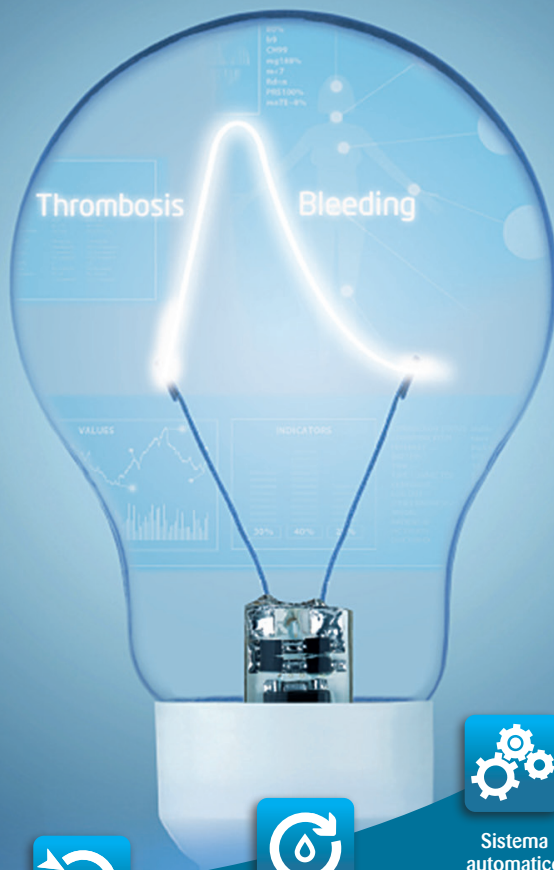


Generazione di Trombina



Innovazione



Sistema
automatico



Soluzione
completa



Standardizzazione

Introduzione alla determinazione del potenziale
di generazione di trombina nel plasma

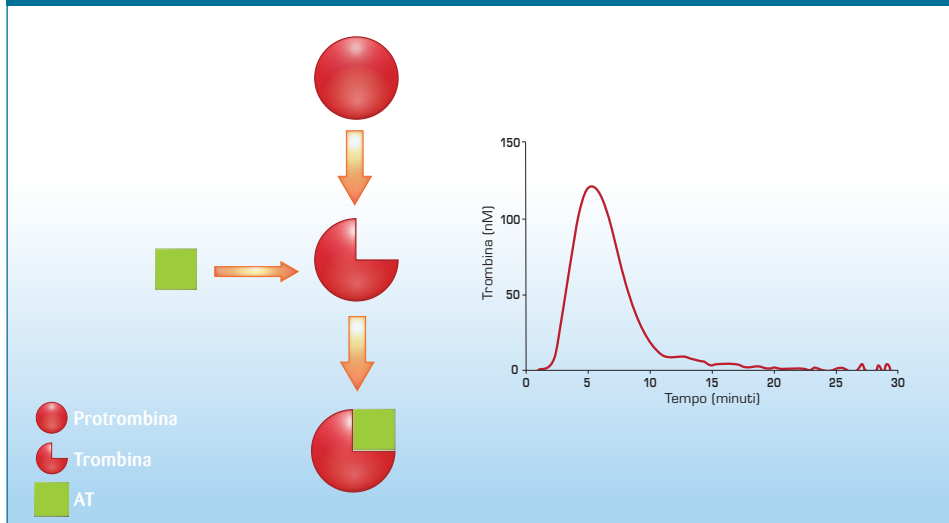

Stago

Perché la trombina e la sua generazione sono importanti?

La trombina è la protagonista principale dell'emostasi e della trombosi⁽¹⁾; essa agisce su varie cellule (in aggiunta alle piastrine) e gioca un ruolo nell'infiammazione. Inoltre, ritarda la fibrinolisi attivando il TAFI (inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina).

In vivo la trombina viene immediatamente generata in seguito ad un danno vascolare, mediante una complicata serie di reazioni complesse in cui sono coinvolte le proteine plasmatiche, le piastrine e la parete del vaso. Il Fattore Tissutale (TF) dà inizio a una serie di interazioni tra i fattori di coagulazione del plasma, che porta alla formazione del complesso *protrombinasi*; quest'ultimo converte rapidamente la protrombina in trombina. La trombina generata viene lentamente inattivata dalle diverse *antitrombine* del plasma⁽²⁾.

Ruolo centrale della trombina



La situazione è simile a quando si versa rapidamente un secchio d'acqua in un lavandino munito solo di una piccola via di scarico. In un primo momento il livello dell'acqua aumenta, e poi lentamente diminuisce fino a zero al cessare del flusso in ingresso.

Regolazione della generazione di trombina

Il TF è il principale attivatore fisiologico del complesso protrombinasi, come risposta al danno tissutale. L'attivazione del complesso protrombinasi è governata dall'interazione tra i fattori della coagulazione procoagulanti (FV, FVII, FVIII, FIX, FX e FXI), l'inibitore della via del fattore tissutale (TFPI), la proteina S (PS) e la proteina C attivata (APC). La formazione di APC è innescata da un complesso di trombina e trombomodulina (TM) legata alla parete vascolare. L'APC, con l'aiuto del cofattore PS, inibisce la cascata coagulativa.

La triade di Virchow è un modello che descrive l'interazione tra flusso sanguigno, superficie della parete del vaso e la capacità coagulativa del sangue nello sviluppo di trombosì.

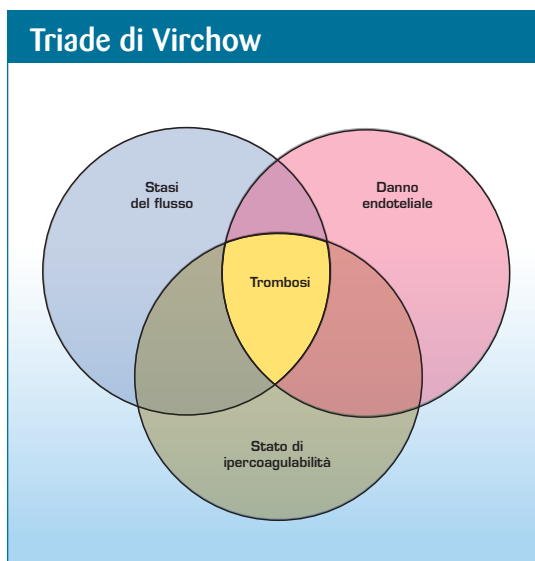
Evidenze cliniche dimostrano che il potenziale di generazione di trombina del sangue è il principale responsabile della coagulazione e che può essere misurato attraverso la TG.

La TG consente un approccio completamente nuovo ai disordini dell'emostasi, che sono stati considerati come la "malattia di nessuno, ma una complicanza per tutti (A. Kakkar)".

La "ipercoagulabilità" può essere evidenziata e quantificata indipendentemente dalle sue cause:

un eccesso di uno o più fattori procoagulanti e/o un difetto nel processo inibitorio.

"Più trombina, meno sanguinamento ma più trombosì, (e al contrario) meno trombina, più sanguinamento ma meno trombosì (H.C Hemker)".

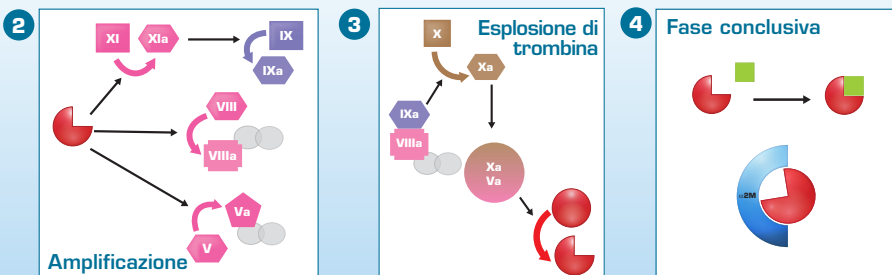
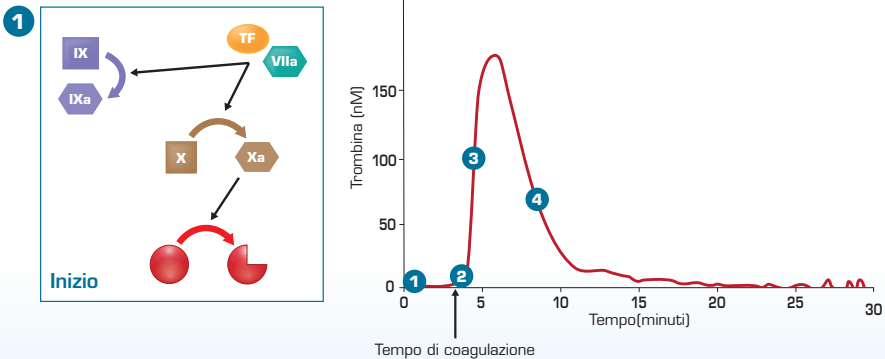


Un tipico trombogramma normale con i suoi fenomeni correlati

La TG *in vitro* può essere vista come un test funzionale su una porzione di “organo isolato”, ad esempio un campione di plasma al quale vengono aggiunti elementi essenziali della parete vasale quali TF e TM.

Il *trombogramma* mostra la variazione di trombina nel tempo e serve a quantificare il potenziale di trombina completo all’interno del sistema.

Le quattro fasi del profilo della TG



-  Protrombina
-  Trombina
-  Vescicole fosfolipidiche
-  AT

La TG in PPP è scatenata da una bassa concentrazione picomolare di TF in presenza di vescicole procoagulanti artificiali di idonei fosfolipidi e ioni calcio designati a mimare la superficie delle piastrine attivate.

La fase di inizio ① è controllata dal TFPI e consiste nella generazione delle prime tracce di trombina *via* Xa. Contemporaneamente, il complesso di FVIIa e TF attiva piccole quantità di FIX che vanno a formare la tenasi intrinseca. La tenasi intrinseca è formata dal complesso di FIXa e dal suo cofattore attivato FVIIIa, che va ad attivare FX.

L'amplificazione ② comprende la fase ciclica amplificativa della trombina:

- formazione di ulteriore IXa come risultato della generazione di XIa mediante trombina;
- attivazione dei fattori VIII e V, che agiscono come cofattori rispettivamente nei complessi tenasi intrinseca e nella protrombinasi.

L'azione fisiologica della trombina è quella di attivare le piastrine, favorendo un contributo all'azione coagulante della loro superficie all'attivazione della trombina. Nella TG, il processo sopra descritto si verifica solo in PRP.

L'esplosione di trombina ③ si verifica quando una protrombinasi completamente attiva viene assemblata con ulteriore FXa generato dalla tenasi intrinseca.

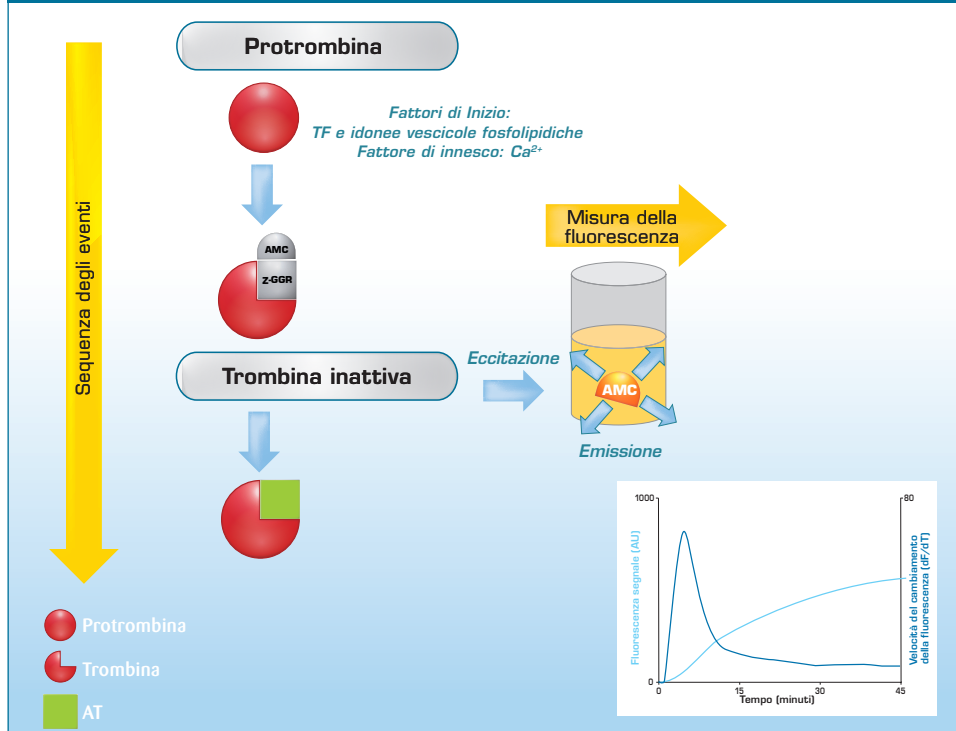
Cosa importante, la coagulazione si verifica proprio all'inizio dell'esplosione di trombina. Il quadro clinico è determinato dall'entità della generazione di trombina, che si verifica dopo la coagulazione e che invece non è contemplata dai test di coagulazione tradizionali.

La fase conclusiva ④ corrisponde alla neutralizzazione della trombina da parte dell'antitrombina, quando la trombina non viene più generata. Anche l'entità dell'inattivazione della trombina non è contemplata dai test di coagulazione tradizionali.

Misura della TG

Il principio di misura della TG è stato inventato da HC Hemker, mediante un piccolo substrato di trombina (Z-GGR-AMC) aggiunto al plasma campione. Il substrato viene convertito lentamente per evitarne il consumo completo durante il dosaggio. I meccanismi coagulativi fisiologici sono solamente debolmente influenzati per via della bassa affinità del substrato per la trombina⁽³⁾.

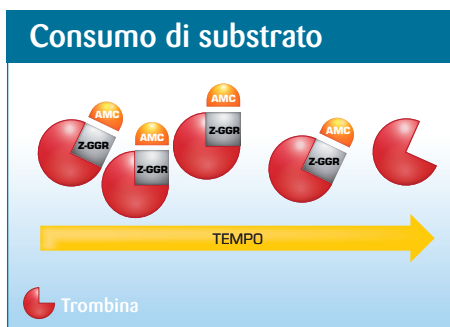
Principio di misura della TG



Il substrato viene scisso dalla trombina e viene definito fluorogenico poiché il prodotto - AMC - può essere rilevato dalla sua fluorescenza (linea azzurra). La velocità (derivata prima) dell'aumento della fluorescenza è la linea blu scuro.

Come determinare la TG dalle variazioni di fluorescenza? (I)

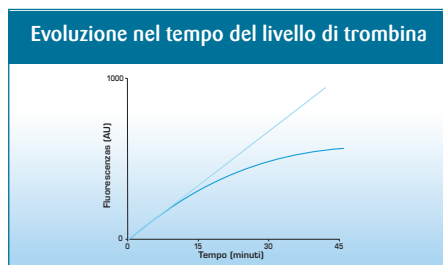
Anche se l'aumento della velocità di fluorescenza somiglia alla curva TG, occorre apportare correzioni per generare la curva TG finale. Il primo motivo è dovuto alla velocità di reazione che non solo dipende dalla quantità di trombina nel tempo ma anche dalla concentrazione del substrato, che diminuisce durante la reazione.



Il secondo motivo è che la fluorescenza non è proporzionale alla concentrazione del prodotto di clivaggio. Le molecole AMC stanno già emettendo luce, schermando altre molecole dal produrre la massima emissione luminosa, come illustrato nel seguente esperimento.

Due soluzioni di AMC sono state preparate ed esposte ad un raggio luminoso, proveniente dal basso (freccie), alla lunghezza d'onda di eccitazione indicata. L'emissione luminosa (mostrata in azzurro) diminuisce dal basso verso l'alto; la differenza di emissione aumenta con l'aumentare della concentrazione di AMC. Il fenomeno è noto come "effetto filtro interno".

A causa del consumo di substrato e dell'effetto filtro interno, la curva di calibrazione, ad esempio la fluorescenza risultante da una quantità fissa di trombina (100 nM), non è lineare (azzurro), ma curva (linea blu scuro).



La variazione nel tempo della concentrazione di trombina nel campione viene calcolata utilizzando la curva di calibrazione corretta e la misura della fluorescenza⁽⁵⁾.

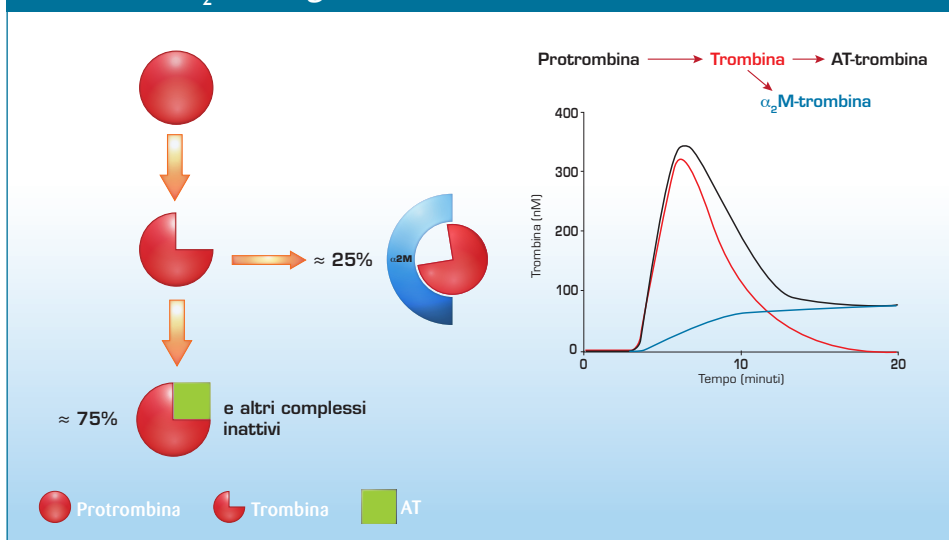
Come determinare la TG dalla variazione di fluorescenza? (II)

Per determinare la curva di attività della trombina libera, è necessario prendere in considerazione un altro fattore.

La trombina appena generata viene inattivata da diverse antitrombine, la più importante delle quali è l'antitrombina che inattiva circa il 65% di tutta la trombina. L'antitripsina e altri inibitori inattivano un altro 10 %.

La trombina complessata con l' α_2 M (α_2 M-trombina) ha perso l'attività fisiologica rispetto ai substrati macromolecolari ma può ancora clivare piccoli substrati fluorogenici.

Correzione α_2 -macroglobulina

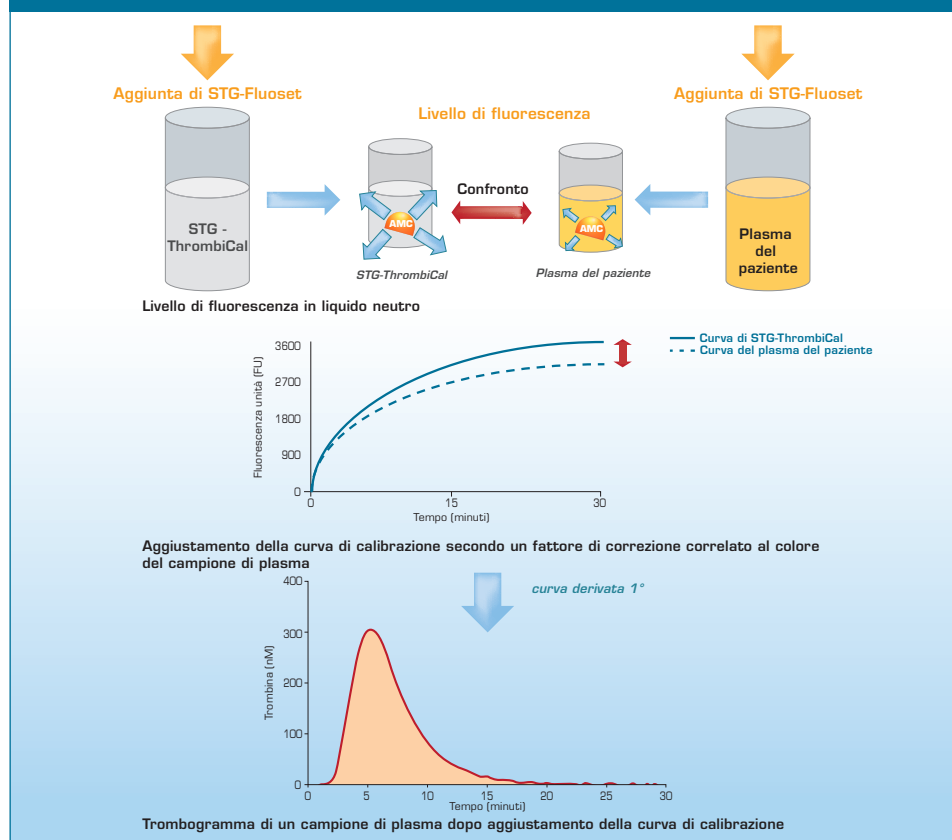


Durante la TG, si accumula α_2 M-trombina (curva blu) la cui attività si aggiunge a quella della trombina libera non inibita (curva rossa). L'attività sondata dal substrato è pertanto la somma delle due curve (curva nera). Un semplice algoritmo consente la suddivisione della curva nera nelle sue due componenti, consentendo di determinare l'attività della trombina libera (curva rossa).

Come viene valutata l'intensità del colore del plasma?

La fluorescenza registrata è influenzata dal colore del plasma (caratteristiche ottiche), che differisce da campione a campione.

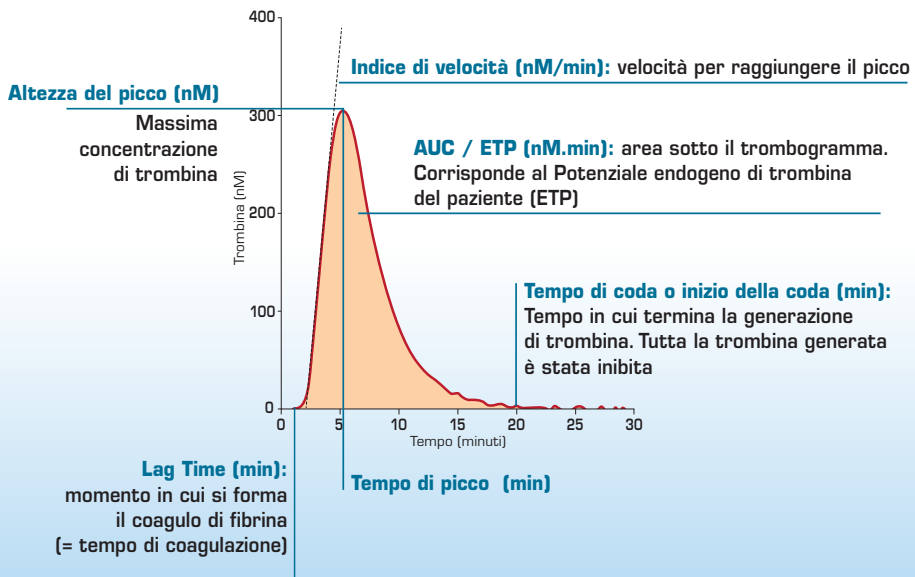
Ruolo di STG-Fluoret



Una concentrazione nota di substrato fluorescente AMC liberato nel campione di plasma dal STG-Fluoret consente una accurata determinazione dei livelli di trombina, dopo aver aggiustato la curva di calibrazione sulla base del colore del plasma. In questo modo, vengono valutati l'attività della trombina e il colore del plasma per ogni singola seduta analitica. Questa correzione automatica del colore del plasma è specifica per ST Genesia.

Parametri del trombogramma

Sei parametri del trombogramma



Reagenti

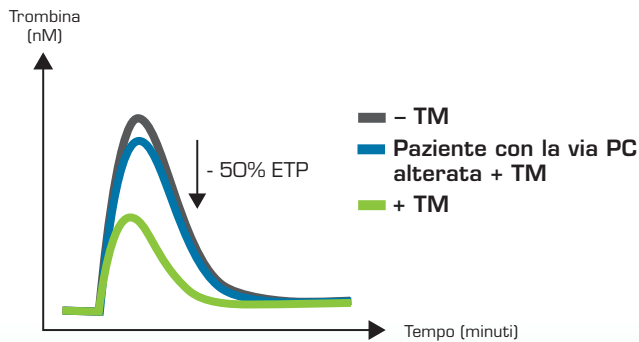
Kit	Cod	Contenuto del kit	Confezionamento	Stabilità a bordo	Composizione
STG-BleedScreen*	01131	STG-BleedScreen	3 x 1 ml	8 ore	TF umano a un livello picomolare basso, con sensibilità bilanciata alla carenza di fattori e minimizzando l'attivazione da contatto. Fosfolipidi procoagulanti.
		STG-RefPlasma BLS		4 ore	
		STG-QualiTest Low BLS			
		STG-QualiTest Norm BLS			
STG-DrugScreen*	01132	STG-DrugScreen	3 x 1 ml	8 ore	TF umano a un livello picomolare alto per valutare l'effetto anticoagulante a dosi profilattiche e terapeutiche. Fosfolipidi procoagulanti.
		STG-RefPlasma DS		4 ore	
		STG-QualiTest Low DS			
		STG-QualiTest Norm DS			
STG-Thromboscreen	01133	STG-Thromboscreen - TM	3 x 1 ml	8 ore	TF umano a un livello picomolare medio, con sensibilità bilanciata alle carenze di anticoagulanti naturali. Nessuna interferenza da attivazione da contatto. Raggiunge una media del 50% dell'inibizione nel plasma normale. Fosfolipidi procoagulanti.
		STG-Thromboscreen +TM		4 ore	
		STG-RefPlasma TS			
		STG-QualiTest Low TS			
		STG-QualiTest Norm TS			
		STG-QualiTest High TS			
STG-Cal&Fluo	01141	STG-ThrombiCal	3 x 2 ml	8 ore	STG-Thrombical: quantità fissa di trombina
		STG-FluoStart	3 x 1,5 ml	8 ore	STG-Fluoret: quantità fissa di AMC
		STG-FluoSet			STG-Fluostart: Ca ²⁺ e Z-GGR-AMC
STG-ThrombiClean	01140	STG- ThrombiClean	6 x 2 ml	4 ore	Soluzione decontaminante

Disponibilità a seconda dei paesi.

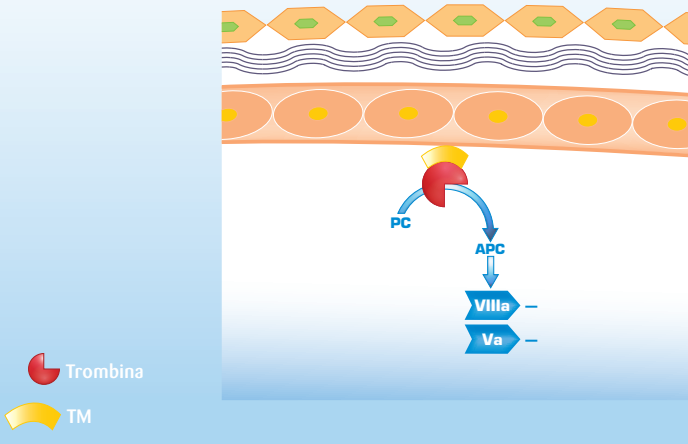
*Reagente in via di sviluppo.

TG in presenza di trombomodulina

Donatore normale



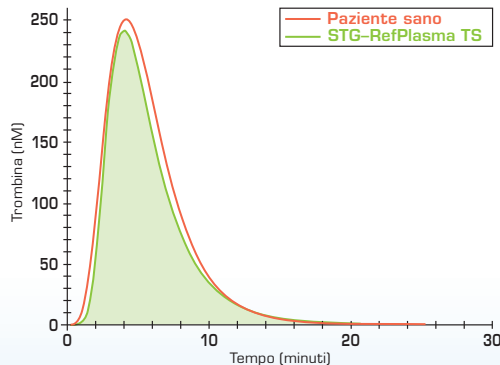
Percorso inibitore della PC



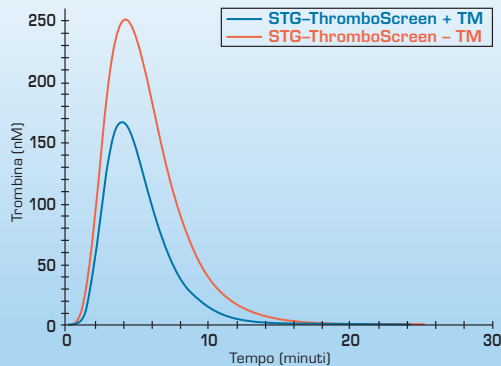
In caso di un difetto nel sistema TM - APC - proteina S (per via di difetti ereditari, utilizzo di contraccettivi orali, cancro, ecc.), l'ETP in presenza di TM è meno ridotto rispetto al plasma normale. In altre parole in questo tipo di pazienti l'ETP in presenza di TM è più alto rispetto ai soggetti normali.

TG in presenza di trombomodulina: plasma normale di un soggetto sano

Soggetto sano: STG-ThromboScreen -TM



Soggetto sano: STG-ThromboScreen +TM

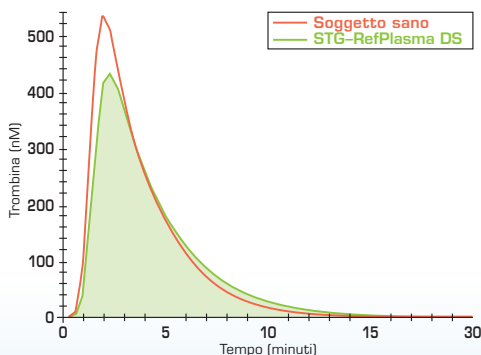


Dati interni

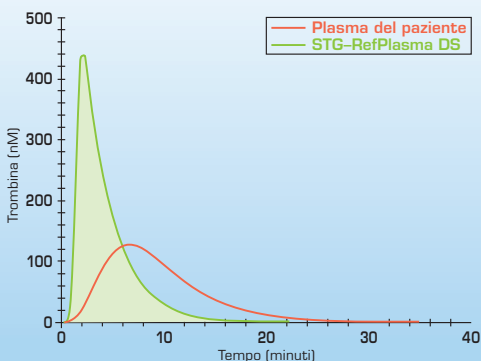
In un soggetto sano ed in presenza di TM il profilo TG è influenzato. L'altezza del picco di ETP risulta diminuita (in questo caso ETP: 528 nM.min contro 946 nM.min in assenza di TM) ed i valori di Lag time sono leggermente allungati (in questo caso 1,5 minuti contro 1,2 minuti in assenza TM).

Esempio di trombogramma con STG-DrugScreen e ST Genesis

Soggetto sano



Paziente trattato con inibitore diretto Xa

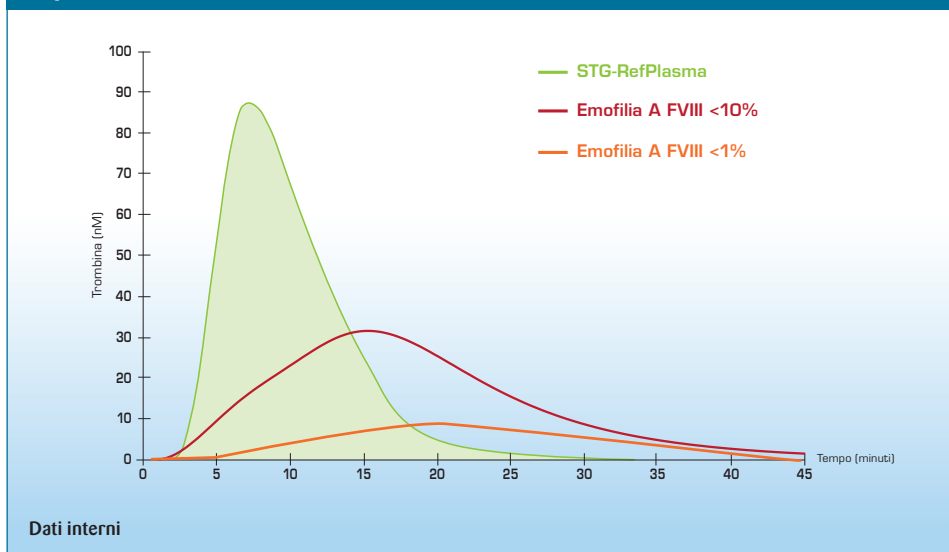


Dati interni

I profili TG risultano diminuiti in tutte le forme di trattamento anticoagulante. Come mostrato nell'immagine, per un paziente trattato con un anticoagulante orale ad azione diretta (DOAC), l'ETP e l'altezza del picco diminuiscono ed il tempo di latenza aumenta. Tali alterazioni sono osservate anche nel caso di trattamento con eparina e con anticoagulanti orali AVK.

Esempio di trombogramma con STG-BleedScreen e ST Genesis

Il profilo TG è funzione del livello di FVIII



Le carenze di qualsiasi fattore di coagulazione fisiologicamente rilevante, in particolare dei fattori antiemofilici A e B, provocano una diminuzione del potenziale di generazione di trombina. Il grafico riporta gli esempi di due pazienti emofilici con carenza di fattore VIII di diversa entità.

Si nota un ETP inferiore al 20% del normale, il che indica un sostanziale rischio di sanguinamento⁽³⁾.

Standardizzazione

L'automazione della misura della TG consente una standardizzazione attraverso:

- Preciso controllo temperatura a 37°C
- Combinazioni dedicate di reagenti di innesco e CQ
- Fino a tre livelli di CQ per coprire l'intero intervallo di lavoro
 - ✓ STG-QualiTest Basso, Normale e Alto
- Plasma di riferimento a titolo noto per la normalizzazione del risultato e maggiore precisione generale^(6, 7)
 - ✓ STG-RefPlasma

	CAT system ⁽⁶⁾ PPP-reagent LOW™		ST Genesis* STG-BleedScreen**	
	Plasma di riferimento esterno con CV normalizzato	Media consistente (N=34)	Plasma STG-Ref con CV normalizzato	Media consistente (N=10)
Lag Time (min)	8%	3.6	3.1%	2.44
Tempo di picco (min)	7%	9.0	3.7%	5.86
ETP (nM.min)	10%	1167	3.2%	774
Altezza del picco (nM)	17%	108	6.3%	94.1
Indice di velocità (nM/min)	27%	20	11.4%	38.02

* dati interni non pubblicati, ** reagente in via di sviluppo

Due plasmi normali, sono stati testati con due diversi reagenti a livelli di TF picomolari bassi sui sistemi CAT e ST Genesis. Questi dati sono stati ottenuti in diverse condizioni sperimentali e non hanno lo scopo di confrontare le prestazioni dei 2 metodi.

STG-RefPlasma è utile per migliorare la riproducibilità dei risultati e la standardizzazione inter laboratorio⁽⁷⁾. Non deve essere confuso con il calibratore specifico STG-ThrombiCal per ST Genesis che consente di correlare la fluorescenza con l'attività della trombina.

Conclusione e alcuni cenni sugli aspetti preanalitici

“Trombina, non puoi vivere senza e probabilmente morirai a causa sua (K.G. Mann)”.

ST Genesis è una soluzione automatizzata integrata per la misura del potenziale di generazione di trombina nel plasma. È un metodo sensibile per rilevare l'intera funzione del contributo plasmatico al sistema emostatico-trombotico.

È fortemente influenzato da condizioni preanalitiche. È importante che il sangue sia prelevato mediante prelievo venoso con minima stasi. La centrifugazione del campione non deve essere ritardata e deve sempre essere eseguita in linea con le raccomandazioni pubblicate⁽⁸⁾.

La misura automatica della TG è attualmente eseguita su plasma povero di piastrine. Poiché si utilizzano basse concentrazioni di TF (intervallo picomolare) per avviare la generazione di trombina, è importante minimizzare l'attivazione da contatto e la contaminazione di TF^(8, 9).

“C'è voluto un po' di tempo prima di capire che la parte difficile non era ricavare un segnale dal plasma coagulato ma ricavare da esso le concentrazioni di trombina. Finalmente, dopo circa 15 anni, abbiamo un metodo che potrebbe essere utilizzato oltre il limitato numero di laboratori specialistici (H.C. Hemker)”.

Abbreviazioni

APC: Proteina C attivata

α_2 M: α_2 -macroglobulina

AMC: Fluoroforo

AT: Antitrombina

AUC: Area sotto la curva

Ca²⁺: Ioni calcio

ETP: Potenziale endogeno di trombina

TG: Generazione di trombina

PPP: Plasma Povero di Piastrine

PRP: Plasma Ricco di Piastrine

PC: Proteina C

TF: Fattore Tissutale

TFPI: Inibitore della vis del Fattore Tissutale

TM: Trombomodulina

Z-GGR-AMC: Substrato fluorogenico

Bibliografia

- (1) Mann KG. Thrombin Can't live without it; Probably die from it. *Chest* 2003; 124:1S–3S
- (2) Tripodi A. Thrombin Generation and its Applications in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry* 2016; 62(5): 699-707
- (3) Al Dieri R., Peyvandi F., Santagostino E, *et al.* The Thrombogram in Rare Inherited Coagulation Disorders: Its Relation to Clinical Bleeding. *Thromb Haemost* 2002; 88(4): 576-82.
- (4) Hemker H. C., Wielders S, Kessels H., *et al.* Continuous Registration of Thrombin Generation in Plasma, its use for the Determination of the Thrombin Potential. *Thromb Haemost* 1993; 70(4): 617-24.
- (5) Hemker H. C., Giesen P., Al Dieri R. *et al.* Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(1): 4-15.
- (6) Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R *et al.* Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: An international multicenter study. *Thromb Res* 2012; 130: 929-934
- (7) Perrin J, Depasse F, Lecompte T *et al.* Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence of the usefulness of normalization with an external reference plasma. *Thromb Res* 2015; 136: 125-130
- (8) Loeffen R, Kleinegris MCF, Loubele STBG *et al.* Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 2544-54
- (9) Baglin T, Besser M, Cattaneo M *et al.* Towards a recommendation for the standardization of the measurement of platelet-dependent thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2011; 9(9): 1859–1861

Note

A series of horizontal dotted lines for writing notes.



Il documento sviluppato in collaborazione con Pr H.C. Hemker, Sinapsi, Maastricht e Pr T. Lecompte, l'Università di Ginevra ed Ospedale di Università di Ginevra.

ST Genesis, STG-BleedScreen, STG-DrugScreen and STG-ThromboScreen è marchi di fabbrica del Gruppo di Stago. I diritti dei marchi di fabbrica e logotipi usato in questo documento appartenga al Gruppo di Stago. L'uso di questi marchi di fabbrica non è permesso senza permesso dal Gruppo di Stago.

Progettazione: L2&F - ©2017 Diagnostica Stago - Tutti i diritti riservati. - Fotografie non contrattuali - 11/2017 - Ref. 300451. Questo documento contiene informazioni su prodotti che sono designati come testaggio di pubblico e potrebbero contenere affini non dettagli di prodotto o informazioni accessibili o valido nel tuo paese.



Al Cuore dell'Emostasi

Stago Italia S.r.l. unipersonale
via Giovanni Antonio Amadeo, 59
20134 Milano
Italia
Tel: +39 02 49 58 85 01
Fax: +39 02 49 58 85 50
info@it.stago.com
www.stago.it