- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

Recettori piastrinici di membrana e rischio cardiovascolare: dalla struttura alle possibili implicazioni cliniche

Marisa Carluccio, Nicoletta Vesentini*, Raffaele De Caterina*§

*Dipartimento Cardio Toracico, Università degli Studi, *Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa, §Cattedra di Cardiologia, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti*

Key words:
Coronary artery disease; Genetics; Platelets; Receptors.

Platelets exhibit membrane receptor proteins the structure of which has adapted, in the course of evolution, to halt hemorrhage. These receptors are also implicated in thrombosis, and their structural variability is likely able to account for part of the variability in intraindividual susceptibility to thrombotic events. This review offers a summary of current knowledge on the molecular structure and function of platelet membrane receptors, here studied also in relation to the variability of platelet function in the general population, with the aim of discussing possible implications for the atherothrombotic risk.

(Ital Heart J Suppl 2001; 2 (7): 733-747)

© 2001 CEPI Srl

Ricevuto il 31 gennaio 2001; nuova stesura il 15 marzo 2001; accettato il 20 marzo 2001.

Per la corrispondenza:

Prof. Raffaele De Caterina

Cattedra di Cardiologia
Università degli Studi
"G. d'Annunzio"
c/o Ospedale San Camillo de Lellis
Via Forlanini, 50
66100 Chieti
E-mail:
rdecater@ifc.cnr.it

Introduzione

Le piastrine sono piccoli elementi cellulari anucleati capaci di aderire alle pareti vascolari danneggiate, di aggregare tra loro e di catalizzare sulla loro superficie le reazioni biochimiche della cascata coagulativa che portano alla formazione della fibrina. Il loro ruolo principale è quindi quello di arrestare l'emorragia. Sin dalle prime descrizioni della funzione piastrinica fatte da Bizzozzero nel 1882 (vedi Anon[1]) emergeva tuttavia l'ipotesi che, qualora la tendenza di questi elementi all'aggregazione non risultasse adeguatamente controllata, poteva derivarne una trombosi.

La pressione evolutiva, per milioni di anni condizionata dal prevalere del rischio emorragico, ha verosimilmente indirizzato la funzione di questi elementi primariamente all'arresto dell'emorragia. Le emorragie, derivanti principalmente da un'interazione violenta con l'ambiente, colpiscono infatti prevalentemente soggetti giovani, prima dell'età riproduttiva. La trombosi, al contrario, prevale in soggetti anziani con patologia vascolare aterosclerotica (aterotrombosi)[2], e si manifesta clinicamente solo quando il rischio di accidenti violenti è scemato per la variazione importante delle cause di morte intervenuta solo nelle ultime migliaia di anni di esistenza della nostra specie. Le piastrine manifestano quindi il loro potenziale protrombotico solo in popolazioni in cui l'aspettativa di vita – e quindi l'incidenza della malattia vascolare aterosclerotica – appaia in progressivo aumento.

Se tuttavia ben individuabile appare il ruolo delle piastrine nel determinismo del rischio trombotico e dei quadri conseguenti di ischemia acuta d'organo, il coinvolgimento di questi elementi nell'innesco e nella progressione della malattia aterosclerotica risulta a tutt'oggi molto più dibattuto.

In questa rassegna analizzeremo i dati morfologici e funzionali a supporto del ruolo delle piastrine nel processo aterotrombotico con particolare riguardo a quelle componenti glicoproteiche della membrana piastrinica che consentono le interazioni delle piastrine con il mezzo esterno. Analizzeremo inoltre come tali strutture consentano anche l'attuarsi di influenze dell'ambiente esterno sul comportamento piastrinico. Le acquisizioni degli ultimi anni sulla struttura e la funzione delle glicoproteine della membrana piastrinica e la scoperta di loro varianti geneticamente determinate hanno di recente stimolato ricerche sul loro possibile significato clinico nel favorire la trombosi e dunque nell'influenzare il rischio cardiovascolare.

Piastrine e flusso sanguigno

Le piastrine esplicano la loro funzione nell'emostasi e nella trombosi aderendo in modo irreversibile ad un sito di danno vascolare. Questo avviene contrastando la

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

tendenza del flusso sanguigno a trasportare le piastrine adese alla parete vascolare[2]. La forza che si oppone all'adesione stabile e all'aggregazione diviene maggiore con l'aumentare della velocità di scorrimento del sangue (*shear*). Se schematizziamo il flusso di sangue nei vasi come costituito da lamine concentriche, la velocità di scorrimento reciproco di ciascuna lamina sulle altre in funzione della distanza dalla parete vascolare rappresenta la velocità di *shear (shear rate)*. Essa è nulla al centro del vaso e massima sulla parete (Fig. 1)[3]. La forza che si esercita tra le lamine (per unità di area) – che rappresenta il determinante del movimento reciproco delle lamine stesse – costituisce invece lo *shear stress* del fluido (misurato in dynes/cm^2). La velocità di *shear* è direttamente proporzionale allo *shear stress* ed inversamente proporzionale alla viscosità del fluido[3].

I fenomeni che sono influenzati dallo *shear stress* assumono particolare rilevanza in quelle regioni del sistema vascolare dove esso è maggiore, ovvero nelle arterie più che nelle vene, ed in particolare nelle arteriole, nei capillari, e nelle sedi di stenosi vascolare (in sede di placche aterosclerotiche o di vasospasmo)[4] (Tab. I).

Le condizioni di flusso sanguigno determinano quindi parametri fondamentali in grado di influenzare il comportamento delle piastrine: il numero di piastrine che passano per un punto del vaso nell'unità di tempo, il tempo in cui una piastrina interagisce con la parete vascolare o con altre piastrine in un sito di danno vascolare, e infine i livelli di forze di *shear*, in grado di influenzare l'entità delle collisioni piastrina-piastrina e piastrina-parete vascolare. L'importanza dei fenomeni dipendenti dalle forze di *shear* risiede nella loro capacità di condizionare, in situazioni patologiche, la predisposizione alla comparsa di occlusioni acute. Livelli di *shear stress* 350 dynes/cm^2, quali si verificano di frequente in sedi di stenosi vascolare, superano infatti, largamente, i valori che, *in vitro*, determinano l'attivazione e l'aggregazione piastrinica (180 dynes/cm^2), anche in assenza di agonisti esogeni[5]. Sono infatti ben documentati due tipi di aggregazione piastrinica: una indotta da agonisti solubili e mediata, come via finale comune, dal recettore piastrinico glicoproteico (GP) IIb/IIIa, ed una indotta dallo *shear stress,* e che assume rilevanza in condizioni patologiche caratterizzate da alto *shear stress*[6]. Inoltre un aumento transitorio della velocità di circolo, come a seguito di esercizio fisico[3] o in corso di iperattività adrenergica (lo stimolo α_2-adrenergico è anche in grado di abbassare la soglia dell'attivazione piastrinica *shear*-indotta[7]), può causare attivazione piastrinica in determinate circostanze, e dunque contribuire alle conseguenze patologiche di tale attivazione.

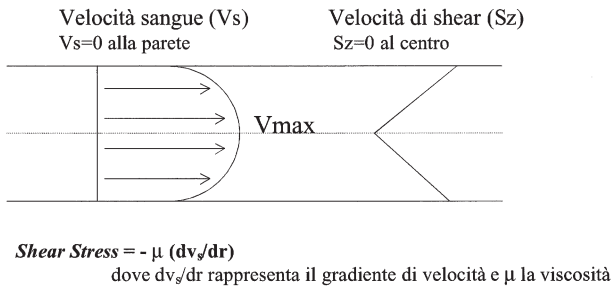

Figura 1. *Il flusso sanguigno nel lume vascolare produce un profilo parabolico della velocità di flusso con la massima velocità di scorrimento ed il minimo shear stress nel centro del vaso. Il gradiente di velocità (dv) tra le lamine del flusso sanguigno (a sua volta proporzionale alla distanza dal centro del vaso - dr) determina le forze di shear. Da Kroll et al.[3], modificata.*

Tabella I. Livelli medi di velocità di *shear* e *shear stress* in diversi distretti circolatori (assumendo una viscosità del sangue intero pari a 0.038 Poise).

Vasi sanguigni	Velocità di shear (/s)	Shear stress di parete (dynes/cm^2)
Grandi arterie	300-800	11.4-30.4
Arteriole	500-1600	19.0-60.8
Vene	20-200	0.76-7.6
Vasi stenotici	800-10 000	30.4-380

I recettori piastrinici di membrana

Il ruolo principale delle piastrine è di contribuire alla formazione del tappo emostatico nelle sedi di lesione vascolare. L'esposizione quindi di strutture della parete vascolare, normalmente non a contatto con la corrente sanguigna (Tab. II), costituisce il segnale che, captato dai recettori di superficie delle piastrine, determina l'attivazione delle piastrine e in genere dell'intero sistema emostatico[2]. Le proteine che compongono la membrana piastrinica presentano caratteristiche strutturali atte a mediare le interazioni da contatto di superficie essenziali per la funzione piastrinica. Tali interazioni sono il contatto piastrina-GP adesive subendoteliali nel processo di adesione, e piastrina-piastrina in quello di aggregazione (Tab. III)[2].

Tabella II. Componenti della parete vascolare che interagiscono con il sistema emostatico.

Subendotelio
Fattore von Willebrand
Collagene (tipi IV, V e VI)
Fibronectina
Trombospondina
Laminina
Vitronectina
Fibrinogeno (fibrina)
Fattore tissutale (tracce)
Media
Collagene (tipi I e III)
Avventizia
Collagene (tipi I e III)
Fattore tissutale

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

Tabella III. Recettori piastrinici di membrana.

Recettore	Ligando	N. recettori sulla superficie piastrinica
Adesione		
Intergrine		
GP Ia/IIa (VLA-2)	Collagene	1000
GP Ic/IIa (VLA-6)	Laminina	1000
GP Ic*/IIa (VLA-5)	Fibronectina	1000
$\alpha_v\beta_3$	Vitronectina, fibrinogeno, fattore von Willebrand, trombospondina	100
GP IIb/IIIa	Fibrinogeno, fibronectina, fattore von Willebrand, vitronectina	45 000
Altri		
GP Ib	Fattore von Willebrand	25 000
GP IV	Trombospondina, collagene	25 000
Aggregazione		
GP IIb/IIIa	Fibrinogeno, fibronectina, fattore von Willebrand, vitronectina	45 000

Sono indicati i recettori presenti sulla superficie piastrinica distinti in rapporto alla funzione svolta ed in base alle caratteristiche molecolari. VLA si riferisce ad una diversa nomenclatura (letteralmente "very late activation antigen"). Da Coller[2], modificata.

L'asse fattore von Willebrand-glicoproteina Ib/IX/V

Dei tre distinti aspetti della funzione piastrinica che governano la formazione del trombo – 1) l'adesione a proteine adesive insolubili, immobilizzate, 2) l'aggregazione, 3) la secrezione delle sostanze contenute nei granuli piastrinici – l'adesione è la prima a intervenire in ordine di tempo, e dà inizio agli eventi sia dell'emostasi fisiologica che della trombosi. L'adesione delle piastrine alla parete vascolare dipende primariamente dall'interazione tra la GP Ib ed il fattore von Willebrand (vWF). Una volta avvenuta questa interazione, l'attivazione piastrinica fa entrare in gioco altre coppie di recettori-ligandi (ad esempio la GP IIb/IIIa ed il recettore della vitronectina) ed altri recettori di superficie, i quali possono contribuire alla fase di contatto legandosi direttamente a componenti della matrice extracellulare (ad esempio i recettori del collagene, GP Ia/IIa e GP IV)[8]. In condizioni di elevato *shear* l'adesione piastrinica dipende in prevalenza, tuttavia, dall'asse vWF-GP Ib, ed è condizionata dagli eventi intrapiastrinici, in particolare dai livelli di adenosin-monofostato ciclico (cAMP), dalla stimolazione trombinica e dalla fosforilazione della catena β della GP Ib[8]. Il vWF e la GP Ib sono in grado tuttavia di interagire anche nella fase fluida per livelli di *shear stress* > 60 dynes/cm^2 (corrispondenti a velocità di *shear* di circa 3000/s) – condizione in cui si verificano un'attivazione ed un'aggregazione piastrinica dirette, senza l'azione di agonisti esogeni[5]. In condizioni fisiologiche, tuttavia, la superficie endoteliale intatta, esposta alle medesime forze di *shear*, libera un insieme di potenti mediatori antipiastrinici e vasodilatatori che sono in grado di neutralizzare gli effetti dell'attivazione piastrinica dipendente dallo *shear*[9].

Il meccanismo di innesco dell'aggregazione piastrinica *shear*-dipendente è un plausibile cofattore di trombosi nelle sedi di lesione della parete vascolare, dove livelli di *shear stress* > 100 dynes/cm^2 sono comuni[5]. È possibile che, sotto l'effetto di elevate forze di *shear*, le molecole di vWF assumano una conformazione a filamenti estesi. La struttura a subunità ripetute, tipica di questi multimeri, offrirebbe una successione di siti di interazione capaci di legarsi in modo multivalente ai recettori sulla superficie piastrinica, aumentando il numero di punti di contatto e la forza delle interazioni (Fig. 2B)[10]. Molto più rilevante, però, appare il meccanismo che vede in primo piano il recettore GP Ib/IX. È stato ipotizzato infatti che le forze di *shear* agiscano modificando l'affinità recettoriale della GP Ib per il vWF (Fig. 2A)[10]. L'iniziale interazione tra vWF e GP Ib costituirebbe il nucleo per la formazione del successivo aggregato, concentrando in una sorta di microambiente vari agonisti chimici, con conseguente amplificazione dello stimolo iniziale[3].

I meccanismi attraverso i quali lo *shear stress* induce l'aggregazione piastrinica sono ancora non completamente definiti. È noto tuttavia che il legame dei multimeri di vWF alla GP Ib causa un flusso transmembranario di ioni calcio. L'aumento del calcio intracellulare, assieme ad una complessa rete di segnali intracellulari (comprendente la proteinchinasi C ed altre serina-treonina chinasi, le tirosina-chinasi e le fosfatidil-inositolo-3-kinasi[11]) è coinvolto nel processo di attivazione piastrinica, ed in particolare nella mutazione conformazionale rapida (*switch*) della GP IIb/IIIa verso uno stato di "recettività" per i ligandi (proteine solubili, come il fibrinogeno, mediatrici dell'aggregazione piastrinica) (Fig. 3)[5,12,13].

Interazioni glicoproteina Ib-fattore von Willebrand e rischio aterotrombotico

Benché oggi sia ridimensionato il ruolo attribuito alla trombosi quale fattore di innesco dell'aterosclerosi spontanea, numerose evidenze cliniche (studi angiografici) ed anatomo-patologiche suggeriscono che la

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

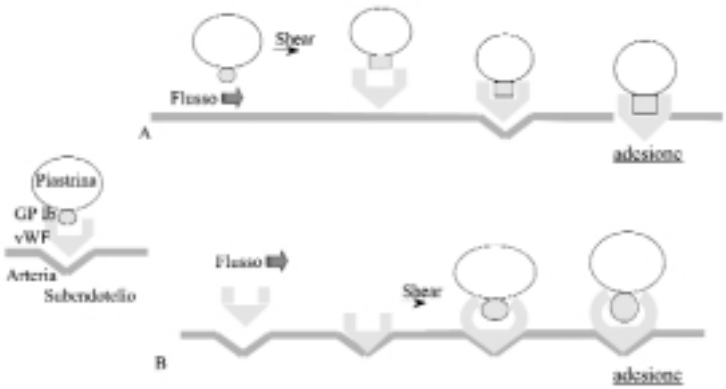

Figura 2. *Meccanismi potenziali dell'adesione piastrinica glicoproteina (GP) Ib/fattore von Willebrand (vWF)-dipendente. In condizioni di stasi* (a sinistra) *non si verifica alcuna interazione tra vWF e GP Ib. In condizioni dinamiche si suppone avvenga un cambiamento dell'affinità della GP Ib* (A) *o una variazione conformazionale del vWF* (B) *o entrambe le cose. Da Roth[10], modificata.*

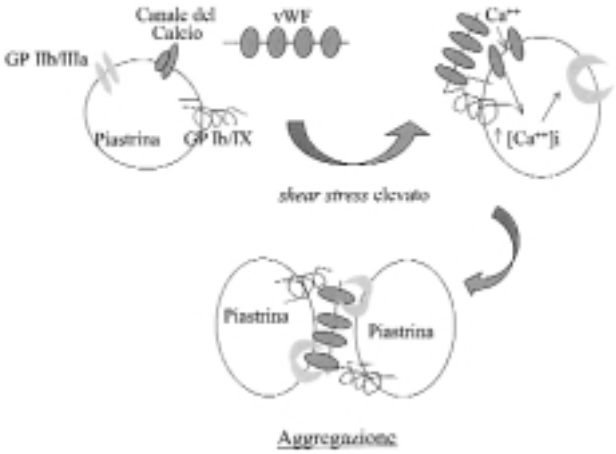

Figura 3. *Rappresentazione schematica di un'ipotesi attuale circa il meccanismo dell'aggregazione piastrinica shear-indotta. Il legame del vWF alla GP Ib in condizioni di elevato shear stress apre i canali del calcio, aumentando il calcio intracellulare ed attivando la GP IIb/IIIa. Il legame tra vWF e GP IIb/IIIa media l'aggregazione piastrinica. Abbreviazioni come in figura 2. Da Ruggeri[5], modificata.*

formazione e l'organizzazione del trombo piastrinico possano svolgere un ruolo importante nella progressione dell'aterosclerosi[14] in seguito all'interazione con l'endotelio disfunzionante o danneggiato e alla conseguente liberazione di fattori di crescita[14]. Le piastrine interverrebbero inoltre nella patogenesi delle sindromi da aterosclerosi accelerata (aterosclerosi da trapianto, malattia del graft venoso e ristenosi postangioplastica)[15] e in tutti quei casi in cui il danno vascolare coinvolga l'intima, isolatamente o in associazione alla tunica media (per esempio nelle sindromi coronariche acute e dopo angioplastica coronarica). In queste circostanze, il grado di ispessimento intimale appare correlare, oltre che con l'entità del danno della media, con l'entità della trombosi sovrapposta[16]. La liberazione di fattori di crescita da parte dei monociti e delle piastrine aggregate appare la fonte principale di mitogeni per la proliferazione delle cellule muscolari lisce, per l'iperplasia intimale e l'organizzazione del materiale trombotico[15].

Un possibile ruolo dell'interazione GP Ib-vWF nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche coronariche e delle sindromi coronariche acute è stato messo in rilievo in studi recenti. Benché fosse già noto che animali congenitamente privi di vWF erano meno suscettibili allo sviluppo dell'aterosclerosi[17], è stato evidenziato solo recentemente come agenti che bloccano il vWF o la GP Ib possano inibire o ritardare lo sviluppo di occlusione coronarica nel modello animale[18-20]. Elevati livelli plasmatici di vWF rappresentano inoltre un fattore prognostico sfavorevole in pazienti con malattia coronarica[21] e costituiscono un fattore di rischio indipendente per eventi acuti in pazienti con angina pectoris[22].

Complesso glicoproteina Ib/IX/V: struttura e funzione

La GP Ib è un eterodimero composto da una catena α più grande ed una catena β più piccola, unite da un ponte disolfuro. Sulla membrana piastrinica, questa GP forma un complesso, unito da legami non covalenti, con altre due proteine più piccole, tutte membri di una famiglia nota come "glicoproteine ricche in leucina": la GP IX e la GP V, in rapporto stechiometrico 1:1 con la GP IX e 2:1 con la GP V[3].

La componente più importante della GP Ib, la catena α, risulta altamente glicosilata, essendo costituita per circa la metà della sua massa da carboidrati. La porzione extracellulare di questa catena presenta alcune interessanti caratteristiche: 1) sette domini ripetuti *in tandem* di 24 aminoacidi ricchi in leucina; 2) due regioni idrofiliche, una detta "regione cerniera" contenente il sito di legame per il vWF[10], una seconda contenente numerosi siti di glicosilazione, cui sono legate catene esasaccaridiche mucino-simili. Quest'ultima struttura costituisce la regione del cosiddetto macroglicopeptide[10]. La catena α (insieme alla GP V) media altresì l'interazione con la trombina. Numerose evidenze indicano che la GP Ib funziona da recettore ad "elevata affinità" per l'α-trombina[23-25].

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

Quale complesso transmembranario, il complesso GP Ib/IX/V consente una trasduzione del segnale dagli eventi extracellulari di adesione piastrinica alle strutture molecolari all'interno delle piastrine attraverso un'interazione diretta tra la componente citoplasmatica della catena α della GP Ib e la "proteina legante l'actina" del citoscheletro[10]. Tale connessione mantiene la morfologia piastrinica ed appare deficitaria nella sindrome di Bernard-Soulier, in cui un difetto della GP Ib si associa al riscontro di piastrine giganti, a gradi variabili di trombocitopenia e ad un aumento del tempo di sanguinamento.

Il legame GP Ib-vWF, direttamente o indirettamente attraverso una o più proteine accoppiate, innesca segnali di attivazione cellulare che, attraverso una modificazione dell'affinità del principale effettore, la GP IIb/IIIa, portano all'aggregazione piastrinica[3].

Tale meccanismo di innesco dell'aggregazione piastrinica può spiegare la formazione di trombi piastrinici all'interno di arterie stenotiche, dove i livelli di *shear stress* sono sufficienti ad indurre l'attivazione diretta del complesso GP Ib/IX/V. Questo meccanismo potrebbe inoltre avere un ruolo nella trombosi associata agli stati iperadrenergici, svolgendo l'adrenalina, attraverso il suo specifico recettore piastrinico α_2, un'azione di "facilitazione" nell'interazione *shear*-indotta tra piastrine e vWF[7].

Glicoproteina Ib: varianti polimorfiche e rischio aterotrombotico

Nella sequenza codificante la catena α della GP Ib, localizzata sul braccio corto del cromosoma 17, sono note alcune varianti genetiche (polimorfismi)[26]. Un polimorfismo è determinato dalla transizione C→T a livello del nucleotide 1018, e risulta in un dimorfismo aminoacidico (Thr-Met) nel residuo 145 della GP Ib α[27]. Il sito è localizzato all'interno del dominio ricco in leucina, sito di legame del vWF. Questo polimorfismo produce una variazione nella struttura tridimensionale della GP, ed è noto per essere la base molecolare di un sistema di alloantigeni (HPA-2a/2b) responsabili della distruzione piastrinica mediata da alloanticorpi in corso di immunizzazioni legate a trasfusioni o gravidanze[27]. Nei bianchi, la frequenza del fenotipo HPA-2a (Thr^{145}) è del 99.3% mentre quella del fenotipo HPA-2b (Met^{145}) è pari a 14.6%. È stato recentemente evidenziato come questo sito sia in disequilibrio di *linkage* con un secondo polimorfismo descritto nel gene della GP Ib α, un "polimorfismo di dimensione" legato alla ripetizione di un numero variabile di volte (da 1 a 4), di una sequenza di 13 aminoacidi all'interno della regione accanto ai residui Glu^{396} e Thr^{411} [28]. L'allele HPA-2a si associa infatti alle varianti D (una ripetizione) e C (due ripetizioni), mentre l'allele HPA-2b è legato alle varianti più lunghe, B (tre ripetizioni) e C (due ripetizioni)[29].

Il polimorfismo di dimensione della GP Ib α venne inizialmente descritto come variante di dimensione della GP Ib, in base alla velocità di migrazione in elettroforesi su sodio-dodecilsolfato-poliacrilamide. Il peso molecolare della proteina venne designato con i simboli da A a D in relazione ad una massa molecolare decrescente (da 168 kD per la variante A fino a 153 kD nella variante D). Queste varianti avevano una frequenza variabile in relazione alla provenienza geografica dei soggetti valutati. Studi successivi hanno evidenziato come queste varianti fossero il prodotto di alleli diversi, aventi frequenza diversa nelle popolazioni asiatica e bianca[30]. La variante C è la più comune in entrambe le popolazioni (80% nei bianchi). La seconda variante per frequenza è quella D nei giapponesi, che però nella popolazione bianca rappresenta solo l'8%. Gli alleli A e B hanno una frequenza invertita nei due gruppi etnici (rispettivamente 1 e 11% nei bianchi).

Il polimorfismo è localizzato nella regione del macroglicopeptide della GP Ib α, regione altamente conservata dove, nel corso dell'evoluzione, una sequenza di 39 nucleotidi (variante D) è andata incontro, probabilmente, a duplicazioni successive *in tandem* (una o due), da cui sarebbero originate le varianti B e C (Fig. 4)[30]. Probabilmente la regione corrispondente al macroglicopeptide deriva *in toto* dalla trasposizione del gene di una mucina, che sarebbe poi andato incontro a duplicazione, con un meccanismo evolutivo comune a questa famiglia e funzionale ad aumentare le dimensioni e, probabilmente, le proprietà fisiche di viscosità della mucina stessa. Gli aminoacidi aggiunti dalla duplicazione ed i carboidrati associati nei cinque siti di O-glicosilazione presenti in ciascun domi-

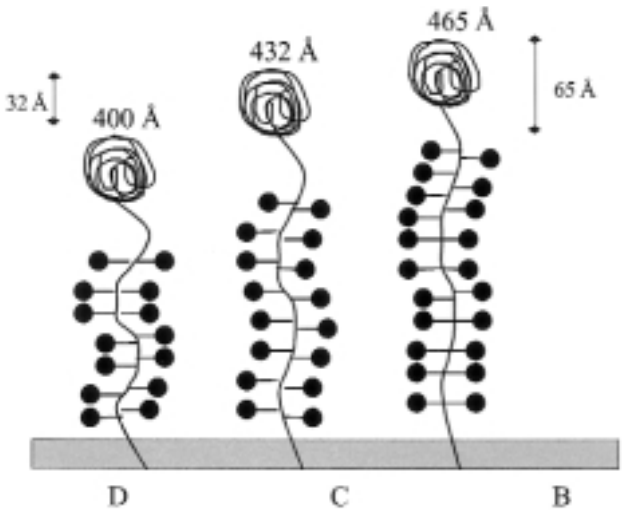

Figura 4. *Schema ipotizzante la struttura della glicoproteina Ibα determinata dall'aggiunta di ripetizioni* in tandem *nella regione del macroglicopeptide. Basandosi sulla stima della lunghezza del legame peptidico, l'aggiunta di 13 aminoacidi allungherebbe il complesso di circa 32 Å. La variante originaria di 13 aminoacidi (variante D) ha dato origine a duplicazioni successive* in tandem *(una o due), da cui sarebbero originate le varianti C e B. La variante B si estenderebbe dunque al di fuori della superficie piastrinica per circa 65 Å. Da Lòpez et al.[30], modificata.*

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

nio sono responsabili dell'aumento della massa molecolare.

Ogni dominio di 13 aminoacidi aumenterebbe di 32.5 Å la lunghezza della regione del macroglicopeptide. L'effetto sarebbe un aumento della distanza della regione di legame con il ligando rispetto alla membrana piastrinica, risultandone una maggiore proiezione di questo dominio nella corrente sanguigna (Fig. 4)[30]. Una potenziale conseguenza di questa variazione strutturale è l'esposizione della molecola a forze di *shear* più elevate, il che potrebbe abbassare la soglia di interazione tra vWF e GP Ib, e potenzialmente favorire l'attivazione piastrinica.

Alcuni studi di associazione hanno indagato il possibile coinvolgimento di questi polimorfismi nella suscettibilità alla cardiopatia ischemica. Già i primi risultati, ottenuti da Murata et al.[31], evidenziavano l'esistenza di un'associazione tra l'allele Met[145] ed il rischio di coronaropatia in soggetti di età < 65 anni. Dati preliminari, poi confermati dall'espansione del campione studiato, indicavano inoltre che gli alleli codificanti per varianti glicoproteiche a più alto peso molecolare correlavano con la gravità dell'aterosclerosi coronarica[32]. Questi dati sono stati successivamente confermati. In uno studio caso-controllo che arruolava soggetti sopravvissuti ad episodi ischemici cerebrali o a sindromi coronariche acute è stata messa in luce un'associazione con il rischio di eventi sia dell'allele con tre ripetizioni che del polimorfismo Met[145] [33].

Nello stesso studio l'associazione non risultava estendersi al rischio di trombosi venosa profonda, ed emergeva invece la prevalenza della variante B (con tre ripetizioni) nel gruppo di pazienti con storia familiare positiva per coronaropatia o accidenti cerebrovascolari.

Le modalità attraverso cui tali polimorfismi influenzerebbero il rischio cardiovascolare sono ancora oggetto di speculazione. Una possibilità, già accennata, è che la maggiore protrusione della molecola verso la corrente sanguigna nelle varianti a più alto peso molecolare renda il recettore più sensibile allo *shear stress*. Il polimorfismo Thr/Met, localizzato nelle vicinanze del sito attivo della GP Ib, probabilmente produce una variazione conformazionale della struttura proteica. Per questo motivo esso sarebbe legato alla produzione di anticorpi anti-GP Ib in corso di alloimmunizzazioni. Esistono però pochi dati conclusivi riguardo al ruolo funzionale della variante Met[145]. Indagini preliminari non sembrano evidenziare infatti differenze significative nell'attivazione piastrinica basale e nell'aggregabilità sia nei portatori dell'allele Met[145] [34], sia nei portatori della variante 3R[33]. Non sono riportati però a tutt'oggi dati circa l'attivazione indotta da *shear in vitro* in queste varianti strutturali. Altro punto oscuro è ancora se il dimorfismo Thr/Met abbia un ruolo causale di per sé quale fattore di rischio, o se piuttosto la sua associazione con il rischio cardiovascolare sia dovuta semplicemente al fatto di essere in forte disequilibrio di *linkage* con il polimorfismo di dimensione.

La catena α della GP Ib è stata sottoposta a uno screening sistematico nella ricerca di varianti polimorfiche, al di là di quelle già note[35]. Sono stati trovati sei siti polimorfici, di cui tre non davano origine a variazioni nella sequenza aminoacidica, uno era localizzato in posizione -5 rispetto al sito di inizio della trascrizione e due erano localizzati in sequenze codificanti a livello dell'Arg 342 e dell'Asn 242. In entrambi i casi, tuttavia, la frequenza dell'allele mutato non superava il 2-3%. Molto recentemente il polimorfismo C→T situato in posizione -5 rispetto al codone ATG di inizio della trascrizione è stato messo in relazione ai livelli di GP Ib α espressi sulla membrana plasmatica[36]. L'allele meno comune -5C (la cui frequenza varia dall'8 al 17% a seconda dei gruppi etnici) più da vicino richiama la sequenza considerata ottimale per un inizio efficiente della trascrizione, e si associa ad un aumento dell'espressione del recettore sulla membrana piastrinica. È plausibile che l'aumentata densità del recettore di adesione sulla superficie piastrinica possa predisporre ad un maggior rischio di eventi cardiovascolari. Alcuni risultati preliminari non sembrano tuttavia attribuire a questa variante un ruolo significativo quale nuovo fattore di rischio[37].

Uno screening effettuato per ricercare possibili varianti polimorfiche a livello della catena β della GP Ib, della GP IX e della GP V ha evidenziato che la sequenza della prima risulta altamente conservata. Il gene della GP IX mostra un'unica mutazione nella regione in 3', mentre il gene in cui le mutazioni appaiono meglio tollerate risulta quello della GP V. Di questa GP sono stati riportati nove siti mutati. In cinque casi si tratta di mutazioni silenti, negli altri quattro la frequenza delle mutazioni raggiunge l'1-2% nella popolazione[38].

I recettori integrinici

Le integrine sono recettori adesivi con un ruolo essenziale nella funzione piastrinica. Tutti i recettori integrinici sono un eterodimero di due subunità, α e β, prodotti di geni separati, mutuamente interdipendenti per una corretta espressione sulla superficie cellulare. Le integrine sono classificate in famiglie sulla base della catena β, di cui si conoscono tre varietà, designate β_1, β_2 e β_3. Le piastrine contengono cinque integrine, tre della classe β_1 e due della classe β_3 (Tab. III).

La classe β_1 (GP IIa) dei recettori integrinici (designata altresì con la sigla VLA, ovvero *very late activation antigen*) include recettori presenti su diversi tipi di cellule che mediano le interazioni con molecole della matrice. I recettori piastrinici che appartengono a questo gruppo sono: la GP Ia/IIa (VLA-2) che media le interazioni con il collagene, la GP Ic*/IIa (VLA-5) detta recettore della fibronectina e la GP Ic/IIa (VLA-6), ligando per la laminina. La famiglia β_2 comprende recettori localizzati sui leucociti, i quali oltre a mediare le in-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

terazioni tra leucociti sono coinvolti nell'interazione tra leucociti, proteine del complemento e fattori della coagulazione. La famiglia β_3 (GP IIIa) comprende la GP IIb/IIIa, recettore che appare specifico della linea megacariocitica, e l'integrina $\alpha_v\beta_3$, comunemente detta recettore della vitronectina[2]. Tutte le integrine possiedono, generalmente, un corto dominio citoplasmatico, altamente conservato, topograficamente in rapporto con gli eventi intracellulari, e coinvolto nel flusso di informazioni tra interno ed esterno della cellula[39]. È oggi noto, infatti, come le molecole integriniche svolgano un ruolo determinante nella trasmissione bidirezionale di segnali attraverso la membrana plasmatica. Con la trasmissione di informazioni dall'esterno verso l'interno delle cellule esse infatti partecipano alla regolazione dell'espressione genica, al differenziamento e alla crescita cellulare; viceversa, interagendo con il mezzo intracellulare, regolano la loro stessa affinità o avidità per il ligando[40].

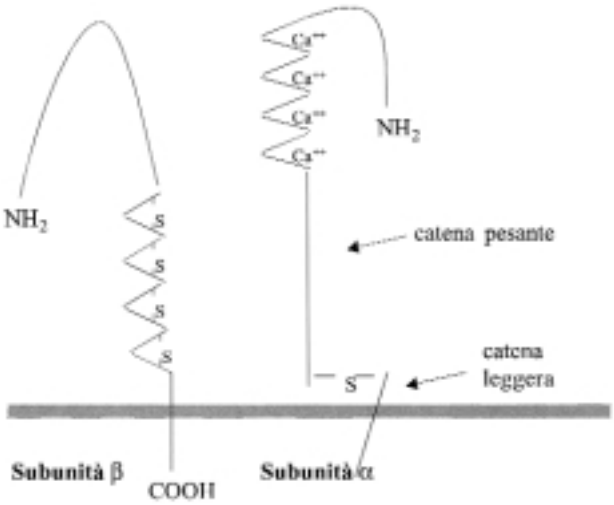

Figura 5. *Schema della struttura dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glicoproteina IIb/IIIa). Sono rappresentati i domini extracellulare, transmembranario e citoplasmatico. Da Plow et al.[44], modificata.*

Glicoproteina IIb/IIIa: struttura e funzione

Indipendentemente dalla sostanza (agonista) che, agendo attraverso specifici recettori e secondi messaggeri, stimoli la mobilizzazione intracellulare di calcio e la degranulazione piastrinica con reclutamento delle piastrine circostanti, la via finale comune per la formazione del trombo piastrinico è comunque il legame di proteine adesive (principalmente fibrinogeno e vWF) alla forma "attivata" (ligando-recettiva) di una β_3 GP piastrinica comunemente nota come GP IIb/IIIa, e tecnicamente designata $\alpha_{IIb}\beta_3$. Questo legame instaura ponti tra piastrine adiacenti con la formazione dell'aggregato piastrinico. La modificazione dell'affinità dell'integrina per i suoi ligandi è indotta da segnali intracellulari che fanno seguito all'attivazione piastrinica.

La conoscenza delle caratteristiche strutturali e funzionali di tale integrina ha consentito oggi la produzione di specifici antagonisti, dimostratisi capaci di migliorare la prognosi di pazienti con sindromi coronariche acute[41].

I geni codificanti le catene integriniche α e β sono localizzati sul braccio lungo del cromosoma 17. La catena α matura è digerita proteoliticamente a formare una catena pesante ed una leggera[42,43]. Il dominio extracellulare della molecola, contiene quattro segmenti ripetuti che costituiscono il sito di legame con gli ioni Ca^{++}, che appare essenziale per il mantenimento della struttura e funzione del complesso (Fig. 5)[42,44]. La subunità β presenta anch'essa un dominio extracellulare, uno transmembrana, ed una breve catena idrofilica all'estremità citoplasmatica[45,46] e presenta cinque regioni ricche in cisteina[47], che instaurando legami disulfidrici conferiscono una struttura globulare e compatta alla proteina[48].

La GP IIb/IIIa sulle piastrine circolanti e a riposo è incapace di legare alcuno dei ligandi solubili. In seguito all'attivazione da parte di agonisti piastrinici l'integrina subisce un cambiamento conformazionale passando da uno stato inattivo ad una condizione di elevata affinità. L'integrina riconosce in queste condizioni varie proteine adesive, quali fibrinogeno, vWF, vitronectina, fibronectina e trombospondina[49], che contengono tutte la sequenza aminoacidica RGD (Arg-Gly-Asp). Il fibrinogeno, oltre alle quattro sequenze RGD, contiene anche una sequenza di 12 aminoacidi[50], anch'essa riconoscibile da $\alpha_{IIb}\beta_3$. Il sito di legame principale per i peptidi RGD risiede nella catena β_3, e precisamente nella regione compresa tra i residui 109 e 171[51-53]. Secondo Charo et al.[54], un altro sito di legame per il fibrinogeno si troverebbe compreso tra gli aminoacidi 211 e 222 della catena β_3. Il sito di legame per il dodecapeptide del fibrinogeno risiede invece sulla catena α_{IIb}, probabilmente in prossimità della regione di legame con gli ioni Ca^{++} [44,55,56].

La porzione citoplasmatica di $\alpha_{IIb}\beta_3$, come quella di tutte le integrine, sembra mediare l'interazione con proteine citoplasmatiche, le quali, a loro volta, fungono da connessione tra le integrine e molecole intracellulari solubili di segnalazione e strutturali del citoscheletro[57]. Il dominio citoplasmatico dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ risulta essenziale per il mantenimento di uno stato di alta affinità per il ligando. I meccanismi energia-dipendenti coinvolti nella fisiologica trasmissione di segnali tra interno ed esterno della cellula agiscono su strutture intracellulari che, producendo una variazione conformazionale del dominio citoplasmatico del complesso recettoriale, provocherebbero la transizione del recettore verso uno stato di alta affinità per il ligando. Queste stesse vie di trasduzione del segnale vengono utilizzate dagli agonisti piastrinici quali trombina, adrenalina e adenosina difosfato (ADP), i quali non possiedono una capacità di attivazione diretta della GP $\alpha_{IIb}\beta_3$,

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

ma agiscono, attraverso specifici recettori sulla membrana piastrinica.

In seguito all'attivazione delle proteinchinasi cellulari, i domini citoplasmatici delle integrine (nel caso della $\alpha_{IIb}\beta_3$ la componente citoplasmatica della subunità α_{IIb}) vanno incontro a processi di fosforilazione con successiva variazione0 dell'affinità recettoriale.

Varianti e polimorfismi genici

Catena β_3. La maggior parte dei dati sulla struttura e funzione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ provengono da osservazioni su pazienti trombastenici. Le varianti finora note sono dovute prevalentemente a mutazioni puntiformi localizzate sul gene sia della catena α che della catena β e provocano generalmente un'alterazione della funzione recettoriale per il fibrinogeno, mentre l'espressione della molecola sulla superficie cellulare risulta conservata. Studi genetici hanno mostrato l'esistenza di siti ad alta frequenza di mutazioni, in corrispondenza del codone per l'arginina 214 del gene codificante la catena β_3[58]. La sequenza in esame sembra essere critica per il mantenimento della struttura terziaria dell'eterodimero.

Oltre alle mutazioni responsabili delle varianti funzionali, sono noti, a carico del complesso $\alpha_{IIb}\beta_3$, numerosi polimorfismi, inizialmente riconosciuti perché responsabili di reazioni alloantigeniche determinanti trombocitopenie immunomediate. I sistemi diallelici noti riguardano principalmente la catena β_3. Tra questi, i meno rari sono rappresentati dal cosiddetto Pen (HPA-4 o Yuk)[59], localizzato nella regione di legame RGD della GP[59] e dal sistema diallelico Sr^a (HPA-8)[60], determinato da una mutazione puntiforme che porta alla sostituzione di un'arginina con una cisteina in posizione 636 della catena β_3[61]. La presenza di questo residuo cisteinico aggiuntivo determina una variazione nella glicosilazione della GP, benché non siano al momento noti gli effetti funzionali di questa variante[61].

Il polimorfismo oggi più studiato è tuttavia il sistema HPA-1, anche noto come Pl^A. Caratterizzato molecolarmente per la prima volta da Newmann et al.[62] nel 1989, esso è dovuto ad una mutazione *missense* (C1565T) che determina una sostituzione della leucina in posizione 33 della proteina con una prolina. Nel 1996 Weiss et al.[63] hanno evidenziato una forte associazione tra la presenza dell'allele raro di questo polimorfismo e l'infarto miocardico in pazienti bianchi di età < 60 anni.

Dopo il primo studio di Weiss et al.[63], il ruolo potenziale di questa mutazione quale fattore di rischio cardiovascolare ha suscitato molto interesse. La tabella IV[63-88] illustra gli studi che si sono succeduti in seguito alla pubblicazione di Weiss in merito alla potenziale associazione tra allele Pl^{A2} e rischio di eventi cardiovascolari.

Molti degli studi sino ad oggi pubblicati, condotti sia su campioni numericamente ampi[68,69,74], che su popolazioni più ristrette[64,66], non hanno riscontrato un'associazione significativa tra l'allele più raro, Pl^{A2}, e il rischio di infarto miocardico[68,69,74], trombosi venosa[68] o accidente cerebrovascolare[68]. Tuttavia nello studio di Carter et al.[65] del 1996 veniva riaffermata l'associazione tra la presenza dell'allele Pl^{A2} e lo sviluppo di infarto miocardico in pazienti giovani, di età < 47 anni. Nel 1997, Walter et al.[71] hanno riportato una forte associazione tra l'allele raro Pl^{A2} e il rischio di trombosi dopo impianto di "stent" coronarico. Kastrati et al.[87], nel 1999, in uno studio effettuato su 1000 pazienti hanno dimostrato l'esistenza di un'associazione significativa tra Pl^{A2} e rischio di ristenosi. Il rischio appariva più elevato nei soggetti omozigoti per Pl^{A2} e in pazienti di sesso femminile. Questo risultato comunque contrasta con i rilievi di Mamotte et al.[80].

I risultati ampiamente controversi in merito all'esistenza di un'associazione tra polimorfismo Pl^{A2} ed insorgenza di eventi cardiovascolari non sono però sufficienti a escluderne in modo assoluto il coinvolgimento. Tra le difficoltà che si incontrano nel paragonare i dati raccolti annoveriamo la disomogeneità (qualitativa e numerica) dei campioni di popolazione esaminata. Inoltre indagini di popolazione indicano differenze notevoli di prevalenza dei diversi alleli nei vari gruppi etnici studiati[72,73,88,89].

Le diatribe intorno a questo polimorfismo coinvolgono anche il suo eventuale ruolo patogenetico: la sede della sostituzione aminoacidica non è infatti nel sito di legame per il fibrinogeno e non dovrebbe per questo tradursi necessariamente in alcuna variazione funzionale. Risultati preliminari non sembrano inoltre evidenziare un rapporto tra questa mutazione ed un aumento dell'aggregabilità piastrinica[90]. È di rilievo, tuttavia, che alcuni autori abbiano dimostrato l'effetto inibente esercitato da anticorpi anti-Pl^A sul legame dell'integrina con il fibrinogeno, malgrado la distanza lineare tra il sito polimorfico ed i siti di legame del fibrinogeno[91]. Studi successivi hanno in parte confermato[92,93], in parte smentito questi primi rilievi[94,95]. In particolare, il Framingham Offspring Study, che ha valutato l'effetto del genotipo sull'aggregabilità piastrinica in risposta a due agonisti fisiologici, adrenalina e ADP, ha evidenziato una soglia significativamente più bassa di aggregazione piastrinica in risposta all'adrenalina, ma non all'ADP, nei soggetti portatori dell'allele Pl^{A2} [92].

Catena α_{IIb}. Sul gene codificante la catena α_{IIb} sono stati descritti quattro polimorfismi tutti in *linkage*: il più noto, indicato come HPA-3 ovvero Bak^a/Bak^b , è determinato dalla sostituzione di un'isoleucina in posizione 843 con una serina, in prossimità dell'estremità carbossilica della catena pesante della molecola[96]. Due siti polimorfici, individuati recentemente (una singola mutazione C→G localizzata nell'introne 21, 7 basi a monte

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

Tabella IV. Caratteristiche cliniche e genetiche dei soggetti arruolati nei principali studi concernenti il polimorfismo $Pl^{A1}/Pl^{A2\ 63\text{-}88}$.

Autori	Tipo di malattia	Associazione	Casi		Controlli		
			A1/A1	A2 carriers	A1/A1	A2 carriers	Disegno
Weiss et al.[63]	IMA/angina instabile	+	43	28	55	13	CC
Marian et al.[64]	CAD	-	142	38	119	45	CC
Carter et al.[65]	IMA	-	66	35	86	28	CC
Carter et al.[65]	IMA	+	12	12	33	12	CC
Osborn et al.[66]	IMA	-	51	15	132	35	CC
Odawara et al.[67]	CAD in NIDDM	-	210	1	146	2	CC
Ridker et al.[68]	IMA/stroke/trombosi ventricolare	-	523	181	518	186	P
Samani et al.[69]	IMA	-	157	85	133	102	P
Carter et al.[70]	CAD	+	280	125	156	60	CC
Walter et al.[71]	Paziente con stent	+	255	63			CC
de Maat et al.[72]	Popolazione Inuit	-			388	27	CC
Kario et al.[73]	Giapponesi ipertesi	-	182	0	148	0	CC
Hermann et al.[74]	IMA	-	441	178	499	200	CC
Garg et al.[75]	CAD	-	894	398			F
Gardemann et al.[76]	CAD	-	1260	482	386	124	CC
Batalla et al.[77]	CAD	-	135	43			CC
Abbate et al.[78]	CAD	-	24	14	51	22	CC
Sperr et al.[79]	CAD	-	71	21	652	254	CC
Mamotte et al.[80]	CAD	-	433	156	422	148	CC
Zotz et al.[81]	IMA	-	95	29	68	23	CC
Zotz et al.[81]	CAD		71	12			CC
Durante-Mangoni et al.[82]	IMA	-	32	10	47	25	CC
Wagner et al.[83]	Stroke	-	46	19	91	31	CC
Carter et al.[84]	Stroke	+/- *	353	152	296	106	CC
Ardissino et al.[85]	IMA < 45 anni	+	141	59	163	37	CC
Laule et al.[86]	CAD	-	704	273	698	274	CC
Kastrati et al.[87]	Restenosi	+	834	316			P
Hooper et al.[88]	IMA	-	91	19	144	41	CC

Caratteristiche cliniche e genetiche relative ai soggetti arruolati nei principali studi pubblicati nel periodo compreso tra il 1996 ed il febbraio 2000 concernenti il polimorfismo Pl^{A}. La ricerca è stata effettuata mediante MEDLINE, con le seguenti parole chiave: "GP IIIa polymorphism", "HPA-1 polymorphism" e "Pl^{A1}/Pl^{A2} polymorphism". CAD = malattia coronarica; CC = caso-controllo; F = studi su famiglie; IMA = infarto miocardico acuto; NIDDM = diabete mellito non insulino-dipendente; P = studio prospettico. * associato al fumo di sigaretta.

dal codone di inizio dell'esone 22, e una seconda mutazione da C→T localizzata nell'esone 30) mostravano la stessa frequenza, ed un completo disequilibrio di *linkage* con HPA-3[97]. Un ruolo specifico del polimorfismo HPA-3 nella patologia cardiovascolare non è stato a tutt'oggi individuato. Studi iniziali non hanno rilevato un'associazione preferenziale dei due alleli con eventi ischemici[79]. Recentemente, tuttavia, alcuni dati attribuirebbero alla presenza della serina in posizione 843 un effetto protettivo nei confronti di eventi cardiovascolari (in particolare nei confronti della restenosi postangioplastica coronarica[98] e degli accidenti cerebrovascolari[99]).

Il recettore per il collagene - glicoproteina Ia/IIa ($\alpha_2\beta_1$, VLA-2)

Il collagene promuove l'adesione piastrinica attraverso recettori multipli, tra cui l'integrina $\alpha_2\beta_1$. Questo recettore interviene nell'interazione con tutti i tipi di collagene, ma solo i tipi I, II e III sono in grado di indurre attivazione piastrinica. *In vivo*, il legame della GP Ia (catena α_2) al collagene di tipo I e III (fibrillare) attiva le piastrine promuovendo la conversione della protrombina e la formazione del trombo fibrinico, funzione che permane invariata anche dopo il blocco della funzione della GP $\alpha_{IIb}\beta_3$[100].

È stata rilevata una significativa eterogeneità interindividuale nell'adesione al collagene, variabilità correlata con i livelli di $\alpha_2\beta_1$ espressi sulla superficie piastrinica, rilevati con tecniche radioisotopiche[101]. È stato ipotizzato che queste variazioni dell'espressione di membrana dell'integrina $\alpha_2\beta_1$, in soggetti normali, possano costituire un fattore di predisposizione alla trombosi. Polimorfismi nella sequenza delle catene α_2 e β_1 potrebbero essere responsabili dell'eterogeneità funzionale descritta. In particolare, è nota una correlazione tra la presenza di alcuni polimorfismi a livello del gene della catena α_2 e i livelli di espressione della GP. Queste varianti potrebbero modulare la funzione piastrinica *in vivo*, influenzando la fase iniziale dell'adesione piastrinica al collagene. È stato infatti dimostrato che, in condizioni di *shear stress* elevato, la velocità di legame tra piastrine e collagene di tipo I è influenzata da queste varianti del DNA[102].

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

Varianti polimorfiche della catena α_2

Sono state individuate numerose varianti nella sequenza nucleotidica della catena α_2 (GP Ia): due mutazioni puntiformi *missense* $A_{1648}G$ ($Lys_{505}Glu$) e $C_{2531}T$ ($Thr_{799}Met$) sono responsabili della formazione degli alloantigeni Br^a/Br^b (HPA-5) e Sit^a (HPA-12bw)[103,104]. La frequenza del fenotipo Br^a in soggetti normali di razza bianca è del 20.6%, mentre la frequenza di Br^b è pari a 99.2%. Recentemente sono stati identificati due polimorfismi silenti, in disequilibrio di *linkage* tra loro, localizzati a livello dei nucleotidi 807 (C→T) ed 873 (G→A). Benché tali varianti non determinino modificazioni nella sequenza aminoacidica, esse sono state associate ad una diversa densità del recettore e, in alcuni studi, l'omozigosi per tali varianti genetiche è apparsa correlata al rischio cardiovascolare[105,106]. Non si sa attraverso quali vie questi polimorfismi, entrambi intronici e silenti, siano in grado di modificare i livelli di espressione della catena α_2: essi potrebbero influenzare la stabilità e la velocità di degradazione dei rispettivi mRNA o, alternativamente, rappresentare semplici marcatori, legati fisicamente alla regione che modula l'espressione della catena α_2[107,108]. All'interno della popolazione la variabilità appare confinata al livello di espressione della catena α_2, mentre la catena β_1 mostra scarsa eterogeneità di espressione. Non si può tuttavia escludere che un polimorfismo della catena β_1 possa determinare una riduzione dell'espressione dell'integrina sulla superficie piastrinica o in qualche modo alterare la struttura e la funzione della subunità α_2[101]. È noto verificarsi infatti un processo di *splicing* alternativo a carico della subunità β_1 che produce una forma alternativa (β_{1S}). Questa variante potrebbe avere un ruolo nel legame con proteine tirosinfosforilate (che prevalgono in condizioni di attivazione piastrinica) ed essere quindi implicata nella modulazione dell'adesione piastrinica nel corso del processo di attivazione[101,109].

Il recettore della vitronectina ($\alpha_V\beta_3$)

Come la GP $\alpha_{IIb}\beta_3$, anche il recettore della vitronectina rappresenta un recettore integrinico promiscuo, in grado di legare un certo numero di proteine adesive contenenti la sequenza RGD, tra cui fibrinogeno, vitronectina, osteopontina, e trombospondina. Il numero di recettori della vitronectina sulla superficie piastrinica risulta alquanto limitato, mentre largamente rappresentato è questo recettore a livello delle cellule endoteliali, dei monociti e dei condrociti[110]. Come detto sopra, mutazioni a carico sia della catena α_{IIb} che di quella β_1 possono produrre i difetti emostatici e le anomalie dell'aggregazione piastrinica tipiche della tromboastenia di Glanzmann. Non è invece noto se mutazioni a carico del gene codificante per la β_3, comune sia alla $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa) che alla $\alpha_V\beta_3$, siano in grado di influenzare l'espressione e la funzione del complesso $\alpha_V\beta_3$ nei tipi cellulari in cui tale complesso è espresso. È evidenza recente, d'altro canto, che questo recettore sarebbe coinvolto in alcuni processi di patologia vascolare: in particolare l'espressione dell'integrina β_3 a livello delle cellule della parete vascolare risulterebbe aumentata in risposta al danno vascolare prodotto dall'angioplastica[111,112]. Questa integrina verrebbe espressa nelle cellule muscolari lisce della neointima nella sede del danno vascolare[112], come pure nelle cellule muscolari lisce di coronarie arteriosclerotiche in cuori umani espiantati per trapianto cardiaco[113]. Questo recettore sarebbe quindi coinvolto, insieme ad uno dei suoi ligandi, l'osteopontina, nel processo di restenosi postangioplastica. I livelli di osteopontina circolanti risultano infatti drammaticamente aumentati in seguito ai processi di migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce della parete coronarica che si verificano nella restenosi[111]. Non è al momento noto se esista un'influenza dei diversi polimorfismi del gene della catena β_3 sull'espressione funzionale di questo recettore in condizioni sia fisiologiche che di patologia vascolare.

I recettori per gli agonisti dell'attivazione piastrinica

Numerosi agonisti solubili stimolano il processo di aggregazione interagendo con specifiche popolazioni di recettori sulla membrana piastrinica. Poco è noto circa la patologia dei recettori piastrinici primari o dei meccanismi che portano all'esposizione dei determinanti recettoriali per il fibrinogeno sulla GP $\alpha_{IIb}\beta_3$ in conseguenza della loro attivazione[110]. Questa GP è mantenuta in uno stato di bassa affinità da vincoli imposti dal citoscheletro; è stato rilevato infatti che dosi submassimali di ADP, insufficienti per l'innesco dell'aggregazione piastrinica, stimolano il turnover dell'actina, eliminando i vincoli sulla GP IIb/IIIa e permettendole di assumere uno stato di elevata affinità per il fibrinogeno[114]. Un numero crescente di evidenze sia cliniche[115] che sperimentali[94] sta svelando l'esistenza di una variabilità interindividuale dell'aggregazione piastrinica, che potrebbe in parte avere una base genetica. Studi preliminari hanno indagato la relazione tra tale variabilità delle risposte aggregometriche ed i polimorfismi della $\alpha_{IIb}\beta_3$ (in particolare il Pl^A), con risultati contradditori. Si può affermare, tuttavia, che la variabilità di risposta rappresenti una manifestazione integrata di differenze funzionali non necessariamente a carico della GP $\alpha_{IIb}\beta_3$, struttura che rappresenta soltanto l'ultimo anello di una lunga e complessa catena di interazioni tra recettori di membrana ed eventi intracellulari. Un'ipotesi alternativa è che parte della variabilità dell'aggregazione piastrinica (per esempio, diversa soglia di attivazione piastrinica in risposta a basse concentrazioni di ADP[116] e variabile risposta individuale ad una dose standard di un antagonista della GP $\alpha_{IIb}\beta_3$,

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

quale l'abciximab[115]) si fondi su una differenza interindividuale nella funzione dei recettori degli agonisti primari.

Il recettore dell'adenosina difosfato. L'ADP è un agente aggregante ritenuto fattore chiave nello sviluppo della trombosi arteriosa[117,118]. Recentemente, la somministrazione a pazienti con malattia aterosclerotica di un agente antipiastrinico che interferisce con le vie di attivazione ADP-dipendenti, il clopidogrel, si è dimostrata efficace nel ridurre il rischio di eventi coronarici in maniera simile all'aspirina[119]. Sono state riportate estese evidenze circa l'esistenza di diversi recettori per l'ADP sulle piastrine umane: il recettore P2X1 che media l'ingresso di cationi, il recettore P2Y1 responsabile della mobilizzazione del calcio intracellulare ed il recettore $P2Y_{AC}$ che media l'inibizione dell'adenilil-ciclasi (Fig. 6)[120]. È nota l'esistenza di una variante funzionale del recettore dell'ADP responsabile di una sindrome di sanguinamento simile a quella indotta farmacologicamente dai tienopiridinici[121,122]. Il difetto del recettore interferisce direttamente con la capacità dell'ADP di modulare l'attivazione della GP $\alpha_{IIb}\beta_3$, per cui l'agonista, anche ad alte dosi, induce un'aggregazione piastrinica limitata e rapidamente reversibile. Tale difetto funzionale è stato dimostrato essere localizzato a livello del recettore $P2Y_{AC}$ dell'ADP, benché non ne sia ancora nota la natura molecolare[123,124].

Il recettore per l'adrenalina. Il ruolo dell'adrenalina nell'attivazione delle piastrine umane rimane tuttora dibattuto[125]. Numerosi studi paiono supportare l'ipotesi che essa sia un amplificatore dell'attivazione piastrinica, pur non essendo un agonista diretto[126,127]. Agendo attraverso i recettori adrenergici α_2, l'adrenalina può favorire l'esposizione dei siti di legame per il fibrinogeno della GP $\alpha_{IIb}\beta_3$ in presenza di ADP. È stata riportata una variabilità interindividuale nella risposta all'adrenalina. Uno studio pilota di famiglie di donatori sani giapponesi ha evidenziato una segregazione familiare del grado di risposta all'adrenalina, dovuta non ad un'alterata risposta del recettore, ma ad una ridotta espressione di superficie del recettore stesso[128]. Recentemente sono stati riportati un polimorfismo del recettore adrenergico α_2 associato ad ipertensione arteriosa ed aumentata aggregabilità piastrinica[129], e una variante della subunità β_3 delle proteine G umane, in cui l'allele mutato (C825T) risulta associato ad ipertensione arteriosa[130] e a vasocostrizione coronarica con segni di ischemia[131].

Il recettore della trombina. L'attivazione delle piastrine umane da parte della trombina è mediata primariamente da recettori attivati da proteasi (PAR), attraverso un meccanismo di esposizione, dopo una proteolisi minore specifica da parte della proteasi, di un ligando non in fase solubile, bensì legato "a guinzaglio" all'estremo aminoterminale del dominio extracellulare. L'esposizione di questo ligando causa un'attivazione intramolecolare del recettore[132]. Evidenze recenti suggeriscono che i recettori PAR1 e PAR4 rappresentino i principali recettori trombinici sulle piastrine. In particolare, sembra probabile che la trombi-

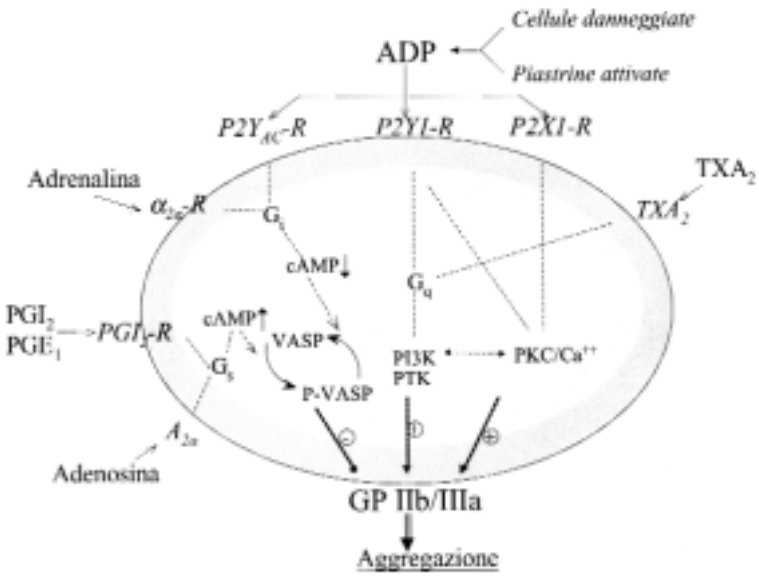

Figura 6. *Rappresentazione dei recettori e dei segnali intracellulari legati alla stimolazione mediata da adenosina difosfato (ADP) ed adrenalina. P2YAC indica il recettore per l'ADP legato all'adenil-ciclasi (AC) e responsabile dell'aggregazione piastrinica macroscopicamente evidente; il recettore P2X1 media il flusso di ioni calcio ADP-dipendente; il recettore P2Y1 accoppiato alla fosfolipasi C/proteina Gq appare mediare la mobilizzazione del calcio e la variazione conformazionale. Il recettore ADP-P2YAC accoppiato al sistema delle proteine Gi ed il recettore adrenergico (α_{2A}-R) mediano la fosforilazione (mentre i recettori accoppiati alle proteine Gs mediano la de-fosforilazione) della "vasodilator-stimulated phosphoprotein" (VASP) che mantiene in uno stato "inibito" la glicoproteina (GP) IIb/IIIa. cAMP = adenosin-monofosfato ciclico; PKC = proteinchinasi C. Da Geiger et al.[120], modificata.*

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

na dia inizio a una risposta piastrinica molto forte attraverso il recettore PAR1, fino all'esposizione di fosfolipidi anionici sulla membrana, responsabili a loro volta dell'assemblaggio accelerato di specifici fattori della coagulazione attivati sulla superficie piastrinica[133]. La risposta mediata dal recettore PAR4 richiama invece quella degli agonisti deboli del processo di aggregazione, quali ADP ed adrenalina, essendo caratterizzata da aggregazione piastrinica senza l'esposizione di livelli soglia di fosfolipidi anionici in grado di accelerare significativamente il processo coagulativo[133].

Esistono alcune evidenze funzionali di una certa variabilità interindividuale della funzione di questi recettori[110]; non sono note tuttavia le basi molecolari e genetiche di tale variabilità.

Conclusioni

Lo studio dei disordini piastrinici legati a difetti genetici mendeliani, benché di impatto limitato nella popolazione, ha avuto il merito di gettar luce su importanti aspetti molecolari del processo emostatico e di contribuire allo sviluppo di farmaci antitrombotici. È risultato inoltre chiaro come, accanto a difetti monogenici semplici, esistessero varianti geneticamente determinate in grado di influenzare il rischio di malattie a prevalenza ben più ampia, quale la malattia vascolare arteriosclerotica. La sfida dei prossimi anni è quindi di chiarire i meccanismi attraverso cui queste variazioni genetiche e strutturali dei recettori piastrinici di membrana possano tradursi in un aumento o in una diminuzione del rischio di eventi cardiovascolari.

Rimangono inoltre da comprendere le modalità con cui questi determinanti recettoriali interagiscono con i fattori di rischio ambientali nel definire il rischio globale di ciascun soggetto.

Riassunto

Le piastrine presentano proteine recettoriali di membrana la cui struttura si è adattata, nel corso dell'evoluzione, ad arrestare l'emorragia. Questi recettori sono implicati tuttavia ancorché nella trombosi, e la loro variabilità strutturale è probabilmente in grado di spiegare parte della variabilità nella suscettibilità interindividuale agli eventi trombotici. Questa rassegna offre una panoramica sulla struttura molecolare e la funzione dei recettori piastrinici di membrana studiate anche in rapporto alla variabilità della funzione piastrinica nella popolazione generale, nell'intento di coglierne altresì le possibili implicazioni per il rischio aterotrombotico.

Parole chiave: Genetica; Malattia coronarica; Piastrine; Recettori.

Bibliografia

1. Anon B. A new blood corpuscle. Lancet 1882; i: 111-2.
2. Coller BS. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. The heart and cardiovascular system. New York, NY: Raven Press, 1993: 219-75.
3. Kroll M, Hellums J, McIntire L, Schafer A, Moake J. Platelets and shear stress. Blood 1996; 88: 1525-41.
4. Alevriadou BR, McIntire LV. Thrombosis and hemorrhage. Cambridge, MA: Blackwell Science, 1995.
5. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. Thromb Haemost 1993; 70: 119-23.
6. O'Brien J. Shear-induced platelet aggregation. Lancet 1990; 335: 711-3.
7. Goto S, Ikeda Y, Murata M, et al. Epinephrine augments von Willebrand factor dependent shear induced platelet aggregation. Circulation 1992; 86: 1859-63.
8. Roth GJ. Platelets and blood vessels: the adhesion event. Immunol Today 1992; 13: 100-5.
9. Resnick N, Gimbrone M. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. FASEB J 1995; 9: 874-82.
10. Roth G. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. Blood 1991; 77: 5-19.
11. Lipfert L, Haimovich B, Schaller M, Cobb B, Parsons J. Integrin dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125fak in platelets. J Cell Biol 1992; 119: 905-12.
12. Chow TW, Hellums JD, Moake JL, Kroll MH. Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. Blood 1992; 80: 113-20.
13. Ikeda Y, Handa M, Kamata T, et al. Transmembrane calcium influx associated with von Willebrand factor binding to GP Ib in the initiation of shear induced platelet aggregation. Thromb Haemost 1993; 8: 213-7.
14. Badimon L, Badimon J, Chesebro J, Fuster V. von Willebrand factor and cardiovascular disease. Thromb Haemost 1993; 70: 111-8.
15. Ip J, Fuster V, Badimon L, Taubman M, Badimon J, Chesebro J. Syndromes of accelerated atherosclerosis. Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. J Am Coll Cardiol 1990; 15: 1667-87.
16. Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose J, Badimon J, Chesebro J. Insights into the pathogenesis of acute ischemic syndromes. Circulation 1988; 77: 1213-20.
17. Nichols T, Bellinger D, Johnson T, Lamb M, Griggs T. von Willebrand's disease prevents occlusive thrombosis in stenosed and injured porcine coronary arteries. Circ Res 1986; 59: 15-26.
18. Strony J, Phillips M, Brands D, Moake J, Adelman D. Aurintricarboxylic acid in a canine model of coronary artery thrombosis. Circulation 1990; 81: 1106-14.
19. Yao S, Ober J, Garfinkel L, et al. Blockade of platelet membrane glycoprotein Ib receptors delays intracoronary thrombogenesis, enhances thrombolysis, and delays coronary artery reocclusion in dogs. Circulation 1994; 89: 2822-8.
20. Matsuno H, Kozawa O, Niwa M, Uematsu T. Inhibition of von Willebrand factor binding to platelet GP Ib by a fractioned aurintriaroxylic acid prevents restenosis after vascular injury in hamster carotid artery. Circulation 1997; 96: 1299-304.
21. Bowie E. The role of von Willebrand factor in thrombosis. In: Poller L, Thomson J, eds. Thrombosis and its management. London: Churchill Livingstone, 1993: 134-40.
22. Thompson S, Kienast J, Pyke S, Haverkate F, van de Loo J.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. N Engl J Med 1995; 332: 635-41.
23. Lanza F, Morales M, de la Salle C, et al. Cloning and characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. J Biol Chem 1993; 268: 20801-7.
24. Ravanat C, Morales M, Azorsa D, et al. Gene cloning of rat and mouse platelet glycoprotein V: identification of megakaryocyte specific promoters and demonstration of functional thrombin cleavage. Blood 1997; 89: 3253-62.
25. Jamieson G. Pathophysiology of platelet thrombin receptors. Thromb Haemost 1997; 78: 242-6.
26. Wenger R, Wicki A, Kieffer N, Adholph S, Hameister H. The 5' flanking region and chromosomal localization of the gene encoding human platelet membrane glycoprotein Ib alpha. Gene 1989; 85: 517-24.
27. Murata M, Furihata K, Ishida F, Russell S, Ware J, Ruggeri Z. Genetic and structural characterization of an aminoacid dimorphism in glycoprotein Ib alpha involved in platelet transfusion refractoriness. Blood 1992; 79: 3086-90.
28. Ishida F, Furihata K, Ishida K, et al. The largest variant of platelet glycoprotein Ib alpha has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine 145. Blood 1995; 86: 1357-60.
29. Simsek S, Bleeker PM, van der Schoot CE, von dem Borne AE. Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ib alpha and HPA-2 alloantigens. Thromb Haemost 1994; 72: 757-61.
30. Lòpez J, Ludwig EH, McCarthy BJ. Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/function implications. J Biol Chem 1992; 267: 10055-61.
31. Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. Circulation 1997; 96: 3281-6.
32. Murata M, Kawano K, Matsubara Y, Ishikawa K, Watanabe K, Ikeda Y. Genetic polymorphisms and risk of coronary artery disease. Semin Thromb Hemost 1998; 24: 245-50.
33. Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, Vicente V. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ibα associated with arterial thrombotic disease. Blood 1998; 92: 2771-6.
34. Mazzucato M, Pradella P, de Angelis V, Steffan A, de Marco L. Frequency and functional relevance of genetic threonine145/methionine 145 dimorphism in platelet glycoprotein Ib alpha in an Italian population. Transfusion 1996; 36: 891-4.
35. Kaski S, Kekomaki R, Partanen J. Systematic screening for genetic polymorphism in human platelet glycoprotein Ib alpha. Immunogenetics 1996; 44: 170-6.
36. Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, Lopez JA. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GPIb-IX-V complex. Blood 1999; 94: 186-91.
37. Croft S, Hampton K, Daly M, Steeds R, Channer K, Samani N. Kozak sequence polymorphism in the platelet GPIbalpha gene is not associated with risk of myocardial infarction. Blood 2000; 95: 2183-4.
38. Koskela S, Kekomati R, Partanen J. Genetic polymorphism in human platelet glycoprotein GP Ib/IX/V complex is enriched in GP V. Tissue Antigens 1998; 52: 5236-41.
39. Ginsberg M, Du X, O'Toole T, Loftus J. Platelet integrins. Thromb Haemost 1995; 74: 352-9.
40. Schwartz MA, Schaller MO, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. Annu Rev Cell Dev Biol 1995; 11: 549-99.
41. Topol E, Byzova T, Plow E. Platelet GP IIb/IIIa blockers. Lancet 1999; 353: 227-31.
42. Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. Annu Rev Cell Dev Biol 1990; 6: 329-57.
43. Nurden AT. Human platelet membrane glycoproteins. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. Haemostasis and thrombosis. 3rd edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: 178-203.
44. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GP IIb-IIIa: a status report. Semin Thromb Hemost 1992; 18: 324-32.
45. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. Blood 1993; 81: 2827-43.
46. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. Blood 1988; 71: 831-43.
47. Fitzgerald LA, Steiner B, Rall SC, Lo SS, Phillips DR. Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". J Biol Chem 1987; 262: 3936-9.
48. Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta subunits of the integrin family. Biochem J 1991; 274: 63-71.
49. Ginsberg MH, Du X, O'Toole TE, Loftus JC. Platelet integrins. Thromb Haemost 1995; 74: 352-9.
50. Kloczewiak M, Timmons S, Hawiger J. Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen gamma chain. Biochem Biophys Res Commun 1982; 107: 181-7.
51. D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Lam SC, Plow EF. Location of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. Science1988; 242: 91-3.
52. Bajt ML, Loftus JC. Mutation of a ligand binding domain of β_3 integrin. Integral role of oxygenated residues in αIIbβ3 (GPIIB-IIIa) receptor function. J Biol Chem 1994; 269: 20913-9.
53. Loftus JC, O'Toole TE, Plow EF, Glass A, Frelinger AL, Ginsberg MH. A β_3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent action-dependent conformation. Science 1990; 249: 915-8.
54. Charo IF, Nannizzi L, Phillips DR, Hsu MA, Scarborough RM. Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. J Biol Chem 1991; 266: 1414-21.
55. Santoro SA, Lawing WJ. Competition for related but non-identical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. Cell 1987; 48: 867-73.
56. D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Plow EF. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium domain of its alpha subunit. J Biol Chem 1990; 265: 3440-6.
57. Sastry SK, Horwitz AF. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. Curr Opin Cell Biol 1993; 5: 819-31.
58. French DL. The molecular genetics of Glanzmann's thrombasthenia. Platelets 1998; 9: 5-20.
59. Wang A, Furihata K, McFarland JG, Friedman K, Aster RH, Newman PJ. An amino acid polymorphism within the RGD domain of platelet glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the PenA/PenB alloantigen system. J Clin Invest 1992; 90: 2038-43.
60. Kroll H, Kiefel V, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Sra, a private platelet antigen on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. Blood 1990; 76: 2296-302.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

61. Santoso S, Kalb R, Kroll H, et al. A point mutation leads to an unpaired cysteine residue and a molecular weight polymorphism of a functional platelet beta 3 integrin subunit. The Sra alloantigen system of GP IIIa. J Biol Chem 1994; 269: 8439-44.
62. Newmann PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. J Clin Invest 1989; 83: 1778-81.
63. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. N Engl J Med 1996; 334: 1090-4.
64. Marian AJ, Brugada R, Kleiman NS. Platelet glycoprotein IIIa PlA polymorphism and myocardial infarction. (letter) N Engl J Med 1996; 335: 1071-2.
65. Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa PlA polymorphism and myocardial infarction [see comment]. (letter) N Engl J Med 1996; 335: 1072-3.
66. Osborn SV, Hampton KK, Smillie D, Channer KS, Daly ME. Platelet glycoprotein IIIa gene polymorphism and myocardial infarction. (letter) Lancet 1996; 348: 1309-10.
67. Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K. Platelet glycoprotein IIIa PlA polymorphism and Japanese diabetic patients with coronary heart disease. (letter) Lancet 1996; 348: 1310.
68. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. Lancet 1997; 349: 385-8.
69. Samani NJ, Lodwick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction. Cardiovasc Res 1997; 33: 693-7.
70. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet Pl(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bbeta 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. Circulation 1997; 96: 1424-31.
71. Walter DH, Schächinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM. Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. Lancet 1997; 350: 1217-9.
72. de Maat MP, Bladbjerg EM, Johansen LG, Bentzen J, Jespersen J. PlA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of cardiovascular disease. (letter) Lancet 1997; 349: 1099-100.
73. Kario K, Shiga N, Ikeda U, Shimada K, Matsuo M. PlA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of cardiovascular disease. (letter) Lancet 1997; 349: 1100.
74. Herrmann SM, Poirier O, Marques Vidal P, et al. The Leu33/Pro polymorphism (PlA1/PlA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. Etude Cas-Temoins de l'infarctus du myocarde. Thromb Haemost 1997; 77: 1179-81.
75. Garg UC, Arnett DK, Folsom AR, Province MA, Williams RR, Eckfeldt JH. Lack of association between platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor PlA polymorphism and coronary artery disease or carotid intima-media thickness. Thromb Res 1998; 89: 85-9.
76. Gardemann A, Humme J, Sticker J, et al. Association of the platelet glycoprotein IIIa PlA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. Thromb Haemost 1998; 80: 214-7.
77. Batalla A, Cubero GI, Reguero JR, Coto E. Platelet glycoprotein Pl^{A} polymorphism, myocardial infarction, and extent of coronary artery disease. Circulation 1998; 98: 826-7.
78. Abbate R, Marcucci R, Camacho-Vanegas O, et al. Role of platelet glycoprotein PL(A1/A2) polymorphism in restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Am J Cardiol 1998; 82: 524-5.
79. Sperr WR, Huber K, Roden M, et al. Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. Thromb Res 1998; 90: 117-23.
80. Mamotte CDS, van Bockxmeer FM, Taylor RR. $Pl^{A2/A2}$ polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty. Am J Cardiol 1998; 82: 13-6.
81. Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, et al. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PlA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. Thromb Haemost 1998; 79: 731-5.
82. Durante-Mangoni E, Davies GJ, Nabeel A, Ruggiero G, Tuddenham EG. Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIa gene PlA2 polymorphism. Thromb Haemost 1998; 80: 218-9.
83. Wagner KR, Giles WH, Johnson CJ, et al. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism P1A2 and ischemic stroke risk: the stroke prevention in young women study. Stroke 1998; 29: 581-5.
84. Carter AM, Mansfield MW, Grant PJ. Polymorphisms of platelet glycoproteins in relation to macrovascular disease in type 2 diabetes mellitus. Diabet Med 1998; 15: 315-9.
85. Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. Blood 1999; 94: 46-51.
86. Laule M, Cascorbi I, Stangl V, et al. A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa and association with excess procedural risk for coronary catheter interventions: a case-controlled study. Lancet 1999; 353: 708-12.
87. Kastrati A, Schomig A, Seyfarth M, et al. PlA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. Circulation 1999; 99: 1005-10.
88. Hooper WC, Lally C, Austin H, et al. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GP IIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. Chest 1999; 116: 880-6.
89. Pastinen T, Perola M, Niini P, et al. Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. Hum Mol Genet 1998; 7: 1453-62.
90. Goldschmidt Clermont P, Weiss E, Shear W, et al. Platelets from PlA2(-) individuals bind more exogenous fibrinogen than platelet from PlA2(+) individuals. (abstr) Blood 1996; 88: 26A.
91. van Leeuwen EF, Leeksma OC, van Mourik JA, Engelfriet CP, von dem Borne AE. Effect of the binding of anti-ZWA antibodies on platelet function. Vox Sang 1984; 47: 280-9.
92. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GP IIIa PlA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1142-7.
93. Goodall AH, Curzen N, Panesar M, et al. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PlA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. Eur Heart J 1999; 20: 742-7.
94. Lasne D, Krenn M, Pingault V, et al. Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of Pl^{A2} polymorphism. Br J Haematol 1997; 99: 801-7.
95. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PlA2): no association with platelet fibrinogen binding. Br J Haematol 1999; 105: 664-6.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.144.33.41 Mon, 29 Apr 2024, 12:15:04

96. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newmann PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with Bak^a /Bak^b alloantigen system. Blood 1990; 75: 2343-8.
97. Ruan J, Peyruchaud O, Nurden A, Bourre F. Linkage of four polymorphisms on the alphaIIb gene. Br J Haematol 1998; 102: 622-5.
98. Goodall A, Knight CJ, Curzen N, Hurd C, Fox K, Ouwehand V. Ile-843-Ser polymorphism in the GPIIb gene and prognosis after coronary angioplasty. In: Proceedings Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. Paris, 1999: 907-15.
99. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Association of the platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism with survival after acute ischaemic stroke. Stroke 1999; 30: 2606-11.
100. Nieuwenhuis H, Akkerman J, Houdijk W, Sixma JJ. Human blood platelet showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. Nature 1985; 318: 470-2.
101. Kunicki T, Orchekowski R, Annis D, Honda Y. Variability of integrin $\alpha_2\beta_1$ activity on human platelets. Blood 1993; 82: 2693-703.
102. Kritzig M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ. Nucleotide polymorphisms in the α_2 gene define multiple alleles which are associated with differences in platelet $\alpha_2\beta_1$. Blood 1998; 92: 2382-8.
103. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller-Eckhart C. The Bra/Brb alloantigen system on human platelets. Blood 1989; 73: 2219-23.
104. Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller Eckhardt C, Newman PJ. The human platelet alloantigens Br(a) and Br(b) are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2). J Clin Invest 1993; 92: 2427-32.
105. Di Paola J, Federici AB, Mannucci PM, et al. Low platelet alpha2/beta1 levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. Blood 1999; 93: 3578-82.
106. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, et al. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. Lancet 1999; 353: 351-4.
107. Kunicki TJ, Kritzig M, Annis DS, Nugend DJ. Hereditary variation in platelet integrin $\alpha_2\beta_1$ density is associated with two silent polymorphisms in the α_2 gene coding sequence. Blood 1997; 89: 1939-43.
108. Beelman CA, Parker R. Degradation of mRNA in eucariotes. Cell 1995; 81: 179-83.
109. Languino L, Ruoslahti E. An alternative form of the integrin β_1 subunit with a variant cytoplasmatic domain. J Biol Chem 1992; 267: 7116-20.
110. Nurden AT. Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance. Thromb Haemost 1995; 74: 345-51.
111. Panda D, Kundu G, Lee B, et al. Potential roles of osteopontin and alphaV-beta3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 9308-13.
112. Stouffer G, Hu Z, Sajid M, et al. Beta3 integrins are up-regulated after vascular injury and modulate thrombospondin- and thrombin-induced proliferation of cultured smooth muscle cells. Circulation 1998; 97: 907-15.
113. Hoshiga M, Alpers C, Smith L, Giachelli C, Schwartz S. AlphaV-beta3 integrin expression in normal and atherosclerotic arteries. Circ Res 1995; 77: 1129-35.
114. Bennett JS, Zigmond S, Vilaire G, Cunningham ME, Bednar B. The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin alpha(IIb)beta(3) for fibrinogen. J Biol Chem 1999; 274: 25301-7.
115. Bihour C, Durrieu-Jais C, Macchi L, et al. Expression of markers of platelet activation and the interpatient variation in response to abciximab. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 212-9.
116. Holmes MB, Sobel BE, Howard DB, Schneider DJ. Differences between activation thresholds for platelet P-selectin glycoprotein IIb-IIIa expression and their clinical implications. Thromb Res 1999; 95: 75-82.
117. Gaardner A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owen P. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. Nature 1961; 192: 531-2.
118. Born G. Adenosine diphosphate as a mediator of platelet aggregation in vivo: an editorial view. Circulation 1985; 72: 741-6.
119. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events. Lancet 1996; 348: 1329-39.
120. Geiger J, Brich J, Honig Liedl P, et al. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2007-11.
121. Cattaneo M, Lecchi A, Randi A, McGregor J, Mannucci PM. Identification of a new congenital defect of platelet function charcterized by a severe impairment of platelet response to adenosine diphosphate. Blood 1992; 80: 2787-96.
122. Nurden P, Savi P, Heilmann E, et al. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. J Clin Invest 1995; 95: 1612-22.
123. Humbert M, Nurden P, Bihour C, et al. Ultrastructural studies of platelet aggregates from human subjects receiving clopidogrel and from a patient with an inherited defect of an ADP dependent pathway of platelet activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 1532-42.
124. Gachet C, Hechler B, Leon C, et al. Activation of ADP receptors and platelet function. Thromb Haemost 1997; 78: 271-5.
125. Lalau Keraly C, Kinlough-Rathbone R, Packham M, Suzuki H, Mustard J. Conditions affecting the responses of human platelets to epinephrine. Thromb Haemost 1988; 60: 209-16.
126. Lanza F, Beretz A, Stierle A, Hanau D, Kubina M, Cazenave J. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. Am J Physiol 1988; 255: H1276-H1288.
127. Steen V, Holmsen H, Aarbakke G. The platelet stimulating effect of adrenaline through alpha 2 adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true stimulatory platelet agonist. Thromb Haemost 1993; 70: 506-13.
128. Kambayashi J, Shinoki N, Nakamura T, Ariyoshi H, Kawasaki T. Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese. Thromb Res 1996; 81: 85-90.
129. Spalding A, Vaitkevicius H, Dill S, MacKenzie S, Schmaier A, Lockette W. Mechanism of epinephrine-induced platelet aggregation. Hypertension 1998; 31: 603-7.
130. Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, et al. Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat Genet 1998; 18: 45-8.
131. Baumgart D, Naber C, Haude M, et al. G protein beta3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on alfa2-adrenoceptor activation. Circ Res 1999; 85: 965-73.
132. Vu T, Hung D, Wheaton V, Coughlin S. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell 1991; 64: 1057-68.
133. Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 11189-93.