Berndt MC., Steinberg D., Messmer K., Arfors KE. P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab. Invest.* 1994; 71 :380-386
52. Loelinger EA, Van Der Esch B, Cleton FJ, Boois HL, Mattern MJ. On the metabolism of factor VII. *Proc. 7th Cong. Europ. Soc. Haemat., part II*, p. 764, London. 1980.
53. Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 302-308
54. Mannucci P.M, Mari D. Haemostasis and liver disease. *Hematologica* 1981; 66: 233-248
55. McEver RP. Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb Haemost* 1991; 66: 80-87
56. Michaux G. et al. Analysis of storage and regulated secretion of three human

- variants of von Willebrand factors provides new insights into von Willebrand disease. *Blood* 2003; 102: 2452-58
57. Molecular Cell Biology Cap.22 Integrating Cells into Tissues par. 22.1. Cell-Cell Adhesion and Communication. Boston 2005
 58. Monazahian M., Bohme L., Bonk S., Koch A., Scholz C., Grethe S., Thomssen R. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* 1999; 57: 223-229
 59. Monazahian M., Kippenberger S., Muller A., Seitz H., Bohme I., Grethe S., Thomssen R. Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 2000; 188: 177-184
 60. Nagamine T., Ohtuka T., Takehara K., Arai T., Takagi H., Mori M. Thrombocytopenia associated with hepatitis C viral infection. *J. Hepatol.* 1996; 24: 135-140
 61. North Italian Endoscopy Club for the Study and treatment of oesophageal varices. Prediction of the first variceal hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and oesophageal varices. *N. Engl. J. Med.* 1988; 319: 983-989.
 62. O'Grady JG, Alexander GJM, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97: 439-45.
 63. Pascal J.P., Cales and the Multicenter Study Group. Propanolol in the prevention of first upper gastrointestinal tract hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and oesophageal varices. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 856-61
 64. Patrik André. P-selectin in haemostasis. *British Journal of Haematology* 2004; 126: 298-306
 65. Pedreño J., De Castellarnau C., Cullare C., Sanchez-Quesada JL., Gomez J., Ordoliez J., Gonzalez F. LDL binding sites on platelets differ from the classical receptor of nucleated cells. *Arterioscler. Thromb.* 1992; 12: 1353-1362
 66. Pedreño J., Sanchez-Quesada JL., Cabre A., Masana L. Molecular Requirements in the Recognition of Low-Density Lipoproteins (LDL) by Specific Platelet Membrane Receptors. *Thromb. Res.* 2000; 99: 51-60
 67. Pinto C., Abrantes A., Esteves A.V., Alameida M., Pinto Correia J. Long term prognosis of patients with cirrhosis of the liver upper gastrointestinal. *Am. J. Gastroenterology.* 1989; 84: 1234-1243
 68. Polgar J., Matukoscka J., Wagner D.D. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3 (8), 1590-1596.
 69. Poynard T., Cales P., Pasta J.P., Pagliaro L., Lebrec D., and the Franco Italian Multicenter Study Group. Beta-adrenergic-antagonist drugs in the prevention of gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis and oesophageal varices. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324: 1532-8
 70. Preble R.B. Conclusion based on sixty cases of fatal gastrointestinal hemorrhage due to cirrhosis of the liver. *Am. J. Med. Sci.* 1990; 119: 263-267
 71. Rake MO., Flute PT., Pannel G., Williams R. Intravascular coagulation in acute hepatic necrosis. *Lancet* 1970: 535-537
 72. Rappaport S.I, Ames S.B., Mikkelsen S., Goodman J.R. Plasma clotting factors in chronic hepatocellular disease. *N. Engl J Med* 1960; 263: 278.
 73. Ratnoff OD, Patek AJ Jr. The natural history of Laennec's cirrhosis of the liver: an analysis of 386 cases. *Medicine* 1962; 21; 207-268
 74. Ready JB, Rector WIG. Morbidity and mortality of portal hypertension. *Drugs* 1989. 37: 13-24.
 75. Rector WIG. Portal hypertension: a permissive factor only in the development of ascites and variceal bleeding. *Liver* 1986; 6: 221-6
 76. Roberts HR, Cederbaum AL. The liver and blood coagulation: physiology and pathology. *Gastroenterology* 1972; 63: 297-320.

77. Rubin MH., Weston MJ., Langley PG., White Y., Williams R. Platelet function in chronic liver disease: relationship to disease severity. *Dig. Dis. Sci.* 1979; 24: 197-202
78. Saunders KB, Walters JRF, Davis P, Paton A. A 20 years prospective study of cirrhosis. *Br. Med. J.* 1981; 282; 263-266
79. Schlichting P, Christensen E, Andersen PK, et al. Prognostic factors in cirrhosis identified by Cox's regression model. *Hepatology* 1983; 3: 889-95 s.
80. Seipp S., Mueller HM., Ptaff E., Stremmel W., Theilmann L., Goeser T. Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J. Gen. Virol.* 1997; 78:2467-2476
81. Sherlock S., Dooley J. Disease of the liver and biliary sistem. IX ediz. Blackwell Scientific Publications, London, 1993
82. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69, 2: 381.
83. Sprengers ED, Princen HMG, Kooistra T, Van Hinsberg VWM. Inhibition of plasminogen activators by conditioned medium of human hepatocytes and hepatoma celiline. *Hep. G. 2. J. Lab. Clin. Med.* 1985; 105: 751.
84. Stricklandn D.K., Kessler C.M. Biochemical and functional properties of protein C and protein S. *Clin Chim Acta* 1987; 170:1
85. Teres J., Bordas JM, Bru C., Diaz F., Brughera M., Rodes J. Upper gastrointestinal bleeding cirrhosis : clinical and endoscopic correlations. *Gut* 1986; 17 : 37-40
86. The Italian Multicenter Project for Propranolol in Prevention of Bleeding. Propranolol prevents first gastrointestinal bleeding in non-ascitic cirrhotic patients. Final report of a multicenter randomized trial. *J. Hepatol.* 1989; 9: 75-83
87. Thomssen R., Bonk S., Propfe C., Heermann KH., Kochel HG., Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol (Berl)* 1992; 181: 293-300
88. Violi F, Alessandri C, Ferro D, Saliola M, Cordova C, Musca A, Balsano F. Interrelation between factor VII, prekallikrein, and hyperfibrinolysis in advanced cirrhosis. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42: 1246-9.
89. Violi F, Ferro D, Quintarelli C, Saliola M, Cordova C, Balsano F. Clotting Abnormalities in chronic liver disease. *Dig Dis* 1992; 10: 162-72.
90. Violi F., Ferro D, Basili S, Cimminiello C, Saliola M, Vezza E, Cordova C, the CALC Group. Prognostic value of clotting and fibrinolytic systems in a follow-up of 165 liver cirrhotic patients. *Hepatology* 1994;
91. Violi F., Ferro D., Basili S., Quintarelli C., Musca A., Cordova C., Balsano F. and CALC Group. Hyperfibrinolysis resulting tram clotting activation in patients with different degrees of cirrhosis. *Hepatology* 1993; 17: 78-83
92. Violi F., Ferro D., Basili S., Quintarlli C., Saliola M., Alessandri C., Cordova C., Balsano F. Hyperfibrinolysis increases the risk of gastrointestinal haemorrhage in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 1992; 15: 672-676
93. Vora DK., Fang ZT., Uva SM., Tyner TR., Parhami F., Watson AD., Drake TA., Territo MC., Berliner JA. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ. Res.* 1997; 80: 810-8

