

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

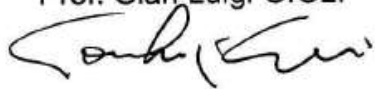
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE E TECNOLOGIE CLINICHE
CICLO XXVI

Tesi di Dottorato di Ricerca

Markers biologici di ricanalizzazione e di efficacia clinica del trattamento con r-tPA nell'ictus cerebrale ischemico acuto

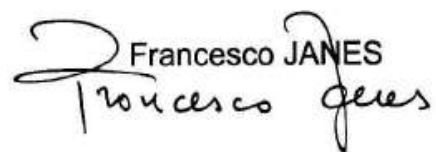
Relatore:

Prof. Gian Luigi GIGLI



Dottorando:

Francesco JANES



ANNO ACCADEMICO 2013 -2014

Prefazione

L'introduzione e la diffusione su larga scala del trattamento specifico per l'ictus cerebrale ischemico con Attivatore tissutale ricombinante del Plasminogeno (r-tPA), i cui primi studi risalgono ormai a quasi 20 anni fa [Hacke et al., 1995; The N.I.N.D.S. study group, 1995], ha fatto crescere, negli anni a seguire, l'interesse verso la ricerca di "marcatori", ovvero "elementi patogenetici predittivi", di outcome clinico e di ricanalizzazione nei pazienti con ictus ischemico.

Due sono i filoni principali nei quali tale ricerca si è polarizzata: l'uno riguardante le scienze neuroradiologiche e di imaging vascolare, l'altro riguardante invece le scienze biologiche e laboratoristiche. Entrambi condividono senz'altro ampi elementi in comune e di sovrapposizione. Tuttavia, al primo attengono più propriamente l'identificazione e la misurazione del grado di ricanalizzazione del vaso sanguigno oggetto di occlusione, mediante ecografia doppler dei vasi epi-aortici, angio-TC o angio-RM. Al secondo compete piuttosto l'identificazione di markers molecolari e la determinazione dei processi biologici che li legano, al fine di individuare quelle fonti di variabilità fenotipica e di risposta patogenetica che portano ad outcome clinici differenti nei singoli individui.

Il presente elaborato tratta specificatamente di questo secondo aspetto, partendo dalle conoscenze fino ad oggi consolidate o quelle ancora dibattute nella letteratura scientifica e proponendo quelle che sono state le nostre esperienze "dal letto del paziente al laboratorio".

Indice

1 – Introduzione	p. 6
1.1 - ictus ischemico e r-tPA	
1.2 - Ruolo del sistema fibrinolitico nell'ictus ischemico.	
1.3 - Ruolo dell'infiammazione nell'ictus acuto.	
1.4 - Omocisteina e ictus ischemico.	
1.5 - Visione d'insieme.	
2 – Ipotesi di studio, obiettivi e rilevanza clinica	p. 26
3 – Materiali e metodi	p. 27
3.1 - Criteri di inclusione ed esclusione.	
3.2 - Definizione di outcome clinico surrogato di ri-perfusione.	
3.3 - Processazione e stockaggio dei prelievi ematici.	
3.4 - Plasma "normale" e "pooled plasma".	
3.5 - Saggi di determinazione enzimatica (ELISA).	
3.6 - Preparazione delle piastre di reazione.	
3.7 - Analisi spettrofotometrica di formazione e lisi del coagulo.	
3.7.1. - assorbanza.	
3.7.2. - calibratura e filtro ottico.	
3.7.3. - incubazione.	
3.7.4. - parametri di analisi cinetica.	
3.8 - Analisi statistica.	
4 – Risultati	p. 35
4.1 - caratteristiche cliniche di base dei pazienti	
4.2 - profilo leucitario (WBC)	
4.3 - Proteina C-reattiva (CRP)	
4.4 - Glicemia all'esordio e profilo glicemico in fase acuta	
4.5 - Omocisteinemia (HC)	
4.6 - Fibrinogeno, DDimero e F/DD ratio	
4.7 - inibitori del tPA: PAI-1 e a2AP	
4.8 - clot-lysis – analisi variazione di assorbanza in vitro	
4.9 - fattori confondenti nella differenza tra misure di fibrinolisi e outcome	
5 – Elementi di discussione e prospettive di ricerca	p. 58
6 – Bibliografia	p. 67
7 – Pubblicazioni/presentazioni inerenti il dottorato	p. 86
8 – Altre pubblicazioni durante il corso di dottorato	p. 86

Abbreviazioni comuni

a2AP – alfa 2 AntiPlasmina

ANCOVA – Analisi delle covarianze

AUC - Area under curve (area sotto la curva)

CRP – C-reactive Protein (proteina C reattiva)

DD/F ratio – rapporto DDimero/Fibrinogeno

ELISA – Enzyme-linked immuno-sorbent assay (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima)

EMA - European Medicines Agency

e.v. - endovenoso

FDA - Food and Drug Administration

HCy – Homocysteine (Omocisteina)

i.a. - intrarterioso

mRS - modified Rankin Scale

OD - Optical Density (Densità Ottica)

OTT - Onset To Treatment Time (tempo tra esordio e trattamento)

PAI – Plasminogen Activator Inhibitor (inibitore dell'attivatore tissutale del Plasminogeno)

PLT – platelets (piastrine)

RM – Risonanza Magnetica Nucleare

r-tPA – Recombinant tissue-type Plasminogen Activator (Attivatore tissutale ricombinante del Plasminogeno).

TC – Tomografia assiale computerizzata

TOAST - classificazione patogenetica del "Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment"

WBC – White Blood Cells (Leucociti)

1 – Introduzione

1.1 – Ictus ischemico ed r-tPA

L'ictus cerebrale è una delle più importanti cause di morte e disabilità [Wahlgren et al., 2007] e per l'ictus ischemico l'ultimo decennio ha rappresentato un notevole miglioramento nelle strategie terapeutiche. In particolare l'approccio moderno all'ictus ischemico si basa su tre cardini fondamentali: precocità di diagnosi e di intervento, ottimale gestione medica generale del paziente acuto e la possibilità di attuare terapie specifiche riperfusive. Proprio quest'ultimo punto, con l'approvazione circa 15 anni fa negli Stati Uniti della terapia trombolitica con rt-PA (recombinant tissue Plasminogen Activator - Alteplase) per via endovenosa, ha posto le basi per l'inizio di una rivoluzione in quest'ambito [Khaja AM and Grotta JC, 2007]. L'implementazione poi di strutture dedicate alla cura dell'ictus acuto, le Stroke Unit, ha rappresentato la nascita dell'ambiente adeguato per il suo trattamento e l'acquisizione da parte del personale sanitario di un'expertise specifico nella patologia cerebro-vascolare [Candelise et al., 2007].

I due primi grandi trials clinici randomizzati e controllati sull'rt-PA sono stati l'ECASS I [Hacke et al., 1995] e il NINDS [The N.I.N.D.S. study group, 1995]. L'ECASS I (620 pazienti in totale) era riuscito ad identificare un miglior outcome (misurato con l'mRS – modified Rankin Scale – a 3 mesi dall'evento) dei pazienti trattati con r-tPA, entro 6 ore dall'esordio, solo in un

subset di 511 pazienti altamente selezionati, ovvero con ictus di moderata gravità e che non mostravano violazioni maggiori al protocollo di studio (O.R. per mRS <2 a 3 mesi = 1,29; I.C.95% = 1,09 – 1,54). Il NINDS confermava, sia nella prima parte dello studio (part I – 291 pazienti) che nella seconda (part II – 333 pazienti) un miglior outcome (mRS a 3 mesi dall'evento) dei pazienti trattati con rt-PA entro 3 ore dall'esordio dei sintomi (rispettivamente con O.R. = 2,1 I.C.95% = 1,3 – 3,2 e O.R. = 1,7 I.C.95% = 1,2 – 2,6); la prima parte dello studio aveva tuttavia come scopo principale quello di testare l'attività terapeutica del rt-PA usando come misura di outcome il miglioramento all'NIHSS > 4 punti, o la normalizzazione dell'esame neurologico, entro le prime 24 ore dall'esordio dei sintomi: la differenza tra il gruppo dei trattati con rt-PA e di quello dei trattati con placebo non è risultata, per questa misura di outcome, statisticamente significativa (O.R. = 1,2 I.C.95% = 0,9 – 1,6; p = 0,21). Una successiva analisi del NINDS trial [Marler JR et al., 2000] ha valorizzato la forte influenza della precocità del trattamento (OTT – onset to treatment time) nel determinare un buon esito clinico a 3 mesi (OR = 2,11 I.C.95% = 1,33 – 3,35 tra i pazienti trattati da 0 a 90 minuti dall'esordio e OR = 1,69 I.C.95% = 1,09 – 2,62 tra quelli trattati tra i 91 e i 180 minuti dall'esordio).

A seguito dei risultati del NINDS trial, l'FDA (Food and Drugs Administration) nel 1996 ha approvato nella pratica clinica l'uso del rt-PA per via endovenosa entro le 3 ore dall'esordio di un ictus ischemico. Altri trials randomizzati e controllati hanno tentato di estendere la finestra di trattamento oltre tale soglia di tempo. L'ECASS II [Hacke W et al, 1998], l'ATLANTIS [Clark WM et al, 1999] e l'EPITHET [Davis SM et al., 2008] hanno fallito

nell'accertare un beneficio del trattamento rispetto al placebo, identificandovi anzi un aumentato rischio di morte, principalmente dovuto alle complicanze emorragiche maggiori della fibrinolisi.

L'Europa ha dovuto attendere fino al 2004 per l'approvazione da parte dell'EMA (European Medicines Agency) all'uso del rt-PA nell'ictus acuto a causa dei dati meno definitivi emersi dallo studio ECASS I; l'eventuale approvazione della terapia fibrinolitica era anche subordinata a due condizioni: la creazione di un registro ad hoc dei casi trattati, il SITS-MOST [Wahlgren et al., 2007] e la progettazione dell'ECASS III [Hacke W. Et al., 2008]. Il primo ha confermato il miglior outcome (morte-disabilità a 3 mesi), in linea con i più vecchi trials randomizzati e controllati. L'ECASS III ha dimostrato in più, che il beneficio della terapia fibrinolitica si estende, pur in minor misura e su una popolazione selezionata, oltre le 3 ore ed entro le 4,5 ore dall'esordio (OR = 1,34 I.C.95% = 1,02 – 1,76).

L'ultima analisi pesata di tutti gli 8 più importanti trials randomizzati e controllati riguardanti la terapia fibrinolitica nell'ictus cerebrale per un totale di circa 3.700 pazienti, ha fornito dati più precisi sulla sua efficacia e sicurezza in particolare eliminando le sottili ma rilevanti differenze metodologiche dei singoli studi [Lees K.R. et al., 2010]. L'OR per un outcome favorevole a 3 mesi è 2,55 (95% CI 1,44-4,52) per un OTT 0-90 min, 1,64 (1,12-2,40) per OTT 91-180 min, 1,34 (1,06-1,68) per OTT 181-270 min, e 1,22 (0,92-1,61) per OTT 271-360 min. Di converso il NNT (Number Needed to Treat) per ottenere una mRS 0-1 a 3 mesi è risultato essere 4,5 per un OTT 0-90 minuti, 9,0 per OTT 91-180, 14,1 per OTT 181-270 (Fig.1). L'emorragia intraparenchimale sintomatica è stata osservata, globalmente, nel

5.2% dei pazienti trattati con rt-PA e nell' 1.0% di quelli trattati con placebo, senza una chiara relazione con l' OTT ($p=0.4140$).

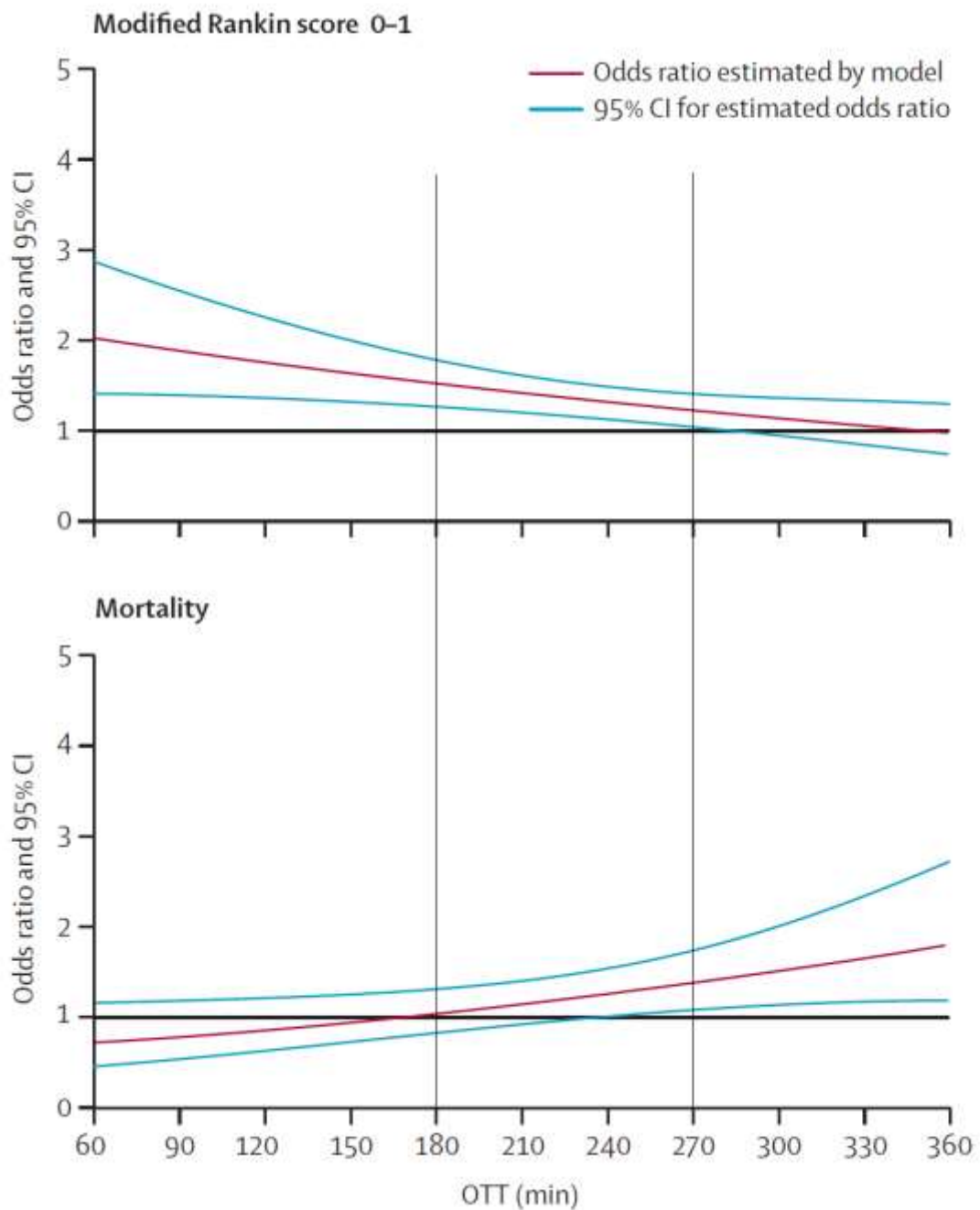


Fig.1 – adattato da Lees et al., 2010 – Modello del rischio di morte e di mRS 0-1 a 3 mesi in relazione all'O.T.T. (metanalisi R.C.T. su rt-PA).

La ricerca sull'ictus cerebrale nell'ultimo decennio è stata caratterizzata dagli sforzi per migliorare tali strategie terapeutiche.

Di forte impatto per la semplicità e la solidità dell'evidenza è l'implementazione delle nuove tecnologie informatiche di telemedicina che hanno dimostrato un enorme potenziale nell'uniformare e diffondere l'accesso sul territorio alla terapia trombolitica [Switzer JA et al., 2007] al fine di trattare tutti i pazienti candidabili.

Nuove tecniche di trombolisi, quella intrarteriosa (i.a.) e quella combinata e.v./i.a., sono state oggetto di una serie di studi, (i PROACT [Furlan A et al., 1999], gli IMS trials [IMS Study Investigators, 2007], ecc.) i cui risultati, ad una attenta revisione critica, ne hanno tuttavia evidenziato luci ed ombre: in particolar modo a dispetto di eccellenti tassi di ricanalizzazione (66% per la trombolisi i.a., 67% per quella combinata e.v./i.a.) l'outcome a 3 mesi, anche se nettamente migliore del placebo, non differiva tuttavia significativamente rispetto a quello dei trials con il solo rt-PA per via endovenosa. Stesse conclusioni possono trarsi per i trials con sistemi di trombolisi meccanica: il MERCI [Smith W.S. et al., 2005], il multi-MERCI [Smith W.S. et al., 2008] ed il PENUMBRA [Bose A. Et al., 2008]; in tali studi a fronte di percentuali di ricanalizzazione fino all'80% (nel Penumbra) si ottengono outcome clinici ancora più deludenti a 3 mesi con un rischio di trasformazione emorragica dell'ictus quasi raddoppiato rispetto ai trials con rt-PA per via endovenosa. I recenti risultati del trial IMS III [Broderick et al, NEJM 2013] hanno confermato, in un confronto randomizzato e controllato, che la fibrinolisi combinata e.v./i.a. (con anche l'eventuale utilizzo del dispositivo MERCI) non è superiore alla sola trombolisi endovenosa con rt-PA.

Notevole interesse ha invece il potenziamento della terapia fibrinolitica endovenosa mediante ultrasuoni (CLOTBUST) [Tsvigoulis G. et al., 2008] i cui ottimi risultati in termini di ricanalizzazione (oltre il 60%) si associano anche ad un basso tasso di emorragia intracerebrale sintomatica (che non differisce cioè da quello dovuto alla sola terapia fibrinolitica) e un miglioramento dell'outcome clinico (mRS 0-2 a 3 mesi) nel 51% dei pazienti contro il 37% del braccio di controllo (solo rt-PA) o al 49% dei pazienti trattati entro 3 ore che emerge dai trials randomizzati controllati con rt-PA endovenoso [Wahlgren N. Et al., 2007]. L'esperienza del SITS-MOST ha però messo in luce anche in questo caso che il trattamento con il solo rt-PA e.v. nel "mondo reale" e dopo il raggiungimento di un expertise da parte dei centri che da più tempo usavano il farmaco raggiungeva outcome migliori rispetto a quelli dei trials randomizzati controllati (mRS 0-2 a 3 mesi nel 54,8% dei pazienti trattati), paragonabile all'effetto clinico della sonotrombolisi. Ciononostante l'ulteriore suo potenziamento con microsfere lipidiche iniettate per via endovenosa che trasmettono energia meccanica nella sede del trombo se investite da onde ultrasonore è altresì una prospettiva promettente: il TUCSON trial [Molina C.A. et al., 2009], pur su pochi pazienti e con numerosi problemi di disomogeneità, ha mostrato una frequenza di ricanalizzazione fino al 67% e una mRS 0-1 a 3 mesi nel 75% rispetto al braccio di controllo i cui risultati sono in linea con quelli dei grandi trials clinici con rt-PA.

Infine, numerosi farmaci fibrinolitici alternativi sono oggetto di sperimentazioni. Tra i tanti il desmoteplase (attivatore del plasminogeno derivato dalla saliva dei pipistrelli) dopo risultati preliminari incoraggianti non ha mostrato un sostanziale beneficio

nel trial clinico DIAS II [Hacke W. Et al., 2009]. La microplasmina (forma di plasmina tronca, priva di una catena polipeptidica all'NH2 terminale) avrebbe minor tendenza alla trasformazione emorragica dell'ictus in modelli animali, ma attende ancora di essere sperimentata sull'uomo [Lapchak P.A. et al., 2002]. Un protocollo sperimentale che prevede, su modello murino, una terapia di combinazione tra rt-PA a basse dosi e Annessina A2, essendo quest'ultima una proteina di superficie presente in abbondanza a livello endoteliale e che, legandosi sia a Plasminogeno e Plasima sia a t-PA, ne catalizza la reazione di attivazione, ha portato a una riduzione combinata delle dimensioni dell'infarto cerebrale e del rischio di trasformazione emorragica [Zhu H. Et al. 2010]. Tra gli svariati agenti neuroprotettori che sono stati proposti come candidati ad una terapia per l'ictus ischemico, la Minociclina, antibiotico con proprietà inibitorie sulla MMP9 (Matrix Metallo Protein 9) ha dimostrato un buon profilo di sicurezza e, per il suo meccanismo, un potenziale ruolo nel ridurre il rischio di trasformazione emorragica dell'ictus in conseguenza del trattamento con rt-PA [Hess D.C. & Fagan S.C., 2010].

Questi trattamenti sono tuttavia, ad oggi, da considerarsi ancora sperimentali [Sacco R.L. et al., 2007] e non superiori nelle evidenze statistiche al solo trattamento con rt-PA, che si impone quindi come l'unica terapia medica accertata come efficace ed approvata nel trattamento della fase iperacuta dell'ictus cerebrale ischemico [De Keyser J. et al. 2007]. A fronte di ciò solo il 50% circa dei pazienti trattati dimostra un outcome favorevole a lungo termine e ciò correla con una incompleta efficacia nella ricanalizzazione del vaso occluso (a causa di una

ricanalizzazione parziale, una ri-occlusione o un'inefficacia completa del farmaco). Alcuni studi hanno dimostrato una diversa probabilità di ricanalizzazione a seconda della diversa sede di ostruzione: le occlusioni della porzione terminale dell'arteria Carotide interna sono quelle a prognosi peggiore con una percentuale di ricanalizzazione del 6% e, a seguire, le occlusioni dell'arteria basilare con un 30%, del tratto M1 dell'A.C.M. (Arteria Cerebrale Media) con il 30%, fino a quelle a prognosi migliore, le occlusioni del tratto distale M2 dell' A.C.M. che raggiungono il 44% [Saqur M. et al, 2007].

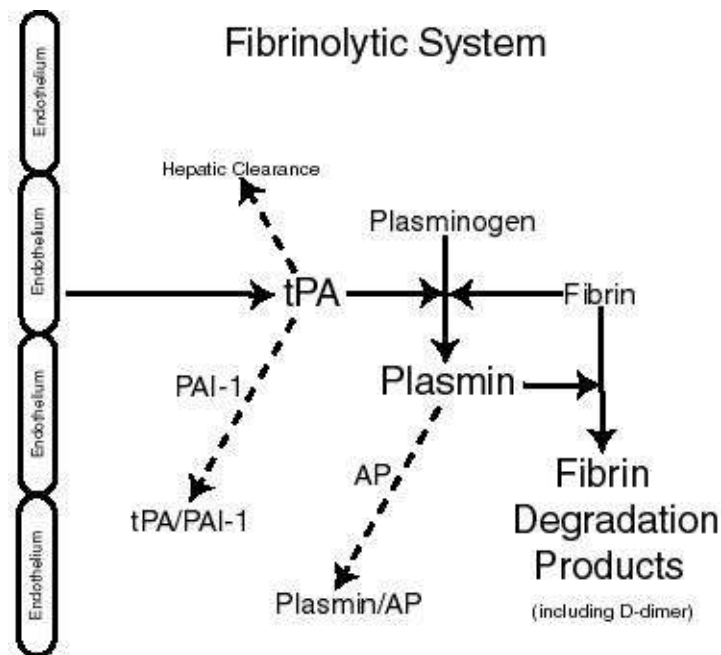
1.2 – Ruolo del sistema fibrinolitico nell'ictus ischemico

Il sistema fibrinolitico è quell'insieme di enzimi e reazioni biochimiche che portano all'attivazione del plasminogeno a plasmina; la Plasmina ne è l'enzima chiave, effetto finale ed è deputato alla degradazione dei polimeri di fibrina che costituiscono il coagulo [Collen D. & Lijnen H.R. 1991].

A dispetto della sua principale funzione, ovvero quella trombolitica, tale sistema gioca un ruolo essenziale anche in altri processi: dalla patogenesi dell'aterosclerosi al rimodellamento tissutale, dall'ovulazione all'embriogenesi, all'angiogenesi, all'infiammazione, fino alla patogenesi tumorale [Plow E.F. et al 1995; Ploplis V. et al 1995; Lijnen H. 2001; Lijnen H.R. 2002].

L'inibizione del sistema plasminogeno/plasmina avviene sia a livello della reazione di attivazione del plasminogeno ad opera del t-PA (via inibitoria a) che a livello della plasmina neoformata

(via inibitoria *b* e *c*): la risposta fibrinolitica fisiologica è regolata da interazioni molecolari specifiche tra i suoi componenti, sia dai livelli di sintesi e rilascio di tPA e inibitori (in primis dalle cellule endoteliali).



Plasminogeno. È una glicoproteina a singola catena (P.M. 92,000 D) che circola nel sangue come zimogeno inerte, inattivo nella sua attività catalitica, nonostante le varie interazioni con altre proteine. A livello plasmatico esistono 2 forme di plasminogeno in riferimento all’N-terminale: Glu-Plasminogeno e Lys-Plasminogeno, quest’ultima risultante da una parziale digestione a livello plasmatico. Tutti gli attivatori del plasminogeno agiscono mediante il clivaggio del ponte Arg561-Val562 e la plasmina risultante è costituita da una catena leggera (contenente il sito catalitico) ed una pesante (costituita dai domini Kringle che

mediano il legame con la fibrina e con l'a2AP), unite da ponti disolfuro. Il Lys-plasminogeno ha una conformazione più aperta ed è meglio accessibile agli attivatori [Rijken D.C. & Lijnen H.R. 2009].

tPA (tissue-plasminogen activator). E' una serin-proteasi (P.M. 68.000 D) responsabile del clivaggio del Plasminogeno (a livello del ponte Arg561-Val562 dello Zimogeno) a Plasmina. L'attività enzimatica del t-PA sembra essere "fibrino-specifica" poichè l'efficienza catalitica è fortemente aumentata dalla presenza di fibrina nel coagulo [Fisher B.E. 1992; Thelwell C. & Longstaff C. 2007].

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1). (P.M. 52.000 D) Gioca un importante ruolo fisiologico nel controllo della fibrinolisi e di altri processi dipendenti dall'attivazione del plasminogeno [Wiman B. 1996; Alessi M.C. & Juhan-Vague I. 2004]. E' una serpina (serin protease inhibitor) ed è il principale regolatore del t-PA [Kruithof E.K. et al. 1984]. Come le altre serpene [Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., et al. 2001], PAI-1 agisce da inibitore suicida che inattiva la proteinasi target by trapping a stabilized acyl enzyme intermediate [Komissarov A.A. et al., 2002; Egelund R. et al., 1998; Ye S. 2001]. La concentrazione plasmatica è bassa, circa 0.4 nM [Booth N.A. et al 1988; Declerck P.J. et al. 1988]; ne sono stati identificati due pool indipendenti [Simpson A.J. et al. 1997; Sprengers E.D. et al. 1986]: il 93% del PAI-1 circolante è contenuto nelle piastrine, ma l'attività del PAI-1 piastrinico è bassa, al contrario di quella del PAI-1 plasmatico che è attivo quasi al 100% [Booth N.A. et al. 1988]. Da un bilancio, a

causa dell'elevata concentrazione, emerge che il PAI-1 piastrinico contribuisce per il 50% all'attività del PAI-1 circolante. Alcuni studi hanno mostrato come piastrine e trombi con un'alta concentrazione di PAI-1 sono molto resistenti alla lisi con tPA [Booth N.A. et al 1988; Jang I.K. et al. 1989; Potter van Loon B.J. et al. 1992]. Allo stesso tempo, specifici anticorpi diretti contro il PAI-1 accelerano la lisi del coagulo in vitro [Torr-Brown S.R. et al. 1993]. D'altro canto, durante terapia trombolitica la concentrazione di rt-PA raggiunta nel plasma è tale da sopraffare verosimilmente l'effetto inibitore del PAI-1 associato al trombo [Lucore C.L. & Sobel B.E. 1988; Colucci M. et al. 1997]. Ma ciò non toglie che alte concentrazioni di PAI-1 sono statisticamente associate ad un outcome peggiore nell'infarto miocardico acuto e siano considerati un fattore di rischio per malattia coronarica [Alessi M.C. & Juhan-Vague I, 2004].

Esistono pochi dati in letteratura sul ruolo del PAI-1 nella resistenza alla lisi del coagulo, nel grado di riperfusione e nell'outcome dei pazienti affetti da ictus ischemico.

α_2AP (*alfa 2 Anti-Plasmina*). (P.M. 70.000 D) Tra tutti gli attori è il più importante regolatore del sistema fibrinolitico [Van Giezen J.J. et al. 1993; Butte A.N. et al. 1997; Nagai N. et al 1999; Nagai N. Et al. 2001]. Primariamente è un inibitore della plasmina, ma è possibile identificare pure un complesso α_2 -AP/rt-PA [Robbie L.A. et al. 2000]. Anch'essa appartiene alla famiglia delle serpine ed è in grado di inibire la plasmina in una delle più rapide reazioni proteina-proteina descritte [Holmes W.E. et al. 1987; Wilman B.& Collen D. 1978]. L'interazione tra α_2 -AP e plasmina avviene attraverso (1) forti legami non covalenti tra l'estremità C-terminale

dell' α_2 -AP e i domini kringle della plasmina, e attraverso (2) legami covalenti tra il sito reattivo dell' α_2 -AP e il sito attivo della plasmina [Wiman B. & Collen D., 1978; Huntington J.A. et al., 2000; Wang H. et al., 2006; Wiman B. & Collen D., 1979; Wang H. Et al., 2003].

L' α_2 -AP è secreta dal fegato nel plasma (~ 1 μM) con una Met all'estremità amino-terminale. Nel circolo ematico la Met- α_2 -AP viene clivata da un antiplasmin-cleaving enzyme, in una forma più corta (Asn- α_2 -AP), che si lega alla fibrina circa 13 volte più velocemente della forma Met- α_2 -AP [Koyama T. et al., 1994; Lee K.N. et al., 2004]. Il gene per la Met- α_2 -AP codifica sia per un'Arg (forma RR, 62.5%) che per un Trp (forme RW e WW, 37.5%) quale sesto aminoacido della catena proteica; entrambi i polimorfismi sono presenti in campioni di plasma umano. Recentemente è stato dimostrato che il polimorfismo Arg6Trp influenza significativamente il grado di incorporazione dell' α_2 -AP nel coagulo e la fibrinolisi [Christiansen V.J.]. Tuttavia l'effetto dell' α_2 -AP sulla terapia trombolitica è tuttora sconosciuto. A causa della sua brevissima emivita ($t_{1/2}$ circa 100 msec [Edy J. & Collen D., 1977]) essa non è adatta ad un trattamento fibrinolitico. La neutralizzazione dell' α_2 -AP aumenta l'emivita della plasmina e risulta in una lisi "spontanea" del coagulo [Reed G.L. et al., 1988], amplificando quindi, in maniera sinergica, la fibrinolisi in presenza di attivatori endogeni del Plasminogeno, sia in vitro che in vivo [Reed G.L. 1997; Sazonova I.Y. et al., 2007]. La deplezione di α_2 -AP circolante in modelli animali può ridurre un danno ischemico focale in assenza di ricanalizzazione del vaso arterioso [Nagai N. et al., 1999; Nagai N. et al., 2001].

TAFI (Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor I). Di recente scoperta, è uno zimogeno che può essere attivato dalla trombina o dalla plasmina diventando un enzima con attività carboxypeptidase B-like. Il TAFI attivato (TAFIa) sopprime la fibrinolisi, molto probabilmente mediante la rimozione dei residui COOH-terminali di Lisina dai residui parzialmente degradati di fibrina, prevenendo quindi l'ulteriore legame alla fibrina della plasmina/plasminogeno e/o del t-PA [Nesheim M. et al., 1997; Nesheim M. et al., 2001; Wang. W. et al., 1998]. Studi in vivo su modelli animali suggeriscono che la somministrazione di un inibitore della carboxipeptidasi B insieme con rt-PA potrebbe marcatamente aumentare la terapia mirata con trombolitico [Klement P. et al., 1999; Bjorkman J.A. et al., 2005]. la concentrazione endogena di TAFI stessa quindi può essere un utile marker di suscettibilità del coagulo alla trombolisi [Mosnier L.O. et al., 1998].

Nonostante ampia evidenza supporti l'influenza degli inibitori delle serpine e del TAFI sulla fibrinolisi, sia *in vitro* che *in vivo*, poco si sa sugli effetti che questi possano avere sulla terapia trombolitica nell'ictus ischemico acuto. Il ruolo che questi fattori emostatici endogeni ricoprano nel determinare o meno la ricanalizzazione non è chiaro. Nonostante un gruppo di ricercatori abbia dimostrato che i livelli basali di α_2 -AP sono predittivi di ricanalizzazione in pazienti con occlusione dell'ACM, questo dato richiede ulteriori conferme su altre popolazioni [Burgin W.S. & Alexandrov A.V., 2001; Rubiera M. et al., 2005; Marti-Fabregas J. et al., 2008; Marti-Fabregas J. et al., 2005].

Le maggiori esperienze riguardo il ruolo del sistema fibrinolitico e dei suoi componenti nella patologia aterosclerotica vengono da studi d'ambito cardiologico, che hanno confermato una forte correlazione tra suscettibilità alla fibrinolisi e outcome nelle sindromi coronariche acute [Undas A. et al. 2008]. Gli stessi sforzi nella ricerca scientifica sono oggi mirati ad una vasculopatia, l'ictus cerebrale, ancora più eterogenea e complessa di quella cardiaca.

I molteplici polimorfismi genetici e i diversi assetti del sistema emocoagulativo rendono conto di una percentuale fino al 30-40% degli ictus, molti dei quali risultano ad oggi criptogenetici; gli stessi fattori modificano probabilmente anche il rischio vascolare e l'outcome di pazienti nei quali si riconoscono i "tradizionali" fattori di rischio per patologia vascolare. Su circa 150 pazienti Anetta Undas ha eseguito degli studi sulle proprietà del coagulo ematico, in vitro, in controlli sani rispetto a pazienti con ictus ischemico, in particolare rispetto a quegli ictus "criptogenetici" dei quali non si rende evidente una causa precisa: il profilo del coagulo in termini di formazione e lisi, di minore permeabilità e di maggior rilascio di D-Dimero indicano che i pazienti con ictus ischemico presentano un certo grado di resistenza alla fibrinolisi [Undas A. et al. 2009].

Alcuni studi hanno tentato di mettere in correlazione attività e livelli ematici dei singoli enzimi del sistema fibrinolitico con l'outcome dopo terapia con rt-PA in pazienti affetti da ictus ischemico [Fàbregas J.M. et al. 2005]: i livelli di a2AP (alfa 2 antiplasmina) circolanti sono risultati nell'analisi di Fàbregas e colleghi significativamente più elevati nei soggetti che andavano incontro a riperfusione post rt-PA ma non per quanto riguarda

l'outcome a lungo termine (3 mesi dall'evento); altri marker tuttavia, quali il PAI (Plasminogen Activator Inhibitor) o il TAFI (Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor) non sono risultati predittivi di una risposta positiva alla fibrinolisi. Tali risultati, soprattutto quelli in senso negativo, potrebbero essere influenzati dalla presenza di polimorfismi per gli enzimi del sistema fibrinolitico che ne modificano l'affinità per i substrati ed attività: proprio ad una analisi di questo tipo è emerso che se, globalmente, nei vari studi i livelli di PAI circolante non sono significativamente predittivi di ricanalizzazione, tuttavia il polimorfismo 4G/5G del PAI tenderebbe a predisporre i pazienti alla ricolonizzazione del vaso anche dopo una ricanalizzazione efficace [Cadenas I.F. et al., 2010]; polimorfismi del PAI-1 ma anche del TAFI sono associate ad una minor probabilità di miglioramento clinico a 24h dal trattamento fibrinolitico [Cadenas I.F. et al, 2007]. Un altro studio ha invece valutato l'impatto del "profilo fibrinolitico" dei pazienti trattati con rt-PA nel predire la trasformazione emorragica dell'ictus in seguito alla terapia [Ribo M., et al. 2004]: le concentrazioni plasmatiche di PAI-1 e TAFI sono risultate maggiori nei pazienti con emorragia intracranica sintomatica post-trombolisi.

In una sottoanalisi dei principali trials randomizzati e controllati sull'rt-PA Kent e colleghi hanno dimostrato usando una regressione logistica corretta per età, O.T.T., NIHSS all'esordio e altri fattori di rischio, che le donne sembrano beneficiare in misura maggiore degli uomini del trattamento: la probabilità di una mRS <2 a 3 mesi era del 38,5% per gli uomini trattati vs 36,7% degli uomini che hanno ricevuto placebo ($p=0,52$) mentre tra le donne consisteva in un 40,5% per quelle trattate vs un 30,3% di quelle

che hanno ricevuto placebo ($p=0,0008$). Tale differenza potrebbe derivare da un diverso funzionamento del sistema fibrinolitico nei due sessi come peraltro suggerito anche in altri studi [Savitz S.I. et al. 2005; Kain K. et al. 2003]. Savits e colleghi per esempio hanno osservato una maggior probabilità di ricanalizzazione, a parità di sede del trombo per le donne rispetto agli uomini. Tale dato è stato replicato anche in una sottoanalisi dello studio PROACT2 nel quale il beneficio netto del trattamento con pro-urokinasi i.a. è stato doppio per le donne che per gli uomini [Hill M.D. et al. 2006].

1.3 – Ruolo dell'infiammazione nell'ictus ischemico acuto

Gli studi presenti in letteratura riguardo alla risposta infiammatoria nell'ictus ischemico acuto si sono concentrati essenzialmente su due parametri: la conta dei globuli bianchi (WBC) e la determinazione dei livelli di proteina C-reattiva (CRP). Audebert et al. Misurarono valori più elevati di entrambe le variabili in associazione a una dimensione maggiore dell'area infartuale e parallelamente ad una maggiore gravità clinica dell'ictus [Audebert et al, 2004]. Nello stesso studio, il sottogruppo di pazienti che vennero sottoposti a trattamento fibrinolitico dimostrò una significativa attenuazione della risposta infiammatoria.

Numerosi studi hanno analizzato il valore di CRP misurato durante la fase acuta dell'ictus, generalmente entro le 12 o le 48 ore dall'esordio, quale predittore di disabilità (valutata attraverso

modified-Ranking-Scale, mRS) a medio o lungo termine [Winbeck et al, 2002; Montaner et al, 2006, Idicula et al, 2009]. Solo alcuni studi hanno preso in considerazione l'outcome a breve termine: Montaner et al dimostrarono CRP più elevata al baseline nei pazienti deceduti dopo fibrinolisi sistemica [Montaner et al, 2006]. In pazienti, trattati o non con rtPA, valori elevati di CRP si associano ad una maggiore gravità clinica e sono predittivi di maggiore mortalità [Idicula et al, 2009; Welsh et al, 2009; Naess et al, 2013]; tuttavia alcuni studi confermano l'associazione con la disabilità a lungo termine [Welsh et al, 2009; Gong et al, 2013], altri no [Idicula et al, 2009]. Tiainen et al, in una ampia coorte di pazienti sottoposti a fibrinolisi conferma l'associazione tra alti livelli di CRP e disabilità a lungo termine, ma trovano anche una marginale predittività rispetto al miglioramento precoce, misurato come diminuzione di 4 punti alla NIHSS entro 24h dall'inizio del trattamento [Tiainen et al, 2013].

Molti degli autori degli studi sulla CRP hanno esplorato anche la conta dei leucociti (WBC) come ulteriore marker di risposta infiammatoria. Audebert dimostrò una correlazione tra un aumento dei WBC all'esordio, il volume infartuale finale e la gravità clinica dell'ictus [Audebert et al, 2004]. Questo dato è stato confermato recentemente da Bill et al. [Bill et al, 2012]. Nello stesso lavoro Audebert inoltre, esplorando l'andamento nei giorni immediatamente successivi all'evento, ha descritto anche un decremento della conta dei WBC nei pazienti sottoposti con successo a trattamento fibrinolitico. Montaner et al, su 143 pazienti sottoposti a trombolisi e.v. non ha riscontrato invece un significativo aumento dei WBC nei pazienti con successivo outcome fatale dopo trattamento [Montaner et al, 2006].

Recentemente, altri gruppi di studio hanno invece osservato in pazienti con ictus acuto, pesando l'analisi anche per possibili fattori confondenti, che una conta leucocitaria più elevata al baseline è predittiva di un peggiore outcome funzionale a lungo termine [Gong et al, 2013; Furlan et al, 2013]. Tali osservazioni cliniche mettono in luce una notevole incertezza sul ruolo dei leucociti nella patogenesi dell'ictus ischemico. Anche studi più specificatamente mirati alla patogenesi del danno infiammatorio nella trombosi acuta hanno dimostrato risultati contrastanti: Rabai et al hanno dimostrato un possibile contributo positivo al processo fibrinolitico da parte dei neutrofili, attraverso il rilascio di una specifica elastasi dei neutrofili [Rabai et al, 2010]; Ishikawa et al. invece hanno recentemente osservato, tramite citometria di flusso, una netta maggiore formazione di aggregati WBC-PLT nel sangue di pazienti con ictus ischemico rispetto a controlli sani [Ishikawa et al, 2012]. Gli stessi autori suggeriscono anche una correlazione positiva con il sottotipo di ictus, ovvero la maggiore formazione di aggregati in pazienti con ictus atero-trombotico rispetto all'ictus lacunare. Due recentissimi studi hanno esplorato il ruolo del rapporto tra neutrofili e linfociti (NLR), quali elementi suggestivi il primo di una elevata risposta immunitaria, il secondo di una diminuita risposta immunitaria adattativa. Entrambi hanno dimostrato che il NLR è fattore predittivo indipendente di outcome funzionale e mortalità nell'ictus ischemico acuto [Tokgoz et al, 2013] ma anche nei sottogruppi sottoposti a trattamento endovascolare, endovenoso, intrarterioso e trombectomia [Brooks et al, 2013].

1.4– Omocisteina e ictus ischemico

Tra gli altri markers clinici che sono stati studiati nell'ictus ischemico acuto, il ruolo dell'omocisteina (Hcy) sull'outcome e sulla ricanalizzazione post rt-PA nonchè nella patogenesi dell'ictus ischemico, è stato relativamente poco esplorato.

Che vi sia una relazione positiva e probabilmente causale tra Hcy e incidenza di ictus ischemico è già noto da molti anni [Sacco et al, 2004]. Dati che ne suggeriscono un nesso patogenetico emergono da studi in vitro nei quali elevate concentrazioni di Hcy sono risultate associate a una minore permeabilità del coagulo di fibrina, ovvero ad una maggiore resistenza alla fibrinolisi da parte del di tPA e Plasmina [Sauls et al, 2002; Undas et al, 2006]. Inoltre plasma di soggetti noti iperomocisteinemici e pretrattati con folina, hanno dimostrato miglioramento della permeabilità del coagulo in vitro [Undas et al, 2006].

Tuttavia, che ridurre i livelli di Hcy in prevenzione vascolare secondaria porti a minore ricorrenza di ictus o altri eventi vascolari rimane controverso. Tool et al hanno dimostrato in un trial randomizzato e controllato che non vi è relazione tra terapia ipomocisteinizzante ed eventi vascolari ricorrenti, ma hanno evidenziato una significativa correlazione tra livelli di Hcy e rischio ischemico, concludendo che il ruolo tra Hcy, patogenesi ed outcome dell'ictus ischemico debba essere ancora oggetto di studi [Tool et al, 2004].

Per quanto concerne il solo l'outcome clinico, Men et al, hanno recentemente dimostrato, su 179 pazienti con ictus, che elevati livelli di Hcy sono predittivi della progressione clinica,

definita come peggioramento in fase acuta di almeno 1 punto all'NIHSS. La misurazione dei livelli di Hcy in tale studio è stata effettuata entro le 24h dal ricovero del paziente [Men et al, 2013]. Analogamente Tu et al. hanno dimostrato livelli maggiori di Hcy in pazienti con ictus ischemico rispetto a controlli sani e hanno pure trovato che livelli elevati di Hcy sono significativamente prognostici di un peggior outcome a 3 mesi, misurato con mRS [Tu et al, 2013]. Altri autori hanno invece riscontrato lo stesso risultato in termini di outcome ma senza confermare maggiori livelli di Hcy nei pazienti con ictus rispetto ai controlli sani [Kalita et al, 2009]. Al contrario, in uno studio esplorativo su 69 pazienti con ictus ischemico acuto e 86 volontari sani, Njideka et al. non hanno riscontrato relazione tra i livelli di Hcy entro 20-72 ore dall'esordio dei sintomi né con le caratteristiche dell'ictus né con la mRS a 3 mesi.

Pochi sono i dati sull'evoluzione temporale che i livelli di Hcy potrebbero avere come risposta di fase acuta nell'ictus ischemico. Lindgren et al. hanno comparato le concentrazioni plasmatiche di Hcy in fase acuta con quelle in fase cronica dopo un ictus ischemico, non trovandone tuttavia differenze significative [Lindgren et al., 1995]. Una più recente analisi ha sostanzialmente confermato tale dato, mostrando livelli sovrapponibili di Hcy all'ingresso, a 1 settimana, 1 e 3 mesi dall'evento ictale.

1.5 – Visione d'insieme.

Il rispettivo peso che ognuno dei fattori, degli enzimi, che costituiscono il sistema fibrinolitico non è a tutt'oggi ben definito e l'effetto del ruolo complementare che rivestono nel controllo dell'emostasi ancora da determinare [Mutch N.J. et al., 2007]. I risultati sono sempre parziali, non conclusivi ma soprattutto ancora distanti da un loro utilizzo nella pratica clinica. In una recente metanalisi che ha preso in considerazione diversi studi clinici individuali degli ultimi 10 anni, ha concluso che solo una netta minoranza dei marcatori biologici proposti hanno una solida valenza diagnostica e prognostica nell'ambito dell'ictus ischemico [Hasan et al, 2012]. Dal punto di vista diagnostico solo la proteina gliofibrillare acida (GFAP) ha dimostrato significativa utilità nel differenziare ictus ischemico ed emorragico. Dal punto di vista prognostico invece rimangono significativi livelli elevati di glicemia all'esordio e di fibrinogeno, quelli di glicemia anche nel sottogruppo dei pazienti trattati con rt-PA, ove predicono il rischio di trasformazione emorragica.

Come sottolineano Ioannidis e Panagiotou, autori di una metanalisi sull'effetto della numerosità campionaria sui risultati degli studi sui marcatori biologici, la loro utilità clinica è al momento dubbia considerati i numerosi dati contrastanti [Ioannidis&Panagiotou, 2011].

2 – Ipotesi di studio, obiettivi e rilevanza clinica

L'ipotesi di partenza è che una mancata ricanalizzazione dopo terapia con r-tPA dipenda dalla presenza di fattori di resistenza alla lisi del coagulo. Il modello di fibrinolisi in vitro su plasma è un surrogato valido del processo di fibrinolisi in vivo e quindi un fattore prognostico di ricanalizzazione se analizzato in acuto ed in prospettiva un elemento guida per future indicazioni terapeutiche.

Lo scopo dello studio è di chiarire il ruolo patogenetico/fisiopatologico del sistema fibrinolitico e di altri marcatori biologici nell'ictus ischemico. Tale obiettivo riveste interesse clinico nell'identificazione, fin dalla fase iperacuta, di pazienti sensibili o resistenti al trattamento fibrinolitico. Il tentativo di fornire dati prognostici è infine utile per mirare terapie aggiuntive (bridging therapies) o per differenziare il dosaggio del farmaco stesso.

3 – Metodi e Materiali

3.1 - Criteri di inclusione ed esclusione

Sono oggetto di studio i pazienti colpiti da ictus ischemico acuto sottoposti a trattamento con tPA per via endovenosa secondo i criteri di inclusione e di esclusione (di seguito elencati) stabiliti dall'A.I.F.A. per l'esecuzione della fibrinolisi stessa. I pazienti eleggibili per il nostro studio dovranno aver espresso e firmato il consenso informato allo studio oltre a quello inerente la procedura di trombolisi endovenosa.

Criteri di inclusione:

- età >18 anni, < 80 anni
- diagnosi clinica di ictus ischemico
- esclusione radiologica (mediante TC cerebrale) di un ictus emorragico
- esordio entro 3h dal trattamento fibrinolitico
- sintomatologia presente da almeno 30 minuti
- assenza di rapido miglioramento dei sintomi

Criteri di esclusione:

- sospetta ESA
- non chiara ora di esordio dei sintomi
- sintomatologia presente al risveglio
- età < 18 anni o > 80
- NIHSS > 25 o < 6
- rapido miglioramento della sintomatologia
- ictus esordito con crisi epilettica
- storia clinica di crisi epilettiche
- pregresso ictus con esiti invalidanti (mRS>2)

- ictus ischemico nei tre mesi precedenti
- pregresso ictus associato a diabete
- storia di emorragie intracraniche o retiniche
- paziente con altra malattia neurologica invalidante
- intervento neurochirurgico nei tre mesi precedenti
- grave trauma cranico nei tre mesi precedenti
- trauma di qualunque entità nei 14 giorni precedenti
- ipertensione non controllabile al momento del trattamento (PAS>185 o PAD>110)
- presunto embolo settico
- endocardite infettiva nota
- presunta pericardite o presenza di nota di trombo o di aneurisma ventricolare da IMA recente
- intervento chirurgico o biopsia di un organo nel mese precedente
- Trauma con danno di organi interni o con ferite ulcerate nel mese precedente
- trauma con danno di organi interni o con ferite ulcerate nel mese precedente
- diagnosi di ulcera duodenale, emorragia gastrointestinale o urinaria nel mese precedente
- rettocolite ulcerosa, varici esofagee, pancreatite acuta
- Aneurisma dell'aorta
- grave patologia epatica o epatite attiva
- diatesi emorragica ereditaria o acquisita nota incluso uso corrente di anticoagulanti orali con INR> 1.7
- somministrazione di eparina entro le 48 ore precedenti l'esordio dell'ictus con aPTT elevato al ricovero
- conta piastrinica < 100.000/mm³
- glicemia di base <50mg/dL o > 400mg/dL
- puntura arteriosa o venosa complicata ed in sede non comprimibile nei 7 giorni precedenti
- puntura lombare nei 7 giorni precedenti
- puerpera in fase di allattamento o donna in stato di gravidanza
- parto recente (entro 30 giorni)
- neoplasia con aumentato rischio emorragico

Criteri di esclusione radiologici:

- presenza di emorragia intracerebrale
- reperto di neoplasia cerebrale
- presenza di malformazione vascolare cerebrale
- aneurisma cerebrale

- presenza di segni precoci di ischemia alla TC coinvolgenti > 1/3 del territorio dell'arteria cerebrale media
- spostamento della linea mediana
- grave leucoaraiosi/encefalopatia multinfartuale

3.2 - Definizione di outcome clinico surrogato di riperfusione.

La scelta della migliore definizione di outcome dopo trattamento fibrinolitico è stata oggetto di dibattito e di numerosi studi. La necessità di definire un indice di “miglioramento neurologico precoce” (ENI) quale surrogato di ricanalizzazione è dettata d'altro canto dalla assai diffusa indisponibilità routinaria nella pratica clinica e dal costo economico, di esami di imaging vascolare che direttamente possano misurare l'entità della ricanalizzazione stessa. Da una recente analisi del registro SITS, che ha raccolto i dati dei pazienti trattati con tPA e.v., emerge che considerare l'ENI come miglioramento del 20% all'NIHSS dopo 2 ore dall'inizio del trattamento, è la migliore definizione, quella che raggiunge livelli di sensibilità e specificità maggiori, se confrontati con i dati di imaging vascolare [Kharitova et al, stroke 2011].

Sulla scorta di questa analisi, operata su una ampia casistica di 798 pazienti dei quali fossero disponibili una CTA o MRA prima e dopo trattamento, abbiamo scelto di adottare la suddetta definizione di ENI per l'intera analisi dei dati dei nostri studi.

3.3 - Processazione e stockaggio dei prelievi ematici.

Il prelievo ematico è stato eseguito da sangue periferico, prima dell'inizio dell'infusione di tPA e.v. Il sangue è stato prelevato in provette contenenti Na-citrato e immediatamente riposto su ghiaccio. Per ottenere un plasma povero di piastrine le provette, entro 1 ora dal prelievo, sono state quindi centrifugate a 2000 g per 20 minuti, dopo incubazione a 4°C per 5 minuti. Il plasma è stato delicatamente separato in aliquote (ciascuna del volume di 150microL), evitando di prelevare il 1/3 di volume in continuità con il sedimento corpuscolato. Le aliquote sono state poi conservate a -80°C. Il trasporto dei campioni ematici, tra la sede del prelievo e quelle di centrifugazione, analisi e stockaggio è stato effettuata con contenitori idonei per la conservazione di materiale biologico a rischio.

3.4 - Plasma “normale” e “pooled plasma”.

Alcuni dati preliminari e di ottimizzazione della metodica in vitro sono stati ottenuti su plasma normale, in kit fornito da American Diagnostica inc. (Normal Hemostasis Reference Plasma; product N. 258N) Altri sono stati eseguiti su un mix di plasma ottenuto da donatori sani, suddiviso in aliquote standard, quindi conservato in freezer a -80°C.

3.5 - Saggi di determinazione enzimatica (ELISA).

Il kit per la determinazione del fibrinogeno è stato fornito da Instrumentation Laboratory (HemosIL™ fibrinogen-C).

Il kit per la determinazione del PAI1 è stato fornito da Techclone (Technozym PAI-1 antigen ELISA).

Il kit per la determinazione dell'a2AP è stato fornito da Instrumentation Laboratory (HemosIL™ plasmin inhibitor).

Il Kit per la determinazione dei livelli di DDimero è stato fornito da bioMérieux SA (VIDAS D-Dimer Exclusion™).

3.6 - Preparazione delle piastre di reazione.

Sono stati utilizzati piatti standard da 96 pozzetti, ognuno con capacità fino a 300 microL. Le reazioni sono state predisposte mediante preparazione di soluzioni d'innescò contenenti, in rapporto e concentrazioni variabili, CaCl, trombina e rt-PA. La trombina è stata fornita da: Sigma/America diagnostica. Il rt-PA è stato fornito da Boehringer-Ingelheim. (Actylise). Il tampone Tris con il quale venivano diluiti i campioni aveva pH 7.4.

In altri pozzetti venivano organizzati i campioni di plasma, a varia diluizione, dei pazienti, secondo il progetto dei singoli saggi. Le aliquote di plasma venivano prelevate dal freezer a -80°C, poste su ghiaccio durante il trasporto, quindi incubate a 37°C per 5 minuti e infine poste su ghiaccio durante la preparazione dei singoli saggi.

Anche tutti i passaggi delle procedure di preparazione delle

soluzioni di lavoro e d'innesco sono stati effettuati su ghiaccio, così come la preparazione dei piatti stessi.

3.7 - Analisi spettrofotometrica di formazione e lisi del coagulo.

Per le analisi sono stati usati spettrofotometri della serie Victor 3 (Perkin Elmer) e i dati elaborati mediante il software SoftMaxPro 5.3 (Molecular Devices, LLC).

Il principio alla base della determinazione in vitro della cinetica di formazione e lisi di un coagulo è rappresentato dalla variazione nel tempo di densità ottica del campione, che a sua volta dipende, in successione, dalla formazione e dalla lisi dei polimeri di fibrina all'interno del pozzetto di reazione stesso.

3.7.1 - calibratura e filtro ottico.

La lunghezza d'onda su cui calibrare l'analisi è impostata scegliendo uno dei filtri ottici presenti nello spettrofotometro. Diverse lunghezze d'onda determinano diversi valori assoluti di densità ottica (OD). Verranno prese in considerazione tre lunghezze d'onda test, 340, 380 e 405 nm, le più frequentemente usate nella letteratura di riferimento.

3.7.2 – incubazione.

Il piatto di reazione è stato sempre incubato per 5 minuti alla temperatura di 37°C all'interno dello spettrofotometro.

3.7.3 - parametri di analisi cinetica.

La realizzazione grafica delle curve di variazione di OD è stata elaborata tramite foglio di lavoro Excel, quindi analizzata tramite Graphpad. Dalle curve sono estrapolabili i seguenti differenti parametri descrittivi:

- Min-OD (OD di partenza del campione)
- Lag-c (tempo intercorrente tra inizio della reazione e aumento della densità ottica)
- OD-max (massima assorbanza misurata)
- Time to Odmax (tempo di raggiungimento dell'OD-max)
- T50% (tempo di raggiungimento del 50% della variazione di OD)
- T100% (tempo di raggiungimento del minimo di OD, dopo completa lisi del coagulo)
- AUC (area sotto la curva, con Min-OD come valore basale) .

3.8 - Analisi statistica

Le variabili continue verranno espresse come media, mediana e deviazione standard, se non altrimenti specificato; in termini percentuali verranno espresse le variabili categoriali. Il test di

Kolmogorov-Smirnov verrà utilizzato per verificare la distribuzione normale delle variabili continue e il test di Levene per verificare l'ipotesi d'equivalenza delle varianze. Per verificare se esistono differenze significative all'interno dei 2 gruppi (buon outcome e cattivo outcome) verrà utilizzato il t-test per campioni indipendenti qualora le variabili abbiano una distribuzione normale; qualora invece le variabili non abbiano una distribuzione normale verrà utilizzato il test U di Mann-Whitney; Per le variabili categoriali verrà utilizzato il test χ^2 o Fisher Exact.

La ricerca di correlazioni tra le diverse variabili verrà effettuata tramite test di Pearson con una significatività a 2 code $< 0,05$.

4 - Risultati

4.1 – caratteristiche cliniche di base

Sono stati arruolati 54 pazienti. La Tabella 1 riassume le caratteristiche dei pazienti per età, sesso, principali fattori di rischio vascolare, terapia in atto all'esordio, tipo di ictus ischemico secondo classificazione TOAST [Adams et al, stroke 1993] e gravità all'esordio secondo l'NIHSS.

Di 51/54 pazienti erano disponibili entrambi gli score NIHSS pre-trattamento e a 2h dall'inizio dell'infusione. Dicotomizzando l'outcome come buono o cattivo dopo rt-PA, così come è già stato definito precedentemente, 24/51 (47,1%) pazienti ha presentato un miglioramento significativo.

Il sesso è risultato significativamente associato all'outcome positivo, con un Odds ratio di 0,72 (0,52 - 0,99) per il sesso maschile. Analogamente, elevato score all'NIHSS è risultato predittivo di outcome peggiore con p-value < 0,05.

Nessuna associazione è stata riscontrata per altre variabili cliniche che potessero influenzare i riscontri laboratoristici: in particolare i due sottogruppi non si differenziano per età all'evento, per l'uso di farmaci vascolari al momento dell'evento e per i principali fattori di rischio vascolari.

Anche il sottotipo fisiopatologico non si associa ad un preferenziale outcome post rt-PA.

TAB.1 Caratteristiche cliniche di base

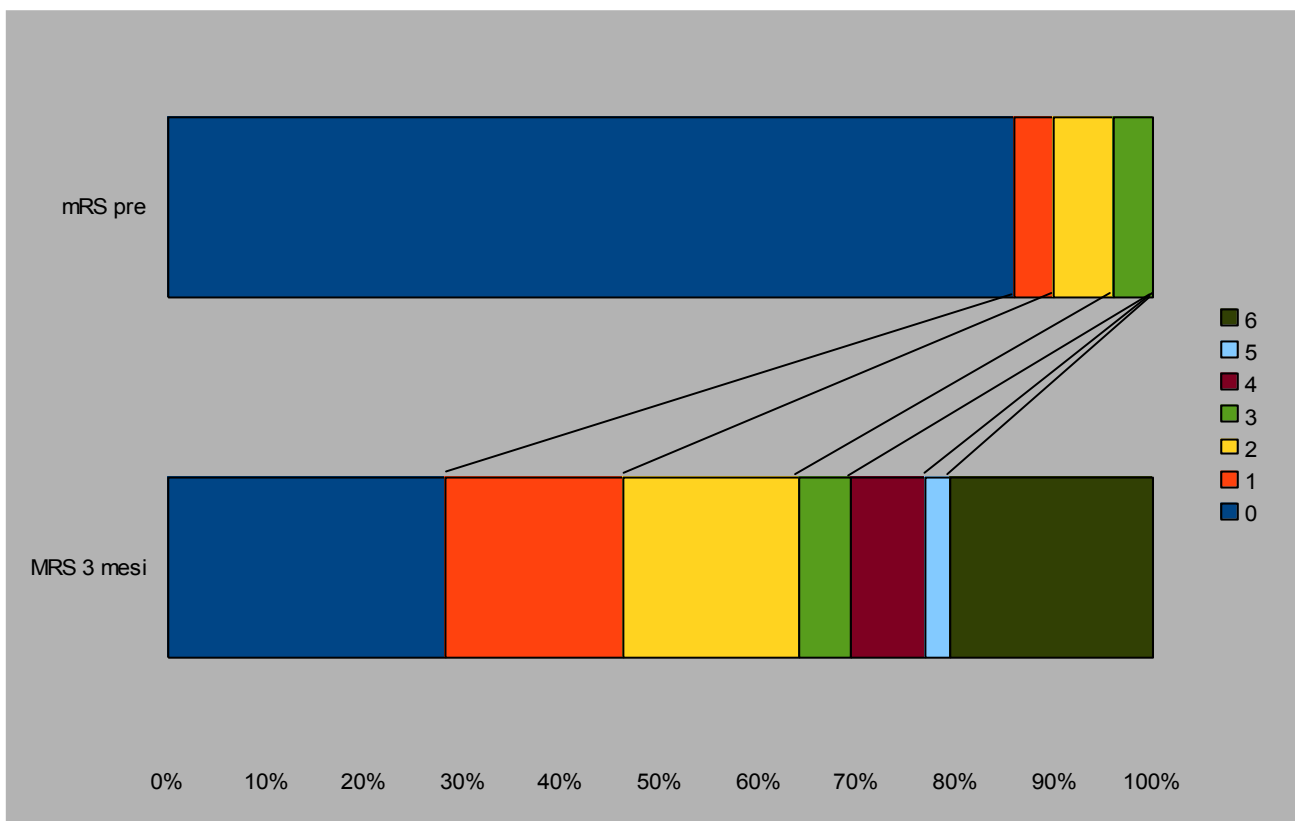
Variabile	Valori	Totale N=54 media(ds) o n/totale (% corretta)	Miglioramento precoce		
			SI, N=24 (47,1%) media(ds) o n/totale (% corretta)	NO, N=27 (52,9%) media(ds) o n/totale (% corretta)	P-value T-test, Fisher Exact o Chi-quadro
Razza	bianca	46 (85,2)	21 (91,3)	22 (84,6)	0,395
	nera	8 (14,8)	2 (8,7)	4 (15,4)	
Età	anni	62,5 (14,9)	62,3 (15,7)	63,2 (14,7)	0,835
Sesso	maschi	39 (72,2)	21 (87,5)	17 (63,0)	0,044
	femmine	15 (27,8)	3 (12,5)	10 (37,0)	
Ipertensione	si	34 (63,0)	15 (62,5)	17 (63,0)	0,600
	no	20 (37,0)	9 (37,5)	10 (37,0)	
Diabete	si	9 (16,7)	2 (8,3)	7 (25,9)	0,100
	no	45 (83,3)	22 (91,7)	20 (74,1)	
CAD	si	4 (7,4)	1 (4,2)	3 (11,1)	0,351
	no	50 (92,6)	23 (95,8)	24 (88,9)	
CABG	si	1 (1,9)	0 (0,0)	1 (4,0)	0,510
	no	51 (98,1)	24 (100,0)	24 (96,0)	
FA	si	13 (24,1)	4 (16,7)	9 (33,3)	0,149
	no	41 (75,9)	20 (83,3)	18 (66,7)	
Fumatore attuale	si	12 (33,3)	7 (58,3)	5 (41,7)	0,278
	no	24 (66,6)	10 (41,7)	14 (58,3)	
Pregresso fumatore	si	1 (2,8)	0 (0,0)	1 (100,0)	0,528
	no	35 (97,2)	17 (48,6)	18 (51,4)	
acido acetil salicilico	si	9 (21,4)	4 (44,4)	5 (55,6)	0,565
	no	33 (78,6)	16 (48,5)	17 (51,5)	
clopidogrel	si	1 (2,0)	1 (4,2)	0 (0,0)	0,480
	no	49 (98,0)	23 (95,8)	26 (100,0)	
warfarin	si	1 (2,0)	0 (0,0)	1 (3,8)	0,520
	no	49 (98,0)	24 (100,0)	25 (96,2)	
statina	si	11 (22,0)	4 (16,7)	7 (26,9)	0,298
	no	39 (78,0)	20 (83,3)	19 (73,1)	
NIHSS pre rt-PA		11,2 (5,1)	9,79 (3,7)	12,9 (5,97)	0,029

T O A S T	CE	si	15 (31,3)	9 (39,1)	5 (21,7)	0,337
		no	33 (68,8)	14 (60,9)	18 (78,3)	
	LAD	si	13 (27,1)	4 (17,4)	9 (39,1)	0,189
		no	35 (72,9)	19 (82,6)	14 (60,9)	
	LAC	si	5 (10,4)	3 (13,0)	2 (8,7)	1,000
		no	43 (89,6)	20 (87,0)	21 (91,3)	
	OTHER	si	1 (2,1)	1 (4,3)	0 (0,0)	1,000
		no	47 (97,9)	22 (95,7)	23 (100,0)	
	UND	si	12 (25,0)	4 (17,4)	7 (30,4)	0,491
		no	36 (75,0)	19 (82,6)	16 (69,6)	

Legenda: CAD, malattia coronarica; CABG, Coronary Artery Bypass Graft; FA, Fibrillazione Atriale; NIHSS, National Institute Health Stroke Scale; CE, ictus cardioembolico; LAD, ictus da patologia dei grossi vasi; LAC, ictus lacunare; OTHER, ictus da altre cause UND.

Come sintetizzato in Figura 1, 43/53 pazienti (86% corretto) presentavano completa autonomia nella vita quotidiana prima dell'evento ischemico (mRS = 0) e 48/53 (96% corretto) presentavano piena autonomia o disabilità minima. A 3 mesi dall'evento 25/53 (64% corretto) presentava una disabilità assente o minima (mRS 0-2). La letalità è stata di 8/53 (20,5 % corretto). La principale causa di morte, in 5/8 pazienti è stata la formazione di edema cerebrale e ipertensione endocranica post-trattamento, 1 paziente ha presentato trasformazione emorragica sintomatica e fatale dopo il trattamento.

FIG.1 Valutazione funzionale pre- e post-fibrinolisi



Legenda: mRS, modified Rankin Scale

4.2 – profilo leucocitario all'esordio ed evoluzione.

La tabella 2 mostra il valore di WBC a varie finestre temporali espresso per $10^3/\text{microL}$. I dati visualizzati sono quelli disponibili in 33/53 pazienti e sono riportati deidentificati rispetto alle variabili cliniche. Vi è un trend non significativo per il riscontro di una maggiore conta leucocitaria, misurata pre-trattamento (<3h dall'esordio), nei pazienti con outcome peggiore dopo rt-PA (9,25 vs 8,23; $p = 0,446$).

TAB.2 - andamento della conta leucocitaria dall'esordio

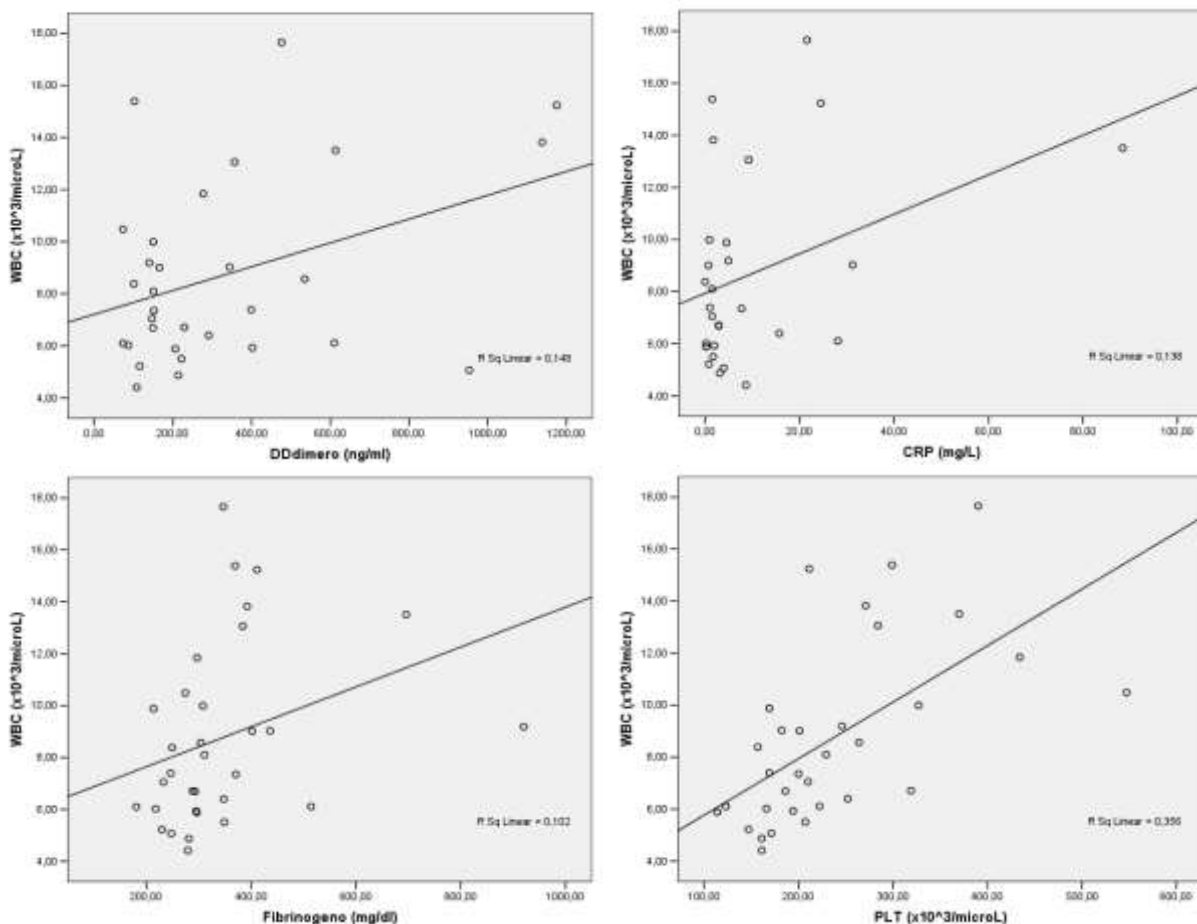
Pt	conta leucocitaria (x10 ³ /microL)							NIHSS<20%@2h
	E.R. (<3h)	S.U. (<12h)	S.U. (12<48h)	S.U. (gg3)	S.U. (gg4)	S.U. (gg5)	S.U. (>gg6)	
1	8,570	12,090	9,390			8,400		SI
2	11,840	NA	NA	NA	NA	NA		NO
3	13,510	NA	12,180	NA	NA	NA		NO
4	5,930	NA	5,240	NA	NA	NA		SI
5	6,710	8,140	NA	NA	NA	NA		NA
6	NA	NA	17,660	NA	NA	NA		NO
7	13,820	10,820	NA	NA	NA	8,450		NO
8	7,350	7,750	12,760	NA	NA	NA		SI
9	NA	NA	9,880	NA	7,240	NA		NA
10	6,690	NA	7,660	6,060	NA	NA		SI
11	10,480	9,190	NA	NA	NA	NA		SI
12	6,110	NA	8,410	9,390	8,710	7,350		NO
13	15,240	15,620	NA	NA	NA	NA		NO
14	7,050	7,950	NA	NA	7,980	NA		NO
15	9,010	NA	7,160	NA	NA	NA		SI
16	6,100	NA	6,010	NA	NA	NA		NO
17	4,410	5,800	6,270	NA	NA	NA	5,030	NO
18	9,030	7,870	NA	NA	NA	NA	NA	SI
19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SI
20	13,060	NA	15,180	NA	NA	NA	NA	NO
21	5,070	6,150	6,610	7,090	NA	7,180	6,230	SI
22	4,870	NA	6,500	6,570	11,990	10,160	9,930	NO
23	9,190	NA	9,050	8,410	12,520	NA	NA	NO
24	8,100	NA	8,620	8,380	NA	NA	NA	SI
25	5,500	NA	11,280	NA	NA	NA	NA	NO
26	15,390	14,630	NA	9,360	NA	NA	11,620	SI
27	9,990	NA	9,540	NA	NA	NA	8,850	SI
28	5,880	NA	5,510	NA	NA	NA	NA	NO
29	8,380	NA	10,020	NA	NA	NA	NA	SI
30	5,220	NA	8,860	NA	NA	NA	7,520	SI
31	6,400	9,670	10,760	8,150	9,000	NA	8,560	NO
32	6,020	6,630	5,880	NA	NA	6,980	5,800	SI
33	7,390	NA	11,800	NA	NA	NA	7,950	NO

Legenda: NA, non disponibile; Pt, paziente; E.R., emergency room, pronto soccorso; S.U., Stroke Unit.

Non abbiamo trovato invece alcuna correlazione tra gravità dell'ictus, come da NIHSS all'esordio, e conta leucocitaria.

Come indicato in Figura 2 vi è una correlazione positiva significativa tra WBC e livelli di D-Dimero ($r = 0,38$; $p = 0,03$) e marginalmente significativa tra WBC e CRP ($r = 0,371$; $p = 0,05$); inoltre sembra esservi una tendenza alla correlazione tra valori di Fibrinogeno e WBC, pur non significativa ($r = 0,319$; $p = 0,07$). La più forte e significativa correlazione è quella presente tra WBC e PLT ($r = 0,597$ $p < 0,0001$).

FIG.2 - correlazioni tra conta leucocitaria (WBC) e altri parametri



Osservando, dai dati grezzi in tabella 2, una ampia variabilità della evoluzione della conta leucocitaria tra paziente e paziente, abbiamo provato

quindi a raggruppare i pazienti secondo specifici profili nelle prime 72 ore: pazienti che rimangono stabili da pre-trattamento ai 3 giorni successivi (STABLE profile), altri nei quali si osserva un incremento post-tPA e poi una diminuzione (INCR-DECR profile), altri ancora nei quali si osserva solo un incremento (INCR profile) ed infine pazienti con mostrano un decremento (DECR profile). Sono state considerate significative variazioni di almeno 0,5 ($10^3/\text{microL}$) tra una misurazione e l'altra. I risultati sono sintetizzati in figura 3 e 4 e risultano significativamente diversi tra i vari gruppi. Tuttavia, dicotomizzando i pazienti tra quelli che rimangono stabili (STABLE profile) e quelli che sembrano andare incontro ad una risposta infiammatoria, (UN_STABLE profile = INCR+DECR+INCR-DECR) non vi è differenza nell'outcome dopo tPA (dati non mostrati).

FIG.3 – profilo leucocitario in fase iperacuta

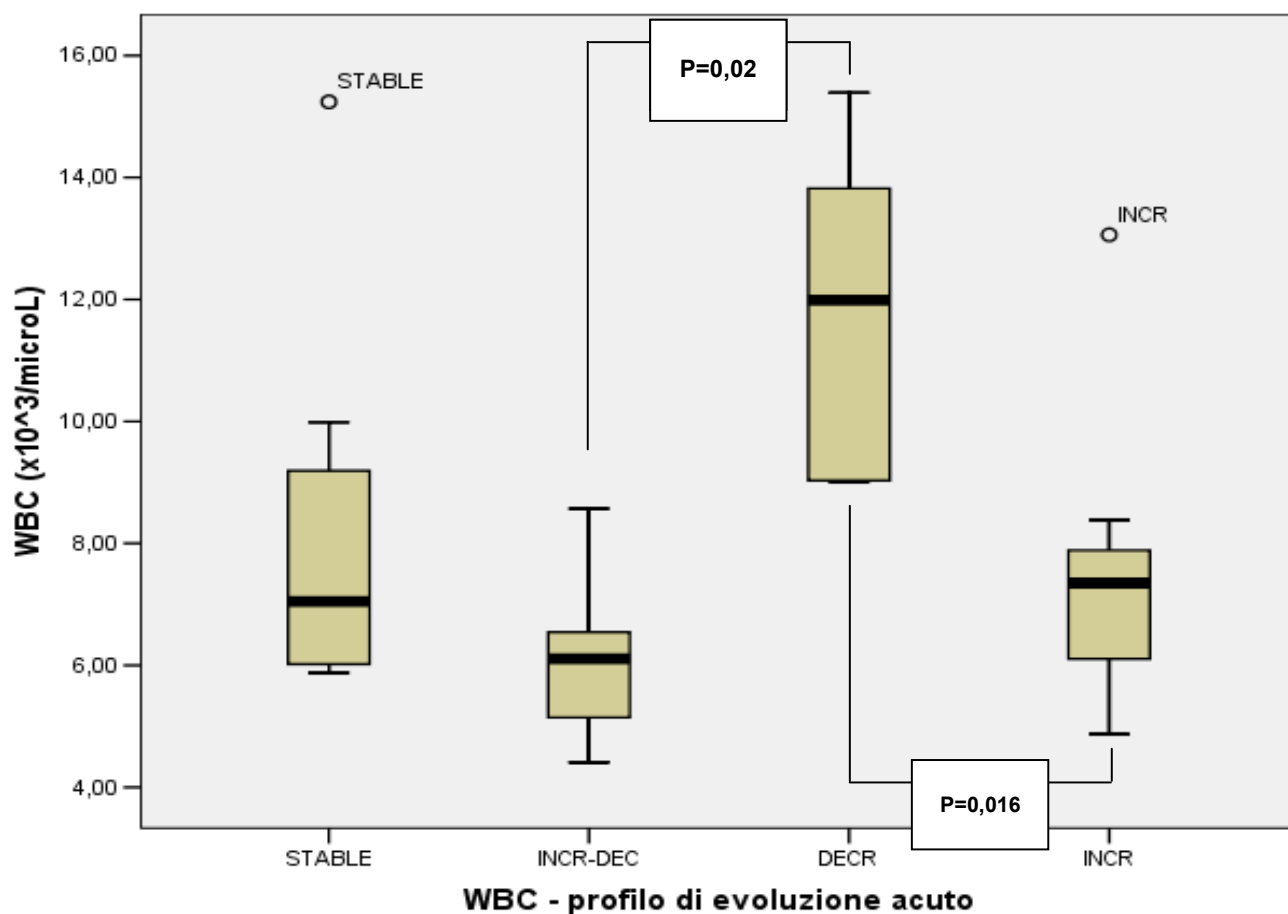
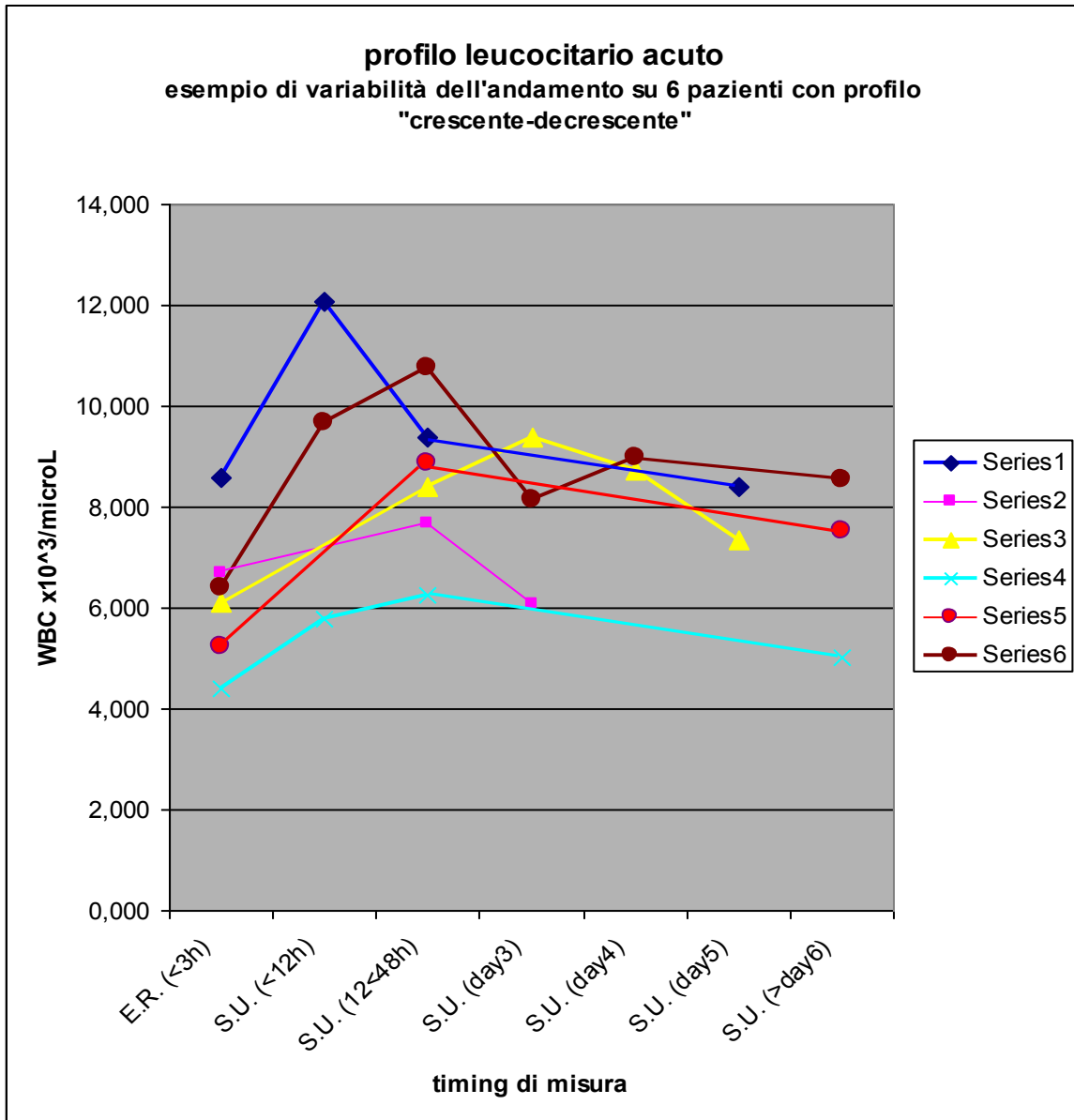
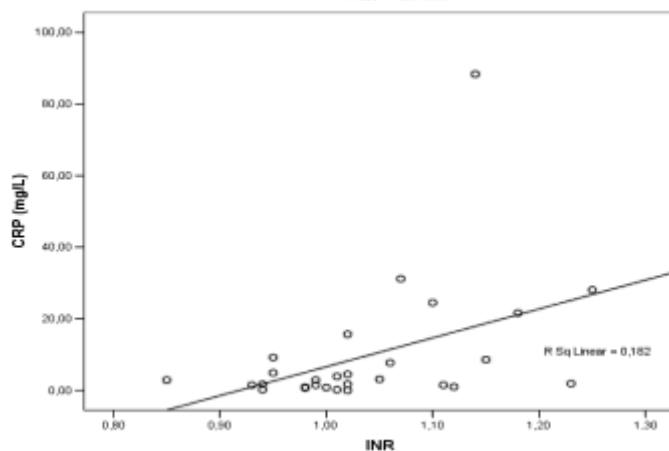
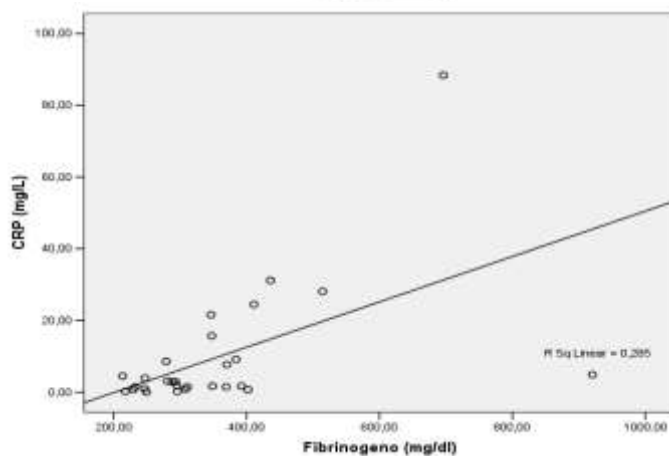
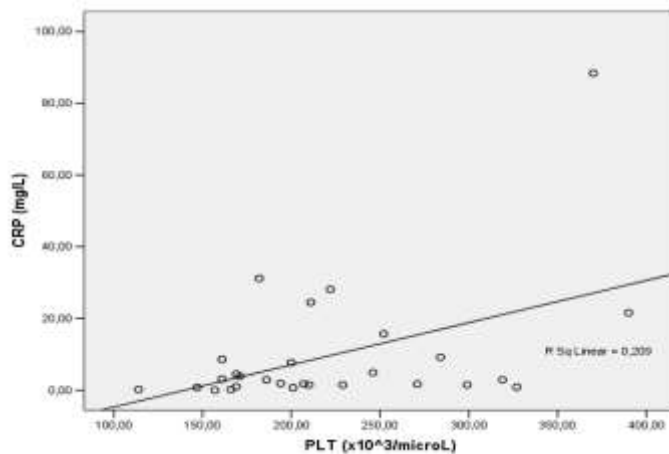


FIG.4 - differenti profili di evoluzione della conta leucocitaria



4.3 – proteina C-reattiva (CRP)



Ventotto pazienti avevano a disposizione una rilevazione entro le 3h dall'esordio dei sintomi e prima del trattamento con rt-PA. A dispetto di un evidente trend (tabella 5) verso valori mediamente maggiori di CRP in pazienti con cattivo outcome post t-PA (15,01 mg/L) rispetto ad un buon outcome (4,43 mg/L), tale differenza non raggiunge la significatività ($p = 0,131$).

Come illustrato in Figura 6, abbiamo riscontrato una significativa correlazione positiva tra valori di CRP e Fibrinogeno ($r = 0,533$; $p = 0,003$), CRP e PLT ($r = 0,457$; $p = 0,014$), nonché tra

CRP e INR ($r = 0,426$; $p = 0,024$). Vi è invece solo una tendenza ad una correlazione tra CRP e Ddimero ($r = 0,350$; $p = 0,073$).

4.4 - Glicemia all'esordio e profilo glicemico in fase acuta

Il dato è disponibile per 30/54 pazienti. Non abbiamo osservato alcuna differenza nei valori di ingresso, misurati entro 3h dall'esordio dei sintomi e precedentemente al trattamento con rt-PA, tra pazienti con e senza miglioramento precoce: 122,7 mg/dl vs 122,4 mg/dl ($p = 0,983$). Non si osserva nemmeno correlazione con alcuna delle altre variabili in esame.

La tabella 3 mostra l'andamento del profilo glicemico nei 30 pazienti con dati disponibili.

Partendo quindi dall'osservazione in alcuni pazienti sulla documentazione di valori glicemici elevati anche nei giorni successivi, abbiamo diviso i pazienti in due gruppi secondo le glicemie misurate fino a 72 ore dall'esordio dei sintomi: iperglicemia persistente dopo trattamento fibrinolitico ed euglicemia oltre le 12 ore dall'esordio. Come mostrato in tabella 4, a dispetto della bassa numerosità dei gruppi, pazienti che mostrano iperglicemia persistente fino a 72h dall'esordio hanno minore probabilità di andare incontro a buon outcome dopo rt-PA e.v. (OD 0,54, 95%IC = 0,30 – 0,97; fisher exact test 2-sided = 0,05).

TAB.3 - variazioni del profilo glicemico in fase iperacuta

Pt	Glicemia (mg/dL)						iperG LU pers	Hb-gli(%)	NIH<20% @2h
	E.R. (<3h)	S.U. (<12h)	S.U. (12<48h)	S.U. (gg3)	S.U. (gg4-6)	S.U. (>gg6)			
1	119	111	89	NA	NA	NA	0	5,3	SI
2	115	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NO
3	84	NA	88	NA	NA	NA	0	5,6	NO
4	104	NA	86	NA	NA	NA	0	5,8	SI
5	89	85	NA	NA	NA	NA	0	5	NA
6	NA	NA	74	NA	NA	NA	0	5,6	NO
7	124	133	NA	NA	116	NA	1	6,8	NO
8	93	88	84	NA	NA	NA	0	5,8	SI
9	NA	NA	107	93	100	NA	NA	5,4	NA
10	126	NA	81	96	91	NA	0	5,8	SI
11	100	75	NA	NA	NA	NA	0	5,6	SI
12	127	NA	110	120	78	120	1	5,5	NO
13	125	200	NA	NA	NA	NA	1	6	NO
14	171	154	NA	NA	86	99	1	6,1	NO
15	141	NA	74	NA	NA	NA	0	5,7	SI
16	89	NA	86	NA	NA	NA	0	4,8	NO
17	220	258	191	NA	NA	128	1	7,9	NO
18	199	148	NA	NA	NA	NA	1	6,2	SI
19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SI
20	103	NA	100	NA	NA	NA	0	5,8	NO
21	124	85	105	85	78	86	0	5,9	SI
22	98	NA	91	153	245	172	0	5,5	NO
23	203	NA	99	NA	161	NA	0	NA	NO
24	135	NA	111	100	NA	NA	1	5,8	SI
25	95	NA	110	NA	NA	NA	1	5,9	NO
26	102	96	NA	89	78	74	0	5,8	SI
27	125	NA	80	NA	74	NA	0	5,9	SI
28	125	NA	89	NA	NA	NA	0	6	NO
29	143	NA	80	NA	NA	NA	0	6,4	SI
30	101	NA	91	NA	NA	81	0	5,3	SI
31	105	128	111	114	78	NA	1	NA	NO
32	106	109	96	NA	83	76	0	NA	SI
33	101	NA	110	NA	NA	89	1	5,8	NO

Legenda: NA, non disponibile; E.R., emergency room; S.U., Stroke Unit; Hb-gli, Emoglobina glicata.

TAB.4 - crosstabulation per glicemia persistente e outcome clinico

@2h_impr_20perc * persitent_hypergly Crosstabulation

			persitent_hypergly		Total
			0	1	
@2h_impr_20perc	0	Count	7	8	15
		% within persitent_hypergly	36,8%	80,0%	51,7%
	1	Count	12	2	14
		% within persitent_hypergly	63,2%	20,0%	48,3%
Total		Count	19	10	29
		% within persitent_hypergly	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,887 ^b	1	,027		
Continuity Correction ^a	3,312	1	,069		
Likelihood Ratio	5,152	1	,023		
Fisher's Exact Test				,050	,033
Linear-by-Linear Association	4,719	1	,030		
N of Valid Cases	29				

a. Computed only for a 2x2 table

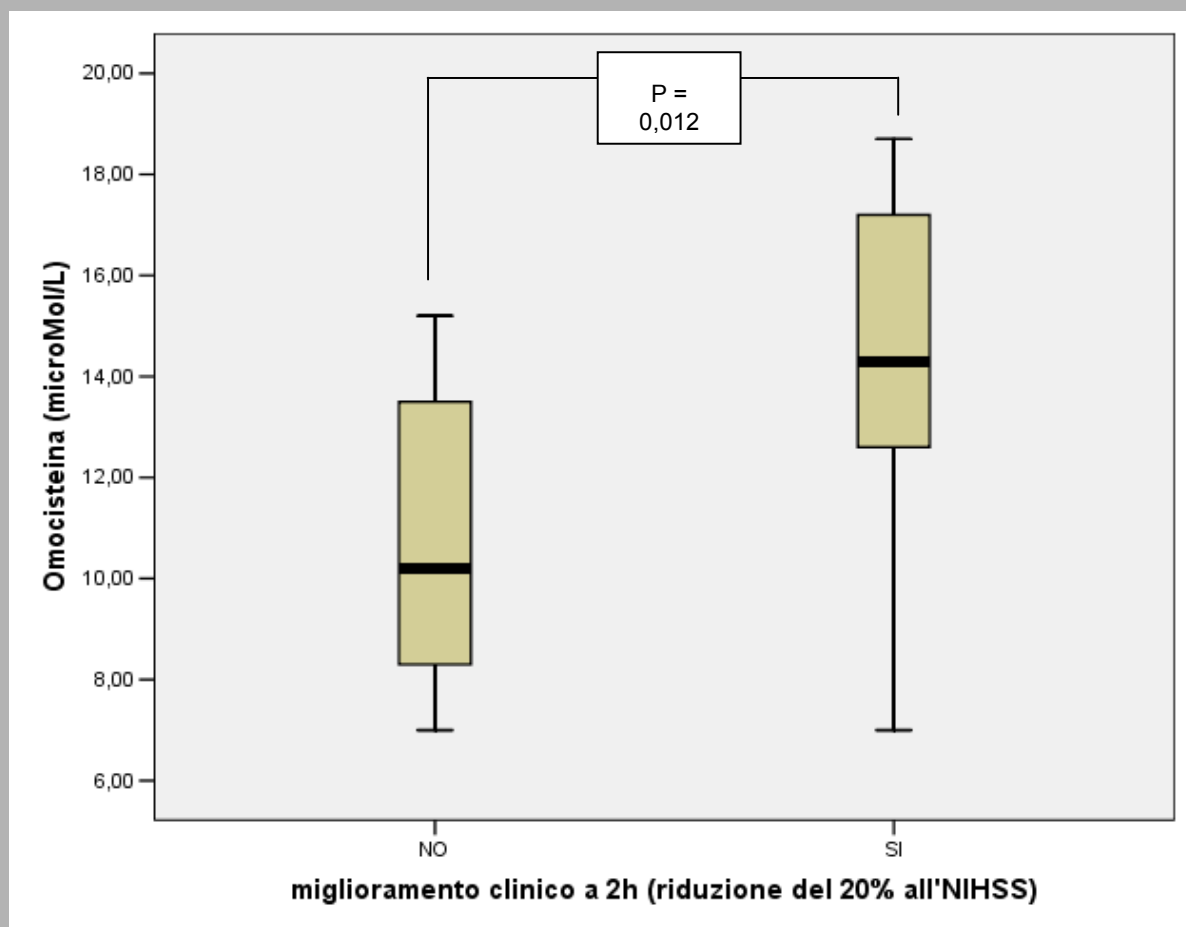
b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,83.

4.5 – Omocisteina

Solo 20 pazienti presentano una misurazione dei livelli di omocisteina, a digiuno al mattino e in clinostatismo, eseguita entro 48 ore dall'esordio dei sintomi. Valori significativamente maggiori di omocisteina sono stati rilevati nei pazienti con miglior outcome post-trombolisi e.v. (figura 8), 14,39 microMol/L vs 10,53 microMol/L ($p = 0,012$).

Non si osservano correlazioni con altre variabili in esame, in particolare con markers di risposta infiammatoria (WBC, CRP, Fibrinogeno) o con la gravità dell'ictus all'esordio (NIHSS).

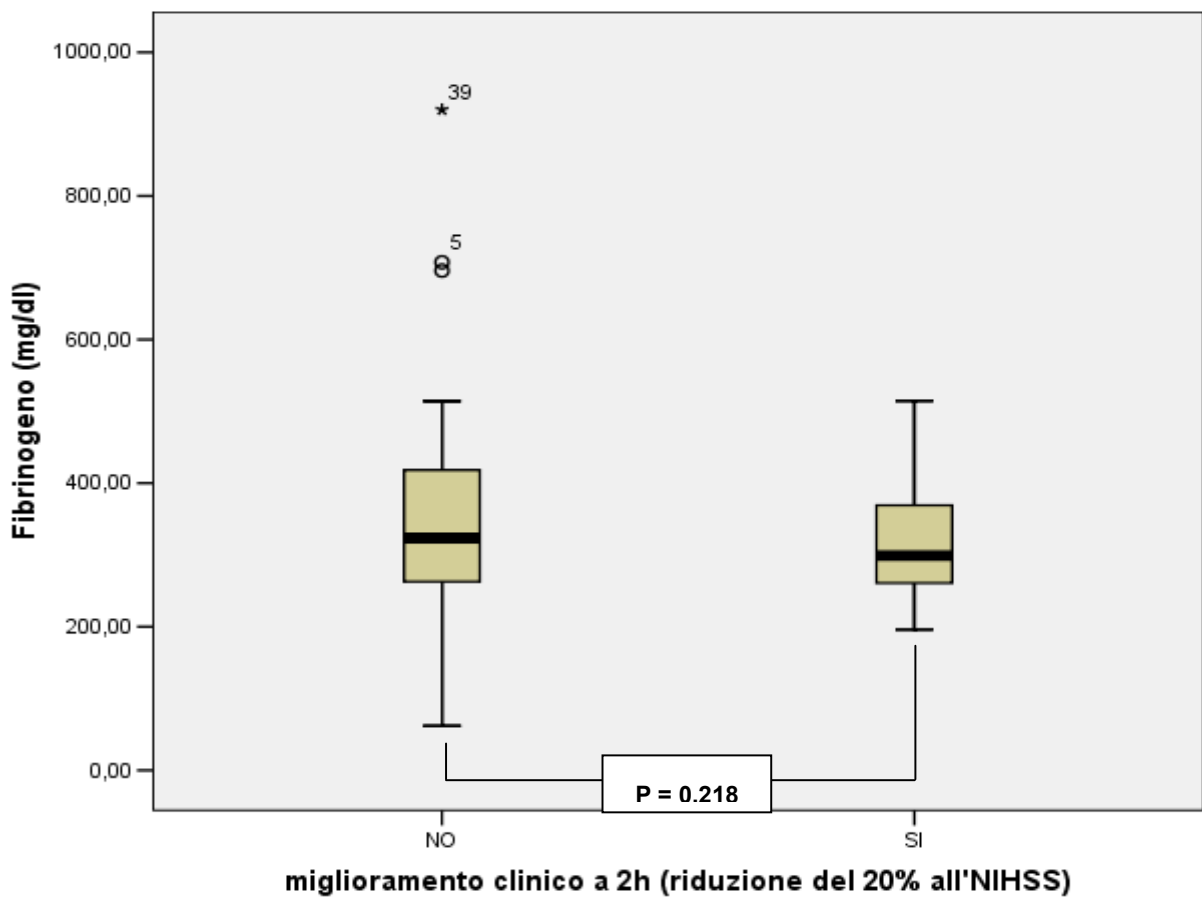
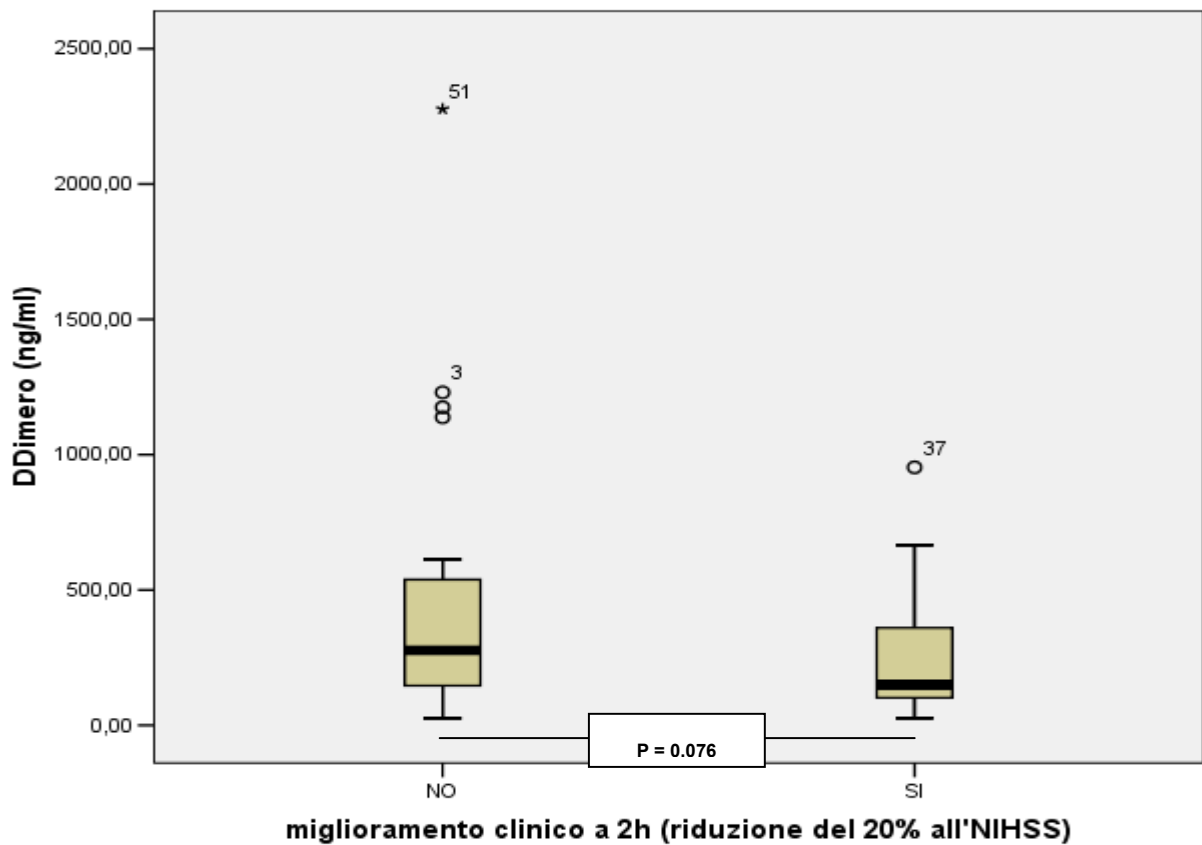
FIG.8 - livelli di omocisteina pre-rtPA e outcome clinico

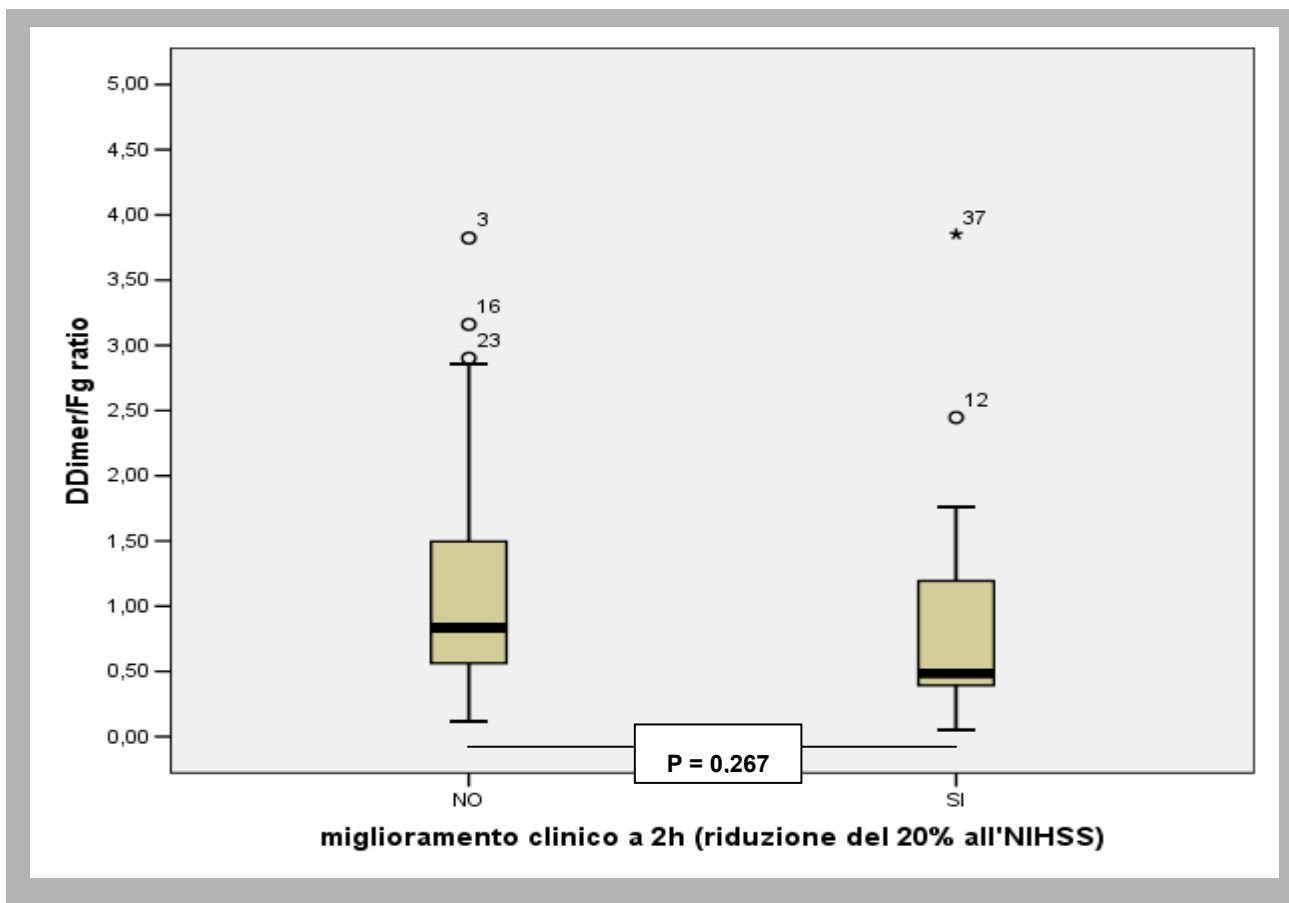


4.6 – Fibrinogeno, Ddimero e DD/F ratio

Su 50 pazienti che hanno a disposizione il dato, i livelli di Fibrinogeno, Ddimero e DD/F ratio pre-trattamento fibrinolitico sono illustrati in figura 9. Vi è un trend verso una significatività di maggiori livelli di DDimero (451,7 ng/ml vs 249,7 ng/ml, $p = 0,076$) nei pazienti con outcome peggiore. Lo stesso trend anche per i livelli di Fibrinogeno è tuttavia meno significativo (312,6 mg/dl nei pazienti con miglioramento precoce vs 361,8 mg/dl nei pazienti con cattivo outcome, $p = 0,218$). Il DD/F è risultato 2,41 nei pazienti senza miglioramento post rt-PA, non significativamente superiore allo 0,86 dei pazienti con miglioramento di almeno il 20% alla NIHSS ($p = 0,267$).

FIG.9 - marcatori del sistema fibrinolitico e outcome clinico





Come già menzionato precedentemente vi è una debolmente significativa correlazione tra CRP e WBC e Ddimero. I livelli di Ddimero circolanti pre rt-PA sono marginalmente associati positivamente con la gravità dell'ictus all'esordio (Ddimero ed NIHSS, $r = 0,264$; $p = 0,059$).

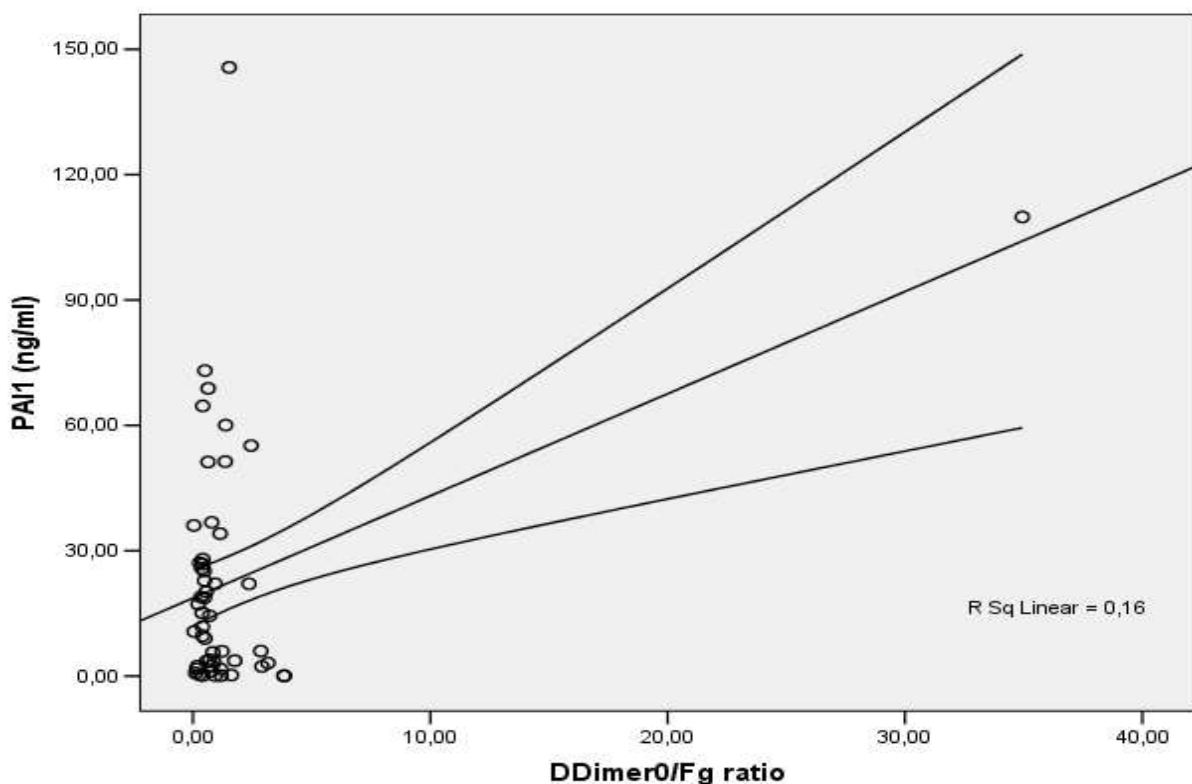
Come già menzionato, alti livelli di Fibrinogeno sono invece associati a maggiori livelli di CRP in modo significativo ($r = 0,533$, $p = 0,003$).

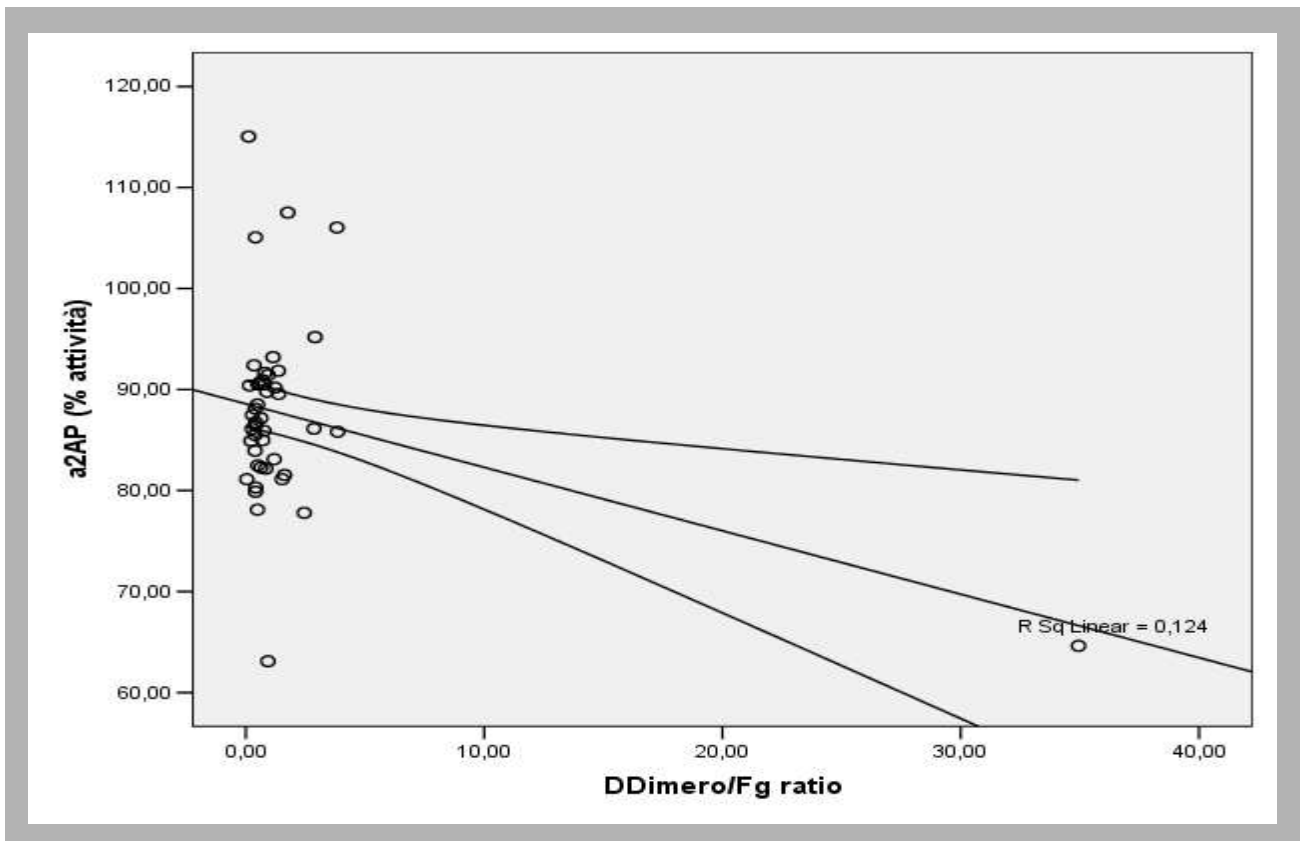
4.7 – Inibitori del tPA: PAI1 e a2AP

Su 44 pazienti con dosaggi disponibili dell'a2AP non abbiamo osservato alcuna differenza nei livelli pre rt-PA e.v. Tra pazienti con e senza successivo miglioramento clinico ($p = 0,77$). Per quanto riguarda il dosaggio di PAI1 vi è una tendenza non significativa per una media più elevata in pazienti con outcome migliore (27,49 ng/ml vs 18,15 ng/ml; $p = 0,263$).

Vi è una debole, non significativa correlazione positiva tra PAI1 e Ddimero ($p = 0,154$) e una chiara correlazione negativa tra PAI1 e Fibrinogeno ($r = -0,277$, $p = 0,043$). Un più alto livello di DD/F ratio è infine significativamente correlato al riscontro di maggiore PAI1 ($r = 0,4$; $p = 0,003$). La relazione tra DD/F, PAI e a2AP, sembra dai risultati complessa ed è illustrata in figura 10. I livelli di a2AP si correlano negativamente sia con quelli di PAI1 ($r = -0,367$, $p = 0,011$) che con quelli di DD/F ($r = -0,352$, $p = 0,018$).

FIG.10 - relazione tra DDimero, PAI1 e a2AP





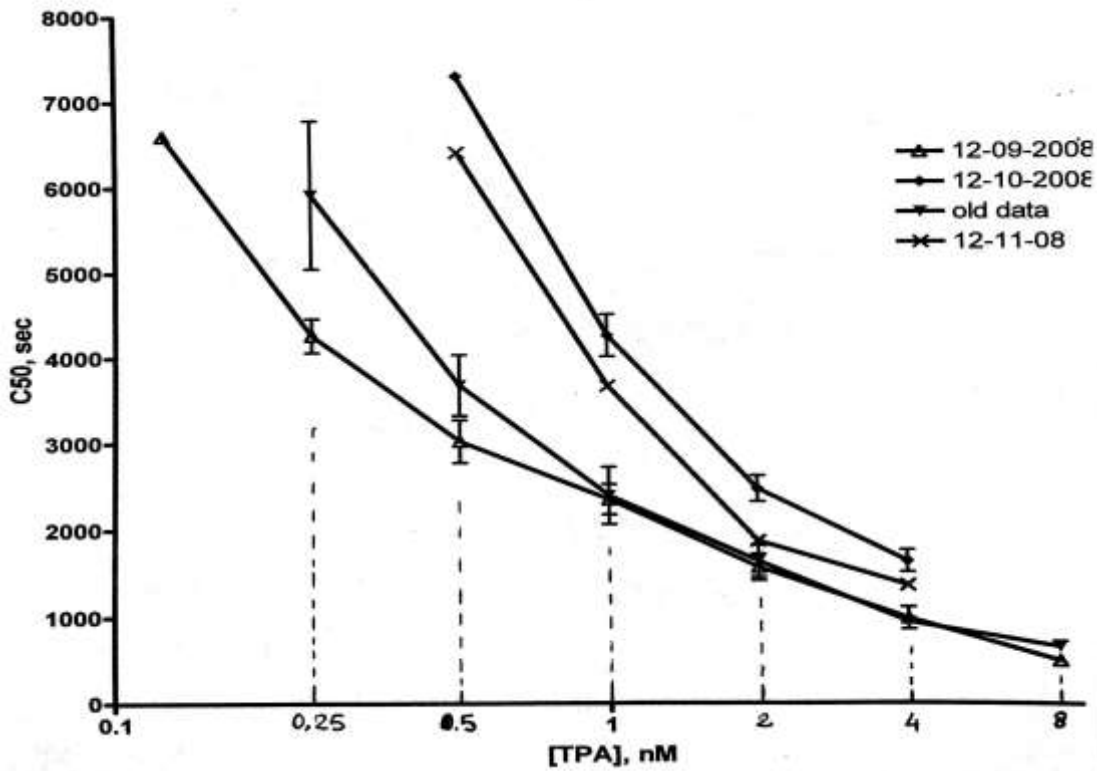
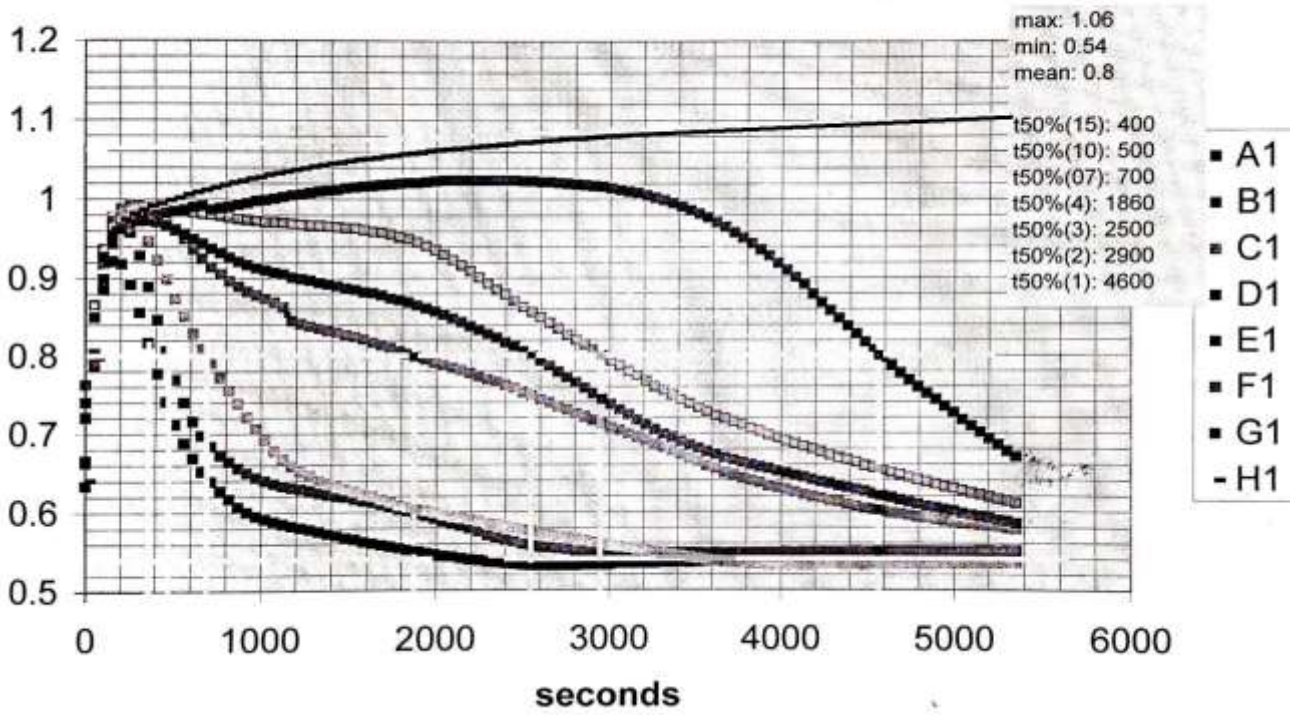
4.8 – clot-lysis, analisi in vitro di variazione dell'assorbanza

La soluzione d'innescò della reazione di formazione e lisi del coagulo si compone, come già menzionato, di rt-PA, Trombina e calcio cloruro. Di seguito riportiamo alcuni esempi significativi dell'effetto che la variazione di alcuni dei parametri di preparazione ha sul risultato finale del saggio. L'analisi di tali modifiche è stata fondamentale per ottenere dei parametri che potessero essere il più sensibili possibile a determinare piccole variazioni come quelle che ci aspettavamo utilizzando il plasma dei singoli pazienti.

Variazioni di concentrazione di tPA influenzano la velocità della reazione di fibrinolisi in vitro. L'andamento è pressochè lineare per concentrazioni di tPA che variano da 1 a 8 nM (figura 11).

FIG.11 - curve clot-lysis a diverse concentrazioni di tPA; plasma al 70% e OD a 340nm.

70 microL Pla and tPA between 15 and 0



Differenti diluizioni del plasma probando introducono invece due tipi di variabilità nella metodica: in primis una maggiore difficoltà tecnica con le concentrazioni maggiori di plasma (o diluizione inferiore), per la formazione di bolle con il pipetting, che alterano fortemente la lettura ottica e del risultato; in seconda battuta diverse diluizioni alterano i valori di densità ottica ottenuti a parità degli altri parametri. Aumentando la diluizione del plasma diminuiscono sia l'ODmax sia l'ODmin, ma in modo più accentuato per il primo parametro, così che il differenziale massimo-minimo globalmente diminuisce (figura12).

Per verificare se la lunghezza d'onda di lettura impostata sullo spettrofotometro potesse influenzare i parametri del saggio, abbiamo provato ad analizzare, su pooled-plasma, i risultati a 3 lunghezze d'onda diverse, 340nm, 380nm e 405nm, sulla scorta di quelle che più vengono utilizzate in lettura per l'assorbanza su plasma. La lettura a 380 e 405nm ha prodotto risultati tra loro sovrapponibili e valori di OD maggiori rispetto alla lettura a 340nm. Quest'ultima ha tuttavia dimostrato di riportare un maggior differenziale ODmax-ODmin, soprattutto in presenza di diluizioni maggiori del plasma probando (figura 12).

Dopo diversi passaggi, non ivi riportati, la metodica in vitro è risultata quindi ottimale con un volume finale di reazione pari a 150 microL, ripartiti rispettivamente in 37,5 microL di Plasma (nella reazione finale risulta quindi plasma al 25%), 62,5 microL di T.B.S. e 50 microL di Soluzione d'innescio. Tale soluzione contiene CaCl 15nM, trombina 0,3 U/ml e tPA 6nM (nella reazione finale risultano quindi CaCl 5nM, Trombina 0,1U/ml e tPA 2nM).

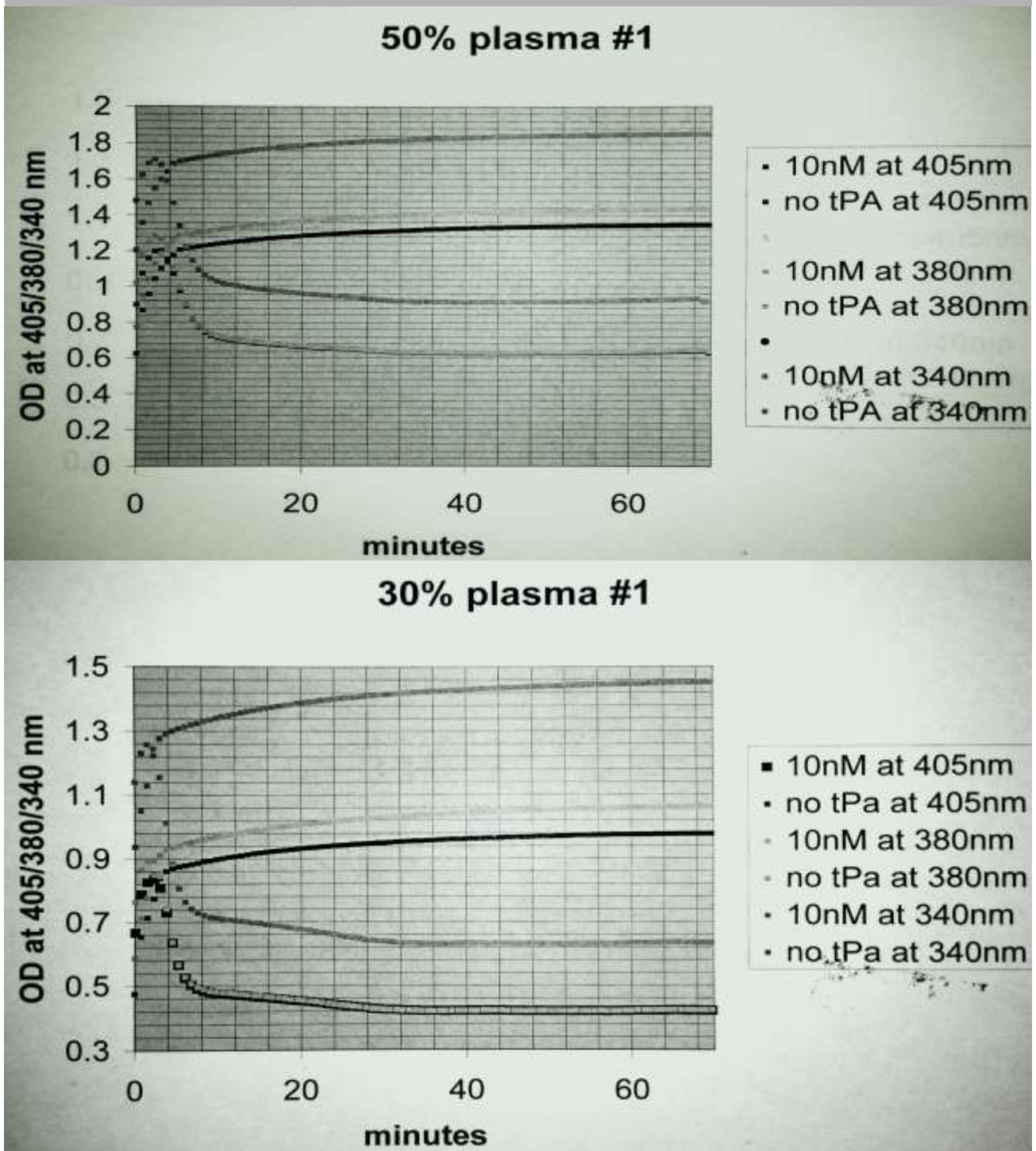
La misurazione è avvenuta in triplicato sullo stesso piatto da laboratorio e nella medesima sessione di analisi.

I parametri che abbiamo preso in considerazione sono stati il tempo di metà lisi, t50% e l'AUC con i rispettivi valori normalizzati.

La tabella 5, oltre a riassumere le variabili laboratoristiche osservate, mostra la differenza nel valore dei parametri cinetici tra pazienti con e senza

precoce miglioramento clinico: marginale è la differenza nel valore medio di t50% (713,6 vs 672,5, $p = 0,07$) ma il dato normalizzato raggiunge la significatività (1,055 vs 0,990, $p = 0,048$). Più netta la differenza tra i due sottogruppi di pazienti riguardo alla media di AUC e di AUC-ratio ($p = 0,022$ e $p = 0,018$ rispettivamente).

FIG.12



TAB.5 - parametri emostatici e di fibrinolisi

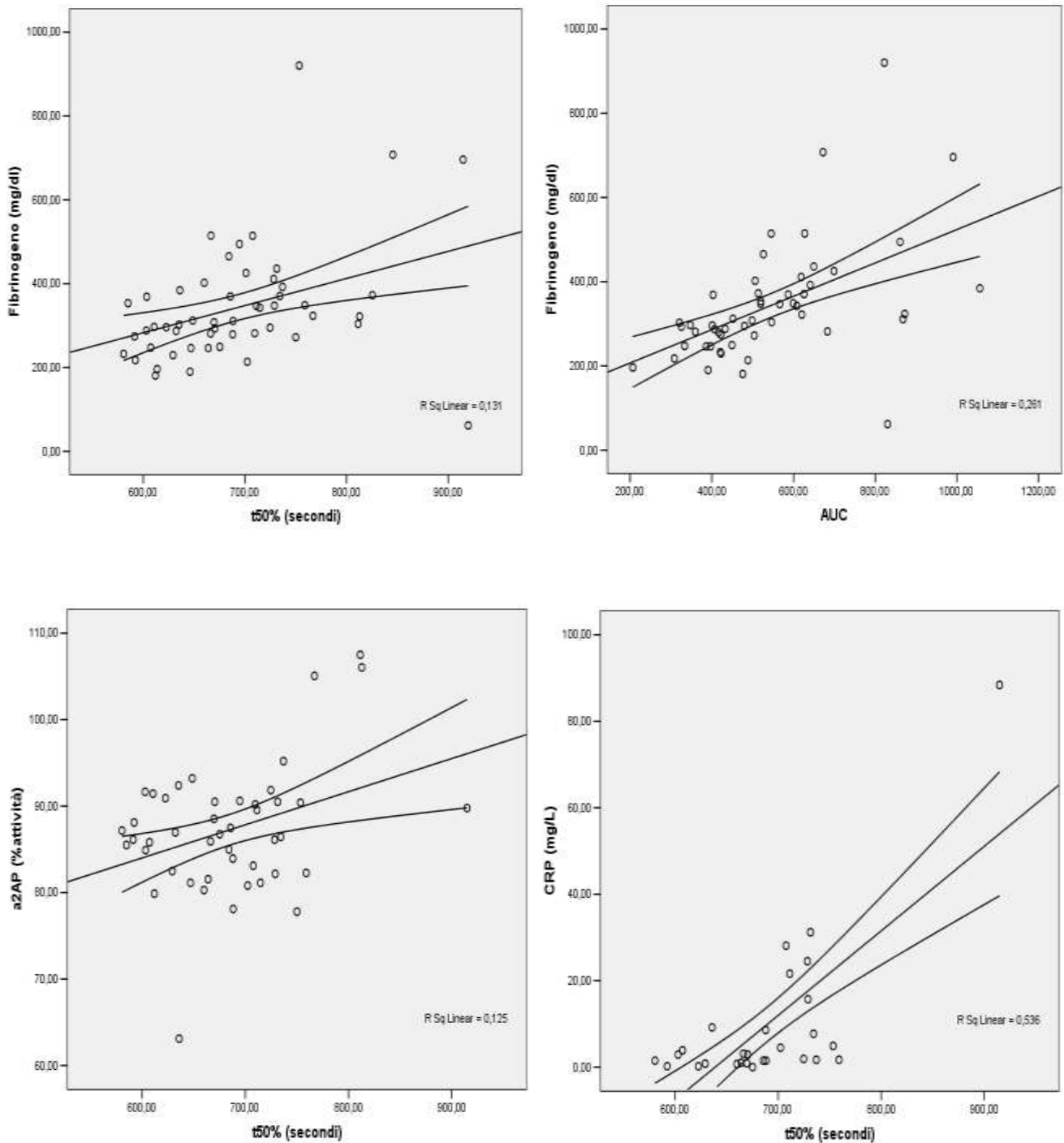
Variabile	Valori	Totale N=54 media(ds) o n/totale (% corretta)	Miglioramento precoce		
			SI, N=24 (47,1%) media(ds) o n/totale (% corretta)	NO, N=27 (52,9%) media(ds) o n/totale (% corretta)	P-value T-test, Fisher Exact o Chi- quadro
DDimero	ng/ml	349,6 (397,4)	249,6 (227,9)	451,7 (491,1)	0,076
Fg	mg/dl	335,5 (143,6)	312,6 (74,2)	361,8 (187,9)	0,218
DD/Fratio	-	1,64 (4,8)	0,86 (0,88)	2,41 (6,58)	0,267
PAI1	ng/ml	22,51(28,88)	27,49 (32,35)	18,15 (26,62)	0,263
a2AP	%attività	87,34 (9,04)	87,11 (6,26)	87,91 (11,41)	0,777
t50%	secondi	692,3 (78,6)	672,5 (65,71)	713,61 (88,05)	0,071
t50%ratio	-	1,02 (0,11)	0,99 (0,09)	1,05 (0,13)	0,049
AUC		542,8 (181,1)	483,5 (145,1)	603,6 (203,4)	0,022
AUCratio	-	1,25 (0,42)	1,11 (0,35)	1,39 (0,46)	0,018
CRP	ng/L	9,67 (17,84)	4,43 (8,69)	15,01 (23,14)	0,149
WBC	x10 ³ /microL	8,745 (3,49)	8,231 (2,68)	9,252 (4,25)	0,433
OmoCy	microMol/L	12,9 (4,06)	14,39 (3,43)	10,53 (2,69)	0,012
Glicemia	mg/dl	121,03 (34,5)	122,7 (27,3)	122,4 (41,5)	0,983
INR	-	1,04 (0,09)	1,02 (0,08)	1,07 (0,09)	0,197

Legenda: Fg, fibrinogeno; DD/F, rapporto DDimero-fibrinogeno; AUC, Area sotto la curva; CRP, proteina C reattiva; WBC, leucociti; OmoCy, omocisteina.

In figura 13 sono riportate le più significative correlazioni tra le diverse variabili in esame. Le concentrazioni pre-trattamento di a2AP dei pazienti sono risultate significativamente correlate con il t50% ($r = 0,353$, $p = 0,017$), il t50%ratio ($r = 0,361$, $p = 0,015$), ma non con l'AUC. Nessuna correlazione invece è riscontrabile tra parametri di fibrinolisi e concentrazioni di PAI1. Le concentrazioni basali di fibrinogeno sono risultate significativamente associate al t50% ($r = 0,362$, $p = 0,008$) e ancor più con l'AUC ($r = 0,511$, $p <$

0,0001). I livelli di CRP sono risultati fortemente associati ai valori di t50% ($r = 0,732$, $p < 0,0001$) e ai valori di AUC ($r = 0,510$, $p = 0,006$). Anche i valori di WBC si sono dimostrati associati a quelli di AUC ($r = 0,482$, $p = 0,005$).

FIG.13 - Correlazioni



4.9 – analisi della differenza tra misure di fibrinolisi e outcome

In tabella 6 è mostrata l'analisi multivariata secondo modello lineare. Non si è vista alcuna significativa differenza nelle quattro variabili di cinetica prese in considerazione, aggiustando per età, sesso, razza ed NIHSS all'esordio.

TAB.6 - covarianze - outcome e parametri cinetici di fibrinolisi.

parametro	Variabile	Mean square	F-value	P-value
t50% normalizzato	Età	0,0230	1,727	0,197
	Razza	0,0050	0,345	0,560
	Genere	0,1400	1,056	0,310
	NIHSS all'esordio	2,40E-005	0,002	0,967
	20% NIHSS miglior.	0,0020	0,120	0,730
t50% media	Età	11667,5760	1,857	0,181
	Razza	3830,8490	0,610	0,440
	Genere	5561,8440	0,885	0,353
	NIHSS all'esordio	4,4930	0,001	0,979
	20% NIHSS miglior.	145,5140	0,023	0,880
AUC normalizzata	Età	0,1480	0,940	0,338
	Razza	0,4000	0,252	0,618
	Genere	0,1740	1,104	0,300
	NIHSS all'esordio	0,5000	3,181	0,082
	20% NIHSS miglior.	0,2520	1,605	0,213
AUC media	Età	22296,5150	0,747	0,393
	Razza	2552,8200	0,086	0,771
	Genere	33076,8740	1,108	0,299
	NIHSS all'esordio	95737,9100	3,208	0,081
	20% NIHSS miglior.	44097,3660	1,478	0,231

5 - Elementi di discussione e prospettive di ricerca

A dispetto di una importante rilevanza sul piano dell'interpretazione patogenetica dell'ictus ischemico, tuttavia, il valore traslazionale dei marcatori biologici è al momento difficile da quantificare. Numerosi sono i dati contrastanti: Ioannidis e Panagiotou, in una recente metanalisi sull'effetto prodotto dalla numerosità campionaria sui risultati degli studi sui marcatori biologici, concludono che l'effetto desunto per la maggior parte di essi sia esagerato e non replicato da studi su più larga scala [Ioannidis&Panagiotou, Jama2011]; Hasan et al, inoltre hanno provato a racchiudere in una metanalisi tutti gli studi clinici a riguardo, rilevando che le relazioni significative tra markers ed esito clinico permangono solo per pochissimi di essi, come discusso precedentemente e in seguito [Hasan et al, BJCP 2012]. D'altro canto è anche vero che studi di notevoli dimensioni non possono tener conto in modo "estensivo" di numerosi fattori di variabilità della misura dei singoli marcatori. La misura, come osservato in alcuni dei nostri stessi risultati (si veda la conta leucocitaria, i livelli glicemici, di CRP, di omocisteina, ecc), di un marcatore biologico può risentire di ampie oscillazioni in fase iperacuta, in parte non note in letteratura e non prevedibili con sicurezza. Tali oscillazioni sono altresì significative soprattutto nelle prime 24-48 ore. Ancora da determinare sembra pure il ruolo che il marcatore stesso ha nelle diverse fasi di un processo trombotico (fattore di rischio pre-evento, marcatore in fase

iperacuta e cronica, marcatore in prevenzione secondaria, ecc.). Inoltre, interessante e relativamente poco esplorato è il ruolo dei marcatori biologici in relazione alla terapia riperfusiva con rt-PA per via endovenosa.

Se è vero che il valore traslazionale dei marcatori biologici è a tutt'oggi dubbio, è parimenti innegabile la necessità di continuare a studiarli, anche attraverso piccole esperienze monocentriche, che hanno il vantaggio di poter cogliere e meglio descrivere gli eterogenei aspetti della patogenesi dell'ictus ischemico. Le metanalisi che appaiono in letteratura sono, come discusso peraltro da alcuni degli autori delle medesime, da considerarsi esse stesse delle suggestioni, i cui risultati non possono tener conto oltretutto delle profonde differenze metodologiche dei singoli studi cui si rifanno: nella scelta dei pazienti, dei sottotipi di ictus ischemico, nelle comorbidità e nelle terapie assunte, nelle analisi di laboratorio e nel timing delle stesse analisi, nonché nella loro evoluzione temporale.

Nella nostra casistica, specifica di pazienti sottoposti a trombolisi endovenosa, i due gruppi, quello con buon outcome dopo fibrinolisi e quello con cattivo outcome, differiscono nella distribuzione per sesso e per la gravità dell'ictus all'esordio. Il sesso maschile è risultato associato ad outcome migliore dopo rt-PA ($p=0,044$). Questo è in contrasto con i dati noti in letteratura e ottenuti da subanalisi dei trial randomizzati controllati sull'rt-PA e riflette verosimilmente un bias legato al piccolo numero di soggetti. Le sottoanalisi dei trials indicano un miglior effetto del trattamento trombolitico nelle donne rispetto agli uomini [Kent et al, stroke 2005]. Più elevati tassi di ricanalizzazione sono stati osservati radiologicamente nelle donne rispetto agli uomini dopo

trombolisi endovenosa [Savits et al, stroke 2005]. Una migliore efficacia della terapia trombolitica è confermata anche in uno studio ad-hoc [Shobha, neurology 2010]; Tuttavia, come notano gli stessi autori, tra i pazienti non trattati con rt-PA quelli di sesso femminile presentano maggiore gravità all'esordio e hanno minori probabilità di buon outcome a distanza, questo potrebbe spiegare l'occorrenza di un risultato come il nostro in una piccola popolazione. Le cause di una possibile differente tendenza alla trombogenicità tra i due sessi non sono completamente note. La presenza di una sindrome metabolica si è dimostrata essere un fattore di resistenza alla trombolisi nella donna [Arenillas et al, stroke 2009] e maggiori concentrazioni plasmatiche di PAI1 sono state osservate in pazienti con ictus ischemico di sesso femminile [Kain et al, British J Hematology 2001]. Analizzando la nostra pur piccola casistica, emerge che i livelli di antiplasmina (a2AP) sono risultati significativamente maggiori, così come il t50%, nel sesso femminile rispetto a quello maschile. Solo un trend invece abbiamo misurato riguardo ai livelli di CRP, fibrinogeno e DDimero che risultano più elevati nelle donne e di PAI1, che risultano invece più elevati negli uomini. Queste differenze, soprattutto nelle concentrazioni di a2AP, potrebbero spiegare l'apparentemente paradossale migliore outcome del sesso maschile, riscontrato nella nostra popolazione.

L'NIHSS all'esordio è significativamente maggiore nei pazienti che non vanno incontro a miglioramento clinico ($p=0,029$). Tale dato, come riportato in introduzione, è diffusamente riprodotto in letteratura, anche con diverse definizioni di outcome clinico [Bovin et al, J Neurol Sci 2010]. L'averlo dimostrato prendendo la variabile clinica stessa quale

surrogato di ricanalizzazione rende ragione della rilevanza che la mera dimensione del trombo o dell'embolo ha sulla efficacia del trattamento farmacologico riperefusivo, quanto meno a dosaggio di rt-PA costante quale quello approvato attualmente per l'ictus ischemico.

Il nostro studio suggerisce un ruolo importante dell'infiammazione nel determinare l'efficacia del trattamento fibrinolitico. La CRP e i WBC mostrano un evidente trend verso livelli maggiori all'ingresso (entro 3 ore dall'esordio dei sintomi e prima dell'infusione di rt-PA) nei pazienti con mancata ricanalizzazione. Che un'elevata conta leucocitaria indichi maggiore probabilità di un outcome infausto nell'ictus cerebrale in generale è in linea con quanto riporta la letteratura [Furlan et al, Eur J Neurol 2013]. Tra i pochi studi che si sono focalizzati sui pazienti sottoposti a fibrinolisi e.v., la maggior parte non è riuscita a dimostrare un differente rischio prognostico in relazione a CRP e WBC [Audebert et al, stroke 2004]. Solo Tiainen, su quasi 1000 pazienti sottoposti a rt-PA, ha evidenziato OR significativi per buon outcome in pazienti con bassa CRP e bassa conta leucocitaria [Tiainen et al, Int J stroke 2013]. Tuttavia in tale studio, a differenza del nostro, la definizione di miglioramento clinico/ricanalizzazione adottata è stata quella di una riduzione all'NIHSS di almeno 4 punti rispetto al baseline, che non si è dimostrata quella con migliore sensibilità e specificità come surrogato di ricanalizzazione [Kharitonova et al, stroke 2011]. Nessuno studio inoltre, pur focalizzandosi primariamente su ictus ed infiammazione, ha anche esplorato la relazione tra infiammazione, ictus e sistema fibrinolitico. Ulteriori studi saranno quindi necessari per dirimere le incertezze su tale argomento. I

livelli di WBC non indicano, nella nostra casistica, una maggiore gravità dell'ictus all'esordio. I dati sui diversi profili di evoluzione temporale, potrebbero suggerire la possibilità di diversi potenziali di risposta infiammatoria nei singoli pazienti, possibile espressione di un contributo diverso al processo di fibrinolisi. La scarsa numerosità della casistica, soprattutto se suddivisa in diversi sottogruppi, non consente tuttavia di trarre conclusioni al momento su tale aspetto. La relazione positiva che tende ad esservi tra conta leucocitaria, CRP, livelli di fibrinogeno e di ddimero, e conta PLT, già prima del trattamento con rt-PA, sembra suggerire l'interrelazione esistente tra una precoce risposta infiammatoria e un'accelerazione sia del processo trombotico (WBC come marcatore di trombosi e di outcome) che del precoce inizio del processo fibrinolitico (possibile ruolo dei diversi profili di evoluzione della conta leucocitaria nel determinare outcome post-fibrinolisi). Tali ipotesi andranno confermate in una casistica più ampia. La forte associazione tra WBC e PLT rimanda alle recenti e ancora parziali evidenze su aggregati leuco-piastrinici nella fisiopatologia dell'ictus ischemico. La formazione di tali aggregati sembra dipendere dal tipo patogenetico di ictus, essendo più prominente in quelli di tipo aterotrombotico rispetto ai lacunari [Ishikawa et al, J Atheroscl thromb 2012]. L'evidenza tuttavia che la conta PLT non si correla con un miglior tasso di ricanalizzazione, suggerisce di considerare tale aspetto fisiopatologico come marginale nel determinare l'outcome post-fibrinolisi, pur rimanendo possibile un eventuale ruolo in alcuni sottotipi di ictus, come quello aterotrombotico.

L'iperglicemia all'ingresso non è risultata associata ad un miglioramento precoce post-trombolisi e nemmeno all'outcome a

lungo termine. Alcuni autori hanno osservato, su piccola casistica, una tendenza verso tassi maggiori di ricanalizzazione, entro 6 ore dal trattamento, in pazienti normoglicemici all'esordio [Alvarezsabin et al, stroke 2003]. Nella nostra popolazione l'iperglicemia persistente (entro 48-72 ore dall'esordio) è invece risultata associata ad un peggiore outcome precoce ($p = 0,05$) e a lungo termine ($p = 0,017$). Un recente studio, che tuttavia ha preso in esame il solo outcome a lungo termine, ha confermato che l'iperglicemia persistente e a 48h dall'esordio sono predittive di un peggiore esito neurologico [Putaalaa et al, cerebrovasc dis 2011].

Tra i marcatori sierologici del sistema fibrinolitico nessuno è risultato significativamente associato ad un miglioramento precoce post-rtPA. Da segnalare è il trend verso basse concentrazioni di DDimero quali predittori di ricanalizzazione ($p = 0,07$). In letteratura vi sono dati controversi sul significato dei livelli di DDimero nei pazienti con ictus: è stato suggerito siano indicatore di attivazione del sistema fibrinolitico ma anche di outcome negativo e di progressione clinica. [Skoloudik et al, J Thromb Thrombolysis 2010]. Skoloudik ha provato a chiarirne la dinamica di evoluzione nelle prime 24 ore dall'esordio di un evento cerebrale ischemico, non trovando correlazione tra le concentrazioni di DDimero e il timing di ricanalizzazione. Nello stesso studio tuttavia vengono inseriti pazienti sottoposti a trombolisi endovenosa e non, elemento che assieme ad una scarsa numerosità dei vari sottogruppi solleva dubbi sulle conclusioni cui gli autori giungono. Nella nostra popolazione maggiori livelli di DDimero pre-trattamento fibrinolitico si associano a mancato miglioramento clinico dopo 2 ore. Che il DDimero sia marcatore di attivazione del sistema fibrinolitico è

una ovvia conseguenza del fatto che il DDimero stesso è un prodotto del processo di fibrinolisi, tuttavia i dati suggeriscono che i livelli basali possano essere indicativi piuttosto di un maggior "burden trombotico" iniziale e quindi di una indiretta maggiore resistenza alla fibrinolisi. A supporto di tale affermazione un recente studio prospettico ha dimostrato un significativo aumento di rischio di sviluppare ictus ischemico, in una popolazione sana al baseline, per livelli aumentati di DDimero [Wannamethee et al, stroke 2012]. La notevole variabilità interindividuale e i numerosi fattori patogenetici intercorrelati rendono comunque necessari ulteriori studi per chiarirne il ruolo.

I parametri cinetici in vitro sono risultati invece significativamente associati al miglioramento precoce dopo 2 ore dall'infusione di rt-PA. Interessante è la significativa correlazione osservata tra t50% e concentrazioni di a2AP ($r = 0,353$ $p = 0,017$), relazione che non si osserva invece con i livelli di PAI1, suggerendo che l'a2AP sia il principale inibitore del processo fibrinolitico. Tale ipotesi è supportata in letteratura da diversi studi [Sazonova et al, J Thromb and Haemost 2007; van Giezen JJ et al, Blood Coagul Fibrinolysis 1993]. Anche i livelli di Fibrinogeno al baseline si correlano positivamente con il t50% ($r = 0,362$; $p = 0,008$). Questi risultati sembrano offrire la concreta possibilità di uno strumento di definizione prognostica in fase iperacuta, oltre che di interpretazione patogenetica dell'ictus ischemico.

Un commento a parte merita il risultato della determinazione dell'omocisteina. A dispetto dell'evidenza piuttosto ampia in letteratura sul ruolo protrombogeno dell'iperomocisteinemia [Undas et al, ArteriosclThromb and vasc biol 2006; Sauls et al, stroke J thromb and Hem 2003] vi sono evidenze contrastanti sul

ruolo di predittore di outcome infausto a breve e a lungo termine [Haapaniemi et al, EurJNeurol 2007; Men et al, Plos One 2013]. I risultati da noi osservati sembrano invece indicare un ruolo predittivo nei confronti un miglior tasso di ricanalizzazione dei pazienti con valori maggiori di Hcy ($p = 0,012$). Kalita et al hanno osservato migliori outcome a 3 mesi in pazienti con ictus con iper-Hcy [Kalita et al, Clin Neurol Neurosurg 2009]. Ribo et al, non hanno osservato alcuna correlazione tra i livelli di Hcy e outcome precoce dopo rt-PA in una piccola casistica [Ribo M et al, Thromb and Haem 2004]. Nessuna conclusione possiamo trarre sul nostro campione prendendo in esame la mRS a 3 mesi dall'evento a causa della bassa numerosità.

Pochi studi sull'Hcy, qui misurata tra le 24 e le 48 ore dall'esordio dei sintomi, hanno dimostrato un effetto di fase acuta nei pazienti con ictus con livelli più bassi al baseline, che poi crescono nell'arco di una settimana dall'esordio [Howard et al, stroke 2002, Haapaniemi et al, EurJNeurol 2007]. Non è invece noto se la terapia trombolitica ne influenzi le concentrazioni ematiche.

I risultati ottenuti pongono le basi per successivi esperimenti che riguarderanno:

- l'andamento della conta leucocitaria nei pazienti sottoposti a rt-PA, alla ricerca di una conferma sulla presenza di diversi profili che possano rendere conto, a dispetto della conta globale iniziale, di una eterogenea risposta infiammatoria del paziente e quindi di una diversa efficacia del trattamento stesso.
- l'omocisteina, per quanto concerne la definizione di un possibile effetto di fase acuta e l'interazione con la terapia fibrinolitica. Cercheremo di creare un profilo di evoluzione dei livelli con

prelievi seriatati nel tempo, in pazienti sottoposti o meno a fibrinolisi endovenosa, e parallelamente cercheremo conferma in una casistica più ampia dell'associazione con l'outcome dopo rt-PA.

- la ricerca di una conferma in una casistica più estesa, del valore predittivo dell'analisi in vitro di formazione e lisi del coagulo.

- l'eventuale ruolo di fattori della coagulazione, come il VII, l'VIII e il XIII nella patogenesi dell'ictus ischemico.

- l'interrelazione tra iperglicemia ed edema cerebrale post-TPA (la bassa numerosità non consente di trarre conclusioni sulla tendenza a presentare iperglicemia nei pazienti con ICH o edema cerebrale post-tPA: 119,9 vs 127,2, $p = 0,7$).

6 - Bibliografia

Alessi M.C. & Juhan-Vague I. **Contribution of PAI-1 in cardiovascular pathology.** *Arch Mal Coeur Vaiss. Jun 2004;97(6):673-678.*

Alvarez-sabin J., Molina C.A., Montaner J. et al. **Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfusion tissue plasminogen activator - treated patients.** *Stroke 2003; 34:1235-1240.*

Arenillas J.F., Sandoval P., Perez del la Ossa N., et al. **The metabolic syndrome is associated with a higher resistance to intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in women than in men.** *Stroke 2009; 40:344-349.*

Audebert H.J., Rott M.M., Eek T. and Haberl R.L. **Systematic inflammatory response depends on initial stroke severity but is attenuated by successful thrombolysis.** *Stroke 2004; 35: 2128-2133.*

Bill O., Zufferey P., Faouz M. and Michel P. **Severe stroke: patient profile and predictors of favourable outcome.** *J Thrombosis and Haemostasis 2012; 11: 92-99.*

Bjorkman J.A., Abrahamsson T.I., Nerme V.K., et al. **Inhibition of carboxypeptidase U (TAFIa) activity improves rt-PA induced thrombolysis in a dog model of coronary artery thrombosis.** *Thromb Res. 2005;116(6):519-524.*

Booth N.A., Simpson A.J., Croll A., et al. **Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets.** *Br J Haematol.* Nov 1988;70(3):327-333.

Bonvin C., Momjian-Mayor I., Sekoranja L., et al.. **Stroke severity and residual flow determined by transcranial colour-coded ultrasound (TCCD) predict recanalization and clinical outcome during thrombolysis.** *Journal of the Neurological Sciences.* 2010; 296(1): 96-100.

Broderick J.P., Palesch Y.Y., Demchuk A.M., et al. **Endovascular Therapy after Intravenous t-PA versus t-PA Alone for Stroke.** *N Engl J Med* 2013;368:893-903.

Brooks S.D., Spears C., Cummings C., et al. **Admission neutrophil-lymphocyte ratio predicts 90 day outcome after endovascular stroke therapy.** *J NeuroIntervent Surg* 2013;0:1-6.

Butte A.N., Houg A.K., Jang I.K., et al. **Alpha 2-antiplasmin causes thrombi to resist fibrinolysis induced by tissue plasminogen activator in experimental pulmonary embolism.** *Circulation.* 1997;95(7):1886-1891.

Burgin W.S. & Alexandrov A.V.. **Deterioration following improvement with tPA therapy: carotid thrombosis and reocclusion.** *Neurology.* Feb 27 2001;56(4):568-570.

Cadenas I.F. et al. **Influence of Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene**

polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007; 5: 1862-1868.

Cadenas I.F. et al. **PAI-1 4G/5G polymorphism is associated with brain vessel reocclusion after successful fibrinolytic therapy in ischemic stroke patients.** *International Journal of Neuroscience* 2010 Apr; 120(4):245-51.

Candelise L. et al. (on the behalf of the PROSIT Study Group). **Stroke-unit care for acute stroke patients: an observational follow-up study.** *Lancet* 2007; 369: 299–305.

Christiansen V.J., Jackson K.W., Lee K.N., et al. **The effect of a single nucleotide polymorphism on human alpha 2-antiplasmin activity.** *Blood.* Jun 15 2007;109(12):5286-5292.

Collen D. & Lijnen H.R. **Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis.** *Blood.* Dec 15 1991;78(12):3114-3124.

Clark W.M. et al. **Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset: the ATLANIS study: a randomized controlled trial.** *JAMA* 1999; 282(21):2019-2026.

Colucci M., Scopece S., Gelato A.V., et al. **In vitro clot lysis as a potential indicator of thrombus resistance to fibrinolysis--study in healthy subjects and correlation with blood fibrinolytic parameters.** *Thromb Haemost.* Apr 1997;77(4):725-

729.

Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., et al. **Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay.** *Blood. Jan 1988;71(1):220-225.*

De Keyser J. et al. **Intravenous Alteplase for stroke.** *Stroke 2007; 38:2612-2618.*

Demchuk A.M. et al. **Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator.** *Stroke 2001; 32: 89-93.*

Edy J. & Collen D. **The interaction in human plasma of antiplasmin, the fast-reacting plasmin inhibitor, with plasmin, thrombin, trypsin and chymotrypsin.** *Biochim Biophys Acta. Oct 13 1977;484(2):423-432.*

Egelund R, Rodenburg KW, Andreasen PA, et al. **An ester bond linking a fragment of a serine proteinase to its serpin inhibitor.** *Biochemistry. May 5 1998;37(18):6375-6379.*

Fàbregas J.M. et al. **Hemostatic markers of recanalization in patients with ischemic stroke treated with rt-PA.** *Neurology 2005; 65:366-70.*

Fischer B.E. **Comparison of fibrin-mediated stimulation of**

plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator (t-PA) and fibrin-dependent enhancement of amidolytic activity of t-PA. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1992;3(2):197-204.

Furlan A. et al. **Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled study. Prolyse in acute cerebral Thromboembolism.** *JAMA* 1999; 282: 2003-11.

Furlan J.C., Vergouwen M.D.I., Fang J. and Silver F.L. **White blood cell count is an independent predictor of outcomes after acute ischaemic stroke.** *European J Neurology* 2013; Jul 15. doi: 10.1111/ene.12233. [Epub ahead of print].

Gong X., Zou X. Liu L., et al. **Prognostic value of inflammatory mediators in 1-year outcome of acute ischemic stroke with middle cerebral artery stenosis.** *Mediators of inflammation* 2013; 2013:850714.

Haapaniemi E., Helenius J., Soenne L., Syrjala M., Kaste M. and Tatlisumak T. **Serial measurements of plasma homocysteine levels in early and late phase of ischemic stroke.** *Eur J Neurol* 2007; 14: 12-17.

Hacke W. et al. **Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS).** *Jama* 1995; 274:1017-1025.

Hacke W. et al. **Randomized double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II).** *The Lancet* 1998; 352: 1245-1251.

Hacke W. et al. (for the ECASS Investigators). **Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke.** *New England Journal of Medicine* 2008; 359:1317-29.

Hacke W. et al. **Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion– diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, doubleblind, placebo-controlled study.** *Lancet Neurology* 2009; 8:141–150.

Hasan N., McColgan P., Bentley P., Edwards R.J. and Sharma P. **Towards the indentification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review.** *Br J Clin Pharmacol* 2012; 74(2): 230-240.

Hess D.C. & Fagan S.C. **Repurposing an old drug to improve the use and safety of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: minocycline.** *Reviews in Neurological Diseases* 2010; 7 Suppl 1:S7-13.

Hill M.D. et al. **Sex-based differences in the effect of intra-arterial treatment of stroke. Analysis of the PROACT2 study.** *Stroke* 2006; 37:2322-2325.

Holmes W.E., Nelles L., Lijnen H.R., et al. **Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin).** *J Biol Chem* 1987;262(4):1659-1664.

Howard V.J., Sides H.G., Newman G.C., et al. **Changes in Plasma Homocyst(e)ine in the Acute Phase After Stroke.** *Stroke*. 2002;33:473-478.

Huntington J.A., Read R.J., Carrell R.W. **Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation.** *Nature*. 2000;407(6806):923-926.

Idicula T.T., Brogger J., Naess H., Waje-Andreassen U. and Thomassen L. **Admission C-reactive protein after acute ischemic stroke is associated with stroke severity and mortality: the "Bergen stroke study".** *BMC Neurology* 2009; 9(18): doi: 10.1186/1471-2377-9-18.

IMS study II investigators. **The Interventional Management of Stroke (IMS) II Study.** *Stroke* 2007; 38: 2127-2135.

Ishikawa T., Shimizu M., Kohara S., Takizawa S., Kitagawa Y. and Takagi S. **Appearance of WBC-platelet complex in acute ischemic stroke, predominantly in atherothrombotic infarction.** *J of Atherosclerosis and Thrombosis* 2012; 19(5): 494-501.

Jang I.K., Gold H.K., Ziskind A.A., et al. **Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis**

with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis. *Circulation*. Apr 1989;79(4):920-928.

Kain K., Catto A.J., Carter A.M., et al. **Decreased fibrinolytic potential in South Asian women with ischaemic cerebrovascular disease. *Br J Haematol*. 2001 Jul;114(1):155-61.**

Kain K. et al. **Gender differences in coagulation and fibrinolysis in white subjects with acute ischemic stroke. *Thromb Haemost* 2003; 1:390-392.**

Kalita J., Kumar G., Bansai V. and Misra U.K. **Relationship of homocysteine with other risk factors and outcome of ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 11(4): 364-7.**

Kent D.M. and Hill M.D. **Gender differences in tPA-related arterial recanalization. *Stroke*. 2005 Dec;36(12):2529.**

Khaja A.M. and Grotta J.C. **Established treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* 2007; 369:319-30.**

Kharitonova T., Mikulik R., Roine R.O. et al. **Association of early national institutes of health stroke scale improvement with vessel recanalization and functional outcome after intravenous thrombolysis in ischemic stroke. *Stroke* 2011; 42:1638-1643.**

Klement P., Liao P., Bajzar L. **A novel approach to arterial**

thrombolysis. *Blood.* Oct 15 1999;94(8):2735-2743.

Komissarov A.A., Declerck PJ, Shore JD. **Mechanisms of conversion of plasminogen activator inhibitor 1 from a suicide inhibitor to a substrate by monoclonal antibodies.** *J Biol Chem.* 2002;277(46):43858-43865.

Koyama T., Koike Y., Toyota S., et al. **Different NH₂-terminal form with 12 additional residues of alpha 2-plasmin inhibitor from human plasma and culture media of Hep G2 cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 15 1994;200(1):417-422.

Kruithof E.K. et al. **Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma.** *Blood.* Oct 1984;64(4):907-913.

Ioannidis J.P. and Panagiotou O.A. **Comparison of Effect Sizes Associated With Biomarkers Reported in Highly Cited Individual Articles and in Subsequent Meta-analyses.** *JAMA.* 2011;305(21):2200-2210.

Ishikawa T., Shimizu M., Kohara S., Takizawa S., Kitagawa Y. and Takagi S. **Appearance of WBC-platelet complex in acute ischemic stroke, predominantly in atherothrombotic infarction.** *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(5):494-501.

Lapchak P.A. et al. **Microplasmin: a novel thrombolytic that improves behavioural outcome after embolic strokes in rabbits.** *Stroke* 2002; 33:2279-2284.

Lee K.N., Jackson K.W., Christiansen V.J., et al. **A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion.** *Blood.* 2004;103(10):3783-3788.

Lees K.R. et al. **Time to Treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials.** *The Lancet* 2010 May 375(9727): 1695-703.

Lijnen H. **Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling.** *Thromb Haemost.* 2001;86(1):324-333.

Lijnen HR. **Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity.** *Biochemistry (Mosc).* Jan 2002;67(1):92-98.

Lucore C.L., Sobel B.E. **Interactions of tissue-type plasminogen activator with plasma inhibitors and their pharmacologic implications.** *Circulation.* Mar 1988;77(3):660-669.

Marler J.R. et al. (for the NINDS rt-PA Stroke Study Group). **Early stroke treatment associated with better outcome. The NINDS rt-PA Stroke Study.** *Neurology* 2000; 55:1649–1655.

Marti-Fabregas J., Borrell M., Cocho D., et al. **Hemostatic markers of recanalization in patients with ischemic stroke treated with rt-PA.** *Neurology.* Aug 9 2005;65(3):366-370.

Marti-Fabregas J., Borrell M., Cocho D., et al. **Change in hemostatic markers after recombinant tissue-type plasminogen activator is not associated with the chance of recanalization.** *Stroke*. Jan 2008;39(1):234-236.

Men X., Li J., Zhang B., Zhang L., Li H. and Lu Z. **Homocysteine and C-reactive protein associated with progression and prognosis of intracranial branch atheromatous disease.** *Plos One* 2013; 8(9): e73030.

Molina C.A. et al. **Transcranial ultrasound in clinical sonothrombolysis (TUCSON) trial.** *Annals of Neurology* 2009, 66: 28-38.

Montaner J., Fernandez-Cadenas I., Molina C.A., et al. **Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis.** *Stroke* 2006; 37: 1205-1210.

Mosnier L.O., Von dem Borne P.A., Meijers J.C., et al. **Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation.** *Thromb Haemost.* 1998;80(5):829-835.

Mutch N.J. et al. **TAFIa, PAI-1 and a2-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007; 5: 812-817.

Naess H., Nyland H., Idicula T. and Waje-Andreassen U. **C-reactive Protein and Homocysteine Predict Long-term Mortality in Young Ischemic Stroke Patients.** *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013 Nov;22(8):e435-40.

Nagai N., De Mol M., Lijnen H.R., et al. **Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice.** *Circulation.* 1999;99(18):2440-2444.

Nagai N., De Mol M., Van Hoef B., et al. **Depletion of circulating alpha(2)-antiplasmin by intravenous plasmin or immunoneutralization reduces focal cerebral ischemic injury in the absence of arterial recanalization.** *Blood.* 2001;97(10):3086-3092.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA stroke study group. **Tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke.** *New England Journal of Medicine* 1995; 333(24):1581-87.

Nesheim M., Wang W., Boffa M., et al. **Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis.** *Thromb Haemost.* Jul 1997;78(1):386-391.

Nesheim M., Walker J., Wang W., et al. **Modulation of fibrin cofactor activity in plasminogen activation.** *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:247-260.

Plow E.F., Herren T., Redlitz A. et al. **The cell biology of the plasminogen system.** *Faseb J.* 1995;9(10):939-945.

Ploplis V., Carmeliet P., Vazirzadeh S., et al. **Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice.** *Circulation.* 1995;92(9):2585-2593.

Potter van Loon B.J., Rijken D.C., Brommer E.J., et al. **The amount of plasminogen, tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in human thrombi and the relation to ex-vivo lysibility.** *Thromb Haemost.* Jan 23 1992;67(1):101-105.

Putala J., Sairanen T., Meretoja A. et al. **Post-thrombolytic hyperglycemia and 3-month outcome in acute ischemic stroke.** *Cerebrovascular Dis* 2011; 31:83-92

Rabai G., Szilagyi N., Sotonyi P., et al. **Contribution of neutrophil elastase to the lysis of obliterative thrombi in the context of their platelet and fibrin content.** *Thrombosis Research* 2010; 126: e94-e101.

Reed G.L., Matsueda G.R., Haber E. **Acceleration of plasma clot lysis by an antibody to alpha 2-antiplasmin.** *Trans Assoc Am Physicians.* 1988;101:250-256.

Reed GL. **Functional characterization of monoclonal antibody inhibitors of alpha 2-antiplasmin that accelerate fibrinolysis**

in different animal plasmas. *Hybridoma*. 1997;16(3):281-286.

Ribo M., et al. **Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with plasminogen activator.** *Stroke* 2004; 35:2123-2127.

Ribo M, Montaner J, Molina CA, et al. **Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator.** *Thromb Haemost.* 2004 Jun;91(6):1146-51.

Rijken D.C. & Lijnen H.R. **New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009, 7:4-13.

Robbie L.A., Bennett B., Keyt B.A., et al. **Effective lysis of model thrombi by a t-PA mutant (A473S) that is resistant to alpha2-antiplasmin.** *Br J Haematol.* Nov 2000;111(2):517-523.

Rubiera M., Alvarez-Sabin J., Ribo M., et al. **Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke.** *Stroke.* Jul 2005;36(7):1452-1456.

Sacco R.L. et al. **Experimental treatments for acute ischaemic stroke.** *The Lancet* 2007; 369: 331-41.

Sauls D.L., Wolberg A.S., and Hoffman M. **Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia.** *J Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 300-306.

Savitz S.I. et al. **Arterial occlusive lesions recanalize more frequently in women than in men after intravenous tissue Plasminogen activator administration for acute stroke.** *Stroke* 2005; 36:1447-1451.

Sazonova I.Y., Thomas B.M., Gladysheva I.P., et al. **Fibrinolysis is amplified by converting alpha-antiplasmin from a plasmin inhibitor to a substrate.** *J Thromb Haemost.* Oct 2007;5(10):2087-2094.

Shobha N., Sylaja P.N., Kapral M.K, Fang J. and Hill M.D. **Differences in stroke outcome based on sex.** *Neurology* 2010;74:767–771.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, et al. **The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature.** *J Biol Chem* 2001;276(36):33293-33296.

Simpson A.J., Booth N.A., Moore N.R., et al. **The platelet and plasma pools of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) vary independently in disease.** *Br J Haematol.* Aug 1990;75(4):543-

548.

Skoloudík D., Bar M., Sanák D. et al. **D-dimers increase in acute ischemic stroke patients with the large artery occlusion, but do not depend on the time of artery recanalization.** *J Thromb Thrombolysis*. 2010 May;29(4):477-82.

Sprengers E.D., Akkerman J.W., Jansen B.G. **Blood platelet plasminogen activator inhibitor: two different pools of endothelial cell type plasminogen activator inhibitor in human blood.** *Thromb Haemost*. Jun 30 1986;55(3):325-329.

Switzer J.A. et al. **A web-based telestroke system facilitates rapid treatment of acute ischemic stroke patients in rural emergency departments.** *The Journal of Emergency Medicine* 2009 Jan; 36(1):12-8.

Thelwell C. & Longstaff C. **The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* Apr 2007;5(4):804-811.

Tiainen M., Meretoja A., Strbian D., et al. **Body temperature, blood infection parameters, and outcome of thrombolysis-treated ischemic stroke patients.** *International J of Stroke* 2013; 8: 632-638.

Tokgoz S., Kayrak M., Akpınar Z., Seyithanoğlu A., Güney F. and Yürüten B. **Neutrophil lymphocyte ratio as a predictor of**

stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013 Oct;22(7):1169-74.

Torr-Brown S.R., Sobel B.E. **Attenuation of thrombolysis by release of plasminogen activator inhibitor type-1 from platelets.** *Thromb Res. Dec 1 1993;72(5):413-421.*

Tsivgoulis G. et al. **Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis: a meta-analysis of randomized and non-randomized studies.** *Stroke* 2008; 39: 593-594.

Undas A., Brozek J., Jankowski M., Siudak Z., Szczeklik A and Jakubowski H. **Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects.** *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1397-1404.

Undas A. et al. **Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: Effects of inflammation and oxidative stress.** *Atherosclerosis* 2008; 196; 551-557.

Undas A. et al. **Altered fibrin clot structure/function in patients with Cryptogenic Ischemic stroke.** *Stroke* 2009; 40:1499-1501.

Van Giezen J.J., Minkema J., Bouma B.N., et al. **Cross-linking of alpha 2-antiplasmin to fibrin is a key factor in regulating blood clot lysis: species differences.** *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993;4(6):869-875.

Wahlgren N. et al. (for the SITS-MOST investigators)

Thrombolysis with Alteplase for acute ischemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *The Lancet* 2007; 369: 275–82.

Wang H., Yu A., Wiman B., et al. **Identification of amino acids in antiplasmin involved in its noncovalent 'lysine-binding-site'-dependent interaction with plasmin.** *Eur J Biochem.* May 2003;270(9):2023-2029.

Wang H., Karlsson A., Sjostrom I., et al. **The interaction between plasminogen and antiplasmin variants as studied by surface plasmon resonance.** *Biochim Biophys Acta.* Nov 2006;1764(11):1730-1734.

Wang W., Boffa M.B., Bajzar L., et al. **A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor.** *J Biol Chem.* Oct 16 1998;273(42):27176-27181.

Wannamethee S.G., Whincup P.H., Lennon L., Rumley A., Lowe G.D. **Fibrin D-Dimer, Tissue-Type Plasminogen Activator, von Willebrand Factor, and Risk of Incident Stroke in Older Men.** *Stroke.* 2012;43:1206-1211.

Welsh P., Barber M., Langhorne P., Rumley A., Lowe GD. and Stott DJ. **Associations of inflammatory and haemostatic biomarkers with poor outcome in acute ischaemic stroke.** *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(3):247-53.

Wiman B. & Collen D. **On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin.** *Eur J Biochem* 1978;84(2):573-578.

Wiman B. & Collen D. **On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin.** *J Biol Chem. Sep 25 1979;254(18):9291-9297.*

Wiman B. **Plasminogen activator inhibitor 1 in thrombotic disease.** *Current Opinions Hematology* 1996;3(5):372-378.

Winbeck K., Poppert H., Etgen T., Conrad B. and Sander D. **Prognostic relevance of early serial C-Reactive protein measurements after first ischemic stroke.** *Stroke* 2002; 33: 2459-2464.

Ye S., Cech A.L., Belmares R., et al. **The structure of a Michaelis serpin-protease complex.** *Nat Struct Biol.* Nov 2001;8(11):979-983.

Zhu H. et al. **Annexin A2 ombined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke.** *Journal of Cerebral blood flow and metabolism* 2010; 30, 1137-1146.

7 – Pubblicazioni/presentazioni inerenti il dottorato

Pretreatment D-Dimer Levels in acute ischemic stroke Predict Reperfusion after intravenous thrombolysis. Congresso nazionale SIN, Torino, ottobre 2011.

I presenti risultati verranno presentati all'International stroke conference febbraio 2014, San Diego, California, USA.

8 – Altre pubblicazioni/presentazioni durante il corso di dottorato

Cancelli I, Janes F, Gigli GL, Perelli A, Zanchettin B, Canal G, D'Anna L, Russo V, Barbone F, Valente M. **Incidence of transient ischemic attack and early stroke risk: validation of the ABCD2 score in an Italian population-based study.** Stroke. 2011 Oct;42(10):2751-7.

D'Anna L, Janes F, Gigli GL. **Letter by D'Anna et al regarding article, "Long-term mortality in patients with stroke of undetermined etiology".** Stroke. 2013 Jan;44(1):e3.

Janes F, Gigli GL, D'Anna L, Cancelli I, Perelli A, Canal G, Russo V, Zanchettin B, Valente M. **Stroke incidence and 30-day and six-month case fatality rates in Udine, Italy: a population-based prospective study.** Int J Stroke. 2013 Oct;8 Suppl A100:100-5.