

Istituto di Clinica Medica Generale e Terapia Medica III
Università degli Studi di Milano
(Direttore: Prof. N. DI GUARDI)

METODI DI STUDIO DELLA FUNZIONE PIASTRINICA

(*La ricerca degli aggregati piastrinici circolanti*)

DANIELA MARI MARCO MOLA

Alcuni dati morfologici ed autoptici^{4,6} e studi sperimentali^{5,7}, eseguiti iniettando nell'animale agenti aggreganti, hanno dimostrato che la formazione di aggregati piastrinici circolanti è in grado di occludere la circolazione terminale e di causare quindi infarti in vari organi. Con questi presupposti fisiopatologici è stata recentemente proposta e messa a punto una tecnica per dimostrare aggregati piastrinici circolanti¹⁵. Essa è basata sul rapporto fra il numero delle piastrine nel sangue raccolto in formalina e nel sangue raccolto senza questo fissativo. In seguito alla fissazione, gli aggregati piastrinici eventualmente presenti nella circolazione diventano irreversibili e sono rimossi dal sangue con centrifugazione a bassa velocità, determinando riduzione del numero delle piastrine rispetto al sangue raccolto in EDTA, in cui questo agente chelante disaggrega le piastrine stesse. Di conseguenza, il rapporto fra il conteggio delle piastrine nel campione formalinato rispetto al campione EDTA (*platelet aggregation ratio*, PAR) tende a diminuire in presenza di aggregati piastrinici circolanti. Negli ultimi anni tale parametro è stato estensivamente studiato in numerosi laboratori per valutarne la capacità di mettere in evidenza e di quantizzare un'abnorme reattività delle piastrine nelle malattie tromboemboliche. La variabilità dei dati ottenuti e la possibilità che questa potesse essere legata a problemi metodologici ci hanno indotto a rivedere criticamente questo metodo e la sua utilità clinica.

Dati della letteratura

Nel lavoro originale di WU e HOAK¹⁵ sono stati studiati pazienti con manifestazioni cliniche presumibilmente causate da tromboembolie arteriose. Il PAR era si-

La Ricerca Clin. Lab. 10 (Suppl. 2), 19, 1980.

gnificativamente più basso rispetto ai controlli normali nei pazienti con ischemia cerebrale transitoria (TIA), infarto acuto del miocardio ed insufficienza arteriosa periferica acuta, mentre i risultati erano sovrapponibili ai valori normali nei pazienti con angina cronica od insufficienza arteriosa cronica. In un successivo lavoro, Wu e Hoak¹⁶ confermavano i loro dati in una più ampia casistica di pazienti con TIA. Gli stessi AA. eseguivano poi uno studio¹⁴ in pazienti con trombosi venosa idiopatica ricorrente: circa la metà dei pazienti aveva valori diminuiti di PAR. L'alterazione dei *tests* rimaneva invariata per un periodo variabile da mesi a settimane e ritornava normale utilizzando un'associazione di aspirina e dipiridamolo. La validità della prova veniva confermata anche da altri AA.^{1,2,3}, che riscontravano aumento degli aggregati piastrinici circolanti in pazienti con infarto del miocardio e malattie cerebrovascolari.

Successivi studi sollevavano però alcuni problemi circa l'utilità clinica della prova. Infatti, PRAZICH e Coll.¹⁰ pubblicavano risultati contrastanti rispetto a quelli sopra descritti, riferendo che fra la popolazione dei soggetti normali e quella dei pazienti con ischemia del miocardio e con TIA non esistevano differenze statisticamente significative. Inoltre, la riproducibilità del metodo nei diversi campioni di sangue prelevati nello stesso giorno era insoddisfacente, nei pazienti ancor più che nei soggetti normali. Questa osservazione, secondo gli AA., lascia qualche dubbio circa l'attribuzione di un valore definitivo al *test*, specie se eseguito una sola volta in pazienti acuti. ROHRER e Coll.¹² non evidenziavano alcuna differenza fra i valori dei controlli e quelli dei pazienti con infarto del miocardio o condizioni predisponenti alla trombosi arteriosa. METHA e METHA⁸ riferivano infine di aver riscontrato un PAR significativamente più basso in pazienti con infarto nella fase acuta, mentre il parametro tendeva a normalizzarsi dopo il settimo giorno.

RAPER¹¹ ha recentemente sollevato dubbi anche sulla rilevanza fisiopatologica del *test*, escludendo che esso misuri realmente la presenza di aggregati piastrinici circolanti. La differenza del conteggio delle due soluzioni piastriniche utilizzate (EDTA ed EDTA-formalina) potrebbe infatti essere determinata non dalla presenza di aggregati, ma da fattori quali la differente viscosità delle due soluzioni, nonché dall'influenza della formalina sulle proprietà di sedimentazione delle piastrine attraverso modificazioni del raggio, della gravità specifica e del fluido di sospensione.

In tutti i lavori pubblicati, la metodologia di esecuzione appare assai differente nei diversi laboratori, per una serie di dettagli quali il tipo di ago, la concentrazione dell'anticoagulante, le modalità di prelievo, etc. È possibile quindi che alle differenze metodologiche vadano imputati i variabili risultati clinici. Per una migliore valutazione di questo *test* è apparsa necessaria una sua standardizzazione precisa, che è stata concordata in un *Workshop* internazionale svoltosi a Parigi nel 1978.

Vengono qui descritti gli accordi raggiunti circa la modalità di esecuzione.

METODOLOGIA

Reagenti

Formalina al 4% in volume - Si prepara aggiungendo 10 ml di formaldeide 40% (v/v) a 90 ml di acqua distillata.

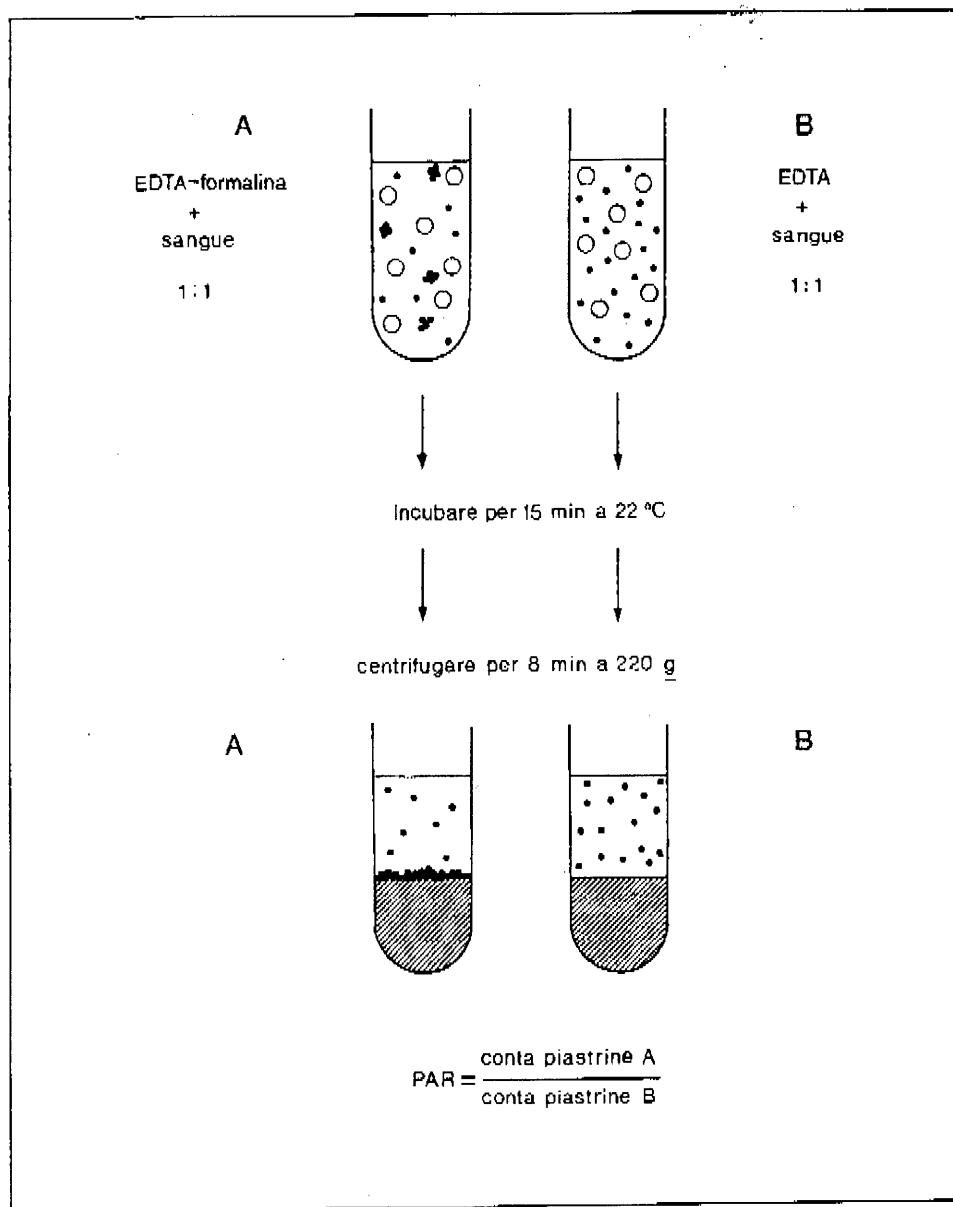


Fig. 1 - Aggregati piastrinici circolanti secondo il test di Wu e Hoak; modalità di esecuzione del test (○ globuli rossi; ● piastrine isolate; ▲ aggregati piastrinici; le aree tratteggiate corrispondono alla parte di sangue che sedimenta con la centrifugazione).

EDTA 0,077 M - Si aggiungono 28,66 g di tetraacetato bisodico di etilendiamina ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 750 ml di acqua distillata. Si aggiusta a pH 7,4 e si porta a 1.000 ml con acqua distillata.

Tampone fosfato (PBS) - Aggiungere ad 1 l di acqua distillata 2 g di KCl (0,027 M), 2 g di KH_2PO_4 (0,015 M), 80 g di NaCl (1,37 M), 11,5 g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,065 M). Molarità totale: 1,477, pH 6,75.

AGGREGATI PIASTRINICI CIRCOLANTI

Soluzioni per il test

1. *Soluzione EDTA-formalina* - Aggiungere 3 ml di EDTA 0,077 M, 5 ml di formalina al 4% e 2 ml di PBS a 10 ml di acqua distillata. Il pH della soluzione è 7,36; l'osmolalità è 717 mOsm/kg.

2. *Soluzione EDTA* - Aggiungere 3 ml di EDTA 0,077 M, 5 ml di PBS a 12 ml di acqua distillata. Il pH della soluzione è 7,26; l'osmolalità è 700 mOsm/kg.

Essendo la formalina importante nell'incremento dell'osmolarità della soluzione, l'equiosmolarità fra le soluzioni 1 e 2 è stata ottenuta incrementando nella soluzione EDTA la concentrazione del PBS. Si consiglia di preparare queste soluzioni estemporaneamente o di conservarle al massimo per un mese a 4 °C.

Prelievo ed esecuzione del test (fig. 1)

1. Si segna con la lettera A una provetta di plastica graduata a 5 ml che contiene 2,5 ml di soluzione EDTA-formalina e con la lettera B una identica provetta contenente la soluzione EDTA (2,5 ml).

2. Si raccolgono direttamente 2,5 ml di sangue nelle due provette A e B. Si utilizza un ago a farfalla n. 19, applicando una stasi venosa di circa 40 mmHg che si interrompe appena il sangue incomincia a fuoriuscire dall'ago. È importante scartare da 1 a 3 ml di sangue prima di raccogliarlo nelle due speciali provette. Il contatto del sangue con gli anticoagulanti deve avvenire entro 30 sec.

3. Si incubano le provette a 22 °C per 15 min.

4. Si centrifugano le provette a 220 g per 8 min per ottenere il plasma ricco in piastrine (PRP).

5. Si contano le piastrine con il microscopio ottico a contrasto di fase o con il contacellule elettronico. Si ottengono gli stessi risultati con il metodo manuale e con quello automatico.

6. I risultati sono espressi come PAR (*platelet aggregation ratio*):

$$PAR = \frac{\text{conteggio piastrine (EDTA-formalina PRP)}}{\text{conteggio piastrine (PRP EDTA)}}$$

soggetti	I	II	III	\bar{x}	DS
M.M.	0,99	0,87	0,91	0,92	0,06
D.M.	0,88	0,80	0,90	0,86	0,05
A.D.A.	0,82	0,96	0,72	0,83	0,12
R.L.	0,89	0,82	0,84	0,85	0,03
W.G.	0,92	0,73	0,87	0,80	0,07

Tab. 1 - Riproducibilità del test di Wu e Hoak in 3 giorni successivi.

soggetti	primo prelievo	dopo 1 h
F.F.	0,89	0,82
S.V.	0,98	0,93
M.M.	0,99	0,95
D.M.	0,90	0,76
A.D.A.	0,96	0,81

Tab. 2 - Riproducibilità del *test* di Wu e Hoak su prelievi successivi.

7. Il valore medio normale di $0,87 \pm 0,12$ è stato riscontrato in un gruppo di 32 soggetti di ambo i sessi apparentemente sani e di età corrispondente a quella dei pazienti delle casistiche studiate (vedere più avanti).

RISULTATI

Riproducibilità

Abbiamo eseguito il *test* su 5 soggetti normali in 3 giorni successivi. Nella tab. 1 sono riportati i valori del PAR ottenuti nei nostri soggetti, il valore medio e la deviazione *standard*.

Inoltre, in 5 soggetti normali, abbiamo eseguito due prelievi nello stesso giorno, a distanza di 1 h l'uno dall'altro. Nella tab. 2 sono riportati i valori del PAR.

Eseguendo sui 10 dati a nostra disposizione il *test* di SCHEFFER¹³ di analisi della varianza, possiamo notare che non vi è una varianza significativa fra i soggetti ed entro i soggetti; d'altra parte l'elevato valore dei quadrati medi di entrambi i gruppi ci suggerisce una elevata variabilità del metodo sia fra i soggetti sia entro i soggetti (tab. 3).

Dati personali

Utilizzando questo metodo, abbiamo studiato gli aggregati piastrinici circolanti, espressi come PAR, oltre che nel gruppo di controlli normali (32), in pazienti con ictus (37), TIA (32) e pregresso infarto del miocardio (24), tutti esaminati a distanza

	grado di libertà	somma dei quadrati	quadrato medio
variazione fra soggetti	4	0,03	0,075
variazione entro soggetti	5	0,03	0,060

$$F_{4,5} = 1,25.$$

Tab. 3 - Analisi della varianza del *test* di Wu e Hoak.

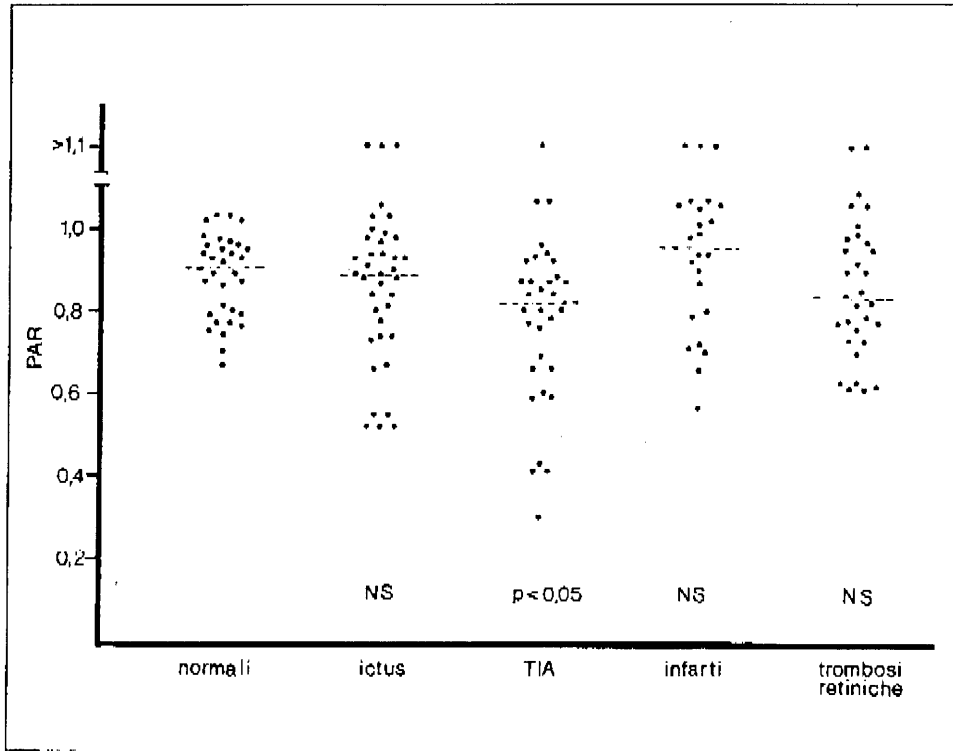


Fig. 2 - PAR studiato in 32 controlli normali, in 37 pazienti con ictus, in 32 pazienti con TIA, in 24 pazienti con infarto del miocardio ed in 31 pazienti con trombosi retiniche. Le linee tratteggiate indicano le mediane.

di 2-3 mesi dall'episodio acuto (fig. 2). Abbiamo inoltre studiato 31 pazienti con trombosi retiniche. Quest'ultima casistica era dapprima divisa in due gruppi di pazienti: l'uno con episodio acuto in atto e l'altro rivisto a distanza; la sovrapposizione dei dati ci ha indotto a rappresentarli nello stesso grafico (fig. 2). Anche se il PAR nei TIA era significativamente diverso dal gruppo di controllo ($p < 0,05$), si osserva notevole sovrapposizione dei dati con quelli del gruppo di controllo. Nei pazienti con ictus non si riscontrano differenze significative; nessuna differenza era evidenziabile nei pazienti con pregresso infarto e con trombosi retinica.

CONCLUSIONI

Nella nostra esperienza, solo nei TIA è stato messo in evidenza un aumento significativo degli aggregati circolanti (espresso dalla diminuzione del PAR). Tale dato può essere interpretato almeno tentativamente come l'espressione dell'aumentata reattività della membrana piastrinica, che si esprime con un'esaltazione della tendenza delle cellule ad aggregarsi *in vivo*. Lo studio, eseguito a distanza dall'episodio acuto, permette di escludere con ragionevole approssimazione che le alterazioni osservate siano la conseguenza aspecifica delle profonde alterazioni dell'omeostasi generale dell'organismo tipiche della fase acuta. Tali alterazioni potrebbero essere quindi

espressioni di un'attivazione duratura dei processi trombogenici ed interverrebbero a scatenare il processo morboso acuto quando si innescano altri fattori complementari legati probabilmente alle condizioni parietali ed emodinamiche. Nelle altre casistiche non sembra invece che vi sia la presenza di piastrine abnormemente reattive, benché sia stato riscontrato un certo numero di dati patologici. Ciò si può forse spiegare o con una scarsa sensibilità del metodo o con il fatto che solo in una parte di questi pazienti la patologia sia di natura tromboembolica; o che, anche quando sia tromboembolica, non sia legata al coinvolgimento delle piastrine.

In conclusione, il *test* di Wu e Hoak, pur rispondendo a caratteristiche di semplicità di esecuzione, presenta i limiti teorici e pratici di tutti i *tests* che dovrebbero aiutare a porre diagnosi di trombosi in atto od imminente. In particolare, questo *test* non appare il più sensibile per mettere in evidenza un'aumentata reattività od attivazione piastrinica, anche secondo i risultati di un'ampia e recente casistica di pazienti 'trombofilici' con malattia aterosclerotica a varia localizzazione d'organo⁹.

RIASSUNTO

Abbiamo criticamente rivisto il metodo di Wu e Hoak per la ricerca degli aggregati piastrinici circolanti valutandone la precisione. Il metodo è stato poi applicato ad una casistica di pazienti neurologici, cardiopatici e di pazienti con trombosi retiniche. Sono stati riscontrati valori significativamente aumentati del *test* solo in pazienti con attacchi ischemici transitori. La negatività della prova negli altri gruppi di pazienti si può spiegare o con una modesta sensibilità del *test* o con una scarsa importanza delle piastrine nelle patologie considerate.

BIBLIOGRAFIA

1. DOUGHERTY J. H., Jr., LEVY D., WEKSLER B. B.: Platelet activation in acute cerebral ischaemia. Serial measurements of platelet function in cerebrovascular disease - *Lancet* *i*, 821, 1977.
2. DOUGHERTY J. H., Jr., MCINTYRE N., WEKSLER B. B.: Assessment of platelet activation in relation to acute thrombotic events - In: 18th Annual Meeting of the American Society of Haematology, 1975; abstract 62, p. 67.
3. GJESDAL K.: Platelet function and plasma-free fatty acids during acute myocardial infarction and severe angina pectoris - *Scand. J. Haemat.* *17*, 205, 1976.
4. JAEREM J. W.: Sudden coronary death. The occurrence of platelet aggregates in the epicardial arteries of man - *Atherosclerosis* *14*, 417, 1971.
5. HAFT J. L., KRANZ P. D., ALBERT F. J.: Intravascular platelet aggregation in the heart induced by norepinephrine: microscopic studies - *Circulation* *46*, 698, 1972.
6. JORGENSEN L.: The role of platelet embolism from mural thrombi and of platelet aggregates arising in flowing blood - In: SHERRY S., BRINKHUIS K. M., GENTON E., STENGLE J. M. (Eds): *Thrombosis*. National Academy of Sciences, Washington, 1969; p. 506.
7. JORGENSEN L., ROWSELL H. C., HOVIG T.: Adenosine diphosphate induced platelet aggregation and myocardial infarction in swine - *Lab. Invest.* *17*, 616, 1967.
8. METHA P., METHA J.: Platelet aggregation ratio in myocardial infarction - *Blut* *37*, 51, 1978.
9. NERI SERNERI G. G., ABBATE R., GENSINI G. F., MANNUCCI P. M., MASOTTI G., STRANO A.: Aterosclerosi e stati trombofilici - In: *Atti 80° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna*. L. Pozzi editore, Roma, 1979; p. 427.
10. PRAZICH J. A., RAPAPORT S. I., SAMPLES J. R., ENGLER R.: Platelet aggregate ratios - Standardisation of technique and test results in patients with myocardial ischemia and patients with cerebrovascular disease - *Thrombos. Haemost.* *38*, 597, 1977.
11. RAPER C. G. L.: Circulating platelet aggregates - *Thrombos. Haemost.* *39*, 537, 1978.
12. ROHRER T. F., PRISTER B., WEBER C., IMHOF P. R., STUCKI P.: Quantitative changes in platelets due to physiological and pathological factors and medication - *Blut* *36*, 21, 1978.
13. SCHEPLER W. C.: *Statistics for the biological sciences* - Addison-Wesley Publ. Co., Menlo Park, Calif., 1969.

AGGREGATI PIATRINICI CIRCOLANTI

14. WU K. K., BARNES R. W., HOAK J. C.: Platelet hyperaggregability in idiopathic recurrent deep vein thrombosis - *Circulation* 53, 687, 1976.
15. WU K. K., HOAK J. C.: A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency - *Lancet* ii, 924, 1974.
16. WU K. K., HOAK J. C.: Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attack - *Stroke* 6, 521, 1975.

Richieste di estratti vanno indirizzate a:

DANIELA MARI
*Istituto di Clinica Medica Generale
e Terapia Medica III
Università degli Studi di Milano
Ospedale Policlinico
Via Pace 15, 20122 Milano - Italia*