



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN

Biochimica, Biologia Molecolare e Biotecnologie

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Francesco Bernardi

**LIVELLI CIRCOLANTI DI FXIII:
UN NUOVO MARKER PROGNOSTICO NELL'INFARTO
ACUTO DEL MIOCARDIO**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/12

Dottorando

Dott.ssa Zeri Giulia

Tutore

Prof. Mirko Pinotti

Co-tutore

Dott. Gemmati Donato

Anni 2010/2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 4
1.1 <i>Storia naturale dell'infarto acuto del miocardio</i>	pag. 4
1.1.1 <i>Fattori di Rischio</i>	pag. 6
1.1.1.1 <i>Fattori di rischio Costituzionali</i>	pag. 6
1.1.1.2 <i>Fattori di rischio Modificabili</i>	pag. 6
1.1.2 <i>Aterosclerosi e Trombosi</i>	pag. 8
1.1.3 <i>Meccanismi cellulari e molecolari nella formazione del trombo</i>	pag. 8
1.1.4 <i>La Cascata della Coagulazione</i>	pag. 9
1.2 <i>Diagnosi</i>	pag.10
1.3 <i>Trattamenti</i>	pag.16
1.3.1 <i>Trattamento Generale</i>	pag.16
1.3.2 <i>Trattamento Specifico</i>	pag.17
1.3.2.1 <i>Terapie di Riperfusione</i>	pag.17
a) <i>Terapia trombolitica (trombolisi)</i>	pag.17
b) <i>Angioplastica (PTCA)</i>	pag.19
1.3.2.2 <i>Terapie Ancillari</i>	pag.20
1.4 <i>Prognosi</i>	pag.21
1.4.1 <i>Frazione di Eiezione, FE%</i>	pag.22
1.5 <i>Alcuni numeri</i>	pag.22
1.5.1 <i>Prevalenza e Incidenza</i>	pag.22
1.5.2 <i>Letalità e Mortalità</i>	pag.23
1.6 <i>Fattore XIII: struttura, funzione</i>	pag.24
1.7 <i>Fattore XIII e malattia cardiovascolare</i>	pag.26
1.8 <i>Le varianti geniche del FXIII</i>	pag.28
2. SCOPO DELLA TESI	pag.32

3. MATERIALI E METODI	pag.34
<i>3.1 Soggetti dello studio</i>	pag.34
<i>3.2 Valutazione dei livelli di FXIII</i>	pag.35
<i>3.2.1 Immunolettroforesi Metodo secondo Laurell</i>	pag.35
<i>3.2.2 Test immunologico al lattice</i>	pag.37
<i>3.2.3 Test immunoenzimatico E.L.I.S.A</i>	pag.38
<i>3.3 Follow-up e descrizione dell' endpoint</i>	pag.39
<i>3.4 Analisi Statistica</i>	pag.40
4 RISULTATI	pag.41
<i>4.1 Caratteristiche cliniche dei soggetti in studio</i>	pag.41
<i>4.2 Follow-up clinico ed endpoint</i>	pag.42
<i>4.3 Livelli di FXIII post-IMA</i>	pag.45
<i>4.4 Livelli di FXIII post-IMA ed endpoint</i>	pag.49
<i>4.5 Analisi di Sopravvivenza(Kaplan-meier Survival Analysis)</i>	pag.51
<i>4.6 Altre variabili con valore prognostico per MACEs</i>	pag.53
5 DISCUSSIOE	pag.55
6 CONCLUSIONI	pag.58
7 BIBLIOGRAFIA	pag.59

1. Introduzione

1.1 Storia naturale dell'infarto acuto del miocardio

L'infarto acuto al miocardio (IMA) è una situazione di ischemia e necrosi del tessuto cardiaco, ovvero un danno conseguente al mancato o diminuito afflusso di sangue in questo distretto e più precisamente di glucosio e ossigeno (ipossia o anossia) per obliterazione o mal funzionamento del circolo arterioso coronario [Figura 1].

Nel 90% dei casi è colpito solo il ventricolo sinistro (SV), mentre nel 10% dei casi sono colpiti entrambi i ventricoli [1,2]

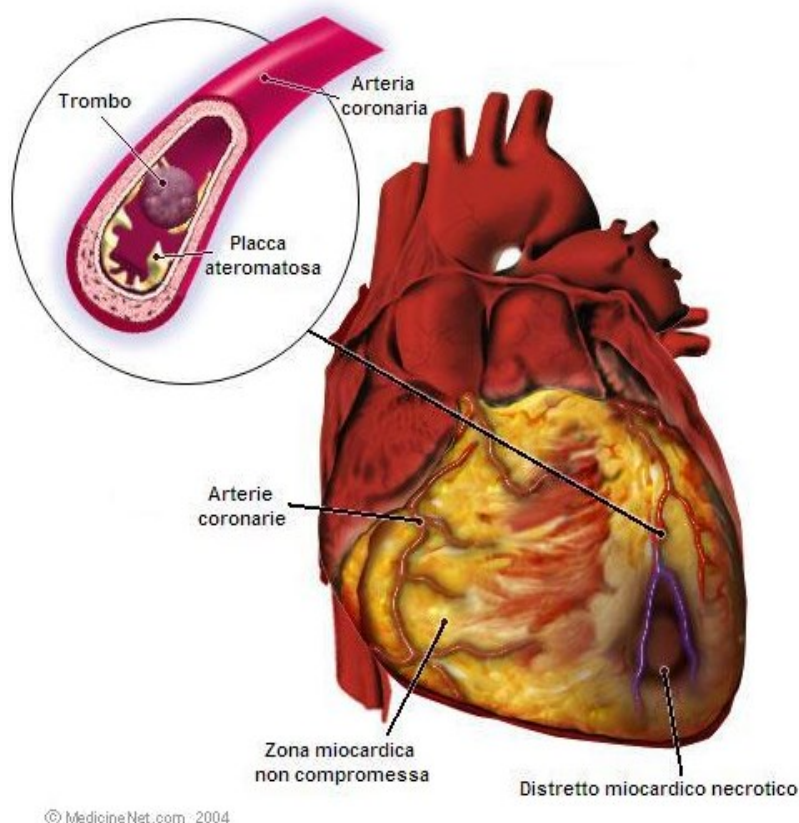


Figura 1 *Infarto miocardico acuto con conseguente necrosi di un distretto cardiaco dovuta all'occlusione dell'arteria coronaria sinistra da parte di un trombo in prossimità di una placca ateromatosa.*

L'infarto è causato:

- Dall'ostruzione acuta di un'arteria coronaria dovuta in genere a trombosi nell'80% dei casi, quasi sempre in prossimità di una placca ateromasica.
- Da un'emorragia subintimale per rottura dei capillari neoformati entro la placca ateromasica stessa nel 10% dei casi.
- Nel restante 10% dei casi da un embolo o ad uno spasmo prolungato e ripetuto dell'arteria.

Queste cause non sono comunque sufficienti all'insorgenza dell'infarto. L'IMA è il risultato finale di un lento processo di aterosclerosi che durante gli anni provoca il restringimento del lume delle arterie coronariche a causa della formazione delle cosiddette placche aterosclerotiche lipidiche o ateromi [3,4].

Quando un'arteria si occlude, è definita arteria coronarica stenotica e la lacerazione o il distacco di una placca provocano un caratteristico dolore toracico detto angina instabile che rappresenta la sindrome immediatamente precedente all'IMA (Angina instabile e IMA sono unificate nella definizione di SCA ovvero Sindromi Coronariche Acute). L'arresto della circolazione sanguigna nell'arteria occlusa fa scendere la pressione a zero nelle diramazioni successive l'ostruzione. Il sangue raggiungerà la zona attraverso altri vasi, se il sangue arriverà prima che le cellule muoiono, si eviterà ogni conseguenza, altrimenti insorgerà necrosi.

La necrosi inizia dopo 20-40 minuti dall'occlusione (tempo variabile secondo lo stato nutritivo delle cellule), dopo tale periodo diviene irreversibile, anche se l'irrorazione sanguigna ritorna alla normalità. Il danno ischemico è invece reversibile quando è in grado di regredire e le cellule colpite riprendono le loro funzioni, purchè sia ripristinata la normale circolazione del sangue [1].

L'istante di tempo che separa il danno ischemico reversibile da quello irreversibile è definito "punto di non ritorno" [Figura 2].

Quanto più grande sarà l'arteria occlusa, tanto maggiore sarà la zona necrotica e se questa è minore del 10% della massa miocardica totale, possono non essere rilevati segni di alterata funzione ventricolare. A seconda della gravità e dell'estensione dell'area infartuata, si possono distinguere:

infarto massivo transmurale (tutto lo spessore della parete cardiaca),

infarto massivo non transmurale,

infarto laminare (verso la superficie interna del cuore),

infarto miliare (a piccoli focolai) [5].

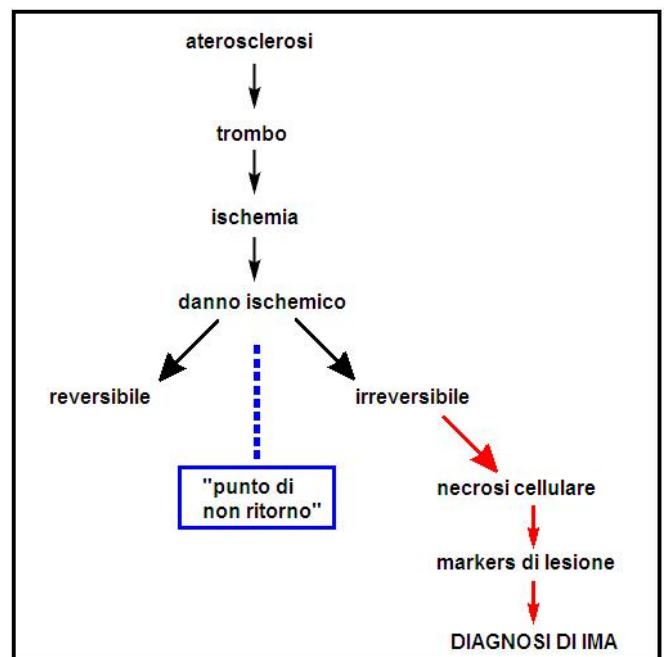


Figura 2. Schema della patogenetica dell'infarto

Inoltre la sede dell'infarto varia in rapporto alla coronaria occlusa:

- **infarto anteriore**: occlusione del ramo discendente dell'arteria coronaria sinistra
- **infarto anterolaterale**: occlusione dell'arteria coronaria sinistra
- **infarto posteriore**: occlusione dell'arteria coronaria destra.

Il danno ischemico irreversibile comporta inoltre un rilascio consistente di macromolecole da parte dei miocardiociti danneggiati che consiste nella perdita di enzimi e proteine come la **creatinachinasi cardiospecifica (CK-MB)**, la **mioglobina (Mgb)**, le **troponine I e T cardiache (cTnI e cTnT)**. Queste macromolecole diventano quindi importanti marcatori diagnostici dell'IMA in quanto sono normalmente assenti nel circolo ematico e pertanto dosabili come markers serici del miocardio.

1.1.1 Fattori di rischio

I fattori di rischio cardiovascolare rappresentano le condizioni specifiche di ciascun individuo che possono aumentare le probabilità di manifestare una patologia del cuore o dei vasi.

I fattori di rischio possono essere suddivisi in due categorie: i fattori di rischio **Costituzionali**, cioè fattori che non sono modificabili, e fattori di rischio detti **Modificabili**, che sono cioè fattori sui quali è possibile intervenire per prevenire una malattia o cambiarne il decorso prognostico[6].

1.1.1.1 Fattori di Rischio Costituzionali

- **ETA'**: il rischio aumenta proporzionalmente all'età, con gli anni infatti la pompa cardiaca e il sistema vascolare si usurano.
- **SESSO**: l'infarto miocardico è più frequente nel sesso maschile (rapporto 4:1 tra maschi e femmine) a parità di caratteristiche rispetto al sesso femminile (in età fertile) in quanto gli estrogeni hanno un effetto protettivo sul sistema vascolare femminile. Tuttavia tale divario si riallinea per le donne in menopausa.
- **FAMILIARITA'**: la presenza di malattie cardiovascolari nei genitori e nei parenti più prossimi da un'idea delle proprie caratteristiche genetiche, va comunque detto che la predisposizione ad ammalarsi può non essere ereditaria o, nel caso in cui fosse stata ereditata, non necessariamente si manifesterà.

1.1.1.2 Fattori di Rischio Modificabili

Tra i principali fattori di rischio sui quali è possibile intervenire ricordiamo:

- **IPERTENSIONE ARTERIOSA (IPTA)**: nei vasi sanguigni di soggetti ipertesi si creano delle turbolenze che non solo possono deformare o rompere i vasi ma costringono il

cuore ad uno sforzo maggiore, ed essendo il cuore un muscolo sottoposto a sforzo continuo a lungo andare si deformerà perdendo efficienza ed efficacia.

- **FUMO:** il tabagismo è uno dei più importanti fattori di rischio associati. Il fumo di sigaretta non solo danneggia le arterie, in particolare le coronarie con depositi di perossidi e radicali liberi, ma provoca un aumento della pressione arteriosa.
- **SOVRAPPESO/OBESITÀ:** spesso si associano a stili di vita sedentari, il cuore si affatica enormemente per irrorare una massa corporea maggiore del normale. Inoltre gli individui in sovrappeso hanno la tendenza a sviluppare iperglicemia, ipercolesterolemia IPTA e diabete. Questo insieme al fumo è sicuramente uno dei fattori di rischio principalmente modificabili.
- **IPERCOLESTEROLEMIA:** la colesterolemia in un individuo normale è stata recentemente fissata a 190 mg/dl, ma devono essere tenuti in considerazione i livelli di LDL ovvero il “colesterolo cattivo” che tende a depositarsi nei vasi danneggiandoli, idealmente dovrebbero essere ≤ 115 mg/dl. Il colesterolo HDL è invece il colesterolo definito “buono” perché è efficacemente eliminato dall’organismo e per questo alti livelli sono considerati “protettivi”. Oggi è possibile controllare l’ipercolesterolemia con l’utilizzo di farmaci specifici come ad esempio le STATINE.
- **DIABETE MELLITO:** elevati e continui livelli di glicemia nel sangue danneggiano gravemente il sistema vascolare. Il controllo della glicemia va effettuato seguendo una dieta sana, riducendo il sovrappeso e avvalendosi degli ipoglicemizzanti.
- **SEDENTARIETÀ:** una sana e costante attività fisica dà la possibilità di controllare i livelli di colesterolo, il diabete e l’obesità e non ultimo migliora i livelli pressori arteriosi.
- **DIETA SCORRETTA:** seguire una dieta basata su cibi molto ricchi in lipidi come grassi saturi, comporta un aumento dei livelli di colesterolo circolante e quindi un aumento della pressione sanguigna. Inoltre un’alimentazione di questo tipo sta nella maggioranza dei casi alla base di obesità e diabetismo.
- **STRESS:** insieme alla IPTA è uno dei fattori di rischio più subdoli e sottovalutati. Il modo in cui ogni individuo reagisce allo stress indirettamente ha effetti anche sugli altri fattori di rischio; uno stress elevato può spingere a mangiare di più, fumare di più, quindi ad avere un aumento nella pressione sanguigna.

1.1.2 Aterosclerosi e Trombosi

L'aterosclerosi è una malattia cronica immuno-infiammatoria, fibroproliferativa, favorita da una condizione di iperlipidemia. Colpisce principalmente l'intima delle arterie di medio e grosso calibro, incluse l'aorta, le carotidi, le coronarie e le arterie periferiche, facendola inspessire. Tale inspessimento porta a un restringimento del lume con conseguente inadeguato flusso. Inoltre, la deposizione di sostanze grasse nella parete delle arterie, ne modifica la struttura formando placche aterosclerotiche responsabili della perdita della levigatezza. La placca aterosclerotica è inoltre composta di collagene, elastina, proteoglicani, qualche cellula muscolare liscia ed è ricca di infiltrazioni macrofagiche, segno di infiammazione.

Se la placca si fessura, il *core*, ricco in lipidi e sostanze protrombotiche (fattore tissutale) capaci di generare trombina e aggregazione piastrinica [7], venendo a contatto con il sangue circolante e genera una massa solida costituita da componenti del sangue capace di occludere un vaso, il cosiddetto trombo [7].

Sulle placche fessurate si depositano le piastrine che, con la loro capacità adesiva, imbrigliano a sé globuli bianchi e globuli rossi **[Figura 3]**, formando un coagulo che si accresce rapidamente fino ad occupare tutto il vaso attraverso il quale il sangue non circolerà più.

Il territorio in cui questo sangue era diretto, resterà senza ossigeno e nutrienti, quindi morirà [8]. Le dimensioni, la sede e la composizione del trombo sono regolate da forze emodinamiche (effetto meccanico), dalla trombogenicità del substrato esposto (effetto molecolare locale) e dall'efficacia dei meccanismi anticoagulanti e fibrinolitici fisiologici [8].

1.1.3 Meccanismi cellulari e molecolari nella formazione del trombo

Disfunzioni a carico dell'endotelio, come la perdita della sua integrità, innescano una serie di reazioni biochimiche e molecolari paragonabili a quelle finalizzate alla prevenzione di un'emorragia e alla riparazione della parete del vaso. E' importante sottolineare che i meccanismi molecolari e cellulari dell'emostasi fisiologica e della trombosi patologica sono gli stessi ma con tempistiche e localizzazioni inadeguate.

La matrice esposta della parete vasale lesa e la trombina prodotta dall'attivazione della cascata coagulativa, così come l'epinefrina e l'ADP (adenosina difosfato), sono potenti agonisti piastrinici.

Le piastrine contribuiscono alla formazione del trombo secondo i seguenti step:

1. Adesione al substrato trombogenico (Fattore di von Willebrand (vWF), collagene, fibronectina e laminina),
2. Diffusione delle piastrine sulla superficie,
3. Aggregazione/degranulazione con formazione del trombo bianco

Inoltre l'esposizione delle componenti più profonde della parete vasale stimola la formazione di trombina attraverso l'attivazione della cascata della coagulazione [7].

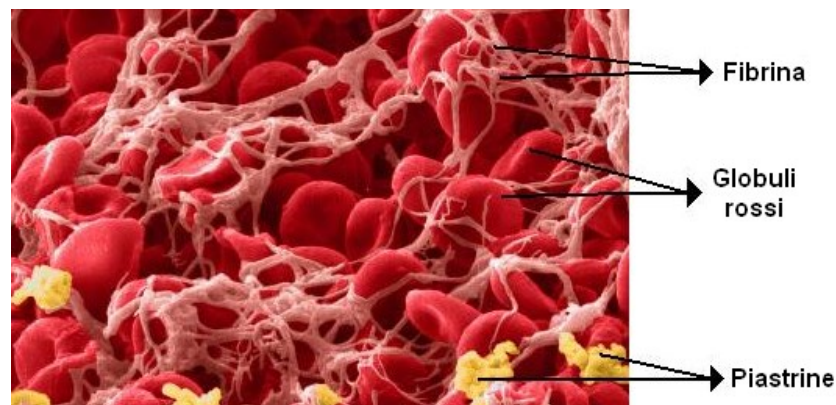


Figura 3. Microfotografia dell'organizzazione iniziale di un coagulo/trombo. Ben evidente la rete di fibrina che imbriglia globuli rossi e piastrine.

1.1.4 La Cascata della Coagulazione

Contestualmente alla rottura della placca, oltre all'adesione piastrinica, si attiva la cascata coagulativa, con la formazione di trombina che catalizza la polimerizzazione della maglia di fibrina, stabilizzata covalentemente dal Fattore XIII della coagulazione (FXIII), con aumentata resistenza alle forze di flusso e alla fibrinolisi [7].

La cascata della coagulazione è formata da una sequenza di reazioni, che integrano zimogeni e cofattori, ed è normalmente distinta in tre vie principali (**Figura 4**):

- a) Attivazione da contatto (*Via Intrinseca*)
- b) Attivazione del complesso Fattore VII/Fattore Tessutale (*Via Estrinseca*)
- c) Conversione del fattore X a fattore Xa (*Via Comune*)

E' importante sottolineare che questa suddivisione è utile solo a livello teorico mentre *in vivo* numerose interrelazioni caratterizzano la cascata e la più importante attivazione fisiologica è quella della via estrinseca.

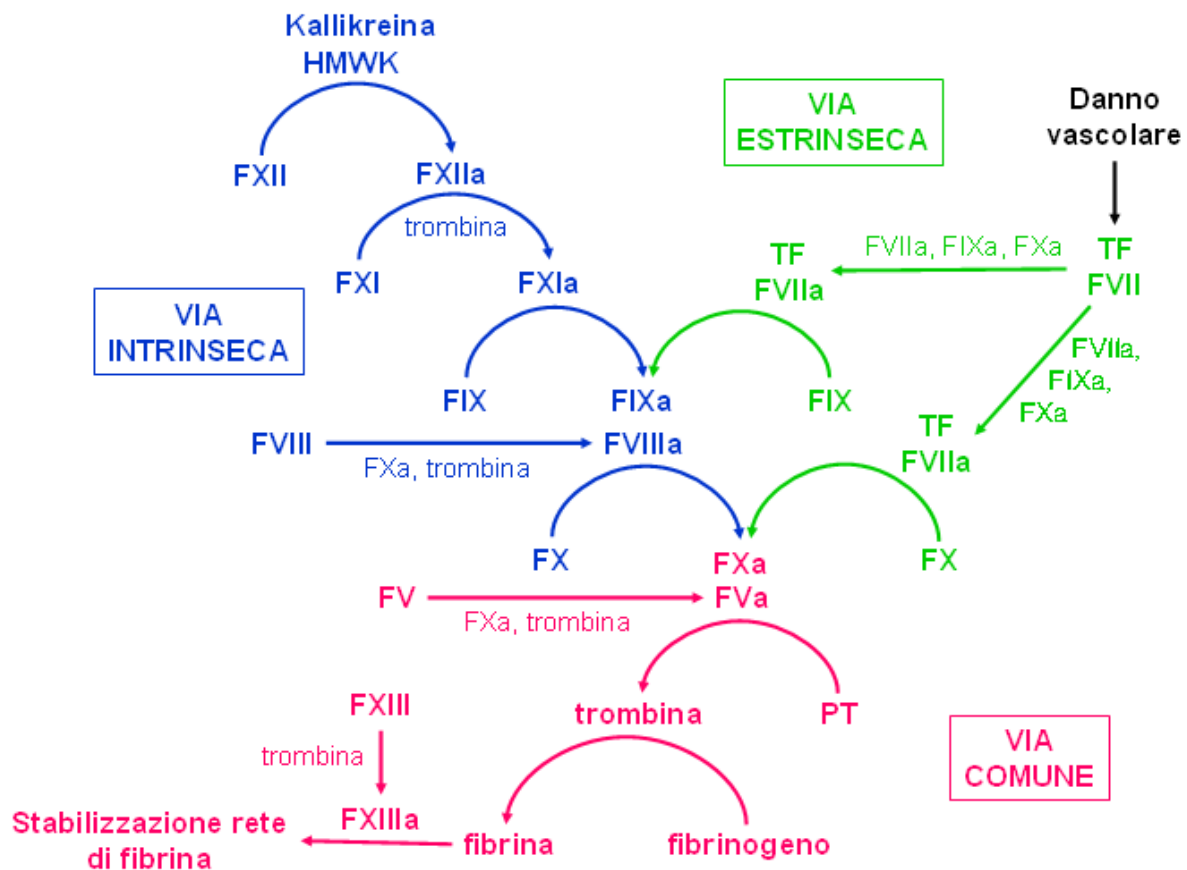


Figura 4. Schema della cascata coagulativa: via intrinseca e via estrinseca che si uniscono in una via comune in conclusione della quale partecipa attivamente il FXIII.

1.2 Diagnosi

La diagnosi di IMA si basa su tre principali caratteristiche stilate nelle linee guida della WHO (World Health Organization):

- 1) Tipico dolore toracico (sintomatologia)
- 2) Modificazioni caratteristiche del tracciato elettrocardiografico (ECG)
- 3) Primo aumento e successivo graduale decremento dei markers serici di lesione.

Sintomatologia

Non sempre la sintomatologia di un infarto è chiara e definita, a volte può essere confusa con disturbi gastrici o persino mancare ed essere rilevata casualmente da un ECG eseguito per altri motivi.

Normalmente, i sintomi dell'infarto sono imponenti e tipici, anche se non sempre a sintomi gravi corrisponde un infarto grave, anche perché la sensibilità al dolore è un fenomeno del tutto soggettivo. Solo un esame clinico approfondito potrà valutare l'entità del danno subito dal cuore. Si giunge quindi alla diagnosi definitiva sulla base dei segni clinici, dell'ECG e da ulteriori indagini di laboratorio e strumentali.

I pazienti con IMA descrivono tale dolore come: dolore toracico intenso, oppressivo, urente, trafittivo, come una pugnalata, con sensazione di morte imminente, irradiato al braccio di sinistra o a entrambe le braccia, anche alla mandibola o al gomito e al polso. E' un dolore che si accompagna a segni neurovegetativi come sudore freddo per attivazione del sistema ortosimpatico, tachiaritmie e non si placa con la nitroglicerina sublinguale per chi ne facesse già uso [5].

Elettrocardiogramma

L'ECG è il tracciato ottenuto registrando i potenziali del campo elettrico che si originano dal cuore.

I miocardiociti sono carichi elettricamente grazie a ioni K^+ all'interno e Na^+ all'esterno. La presenza di proteine citoplasmatiche cariche negativamente creano a riposo un ambiente cellulare interno elettronegativo di circa -100 mV (*polarizzazione*) dove le cariche sono quiescenti. Quando il tessuto cardiaco si attiva si innesca un processo definito *depolarizzazione*. La sequenza di depolarizzazione è espressa come un'onda di propagazione nella quale le cariche positive precedono le cariche negative. Processo inverso riguarda la sequenza di *ripolarizzazione*, dove le cariche negative precedono quelle positive in modo da ripristinare la condizione di polarizzazione iniziale a riposo.

Ecco quindi che un ciclo cardiaco può essere graficamente espresso. Nei soggetti normali l'impulso cardiaco si forma nel nodo del seno e si propaga attraverso gli atri che si contraggono e questa attività elettrica genera l'onda P, successivamente l'impulso si dirige al nodo atrioventricolare e i ventricoli eccitati si contraggono, l'evento è quindi rappresentato dal complesso di onde QRS seguito dall'onda T che rappresenta la fase di ripolarizzazione (**Figura 5A**).

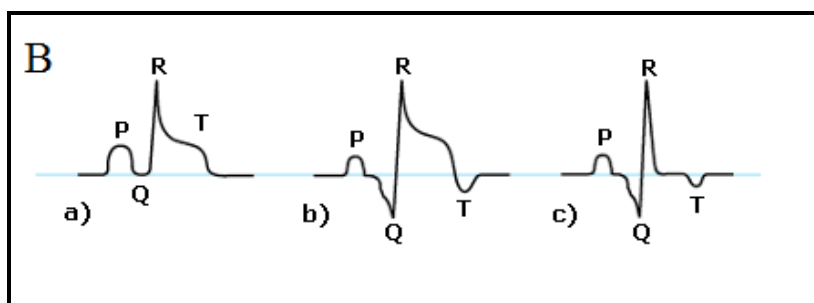
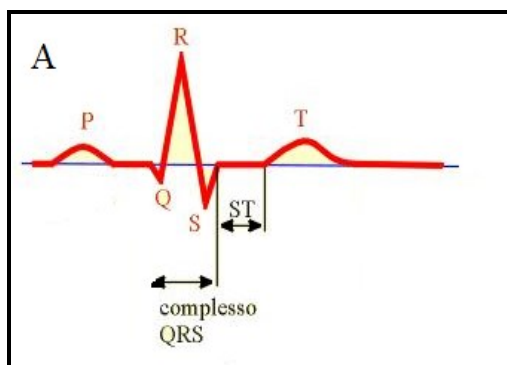


Figura 5. **A)** *Rappresentazione schematica di un tracciato ECG normale.* **B)** *Schema di ECG dopo IMA: a) prime quattro ore: elevazione del segmento ST; b) a quattro giorni: comparsa delle onde Q e T negative; c) a quattro settimane: normalizzazione del segmento ST ma permanenza delle onde Q e T negative.*

Il segmento ST è di particolare importanza nella diagnosi di IMA poiché il suo andamento è indicativo del flusso sanguigno, del livello di ossigenazione del miocardio e non ultimo da un'idea dello stato delle coronarie. In caso di IMA tale segmento presenta generalmente un sopraslivellamento rispetto alla linea isoelettrica su cui normalmente giace (**Figura 5B**).

Secondo le linee guida dell'ACC/AHA (American College of Cardiology/American Heart Association) [9], l'ECG deve essere eseguito entro 10 e non oltre 20 minuti dall'arrivo del paziente con dolore toracico poiché consente di accertare la presenza dell'infarto, la sua localizzazione e la sua evoluzione.

Le alterazioni elettrocardiografiche di ischemia miocardica che può evolvere in necrosi miocardica sono essenzialmente due:

- sopraslivellamento del tratto ST o STEMI (ST-elevation myocardial infarction)
- sottoslivellamento del tratto ST o NSTEMI (non ST-elevation myocardial infarction)

Entrambi questi quadri clinici hanno la possibilità in corso di necrosi di evolvere. Una di queste modificazioni è rappresentata dallo sviluppo di onde Q anomale che riflettono la morte tessutale e compaiono in media 8-12 ore dopo l'insorgenza dei sintomi ma possono anche non comparire

fino a 24-48 ore dopo. L'evoluzione può essere in IMA-Q in particolare per i pazienti STEMI e IMA non Q per i pazienti NSTEMI.

Il tracciato ECG permette di ottenere informazioni cliniche di grande utilità, ma fornendo solo un'approssimazione del voltaggio prodotto dal cuore, può risultare non immediatamente alterato, bisogna comunque tenere presente che alterazioni possono comparire fino a 24 ore dopo l'esordio del primo sintomo ed è quindi necessario un monitoraggio continuo [9].

Markers sierici di danno cardiaco

Oltre che sulla sintomatologia, la diagnosi si basa anche su specifici esami del sangue.

Dalla zona lesa si liberano delle sostanze proteiche e degli enzimi che sono frutto della distruzione delle cellule. Le sostanze proteiche si riscontrano già dopo un giorno dall'infarto e causano un aumento della temperatura corporea (37,5°-38,5°) e un aumento del numero dei globuli bianchi e della velocità di sedimentazione dei globuli rossi (VES).

Un marker cardiaco ideale dovrebbe essere molto specifico per il muscolo cardiaco e perciò assente negli altri tessuti muscolari, dovrebbe essere rilasciato rapidamente nel sangue appena dopo l'insorgenza del danno e dovrebbe soprattutto comunicare un'informazione quantitativa dell'intensità/estensione del danno [10].

Markers specifici come la **Creatinachinasi**, la **Mioglobina** e la **Troponina** sono, per questo utili sia per la diagnosi di necrotizzazione che per la prognosi (**Figura 6**) e (**Tabella 1**).

ENZIMI	TEMPO DI COMPARSA	PICCO PLASMATICO	NORMALIZZAZIONE
Mgb	1-2 h	4-12 h	24 h
cTnI	3-6 h	24-48 h	5-15 giorni
CK-MB massa	4-6 h	18-24 h	36-48 h
CK totale	4- h6	24-30 h	60 h

Tabella 1. Biomarkers di necrosi miocardica acuta: mioglobina (Mgb), troponina cardiaca (cTnI), creatinfosfochinasi e isoenzima MB massa (CK e CK-MB massa); loro tempi di comparsa dall'insorgenza del dolore, di picco plasmatico e di normalizzazione.

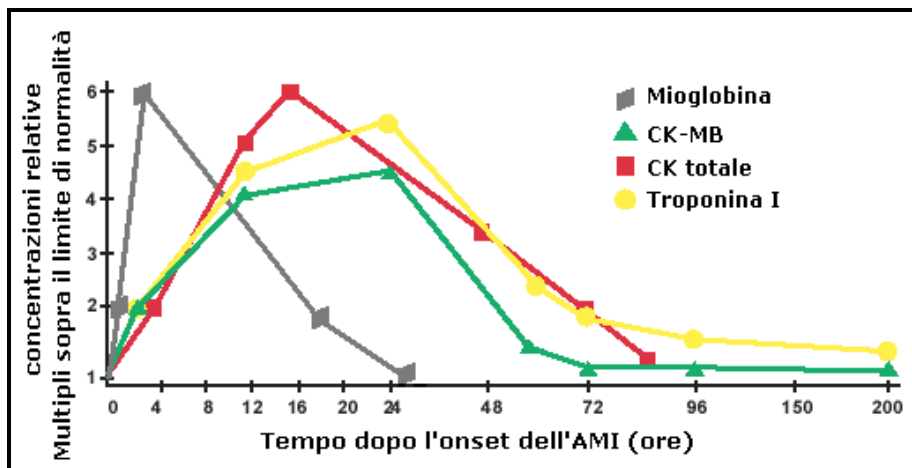


Figura 6. Caratteristiche rilevanti dei principali markers serici con ruolo diagnostico per l'IMA anche a distanza dall'evento acuto

La Creatinachinasi

Fino a pochi anni fa la creatinachinasi (CK totale) è stata il marker cardiaco principalmente utilizzato nella valutazione delle SCA. Esso è un enzima molto sensibile nell'identificare il danno cardiaco (tempo medio del raggiungimento del picco in circolo 24 ore, con inizio dell'innalzamento da 4 a 8 ore dall'insulto per negativizzarsi in circa 3 gg) e può accuratamente predire le dimensioni della necrosi.

Nonostante ciò la CK presenta alcuni limiti, i suoi livelli sono comunemente elevati in pazienti con malattie muscolari, intossicazioni da alcool, trauma alla muscolatura scheletrica, attacchi epilettici, esercizio intenso ed embolia polmonare.

La CK è costituita da due monomeri, i suoi enzimi sono quindi formati dall'associazione di due monomeri M (CK-MM) isoforma predominante nel muscolo, e dei due monomeri B (CK-BB) forma predominante nel cervello; esiste anche un'isoforma ibrida la CK-MB.

Anche l'isoforma MB più specifica per il muscolo cardiaco può essere presente in più distretti dell'organismo. Per questo, metodi più recenti si avvalgono di misurazioni dei livelli di CK-MB con specifici test enzimatici che sono però a loro volta limitati da problemi di disponibilità (sensibilità del dosaggio dipendente dal momento del prelievo) e mantenimento di specificità [7].

Il livello plasmatico dell'attività di CK-MB è nel range di 2-4 UI/l e per un'affidabile diagnosi di infarto basata sull'attività totale di CK-MB si deve verificare un aumento al di sopra di 9 UI/l.

L'isoforma MB rilasciata in circolo è rapidamente convertita tramite un taglio proteolitico e si identificano due isoforme MB1 e MB2 in equilibrio con un rapporto MB2 e MB1 di uno a uno. Quando si manifesta un infarto, la forma tessutale MB2 è rilasciata in circolo in piccole quantità cosiché l'attività plasmatica totale di CK-MB rimane entro il normale range ma se il rapporto MB2/MB1 è > 1,5 questo costituisce la base per una diagnosi precoce di IMA.

La mioglobina

La mioglobina (Mgb) è una proteina eme a basso peso molecolare che si trova sia nel muscolo cardiaco sia in quello scheletrico, non è quindi specifica per il muscolo miocardico, anche se è molto sensibile come indicatore di danno muscolare ed è liberata rapidamente (di solito entro 1-2 ore) dal miocardio necrotico dopo l'inizio del danno.

Tuttavia normali livelli di mioglobina tra la 4^o e la 18^o ora dall'insorgenza dei sintomi esclude un IMA [11].

Le Troponine

Le troponine cardiache sono di grande importanza nella diagnosi di IMA. Il complesso delle troponine consiste in tre subunità che regolano la contrazione del muscolo cardiaco: Troponina I (cTnI) che lega l'actina e impedisce l'interazione actina - miosina, cTnT che lega la tropomiosina e cTnC che lega il calcio. I test immunologici con anticorpi monoclonali sono in grado oggi di distinguere specificamente le isoforme T e I. Tale test risulta essere molto sensibile poiché il normale valore circolante di Troponina I cardiaca è circa uguale a zero e i livelli salgono rapidamente dopo 3-6 ore dal danno cardiaco rimanendo elevati fino a 15 giorni dopo l'evento ischemico [Figura 7]. Ciò non vale per la forma C perché muscolo cardiaco e muscolatura liscia la condividono, perciò nessun test immunologico specifico è presente sin ora.



Figura 7. Sensibilità diagnostica dei marcatori macromolecolari di IMA in funzione del tempo trascorso dall'insorgenza del dolore toracico (Modificato da Rosamond TL, Postgrad Med., 2002)

In conclusione la diagnosi di IMA utilizzando markers serici di danno è effettuata entro le prime 6-12 ore dall'evento, valutando markers sensibili quali la CK-MB e la mioglobina all'arrivo del paziente, dopo un'ora dal ricovero e ogni 2-3 ore fino a 6 ore dopo la scomparsa dei sintomi. Nel

caso in cui i valori di tali markers siano elevati, le linee guida impongono dosaggi ogni 3-4 ore nella prima giornata e ogni 6-8 ore fino al secondo-terzo giorno dal ricovero. Questo perché se in 12-16 ore dall'IMA i valori si normalizzano, il sospetto può essere escluso nella maggior parte dei casi [7].

1.3 Trattamenti

La diagnosi di IMA nei pazienti con dolore toracico è spesso non definitiva, nonostante ciò il trattamento del paziente segue due linee principali: il *trattamento generale* nella fase iniziale (uguale per tutte le sindromi coronariche acute o sospette) e un *trattamento specifico* una volta confermata la diagnosi.

1.3.1 Trattamento Generale

La prima misura di carattere generale è la somministrazione di **ossigeno**: l'ipossia, infatti, non è rara nei pazienti colpiti da IMA.

E' dimostrato che la somministrazione di ossigeno riduce il sopraslivellamento del tratto ST e ha la capacità di ridurre l'insulto ischemico. Le linee guida dell'ACC/AHA indicano una somministrazione di routine di ossigeno per i pazienti con IMA non complicato durante le prime 3-6 ore e supplementi di ossigeno per tutti i pazienti colpiti da IMA complicato per mantenere un normale livello di saturazione [9].

Anche l'uso di **nitroglicerina** è una delle misure terapeutiche generali. E' un farmaco largamente utilizzato nel trattamento dell'IMA perché anti-ischemico e con azione vasodilatatrice sul circolo coronarico responsabile di aumentare il flusso sanguigno verso le regioni ischemiche.

La nitroglicerina somministrata per via endovenosa oltre al dolore, riduce la possibilità di sviluppo di scompenso cardiaco, l'estensione dell'IMA e la morte cardiaca, influenzando così la sopravvivenza.

Si è visto in modelli animali che la terapia a lungo termine con nitrati, in seguito a riperfusione, sembra favorire il rimodellamento ventricolare [12].

Il trattamento dovrebbe iniziare con un bolo di 12,5 – 25 µg, seguito da un'infusione con pompa di 10-20 µg/min aumentando il dosaggio di 5-10 µg ogni 5-10 minuti mentre sono controllate le risposte emodinamiche e quella clinica.

L'**Acido acetilsalicilico (ASA)** è divenuto parte integrante degli schemi terapeutici non solo dell'IMA, ma più in generale della vasculopatia aterosclerotica. Il Second International Study of Infarct Survival (ISIS-2) ha dimostrato l'efficacia dell'ASA nel trattamento dell'IMA, con una

riduzione della mortalità a 35 giorni del 23% [13]. L'ASA riduce l'incidenza di eventi vascolari nei pazienti con IMA durante il primo mese. Inoltre inibisce in modo irreversibile la ciclossigenasi piastrinica, un enzima che determina la formazione del Trombossano A₂ mediatore dell'aggregazione piastrinica.

Infine la riduzione del dolore e dell'ansia rimane un elemento di grande importanza nella cura del paziente con IMA. Il dolore e l'ansia associati contribuiscono a un'eccessiva attività del sistema nervoso autonomo e all'irrequietezza. Questi fattori a loro volta aumentano la domanda metabolica del miocardio. In caso di necessità al paziente possono, quindi essere somministrati **narcotici** che agiscono sul dolore non solo direttamente ma anche indirettamente, riducendo il tono simpatico e la secrezione catecolaminica. Hanno comunque effetti favorevoli l'aumento della pressione arteriosa, frequenza cardiaca e consumo di ossigeno elevando il grado ischemico. Per questo la morfina, somministrata a dosi di 2-4 mg fino a 25-30 mg ogni 15 minuti è il farmaco di prima scelta sia per la sua tollerabilità sia per i suoi ridottissimi effetti collaterali negativi considerando anche la sua capacità di ridurre l'ansia [14].

1.3.2 Trattamento Specifico

Una volta effettuato il trattamento generale, in base ai risultati emodinamici e dell'ECG, al paziente sono somministrati trattamenti specifici per le sue condizioni.

I trattamenti specifici sono:

- **Terapia di riperfusione:**
 - a) Terapia trombolitica
 - b) Angioplastica
- **Terapie ancillari:**
 - a) Congiuntiva
 - b) Aggiuntiva

1.3.2.1 Terapie di Riperfusione

a) Terapia Trombolitica

Consiste nella somministrazione di agenti in grado di attivare il plasminogeno endogeno a plasmina, che frammenta la fibrina con conseguente lisi del trombo coronarico e ripristino del flusso attraverso l'arteria coronarica occlusa.

Una revisione di 9 trials ha mostrato una riduzione significativa della mortalità (21%) a 35 giorni nei pazienti affetti da IMA, trattati con terapia trombolitica rispetto alla terapia convenzionale

[15]. Gli agenti trombolitici sono generalmente somministrati ai pazienti con STEMI, infatti, i benefici della terapia trombolitica in questi pazienti sono maggiori perché dipendono soprattutto dalla durata dei sintomi. La quantità di miocardio che può essere risparmiata dalla necrosi sarà tanto maggiore quanto più precocemente il vaso viene ricanalizzato. L'effetto della trombolisi sulla mortalità è massimo nei pazienti ricoverati entro la prima ora o comunque, entro le prime tre ore dall'inizio dei sintomi e decresce progressivamente con il passare del tempo (fino a 12 ore dalla comparsa dei sintomi).

Tale trattamento viene comunque a volte esteso a pazienti NSTEMI e a pazienti con sintomatologia insorta da più di 24 ore. Le linee guida suggeriscono la somministrazione di vari agenti trombolitici, ad oggi approvati tra i quali: **Streptochinasi (SK)**, **Urochinasi (UK)**, **rtPA** (recombinant tissue-type plasminogen activator), **Anistreplase** (APSCA: anisoylated plasminogen streptokinase activator), **Retepase (rPA)** e **Tenecteplase** [16].

Tutti questi farmaci hanno dimostrato di essere in grado di limitare le dimensioni dell'infarto, preservare le funzioni ventricolari e aumentare la sopravvivenza.

Tra i fattori che influenzano la decisione di somministrare agenti trombolitici si contemplano il tempo intercorso dall'inizio dei sintomi, l'età del paziente, le condizioni emodinamiche e la presenza di anamnesi con altre condizioni morbose.

Per quanto concerne l'età del paziente, i maggiori benefici della terapia trombolitica, in termini di mortalità, sono evidenti nei pazienti più giovani e vanno riducendosi con l'aumentare dell'età, subendo un rapido decremento dopo i 75 anni. Tali pazienti, pur giovando della terapia trombolitica, a causa dell'aumentato rischio di reinfarto, presentano una riduzione del beneficio relativo.

Il principale effetto collaterale negativo della terapia trombolitica è la possibilità di emorragia intracranica ma tale terapia ha subito notevoli mutamenti negli ultimi decenni, dall'utilizzo di trombolitici di prima generazione come la streptochinasi con spiccate caratteristiche antigeniche, di reazione allergica e induzione di ipotensione, si è passati all'uso di molecole naturali di tipo ricombinante come rt-PA (recombinant tissue-type plasminogen activator) insieme a suoi mutanti e varianti, con il vantaggio di una minore antigenicità e senza evidenza diretta di ipotensione farmaco-indotta [17,18]. D'altra parte il breve tempo di emivita anche dei farmaci di ultima generazione richiede infusione continua e conseguente aumento del rischio di emorragie [9].

Il rapporto quindi tra efficacia e rischio emorragico unito a pessima qualità della vita è molto sbilanciato e viene perciò tenuto presente soprattutto per anziani, donne in gravidanza e pazienti appena sottoposti a intervento chirurgico.

b) Angioplastica (PTCA)

L'**angioplastica** (nota con l'acronimo PTCA - *percutaneous transluminal coronary angioplasty*) è una metodica mini-invasiva di cateterismo cardiaco che consente di dilatare un restringimento del lume di un vaso sanguigno (stenosi) per mezzo di uno speciale catetere a palloncino introdotto attraverso un'arteria, generalmente l'arteria femorale comune. Il catetere spinto fino al vaso occluso è in seguito gonfiato in corrispondenza della stenosi, in modo da ripristinare il normale diametro del vaso e incrementare il flusso sanguigno.

In conformità a criteri clinici e/o anatomici si decide se posizionare uno o più STENT. Lo stent è una piccola rete metallica cilindrica, con parete sottile, fissato su un palloncino che, gonfiandosi, lo dilata e lo rilascia sulla superficie dell'arteria dove ripara le irregolarità del vaso mantenendolo pervio [19].

In questo modo si riduce in maniera significativa la probabilità che il vaso si restringa nuovamente (restenosi) da circa il 40-50% a circa il 10-20% [16].

Normalmente lo stent si ricoprirà nell'arco di pochi mesi di un nuovo strato di cellule del vaso e rimarrà per sempre in quella posizione.

La PTCA è un metodo molto efficace per ristabilire la perfusione coronarica ed è applicabile a circa il 90% dei pazienti con STEMI. In **Figura 8** è mostrata la differenza tra un'arteria sana e una obliterata e come viene eseguita l'angioplastica.



Figura 8 Schema della riperfusione meccanica mediante PTCA: l'arteria obliterata viene dilatata e successivo posizionamento dello Stent.

La riperfusione miocardica mediante PTCA può essere presa in considerazione:

- a) come alternativa alla terapia di trombolisi precoce
- b) dopo trombolisi

E' prevedibile un ulteriore miglioramento dei risultati mediante la somministrazione di inibitori delle glicoproteine IIb/IIIa (quali abiciximab, eptifibatide, tirofiban) in associazione alla PTCA.

E' stato dimostrato che tali molecole riducono l'incidenza di morte e di IMA correlato alla procedura e a una ridotta necessità di re-PTCA nel vaso trattato per ricorrenza ischemica miocardica a un mese e a 6 mesi [9]. Oggi nei principali centri a elevato turn-over è esclusivamente eseguita la PTCA come terapia riperfusiva elettiva.

1.3.2.2 Terapie Ancillari

Si suddividono in Congiuntiva e Aggiuntiva, sono terapie coadiuvanti di completamento e di mantenimento associate normalmente alle terapie di riperfusione. La terapia Congiuntiva è effettuata con agenti antitrombotici quali ASA ed eparina e antiaggreganti quali gli inibitori della glicoproteina IIb/IIIa; che hanno lo scopo di impedire la riocclusione dell'arteria dopo terapia trombolitica [14]. L'attività antitrombotica di tali farmaci permette un elevato aumento di prodotti di degradazione del fibrinogeno nel plasma, i quali legando la trombina inibiscono l'aggregazione piastrinica. Gli inibitori della glicoproteina IIb/IIIa operano inibendo il recettore GpIIb/IIIa, presente sulla superficie delle piastrine impedendo l'aggregazione piastrinica e la conseguente formazione del trombo [18].

La terapia Aggiuntiva è mirata a stimolare la "guarigione del miocardio" somministrando farmaci a carattere protettivo quali β -bloccanti, ACE-inibitori, calcio antagonisti e nitrati che facendo rallentare il lavoro del miocardio arginano la progressione della necrosi e aiutano quel processo definito "remodeling" simultaneo alla cicatrizzazione del tessuto cardiaco, essenziale per una funzionalità ottimale cardiaca.

I β -bloccanti difendono il cuore dagli effetti catecolaminergici tossici bloccando i recettori β -adrenergici, in questo modo diminuiscono il consumo di ossigeno da parte del miocardio, la frequenza cardiaca e di conseguenza la contrattilità miocardica migliorando così il flusso sanguigno a livello delle coronarie. I nitrati, come già detto, hanno un'azione vasodilatatoria con conseguente riduzione del consumo di ossigeno e attenuazione dei sintomi dolorosi ma permette anche di tenere sotto controllo manifestazioni più severe di insufficienza cardiaca come l'edema polmonare. I Ca^{2+} -antagonisti secondo le linee guida vanno somministrati solo nel caso in cui i β -bloccanti siano inefficaci, non tollerati dal paziente o controindicati. A loro volta causano una vasodilatazione a livello periferico e delle coronarie rallentando la contrattilità dei miocardiociti.

La terapia con ACE-inibitori promuove la riduzione della dilatazione del ventricolo sinistro e quindi un rallentamento della prognosi verso lo scompenso cardiaco aiutando nel “remodeling” del ventricolo. Tale terapia viene generalmente somministrata una volta raggiunta la stabilizzazione clinica del paziente.

1.4 Prognosi

Successivamente alla dimissione, se non vi sono altre condizioni morbose, circa il 30% dei pazienti colpiti da infarto acuto del miocardio torna ad una vita normale in pochi mesi, mentre il 70% di questi sopravvive per altri dieci anni. In generale la mortalità durante il ricovero ospedaliero è compresa tra il 7,5-15% e non è necessariamente dovuta all'estensione dell'infarto. E' chiaro che maggiore è la quantità di muscolo compromesso dal punto di vista contrattile peggiore sarà la prognosi sia per quanto riguarda il recupero funzionale sia per quanto riguarda la sopravvivenza.

Sono pertanto utili “linee guida” nella valutazione prognostica dei dati clinici come ad esempio l'utilizzo della Classificazione di Killip, utilizzata per stratificare il rischio di morte a 30 giorni nei pazienti con IMA in base a specifiche caratteristiche cliniche (**Tabella 2**).

Classificazione di Killip			
Classe	%IMA	Mortalità a 30 giorni	Caratteristiche Cliniche
1	40-50%	6%	Nessun segno clinico di scompenso cardiaco (assenza di III tono e di stasi polmonare)
2	30-40%	17%	Presenza di crepitii polmonari ed elevata pressione giugulare, insufficienza ventricolare sinistra lieve-moderata (III tono e rantoli alle basi)
3	10-15%	38%	Edema polmonare acuto classico insufficienza ventricolare sinistra grave
4	5-10%	81%	Shock cardiogeno

Tabella 2. *Classificazione di Killip: correlazione tra mortalità ospedaliera e grado di scompenso cardiaco.*

La rivascularizzazione farmacologica e meccanica (PTCA e bypass aortocoronarico) hanno cambiato profondamente l'evoluzione della prognosi delle patologie cardiovascolari diminuendo la mortalità ospedaliera al 10% circa nei pazienti sottoposti a rivascularizzazione con farmaci e

5% nei pazienti sottoposti ad angioplastica. Nonostante abbia un significato favorevole sulla sopravvivenza ha introdotto nuove variabili sia per quanto riguarda la classificazione prognostica, con l'introduzione della valutazione della Frazione di Eiezione (FE%), sia per quanto riguarda l'outcome clinico come nel caso del rimodellamento cardiaco. A questa evoluzione è legata la comparsa dei MACEs (*Major cardiac events*: il reinfarto, la recidiva, lo scompenso cardiaco e le aritmie) i quali hanno portato alla formazione di una popolazione di pazienti che comportano un consistente costo per la società [20,21].

1.4.1. Frazione di Eiezione, FE%

Nei pazienti che dopo la fase acuta non presentano caratteristiche ad alto rischio è importante misurare, prima di dimetterli, la Frazione di Eiezione (FE%): ovvero la porzione di sangue che il cuore pompa dal ventricolo sinistro ad ogni battito cardiaco.

Nei soggetti sani la FE% è $\geq 55\%$, per questo un livello più basso indica uno scompenso cardiaco. Nei pazienti IMA, alla dimissione, la FE% può risultare peggiore di quella misurata dopo l'evento acuto proprio come conseguenza del "remodelling" o di un reinfarto, al contrario può anche risultare migliorata grazie alla risoluzione dell'ischemia [22].

Se la FE% risulta $\leq 45\%$, la mortalità ad un anno è superiore al 10%, ma se combinata ad altre complicanze può comportare un rischio di morte superiore al 20%.

Nei pazienti con buona FE% di solito si associa un test da sforzo, che se risulta positivo a basso carico associa a mortalità ad un anno maggiore del 5% [23].

I pazienti con prova da sforzo negativa o positiva ad alto carico hanno una prognosi a basso rischio di mortalità, circa 1-2%, quindi possono essere dimessi e ricontrollati a 4 settimane.

1.5 Alcuni Numeri

1.5.1 Prevalenza ed incidenza

Nella popolazione italiana, di età compresa tra i 65 e i 74 anni, la prevalenza di infarto acuto del miocardio è 6,4% negli uomini e 1,6% nelle donne.

I dati ISTAT relativi all'anno 2010 indicano che il 19,5 % della popolazione ha più di 65 anni e stimano che nel 2020 sarà il 22,3 % con un 6% con età superiore a 80 anni. Questo preannuncia che la popolazione colpita da eventi ischemici sarà sempre maggiore.

In Italia si stima che in un anno oltre 135.000 individui abbiano subito un evento coronarico acuto e che di questi, 45.000 abbiano portato a decesso [24] (**dati reperibili sul sito www.cuore.iss.it/indicatori**).

Ad oggi si evidenzia un'incidenza di circa 61 mila eventi cardio-ischemici l'anno negli uomini compresi tra i 35 e i 74 anni, e circa 16 mila nelle donne. Il numero di nuovi eventi annuali (fatali e non fatali) è quindi riconducibile a circa 80 mila tra gli uomini e circa 20 mila nelle donne (dati relativi agli anni compresi tra il 2000-2010, www.rssp.salute.gov.it)

1.5.2 Letalità e Mortalità

L'infarto miocardico è la causa più frequente, nel mondo, di mortalità. In Italia la mortalità per malattie cardiovascolari rappresenta circa il 45% di tutte le morti, dove l'8% è rappresentato da IMA [24, 25].

Studi di comunità dimostrano che la mortalità dopo il primo mese di un IMA è circa del 50% di cui il 30-40% si verifica entro le prime 2-3 ore dopo l'inizio dei sintomi [26].

La letalità a 28-30 giorni dall'evento infartuale risulta del 35% nel sesso maschile e del 58% nel sesso femminile, con range che variano rispetto alle regioni. Tali decessi sono principalmente dovuti a scompenso cardiaco, reinfarto, rottura della parete ventricolare o del setto interventricolare, morte improvvisa: tutti endpoints presi in considerazione in questo studio. Nonostante questa elevata mortalità pre-ospedaliera, negli ultimi 40 anni la mortalità si è più che dimezzata (tasso di mortalità ridotto del 53% per IMA e 63% per malattie cardiovascolari tra il 1970 e il 2008), (**Figura 9**) [27]; da sottolineare che ciò è dovuto non solo alle procedure sempre più innovative ed efficaci (PTCA in particolare), ma anche alle differenti versioni della Classificazione Internazionale delle malattie e delle cause di morte, utilizzate per compilare i certificati di morte e all'adozione di uno stile di vita più sano.

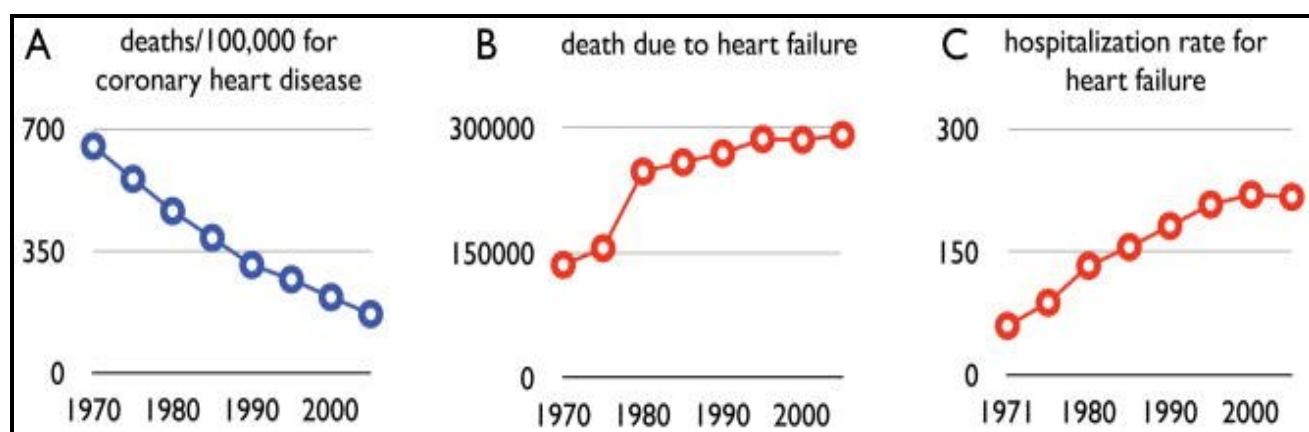


Figura 9. A e B: Tassi di mortalità per malattie cardiache e Heart Failure dal 1970 al 2005; C tassi di ospedalizzazione per Heart Failure dal 1971 al 2006 (modificata da Nahrendorf M, et Al. *Circulation*. 2010)

1.6 Fattore XIII: struttura, funzione

E' una proteina con un peso molecolare pari a circa 320 kD sintetizzata in forma zimogena, è presente sia nel plasma in forma tetrameric A_2B_2 che nelle piastrine in forma dimerica A_2 [28].

Il fattore XIII attivato (FXIIIa) appartiene alla famiglia delle transglutaminasi [31,34].

Le due subunità A (peso molecolare di 77 kD ciascuna), presentano attività catalitica e inducono il processo di stabilizzazione della fibrina; mentre le due subunità B (peso molecolare 80 kD ciascuna), non hanno attività enzimatica e agiscono principalmente come carrier delle subunità A [28].

Classicamente la deficienza di FXIII è associata a problemi emorragici precocemente diagnosticabili per il sanguinamento dal cordone ombelicale nei primi giorni di vita, a emorragie cerebrali soprattutto nelle carenze severe [29], a emorragie post-operatorie ritardate, a difettosa rimarginazione delle ferite e ad aborti ricorrenti. Il difetto è ereditato come tratto autosomico recessivo [28].

Il FXIII è essenziale non solo nelle ultime fasi della coagulazione ma anche per processi fisiologici come la fibrinolisi, la proliferazione cellulare, la riparazione tessutale, la guarigione delle ferite [30], la crescita tumorale, la metastatizzazione e l'aterosclerosi [34,35].

Il gene per le subunità A (locus 6p24-p26) codifica per una proteina di 731 aminoacidi [32] contenenti il sito attivo dell'enzima (-Tyr-Gly-Gln-Cys-Trp) **[Figura 10]**. Il gene per la subunità B (locus 1q31-q32.1) codifica per una proteina matura di 641 aminoacidi [33].

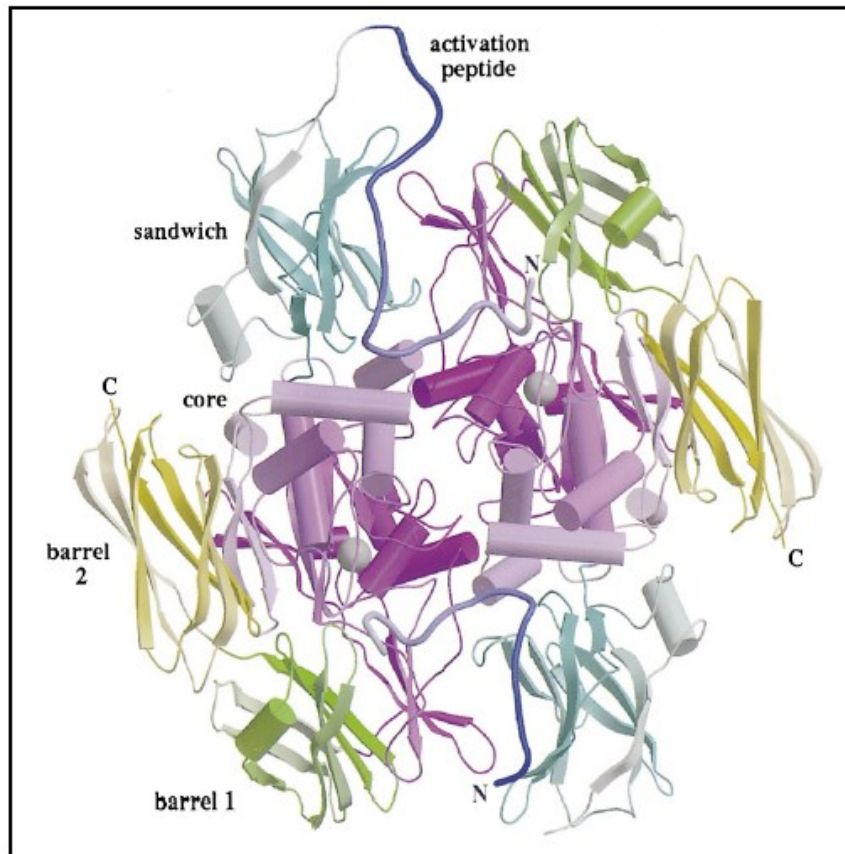


Figura 10. *Struttura dell'omodimero di subunità A del FXIII con evidenziati i diversi domini. Le alfa-eliche e i beta-foglietti sono evidenziati rispettivamente da cilindri e frecce, i due siti attivi sono segnati dalle due sfere in grigio e i due peptidi di attivazione in blu (da Muszbek L. et al, Thromb Res, 1999).*

E' presente un'alta affinità tra le subunità A e anche tra le A e B ma nessuna forte affinità è stata notata tra le catene B, queste interazioni sono sfruttate per mantenere la struttura e la funzionalità dell'eterodimero.

L'attivazione del FXIII è il risultato di un processo multi-step alla fine del quale è esposto il sito attivo di cisteine.

La fibrina è co-fattore nell'attivazione del FXIII, infatti, dopo l'attivazione mediante taglio proteolitico (Arg₃₇-Gly₃₈) da parte della trombina con il successivo rilascio del peptide di attivazione e in presenza di ioni Ca²⁺, il FXIII plasmatico si dissocia dalle subunità B e assume la stessa conformazione di enzima attivo della componente cellulare (A₂).

Il taglio proteolitico non è il solo modo di attivazione del FXIII: in condizioni non fisiologiche, con elevati livelli di Ca²⁺ (>50 mM) liberato dalle piastrine attivate in sede di lesione vasale, la forma tetramerică si dissocia spontaneamente nella forma attiva A₂ senza il rilascio del peptide di attivazione [28].

L'attività transglutaminasica del FXIII è la capacità di catalizzare la formazione di legami covalenti tra un gruppo γ -carbonile di una glutamina e un gruppo ϵ -aminico di una lisina della fibrina. La stabilizzazione della fibrina comprende una dimerizzazione delle catene γ (γ - γ) e la successiva polimerizzazione delle catene α (α - α)_n.

Esistono numerose molecole substrati elettivi per il *cross-linking* del FXIII che hanno importanza fisiopatologica, molti di loro sono grosse proteine del plasma, componenti dei granuli piastrinici o della matrice extracellulare di diversi tessuti [34].

Un elenco dei substrati per il FXIII attivato è riportato in **Tabella 3**:

Substrati di Cross-linking per il FXIIIa
FIBRINA-FIBRINA
FIBRINA-FIBRINOGENO
FIBRINA- FIBRONECTINA
FIBRINA- α 2-ANTIPLASMINA
FIBRINA-FATTORE DI VON WILLEBRAND
FIBRINA-ACTINA
FIBRONECTINA-COLLAGENE
FIBRONECTINA-MIOSINA
TROMBOSPONDINA-TROMBOSPONDINA
FATTORE V- ACTINA
FATTORE DI VON WILLEBRAND-COLLAGENE
ACTINA-MIOSINA
VINCULINA-FIBRINA
VITRONECTINA

Tabella 3. *Elenco di substrati ideali per il FXIIIa*

1.7 FXIII e Malattia Cardiovascolare

Recentemente è stato riportato che bassi livelli di FXIII circolante associavano ad una significativa diminuzione della sopravvivenza post-IMA indotto sperimentalmente in modelli murini anche in presenza di riduzioni moderate del fattore [36]. Questo inoltre si associava ad una difettosa guarigione della lesione cardiaca e a elevati livelli di MMP-9 in circolo. Un ottimale processo di cicatrizzazione implica la deposizione di numerose componenti della

matrice extracellulare compresi fibrina e collagene necessari per una cicatrice elastica e meccanicamente stabile.

In più proliferazione di fibroblasti, sintesi di collagene e angiogenesi sono processi cruciali nella guarigione delle lesioni e tali processi sono tutti regolati dal FXIII [36,37]. In particolare, recentissimi dati di letteratura attribuiscono al FXIII straordinarie proprietà pro-angiogenetiche *in vitro* e *in vivo* mediate dalla down-regulation di un ben noto e caratterizzato fattore anti-angiogenetico, la *Trombospondina I* (Tsp-I) e contemporaneamente da up-regulation di fattori pro-angiogenetici come il *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (VEGFR 2) [36,37].

Inoltre il FXIII promuove proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali della matrice extracellulare favorendo la loro organizzazione in capillari e vasi in modo dose dipendente [37]. Iniezioni di FXIIIa nella cornea di animali da laboratorio mostrano neovascolarizzazione della stessa se confrontata con la cornea controlaterale non trattata [38].

Ulteriori esperimenti in modelli animali dimostrano in modo inequivocabile il ruolo pro-angiogenetico del FXIII in campo cardiologico. In particolare, infarto indotto sperimentalmente in topi *Knock-Out* (KO) per il gene FXIIIa (livelli FXIII 0-70%) portava a morte nel 100% dei casi per rottura del ventricolo sinistro [36]. I topi *wild-type* e i topi KO sottoposti a terapia sostitutiva con FXIII per cinque giorni dopo IMA mostravano identica sopravvivenza.

Un esperimento ancora più arduo in modello murino ha dimostrato che allotrapianti eterotopici di cuore mostravano non solo un maggior numero di vasi al bordo del trapianto, ma anche una significativa superiore performance contrattile del muscolo cardiaco trapiantato in presenza di trattamento con FXIII [39,40].

Tutto questo è corroborato da precedenti osservazioni che hanno evidenziato come dopo tre/quattro giorni da un evento ischemico, nei pazienti si instaura un abbassamento dei livelli di FXIII in concomitanza con (proliferazione cellulare) la cicatrizzazione e guarigione del tessuto miocardico [41]. Sulla base di queste osservazioni è stata utilizzata una terapia sostitutiva post-IMA di FXIII [42]. Per questo, bassi livelli di FXIII possono portare non solo ad uno squilibrio nell'emostasi ma anche, dopo IMA ad un'espansione della zona necrotica e ad un inadeguato *remodeling* tessutale responsabile dello scompenso cardiaco e di ridotte performance contrattili responsabili di prognosi negativa e un'elevata possibilità di reinfarto.

1.8 Le varianti geniche del FXIII

Sono descritte diverse varianti geniche del FXIII, ma i fenotipi clinici e biologici a esse associate non sono del tutto chiari. A causa della bassa frequenza allelica che caratterizza alcuni di questi polimorfismi verranno considerati solo i principali ed un elenco completo delle varianti può essere consultato in NCBI (The National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) [43]. In **Tabella 4** sono riportati i più comuni polimorfismi investigati.

Tabella 4. Polimorfismi del FXIII		
Esone	Aminoacido	Attività (U/ml)
2	Val34Leu	1.63± 0.35
5	Tyr204Phe	n.d.
12	Pro564Leu	1.34±0.84
14	Val650Ile	n.d.
14	Glu651Gln	n.d.
3	His95Arg	-

La sostituzione **Val34Leu** conseguenza di una transversione nell'esone 2 G→T) è considerata il principale polimorfismo capace di influenzare l'attivazione del FXIII [44].

Il codone 34 dista tre aminoacidi dal sito per l'attivazione da parte della trombina (Arg₃₇-Gly₃₈) [Figura 11].

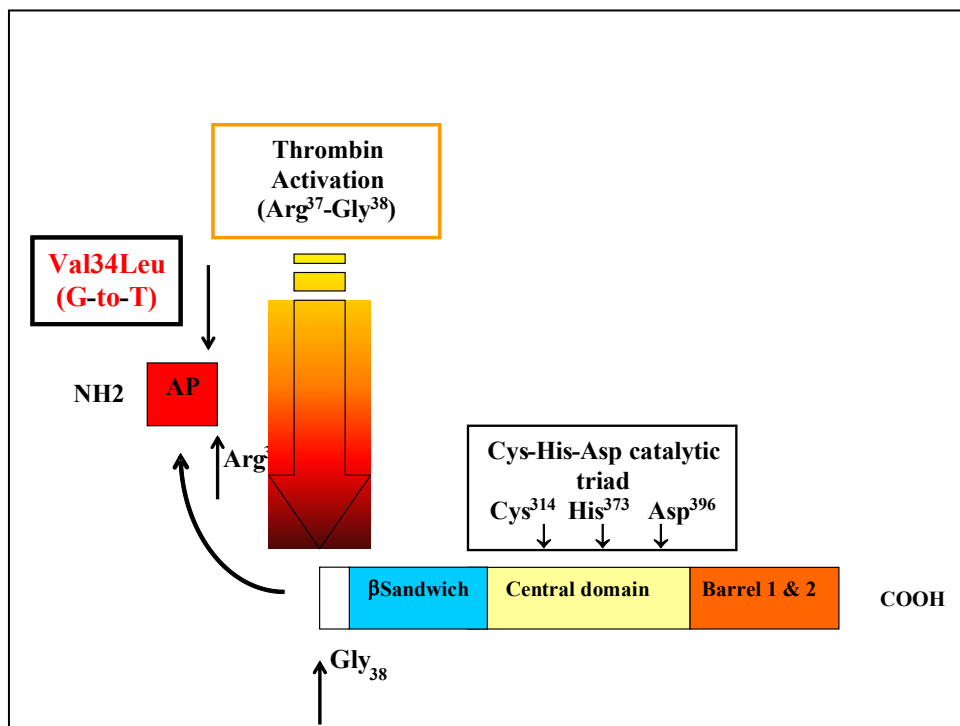
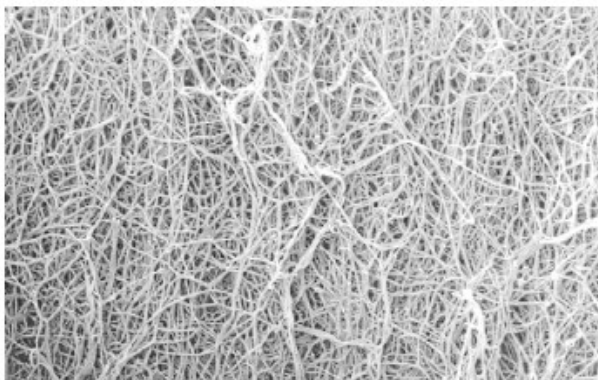


Figura 11. Schema di attivazione trombino-mediata del FXIII.

La presenza della leucina in posizione 34 si traduce in un aumento dell'attività catalitica che a sua volta aumenta la velocità di stabilizzazione del coagulo e altera la struttura tridimensionale della maglia fibrinica che appare meno permeabile e con fibrille più sottili [45] [Figura 12].

Leu34



Val34

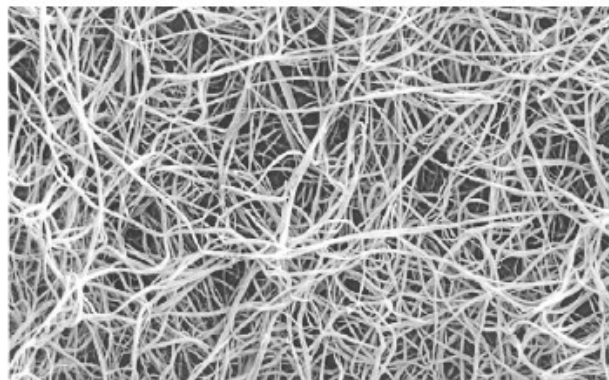


Figura 12. Microfotografia elettronica di un coagulo di fibrina preparato con fibrinogeno purificato rispettivamente in presenza di FXIII Leu34 (a sinistra) e Val34 (a destra) (da Lim BCB. et al, Lancet, 2003).

Organizzazioni strutturali così differenti influenzano suscettibilità e fenotipi clinici differenti come nel caso di un aumento del rischio per emorragia intracerebrale primaria [46] allo stesso tempo un fattore di protezione contro la patologia trombotica, con effetto cardio-protettivo associato alla Leu34 [28]. Si è, infatti, constatato che tale polimorfismo è sottorappresentato in individui IMA [46-48] e recenti studi hanno dimostrato il ruolo protettivo contro lo sviluppo di

IMA [46] e malattie cardiovascolari familiari [49] confrontato in successivi studi in pazienti giovani, di sesso femminile o con età inferiore ai 36 anni [50-52]

Inoltre, studi sulla guarigione di lesioni croniche hanno dimostrato che tale variante ha anche un ruolo protettivo in questa patologia [53]. Come per molti altri polimorfismi sono da tenere in considerazione altre componenti quale quella razziale [54] che combinata a quella genetica può rendere conto dell'ampia variabilità dell'espressione fenotipica del polimorfismo [55] [Figura 13].

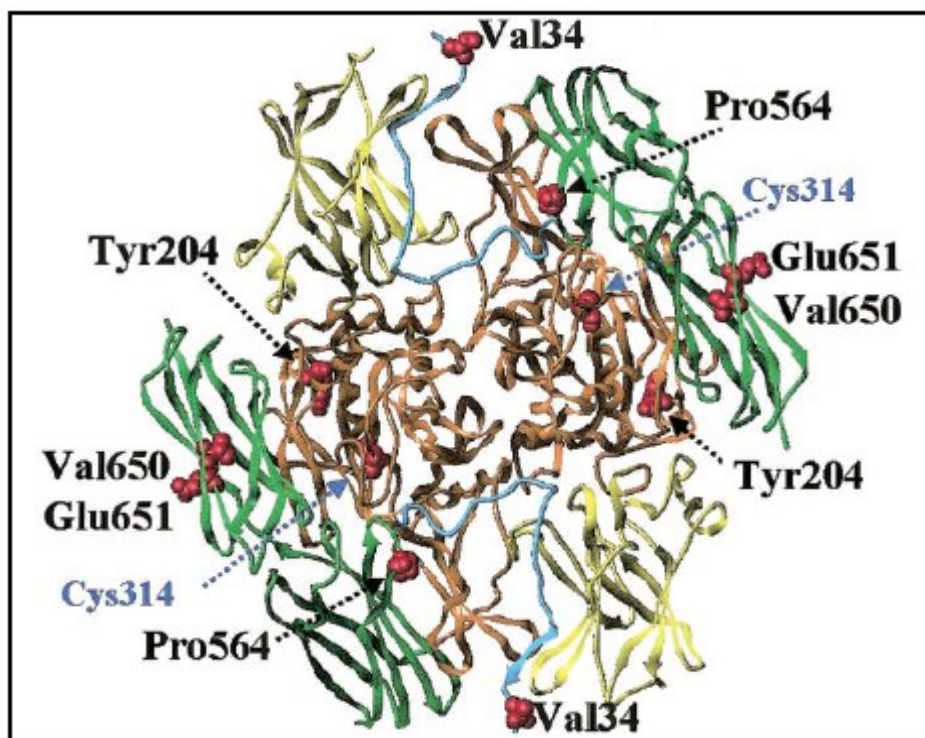


Figura 13. *Struttura dell'omodimero di subunità A del FXIII e localizzazione dei polimorfismi più comuni. In evidenza le Cys314 del sito attivo e in azzurro il peptide di attivazione con localizzata la variante Val34Leu (da Ariëns RAS. et al, Blood, 2002).*

Un aumento nell'attività si riscontra anche nella variante **Pro564Leu** data da una transizione C→T nell'esone 12. Recentemente tale polimorfismo è stato associato ad una diminuzione dei livelli circolanti di FXIII [56,57]. Infatti studi caso-controllo condotti su una popolazione femminile con età inferiore ai 45 anni hanno portato alla luce un suo coinvolgimento nell'aumento del rischio di attacco emorragico non fatale in particolar modo se associato ad un'altra variante genica quale la Tyr204Phe. La Leu564 varia la superficie del dominio che permette l'interazione tra subunità A e B. Prolina e leucina sono aminoacidi con proprietà ben

diverse che quindi vanno a variare la struttura della subunità A sufficientemente da alterare l'efficienza con cui interagisce con le subunità B [58].

E' stato ipotizzato che la variante **Leu564** faccia in modo che la subunità B si leghi meno efficientemente alla A e che il complesso meno stabile che si ottiene si traduca in livelli plasmatici inferiori di FXIII [57]. Per tutti questi motivi la variante **Leu564** potrebbe essere importante in diversi eventi clinici in cui si riscontrano diminuzioni dei livelli plasmatici, come ad esempio il morbo di Crohn e le coliti ulcerose nonché in tumori ginecologici benigni e maligni [59].

La variante **Tyr204Phe** è data da una transversione nell'esone 5 $G \rightarrow T$. La presenza della Phe in posizione 204 è associata oltre che ad aborti ricorrenti anche ad una riduzione dell'attività enzimatica [60,61] che può causare un decremento della stabilità del tappo emostatico portando ad una condizione di elevato rischio di emorragie intracraniche e attacchi ischemici in particolare in donne giovani che tendono per natura ad avere bassi livelli di FXIII [62-64].

Le varianti **Val650Ile** e **Glu651Gln** sono situati nell'esone 14, il primo originato da una transizione $G \rightarrow A$ e l'altro da una transversione $G \rightarrow C$. Sebbene il ruolo di questi polimorfismi non sia ancora ben chiaro, essi potrebbero prendere parte alla patogenesi delle malattie trombotiche attraverso la loro influenza sull'attività del FXIII o sul livello antigenico della subunità A. Recenti lavori hanno dimostrato che l'effetto cardioprotettivo di questo polimorfismo è attribuibile alla copresenza dell'allele **Leu34** attribuendo al polimorfismo **Glu651Gln** un solo ruolo di marker della presenza del principale polimorfismo funzionale **Val34Leu** [44,53].

La variante **His95Arg** della subunità B, dovuta alla transizione **A8259G** nel secondo *sushi domain* nell'esone 3 è responsabile di un aumento della velocità di dissociazione delle subunità B dalle subunità A e quindi con significativi effetti sulla cinetica di attivazione del FXIIIa [65,66].

L'allele **Arg95** co-ereditato all'allele **Leu34** è associato ad aumentata sopravvivenza post-IMA e a riduzione del rischio di IMA o reinfarto in donne in menopausa in terapia con estrogeni (il rischio è ridotto del 70% rispetto a donne non in terapia estrogena ma portatrici delle varianti alleliche) [67]. Questo risultato è stato spiegato dalla coesistenza di entrambi gli alleli con effetti cooperativi sulla cinetica d'attivazione del FXIII [68].

Da un'analisi complessiva delle varianti geniche del FXIII emerge che in una patologia complessa multigenica e polifattoriale, come la malattia cardiovascolare, l'interazione gene-gene e gene-ambiente è il fattore principale responsabile dell'ampia variabilità di espressione fenotipica/clinica caratteristica di tale patologia.

2. Scopo della Tesi

Ciò che rende l'IMA una patologia complessa e multifattoriale è la sua natura caratterizzata da numerose interazioni tra fattori ambientali che influenzano lo stile di vita (alimentazione, vita sedentaria, tabagismo, etc.) e genetici (predisposizione genetica a ipercolesterolemia, aterosclerosi, diabete, ipertensione e familiarità per malattie cardiovascolari, etc.) [69].

Nonostante l'eccellente diagnosi ed efficace strategia riperfusiva (PTCA) oggi disponibili, l'evoluzione della malattia post-infartuale caratterizzata da MACEs più o meno a lungo termine restano ancora un punto critico [70-72] che riducono significativamente la possibilità di sostenere un tenore di vita adeguato e una sopravvivenza a lungo termine [73,74]. La maggior parte dei pazienti con infarto del miocardio oggi sopravvive alla fase acuta ma contestualmente a causa del danno subito, non riescono ad evitare un processo di rimodellamento anomalo della parete del Ventricolo Sinistro (LV), associato a prognosi negativa e causa diretta di Scompenso Cardiaco o *Heart Failure* (HF) [75-77]. Maggiore è l'area del miocardio danneggiata maggiore sarà il rimodellamento e le possibilità di sviluppare HF. Ad oggi le terapie o le strategie per favorire una precoce riparazione locale del miocardio sono scarsamente disponibili per questo agire precocemente intervenendo su possibili meccanismi di guarigione del tessuto miocardico lesso è di cruciale importanza al fine di scongiurare il progressivo rimodellamento e l'alterazione del LV [78,79].

Per molto tempo il fattore XIII della coagulazione è stato principalmente considerato un fattore della cascata coagulativa che interviene nelle fasi finali della stabilizzazione del coagulo. Recentemente, numerosi studi hanno suggerito un suo ruolo nelle malattie cardiovascolari e cerebrovascolari [47,56,80,81]. Il FXIII è oggi riconosciuto come proteina multifunzionale coinvolta in molti processi di regolazione, costruzione e riparazione suggerendo così una sua implicazione in molte aree della medicina tra cui la cardiologia [82]. Fin dagli anni '60-'70 molti studi dimostrarono un abbassamento dei livelli circolanti di FXIII in varie patologie [83-85] che si dimostrava secondaria alla coagulazione intravascolare [41]. Al FXIII è stato riconosciuto un ruolo nella risposta immune e nell'infiammazione [86] così come nell'insulino resistenza e nel diabete mellito di tipo 2 [87]. E' noto che donne con deficienza di FXIII soffrono di aborti spontanei durante il primo trimestre di gravidanza se non sottoposte a terapia sostitutiva [88,89] ed inoltre le transglutaminasi come il FXIII sono coinvolte nella stabilizzazione della matrice extracellulare e in processi come l'ossificazione endocondrale o cartilaginea [90,91]. Alcuni studi hanno infatti dimostrato l'espressione *in-vivo* del FXIII da parte di osteoblasti e osteociti in

tessuto osseo durante il processo di ossificazione [92]. Conferma dell'importanza dei livelli di FXIII giungono anche da studi effettuati su pazienti che hanno subito traumi o interventi chirurgici; il FXIII agisce sui parametri tromboelastografici indicando una sua possibile azione in queste condizioni [93]. Evidenze sperimentali più recenti attribuiscono un ruolo particolare al FXIII nella guarigione del miocardio suggerendo che i suoi bassi livelli portano inevitabilmente a rottura cardiaca e morte post-IMA [36].

In questo studio abbiamo notato una significativa riduzione dei livelli del FXIII in una larghissima percentuale di pazienti durante la fase acuta dell'infarto, nonostante, tutti mostrassero valori iniziali di fattore nel range di normalità. Questo ci ha spinto a chiederci se le differenze nelle modalità di consumo di FXIII, il tempo di raggiungimento del massimo consumo e/o un lento recupero dei livelli fisiologici caratteristici di ogni paziente, potessero avere un ruolo nei processi di guarigione del miocardio post-IMA.

Lo scopo principale della presente tesi è quello di investigare su effettive correlazioni tra livelli di FXIII e insorgenza di MACEs, con particolare interesse a quelli direttamente causati da un anomalo rimodellamento della parete cardiaca (HF). Nell'eventualità di confermare tale coinvolgimento del FXIII, si attribuirebbe allo stesso un ruolo prognostico il cui monitoraggio potrebbe essere affiancato a quello dei tradizionali markers di ischemia che routinariamente vengono eseguiti nei pazienti con sospetto o conclamato infarto. Il riassorbimento della necrosi, la formazione di una cicatrice di tessuto connettivo fibroso non elastico e una non ottimale rigenerazione del tessuto, hanno una grossa influenza sulla sopravvivenza post-IMA a breve e lungo termine. Il FXIII interviene efficacemente in queste fasi, per questo nel presente studio valuteremo i livelli plasmatici di FXIII nei pazienti all'arruolamento e ogni 24 ore, nei successivi 5 giorni e ad almeno 30 giorni post-IMA. I markers standard, infatti, seppur importantissimi rimangono indicatori "passivi" di lesione cellulare mentre il FXIII indicherebbe la potenziale capacità di riparazione cardiaca post-infartuale in un preciso momento. Un follow-up ad un anno sarà eseguito stratificando i pazienti per MACEs ottenendo curve di sopravvivenza che forniranno importanti informazioni prognostiche individuando un valore soglia di FXIII al di sotto del quale si potrà prevedere una prognosi negativa. Queste informazioni potrebbero suggerire un nuovo approccio di management clinico riconoscendo precocemente i pazienti a più elevato rischio di eventi avversi, candidati a potenziale terapia sostitutiva con FXIII (farmaco già presente in commercio ma utilizzato per altri scopi clinici o rFXIII) con effetti positivi sulla sopravvivenza a lungo termine.

3. Materiali e Metodi

3.1 Soggetti dello studio

Nel periodo compreso tra marzo 2008 e giugno 2011 sono stati arruolati dall'Unità Coronarica dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria di Ferrara 350 pazienti con IMA. L'età media dell'intero gruppo era di $68,12 \pm 12,9$ anni e il 71,7% erano maschi. I soggetti sono stati inclusi nello studio quando, arrivati nell'unità coronarica con dolore toracico a riposo prolungato per più di 20 minuti, presentavano un tracciato ECG alterato con sopraslivellamento o sottoslivellamento del tratto ST ≥ 1 mm, livelli sierici di CK-MB e/o Troponina I superiori oltre i limiti di range stabiliti (5 ng/ml per CK-MB e 0.1 ng/ml per Tropi) in almeno due campioni di sangue differenti e quindi con una situazione di necrosi miocardica imminente.

Il numero dei pazienti che all'ingresso mostrava elevazione del segmento ST (gruppo STEMI) era di 251 (71,7%) mentre i rimanenti 99 (28,3%) non hanno mostrato elevazione del segmento ST (gruppo NSTEMI). La malattia coronarica è stata riconosciuta mediante criteri angiografici quali la presenza di stenosi $\geq 50\%$ nella coronaria maggiore o in un ramo maggiore e classificata in base al numero di arterie colpite. Inoltre 238 pazienti (94,8%) del gruppo STEMI sono stati trattati all'ingresso con un intervento di angioplastica percutanea primaria (PTCA), mentre i restanti 13 (5,2%) STEMI non trattati con PTCA sono stati sottoposti ad angioplastica. Tra i pazienti NSTEMI invece 59 (59,6%) sono stati trattati all'ingresso con PTCA, mentre i restati (40,4%) non hanno dovuto essere ripperfusi. Complessivamente 297 pazienti (84,8%) sono stati sottoposti a PTCA durante il ricovero ospedaliero.

Tutti i pazienti ricoverati hanno ricevuto terapie mediche standard comprendenti aspirina, eparina a basso peso molecolare, β -bloccanti, ACE-inibitori, statine e nitrati secondo le attuali linee guida.

Le terapie farmacologiche alle dimissioni dei pazienti erano composte di aspirina (88%), β -bloccanti (78%), statine (81,4%), ACE-inibitori (67,4%), cumarine-warfarin (12%), thienopyridine (78,3%). Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati sono riassunte nella **Tabella 6**.

Tutti i soggetti arruolati nello studio provenivano dal nord d'Italia, avevano lo stesso background etnico e hanno firmato un consenso informato approvato dal Comitato Etico locale.

3.2 Valutazione dei livelli di FXIII

I campioni di plasma povero di piastrine (per evitare contaminazioni da FXIII di derivazione piastrinica) da dosare sono stati ottenuti con una centrifugazione a 2500g per 10 minuti a 20° C da sangue intero periferico dei pazienti in Na-citrato 3.8%, prelevato all'ingresso presso l'unità del pronto soccorso e per ulteriori 5 giorni dopo l'infarto. Un ulteriore prelievo di sangue è stato effettuato dopo 30 giorni e ad un anno dopo l'infarto, presso i nostri ambulatori della Fisiopatologia della Coagulazione dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria di Ferrara.

I campioni di plasma sono stati idoneamente aliquotati e conservati in freezer a -80° C fino all'utilizzo per i saggi.

Tale plasma è stato poi impiegato per il dosaggio quantitativo del FXIII effettuato mediante immunoelettroforesi secondo la teoria di Laurell [94], saggi immunoenzimatici ELISA e test immunologici al lattice.

3.2.1 *Immunoelettroforesi Metodo secondo Laurell*

L'*immunoelettroforesi* secondo Laurell è una tecnica di indagine biologica che consente la separazione, l'identificazione nonché il dosaggio quantitativo di singole proteine plasmatiche quali immunoglobuline, albumina, transferrina, fattori del complemento o della coagulazione.

Questa tecnica detta anche "*rocket elettroforesi*" è una tecnica che si avvale, di un gel d'agarosio in cui sia presente omogeneamente un determinato anticorpo. In questa matrice sono scavati dei piccoli pozzetti, dalla parte del catodo (-), nei quali sono caricati gli antigeni di interesse. Applicando una corrente continua agli estremi del gel, gli antigeni migrano verso l'anodo (+) e incontrano gli anticorpi che si muovono invece verso il catodo; quando antigene e anticorpo avranno raggiunto l'equivalenza stechiometrica si formeranno gli immunoprecipitati insolubili che daranno gli archi di precipitazioni o picchi (**Figura 14**).

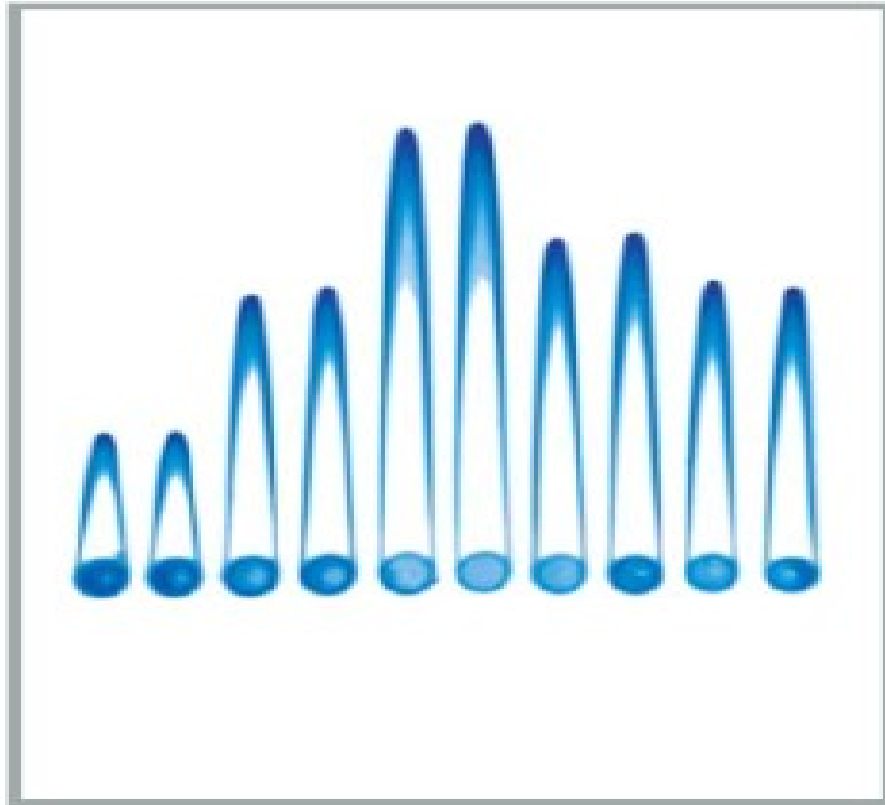


Figura 14. Piastra elettroforetica secondo il metodo di Laurell. Ogni picco, rappresentante un immunoprecipitato insolubile, è proporzionale alla concentrazione dell'antigene ed inversamente proporzionale al titolo dell'anticorpo specifico contenuto nel gel.

Più elevata sarà la concentrazione dell'antigene, più alto sarà il suo arco di precipitazione, proporzionale alla concentrazione (quantità) dell'antigene ed inversamente proporzionale al titolo dell'anticorpo specifico contenuto nel gel. Tale relazione è di tipo semilogaritmico.

Ponendo in grafico l'altezza degli archi in mm (ordinata) contro la concentrazione in percentuale (ascissa) si otterrà una curva di taratura che servirà per determinare la concentrazione di un antigene in un campione ignoto.

I livelli antigenici di FXIII sono stati valutati su gel d'agarosio all'1%, nel quale è stato omogeneamente disciolto alla concentrazione di 0.75%, l'anticorpo specifico anti-FXIII (Affinity Biologicals inc., Ancaster, Ontario, Canada) ad una temperatura ottimale di 65°C. Per ottenere una curva di riferimento si è utilizzato un pool di plasma normale suddiviso in 4 diluizioni scalari 1:2 in buffer TTE 1X (Tris base 0,081 M, Tricina 0,024 M, EDTA 0,5 M pH 8.0) (100% → 50%, 25%, 12.5%, 6.25%). Caricati i pozzetti, con 35 µl di pool/campione è stata applicata una corrente continua di 3 Volt/cm (50 mA) e si è lasciato correre in tampone TTE 1X per 24 ore.

Dopo 24 ore di corsa i gel sono stati immersi prima in soluzione fisiologica overnight e successivamente in acqua distillata sempre overnight; conclusi i lavaggi, le piastre con i gel sono state fatte seccare per poi essere colorate.

La colorazione è eseguita, dopo un primo fissaggio in Acido Tannico 5% per 15 minuti, con una soluzione colorante di Comassie Brilliant Blue (Comassie Brilliant Blue R250 0,5%, etanolo 45%, Acido Acetico 10%, H₂O 45%) per 40 minuti, terminati i quali si eseguono due lavaggi rapidi con acqua distillata e si procede alla decolorazione con soluzione decolorante specifica (Acido Acetico 10%, metanolo 45%, H₂O 45%).

Dopo la decolorazione scompare il background e rimangono visibili solo gli archi di precipitazione. Le piastre sono quindi state fatte seccare per poi calcolare e disegnare le curve di taratura che permettono di determinare le variazioni di concentrazione di FXIII nelle 6 giornate post-IMA e a 4 settimane e a un anno, per ogni singolo paziente.

3.2.2 Test immunologico al lattice

La determinazione quantitativa di FXIII in ogni campione è stata inoltre misurata eseguendo saggi immunologici automatizzati al lattice con l'utilizzo di un kit commerciale (*HemosIL Factor XIII Antige IL*, Instrumentation Laboratories, Werfen Group, Milano).

Il metodo si basa su di un saggio immuno-turbidimetrico al lattice ed è eseguibile in meno di 7 minuti su circa 250µL di plasma povero. Il reagente al lattice è una sospensione di particelle di polistirene a grandezza omogenea ricoperte su tutta la superficie di anticorpi policlonali di coniglio altamente specifici per le sub-unità A del FXIII. Quando il plasma povero di un paziente contenente le sub-unità A attive del FXIII viene mescolato al reagente al lattice e al buffer (TRIS buffer addizionato con albumina di siero bovino BSA, stabilizzatori e conservanti) vi è riconoscimento Ag:Ab e le particelle agglutinano. Il grado di agglutinazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigeni FXIII nel campione ed è determinato misurando la diminuzione della luce trasmessa causata dagli aggregati. La quantità antigenica di FXIII è restituita come % rispetto ai range di normalità.

Tutte le misurazioni sono state effettuate utilizzando lo strumento ACL TOP 500 (IL, Instrumentation Laboratories, Werfen Group, Milano), che prima di ogni seduta è stato calibrato utilizzando un Calibration Plasma = 100%; come riferimenti sono stati invece utilizzati un controllo normale (Normal plasma Control= 75,5%) e uno patologico (Special test Control Level 2= 37,7%).

3.2.3 Saggio immunoenzimatico E.L.I.S.A

La presenza e la concentrazione del FXIII nei campioni biologici dei pazienti è stata infine valutata anche eseguendo il saggio immunenzimatico E.L.I.S.A (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), basato sul principio, anche definito “Sandwich” o diretto, di riconoscimento specifico che avviene tra anticorpo e antigene; tale complesso è riconosciuto a sua volta da un anticorpo secondario coniugato con *Perossidasi (HRP)* la quale una volta aggiunto perossido di idrogeno e un substrato cromogeno, riduce il perossido e ossida il cromogeno, sviluppando una reazione colorimetrica quantificabile allo spettrofotometro (**Figura 15**). Maggiore sarà la colorazione quindi il valore delle OD (densità ottiche) restituite, maggiore sarà la concentrazione dell’antigene ricercato nel campione.

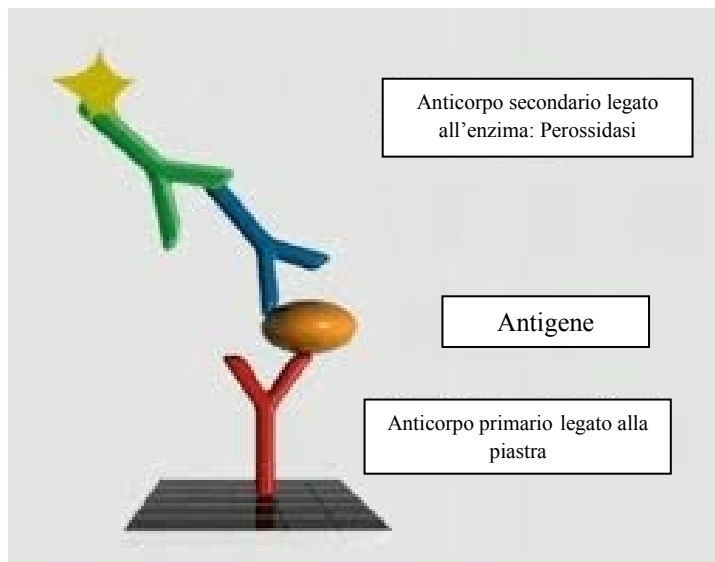


Figura 15. Schematizzazione del complesso "Sandwich" del saggio immunoenzimatico E.L.I.S.A

Il saggio si articola in diversi steps successivi l’uno all’altro: il *coating* della piastra con un anticorpo primario anti-FXIII umano, il *Blocking* dei siti non legati dall’anticorpo, dispensazione dell’*Antigene* (campione di plasma diluito in tampone), legame di un secondo anticorpo primario anti FXIII umano, aggiunta dell’anticorpo secondario coniugato con *HRP* e del substrato cromogenico. Ogni passaggio è alternato da steps di lavaggio con tampone TRIS base/tween-20 1X, (0,089M, 0.04%). Il Coating è stato effettuato aliquotando 60 μ L, in ogni pozzetto, di anticorpo primario di pecora anti-FXIII umano (Affinity Biologicals Inc., Ancaster, Canada) diluito 1:1000 in Buffer di coating 1X (ELISA Plate Coating Solution - 10X Surmodics Inc., Eden Prairie, MN, USA) e incubato a 4° C per una notte. Il giorno successivo sono stati aliquotati 60 μ L di Soluzione Blocking 1X (Fish Gelatine, blocking solution, Surmodics Inc.,

Eden Prairie, MN, USA) e lasciato ad incubare a temperatura ambiente per 1 h. Una volta concluso il blocking in ogni pozzetto è stato dispensato l'antigene, ovvero 50 µL di ogni campione di plasma in tre diluizioni scalari 1:2 in buffer di diluizione (Assay diluent, Surmodics Inc., Eden Prairie, MN, USA). Un pool plasmatico normale diluito scalarmente 1:2 (100%= 1:200 → 50%, 25%, 12.5%, 6.25%) è stato utilizzato per ottenere una curva di taratura; i campioni sono stati lasciati ad incubare per 1 h a temperatura ambiente. Successivamente è stato aggiunto e lasciato in incubazione 1 h, un secondo anticorpo primario di coniglio anti-FXIII umano (STAGO, Francia) diluito 1:1000 in Buffer di coating 1X in grado di riconoscere e legare il complesso Ab:FXIII adeso alla piastra. Un'ulteriore ora è servita per il legame dell'anticorpo secondario anti-Ab di coniglio coniugato *HRP* (Immunological Science, Roma, Italia) e successivamente è stato aggiunto il substrato cromogenico (HRP-Yellow Substrate, Surmodics Inc., Eden Prairie, MN, USA) lasciato ad agire, al buio, circa 50 minuti ed eseguita la lettura allo spettrofotometro a 450 nm.

3.3 Follow-up e descrizione dell'endpoint

L'endpoint composito è stato definito come incidenza cumulativa di morte, reinfarto, Heart Failure (scompenso cardiaco acuto), stroke (ictus) e qualsiasi altro episodio che ha richiesto coronarografia come ad esempio l'angina instabile o la restenosi intra-stent, a un anno. Tutte le morti dei pazienti sono state attribuite a cause correlate alla patologia cardiovascolare. Per la diagnosi di reinfarto si sono considerati la comparsa di nuova sintomatologia ischemica, ulteriori aumenti dei marcatori di lesione cardiaca (livelli di TROP1 e/o CK-MB oltre i range di normalità in due diversi prelievi di sangue) e anomalie dell'ECG.

La determinazione di dispnea a riposo o sotto sforzo in concomitanza con congestione polmonare (evidenziata mediante radiografia toracica), edema periferico, uso di diuretici e un aumento oltre i range di Pro-BNP (peptide natriuretico atriale), ha portato ad una diagnosi conclusiva di *Heart Failure*. L'angina instabile e la restenosi sono stati diagnosticati valutando la comparsa di sintomatologia tipica: dolore acuto al torace che dura meno di 2 minuti scatenato da attività fisica, stress, emozioni forti o sbalzi anomali di temperatura; ed esame angiografico che ha stabilito l'ostruzione parziale dei vasi interessati.

La diagnosi di stroke (ischemico o TIA, attacco ischemico transitorio) è stata raggiunta valutando gli evidenti sintomi clinici dei pazienti all'arrivo in ospedale: dolore alla testa, improvvisa debolezza ad un arto o ad un lato del volto/corpo, confusione mentale, difficoltà di parola, perdita di equilibrio e di coordinazione e mediante TAC cerebrale con o senza mezzo di contrasto.

3.4 Analisi statistica

I parametri continui sono stati descritti come media \pm deviazione standard (SD) e la significatività statistica della differenza tra le medie è stata valutata tramite *t*-test. Le variabili categoriche sono state rappresentate in termini di numero e percentuale e la significatività statistica delle differenze è stata calcolata con il test del *X*-quadro. L'*exact-test di Fisher* e la correzione di *Yates* sono stati applicati quando appropriati.

Per la valutazione del rischio e le analisi di sopravvivenza sono state usate rispettivamente l'analisi di Odds Ratio e le curve secondo il metodo di Kaplan-Meier confrontate mediante il *test log-rank* utilizzando il programma MEDCALC 12.7.8.

L'identificazione del valore soglia ottimale (detto *best cut-off*) cioè il valore del test che massimizza la differenza tra i veri positivi e i falsi positivi è stata effettuata utilizzando la curva ROC (*receiver operating characteristics*).

Il valore prognostico delle variabili è stato esaminato utilizzando il *Cox-proportional hazard model*. La probabilità è stata considerata significativa per valori di $P \leq 0.05$.

Le analisi statistiche sono state eseguite con l'utilizzo del programma STATISTICA 6.1 (Statsoft Inc., Tulsa, Okla).

4. Risultati

4.1 Caratteristiche cliniche dei soggetti in studio

Tabella 5 mostra le principali caratteristiche di base della popolazione in studio. L'età, la distribuzione del sesso maschile e la percentuale di soggetti sottoposti a PTCA, nel gruppo totale e nei due sottogruppi STEMI e NSTEMI. L'incidenza dell'età e della rivascolarizzazione coronarica mediante PTCA era maggiore nel gruppo NSTEMI ($P=0.0007$ e $P< 0.0001$, rispettivamente).

	Total (n= 350)	STEMI (n=251)	NSTEMI (n=99)	P
<i>Età (y, SD, range)</i>	68.1±12.9 (31-100)	66.6±13.06 (31-100)	71.7±11.35 (36-89)	0.0007
<i>Maschi (n, %)</i>	251 (71.7)	185 (73.7)	66 (66.6)	NS
<i>PTCA (n, %)</i>	296 (84.6)	238 (94.8)	59 (59.6)	<0.0001

Tabella 5. Caratteristiche di base dei soggetti IMA.

Il gruppo NSTEMI se confrontato con il gruppo STEMI, mostrava una percentuale più alta di fattori di rischio cardiovascolare (i.e. ipertensione, dislipidemia, diabete, obesità e insufficienza renale) con la sola eccezione dell'abitudine tabagica e della familiarità significativamente maggiori tra gli STEMI.

Valutando il profilo cardiologico: IMA pregresso e circoscrizione dell'infarto nella parete anteriore del cuore mostravano una maggior incidenza nel gruppo NSTEMI (rispettivamente $P=0.0035$ e $P=<0.0001$).

Nel complesso i pazienti hanno dovuto attendere mediamente 8.4 ore dal momento in cui hanno raggiunto l'unità di pronto soccorso al momento in cui sono stati allettati dopo aver ricevuto le terapie adeguate ($ds\pm 21h$, range 0-168; $3.9\pm 10.7h$, range 0-72 nel gruppo STEMI vs $17.7\pm 26.6h$, range 0-140 nel gruppo NSTEMI; $P=<0.0001$).

Inoltre nel gruppo totale il tempo di raggiungimento del picco dell'enzima CK, era pari a 10.6 ore ($ds\pm 12.1h$, range 0-120). Il gruppo STEMI ha invece raggiunto il picco mediamente in un tempo minore ($9.34\pm 7.7h$; range 0-48) se confrontato con il gruppo NSTEMI ($13.8\pm 19h$; range

0-120); P=0.0019. Il 13.4 % dei pazienti totali presentava al ricovero un *Killip class >1*: 12.4% nel gruppo STEMI vs 16.1 % nel gruppo NSTEMI, **Tabella 6**.

Caratteristiche	All cases (n=350)	STEMI (n=251)	NSTEMI (n=99)	P
^a IPTA (n,%)	222 (63.4)	157 (62.5)	65(65.6)	ns
Dislipidemia(n,%)	121(34.6)	75 (29.8)	46 (46.5)	0.0049
Diabete (n,%)	76(21.7)	44 (17.5)	32 (32.3)	0.004
Fumo (n,%)	189(54)	144 (57.4)	45 (45.5)	0.05
Familiarità (n,%)	112(32)	82 (32.6)	30 (30.3)	ns
Obesità(n,%)	37 (10.6)	25 (10)	12 (12.1)	ns
^b IR (n,%)	39 (11.14)	14 (5.6)	25 (25.5)	<0.0001
^c FE% ≥ 50%(n, %)	132 (37.7)	90 (35.8)	42 (42.4)	ns
<i>Profilo cardiologico</i>				
^d D to B (h,SD, range)	8.4±21 (0-168)	3.9±10.7 (0-72)	17.7±26.6 (0-140)	<0.0001
^e T picco CK(h,SD, range)	10.6±12.1 (0-120)	9.34±7.7 (0-48)	13.8±26.6 (0-140)	0.0019
Killip class>1(n,%)	47 (13.4)	31 (12.4)	16 (16.1)	ns
^f re-IMA (n,%)	94(26.8)	56 (22,3)	38 (38,4)	0.0035
^g IMA Ant (n,%)	127 (36.3)	116 (50.2)	12 (12.1)	<0.0001

Tabella 6. *Principali caratteristiche dei soggetti e nei due gruppi considerati due: a)IPTA= ipertensione arteriosa; b)IR= insufficienza renale; c)FE% = Frazione di eiezione; d)D to B= Dolor to Bed time; e)T picco CK= tempo di picco di CK; f)re-IMA= precedente infarto miocardico acuto; g)IMA Ant= infarto miocardico nella zona anteriore; P= valore di significatività.*

4.2 Follow-up clinico ed endpoint

Ad un anno di follow-up (365 giorni) nell'intero gruppo di pazienti presi in studio, è stata riscontrata un numero totale di 129 eventi cardiovascolari avversi MACEs (36.8%) di cui 11 (3.14%) reinfarti, 3 (0.85%) Stroke, 64 (18.3%) scompensi cardiaci *heart failure*, 42 (12%) morte per motivi cardiovascolari e 12 (3.4%) episodi di angina instabile o stenosi intra-stent.

Il totale degli eventi avversi si distribuiva in 87 casi nel gruppo STEMI(n=251) e 42 casi nel gruppo NSTEMI(n=99) (34.6% vs 42.4%, P= 0.21). Dividendo i pazienti a seconda se sottoposti a PTCA(+) o meno, gli eventi avversi totali si distribuivano in 111 casi nel gruppo PTCA (+) e 18 casi nel gruppo PTCA(-) (37.5% vs 33.3%, P= 0.66).

Considerando il gruppo STEMI vs NSTEMI nessuna significatività statistica è stata evidenziata considerando ogni endpoint singolarmente.

Al contrario considerando i due gruppi PTCA(+) e PTCA(-) è stata riscontrata la sola significatività per quanto riguarda l'*Heart Failure* (19.25% vs 7.4% rispettivamente per PTCA(+) e PTCA(-), P= 0.05) (Tabella 7).

Eventi Cardiovascolari avversi (365 giorni di Follow –Up)					
Endpoints	Totali (n= 350)	STEMI (n= 251)	NSTEMI (n= 99)	PTCA(+) (n= 296)	PTCA(-) (n= 54)
Re-IMA(%) OR,CI P	3 (0.85)	7 (2.8)	4(4.04)	9 (3.04)	2 (3.7)
		0.68 (0.19-2.38) ns		0.81 (0.17-3.88) ns	
Stroke(%) OR,CI P	11 (3.14)	2 (0.8)	1(1.01)	1 (0.34)	2 (3.7)
		0.79 (0.07-8.78) ns		0.08 (0.008-0.99) ns	
HF(%) OR,CI P	64 (18.3)	42 (16.7)	19 (19.1)	57 (19.25)	4 (7.4)
		0.85 (0.46-1.54) ns		2.98 (1.03-8.59) 0.05	
Morte CV(%) OR,CI P	42 (12)	27 (10.7)	15 (15.1)	32 (10.8)	10 (18.5)
		0.86 (0.34-1.33) ns		0.53 (0.24-1.16) ns	
^a Altro (%) OR,CI P	12 (3.4)	9 (3.6)	3 (3.03)	12 (4.05)	0 (0)
		1.19 (0.31-4.49) ns		---	
^b EP-comp(%) OR,CI P	129 (36.8)	87 (34.6)	42 (42.4)	111 (37.5)	18 (33.3)
		0.72 (0.44-1.16) ns		1.2 (0.65-2.21) ns	

Tabella 7. Analisi dei diversi endpoint a 365 giorni di Follow-up nei diversi sottogruppi di pazienti IMA. (OR= Odds Ratio; CI= Intervallo di Confidenza; NS= statisticamente non significativo; a) Altro= angina instabile e restenosi; b) EP-comp= endpoint.

Suddividendo, infine i due gruppi di pazienti STEMI e NSTEMI in due ulteriori sottogruppi, ovvero quello dei pazienti sottoposti a riperfusione meccanica, PTCA(+) e quello dei pazienti non sottoposti a PTCA(-) la totalità dei MACEs si dividevano in 87 casi nel gruppo STEMI/PTCA(+) e 6 casi nel gruppo STEMI/PTCA(-) (34% vs 46.15%, P= 0.55). Nel sottogruppo NSTEMI/PTCA(+) si sono riscontrati 30 eventi avversi totali mentre nel sottogruppo NSTEMI/PTCA(-) 12 (50.8% vs 30%, P= 0.06).

Anche in questo caso, come mostrato in **Tabella 8**, considerando ogni endpoint singolarmente non è stata riscontrata alcuna significatività statistica con l'unica eccezione dell'*Heart Failure* nel gruppo NSTEMI (28.8% vs 5%, P= 0.007).

Endpoints	STEMI (n= 251)		NSTEMI (n= 99)	
	PTCA(+) (n= 238)	PTCA(-) (n= 13)	PTCA(+) (n= 59)	PTCA (-) (n= 40)
Re-IMA(%) OR,CI P	7 (2.9)	0(0)	2 (3.4)	2 (5)
	---		0.67 (0.1-4.93) ns	
Stroke(%) OR,CI P	1 (0.42)	1(7.7)	0 (0)	1 (2.5)
	0.05 (0.003-0.86) ns		--- ns	
HF(%) OR,CI P	41 (17.2)	2 (15.4)	17 (28.8)	2 (5)
	1.14 (0.24-5.36) ns		7.69 (1.66-35.5) 0.007	
Morte CV(%) OR,CI P	24 (10.08)	3 (23.07)	8 (13.5)	7 (17.5)
	0.37 (0.1-1.45) ns		0.74 (0.24-2.23) ns	
^a Altro (%) OR,CI P	9 (3.6)	0 (0)	3 (5.1)	0 (0)
	--- ns		--- ns	
^b EP-comp(%) OR,CI P	81 (34)	6 (46.15)	30 (50.8)	12 (30)
	0.6 (0.2-1.85) ns		2.41 (1.03-5.63) 0.064	

Tabella 8. Analisi dei diversi endpoint a 365 giorni di Follow-up nei due sottogruppi PTCA e PTCA(-) di pazienti STEMI e NSTEMI. (OR= Odds Ratio; CI= Intervallo di Confidenza; NS= statisticamente non significativo; a) Altro= angina instabile e restenosi; b) EP-comp.= endpoint.

4.3 Livelli di FXIII post-IMA

L'analisi dei livelli di FXIII misurati nel plasma dei pazienti sia all'arruolamento (t_0) che per ulteriori 5 giorni dopo l'infarto (t_1 - t_5) e poi a un mese di distanza (t_{30}) ci ha restituito la conferma di una fisiologica riduzione dei livelli di FXIII in pazienti dopo IMA (Δ_{medio} di consumo da circa 10% a >50%) in particolare tra la 4° e 5° giornata: t_0 98.5 ± 31.2 , t_{4-5} 82.6 ± 3.7 , t_{30} 107.2 ± 26.7 , (valori di mediana: t_0 95.3, t_{4-5} 82.6, t_{30} 106.7); **(Grafico 1)**. La significatività statistica è stata valutata su tutto il gruppo di pazienti confrontando t_0 vs t_{4-5} , $P < 0.0001$ e t_0 vs t_{30} , $P < 0.0001$.

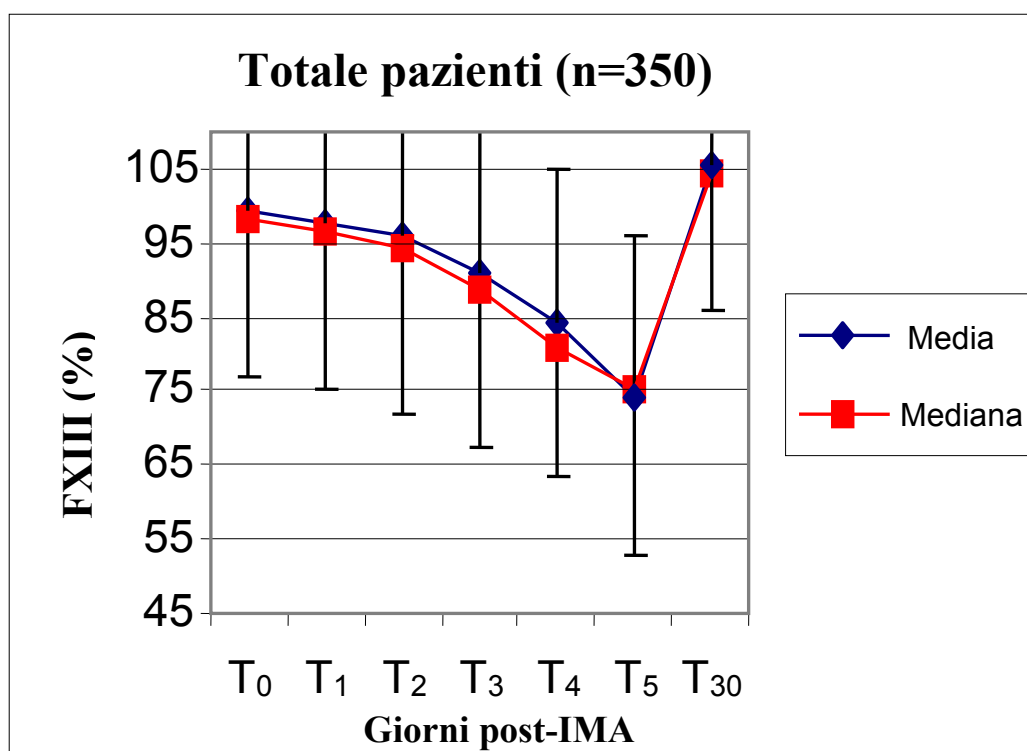


Grafico 1. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi del gruppo dei pazienti arruolati nello studio (in blu). In Rosso i valori mediani degli stessi pazienti.

Confrontando i due gruppi STEMI ($n=250$) ed NSTEMI ($n=99$), la riduzione risultava maggiore nel gruppo NSTEMI con un Δ_{medio} di consumo: 16.6% STEMI vs 25.7% NSTEMI, **(Grafici 2 e 3)**. Nel gruppo STEMI la cinetica riscontrata è stata: t_0 99.3 ± 30.5 , t_{4-5} 84.5 ± 2.4 , t_{30} 104.5 ± 25.2 , (valori di mediana: t_0 97.2, t_{4-5} 84.6, t_{30} 106.2); mentre nel gruppo NSTEMI la cinetica ha restituito dei valori medi pari a: t_0 96.6 ± 32.9 , t_{4-5} 76.5 ± 6.8 , t_{30} 114.9 ± 30.3 , (valori di mediana: t_0 90.4, t_{4-5} 76.5, t_{30} 116). Confrontando i due gruppi, risultati statisticamente significativi si sono trovati solo confrontando t_{4-5} e t_{30} : STEMI vs NSTEMI $P_{t_{4-5}} < 0.0001$; $P_{t_{30}} = 0.0002$); sono state

eseguite anche valutazioni intra-caso che hanno restituito significatività: STEMI t_0 vs t_4 - t_5 , $P < 0.0001$ e t_0 vs t_{30} , $P = 0,038$; NSTEMI t_0 vs t_4 - t_5 $P < 0.0001$ e t_0 vs t_{30} $P < 0.0001$.

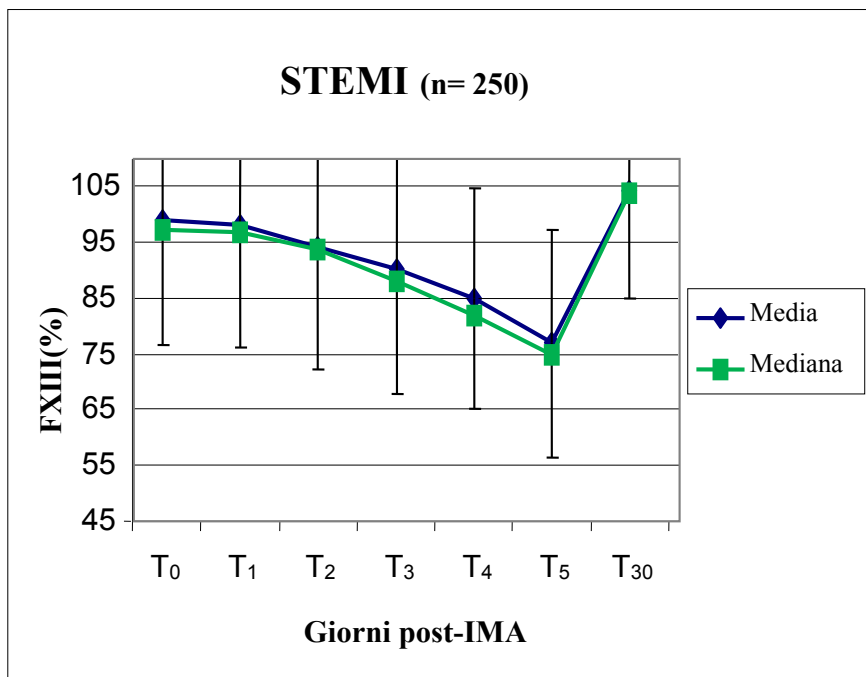


Grafico 2. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi del gruppo STEMI (in blu). In Verde i valori mediani degli stessi pazienti.

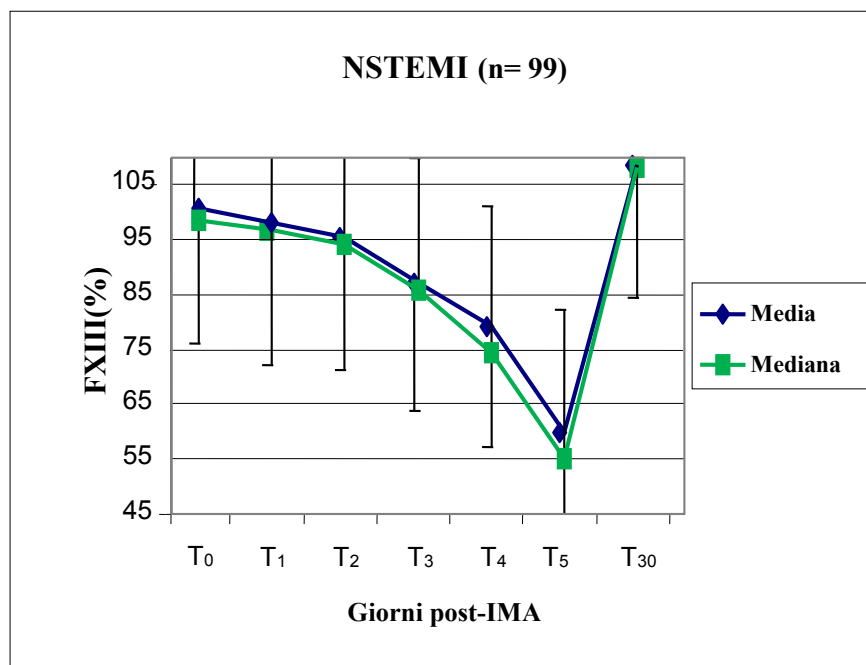


Grafico 3. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi del gruppo NSTEMI (in blu). In Verde i valori mediani degli stessi pazienti.

Stratificando il gruppo intero di pazienti per PTCA(+) e PTCA(-) e mettendoli a confronto abbiamo osservato un maggiore delta di consumo di FXIII nel gruppo PTCA (-) (n= 54) rispetto al gruppo PTCA(+) (n= 296): Δ_{medio} di consumo: 16.4%PTCA vs 24.5% PTCA (-). Le cinetiche si presentavano, per il gruppo PTCA(+): t_0 98.9 \pm 31.2, t_4-t_5 82.7 \pm 4.2, t_{30} 105.4 \pm 27.3, (valori di mediana: t_0 95.9, t_4-t_5 80.7, t_{30} 106.6) mentre per il gruppo PTCA (-): t_0 96.01 \pm 31.2, t_4-t_5 71.5 \pm 1.7, t_{30} 119.2 \pm 17.8, (valori di mediana: t_0 93.4, t_4-t_5 71.5, t_{30} 119.8); (**Grafici 4 e 5**).

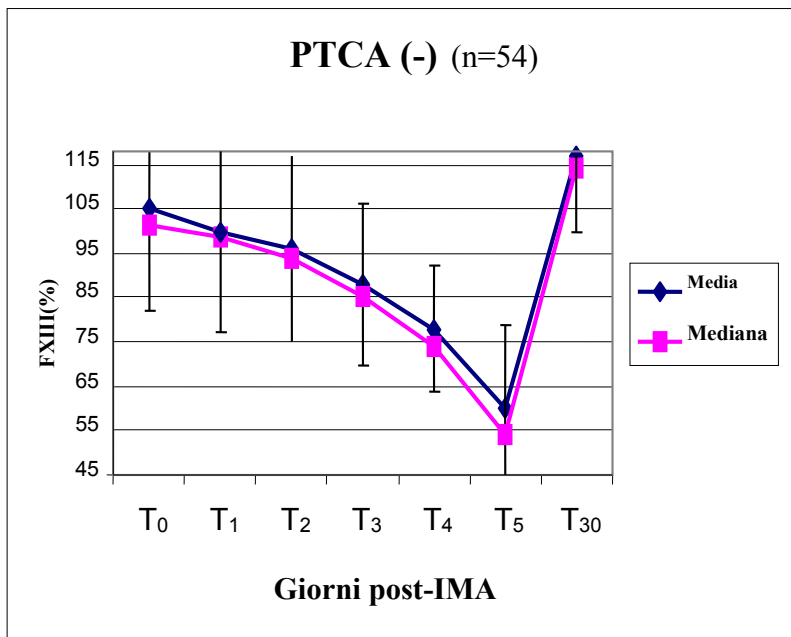
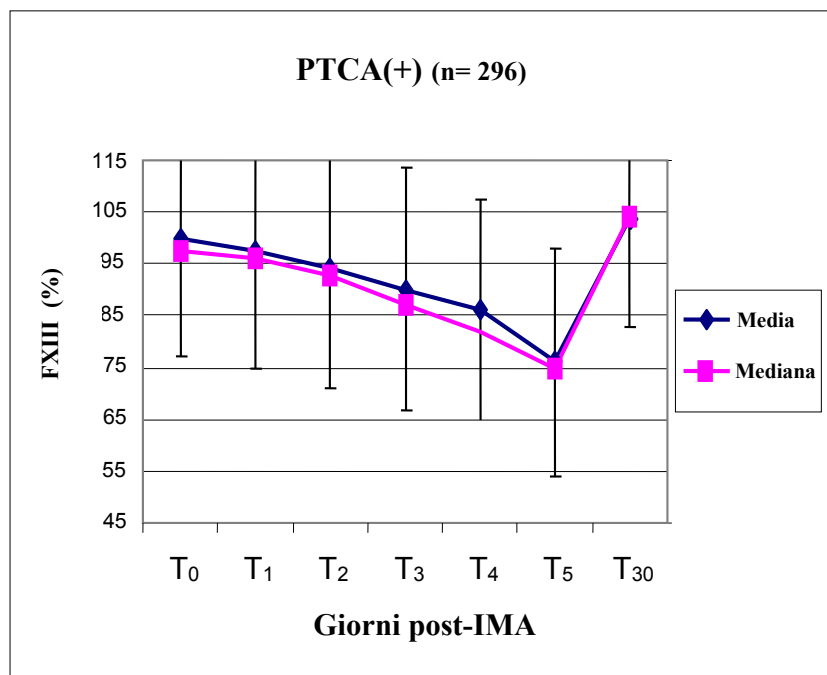


Grafico 4. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi del gruppo PTCA (-) (in blu). In Rosa i valori mediani degli stessi pazienti.

Grafico 5. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi del gruppo PTCA (in blu). In Rosa i valori mediani degli stessi pazienti.



Statisticamente le valutazioni sia intra-caso che confrontando i due gruppi hanno restituito significatività: PTCA(+) vs PTCA(-), $P_{t_{4-5}} < 0.0001$, $P_{t_{30}} = 0.0004$; PTCA(+) t_0 vs t_{4-5} , $P < 0.0001$ e t_0 vs t_{30} , $P = 0.0072$; PTCA (-) t_0 vs t_{4-5} $P < 0.0001$ e t_0 vs t_{30} $P < 0.0001$.

Nel gruppo dei MACE(+) il FXIII è risultato: t_0 90.43 ± 31.1 ; t_{4-5} 77.2 ± 28.7 ; t_{30} 97.84 ± 25.9 (**Grafico 6**). Nel gruppo dei MACE(-) il FXIII è risultato: t_0 100.7 ± 30.8 ; t_{4-5} 85.6 ± 25.23 ; t_{30} 106.9 ± 25.7 , ed inoltre il picco di consumo si è verificato mediamente 24 ore prima rispetto al gruppo MACE (+) (**Grafico 7**).

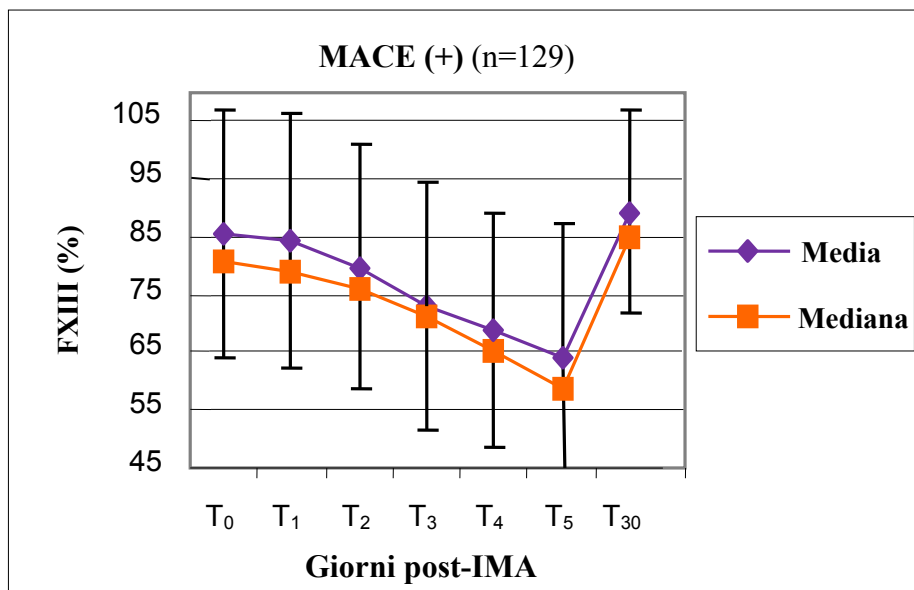


Grafico 6. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi dei pazienti che hanno manifestato eventi avversi (MACE) (in viola). In Arancione i valori mediani degli stessi pazienti

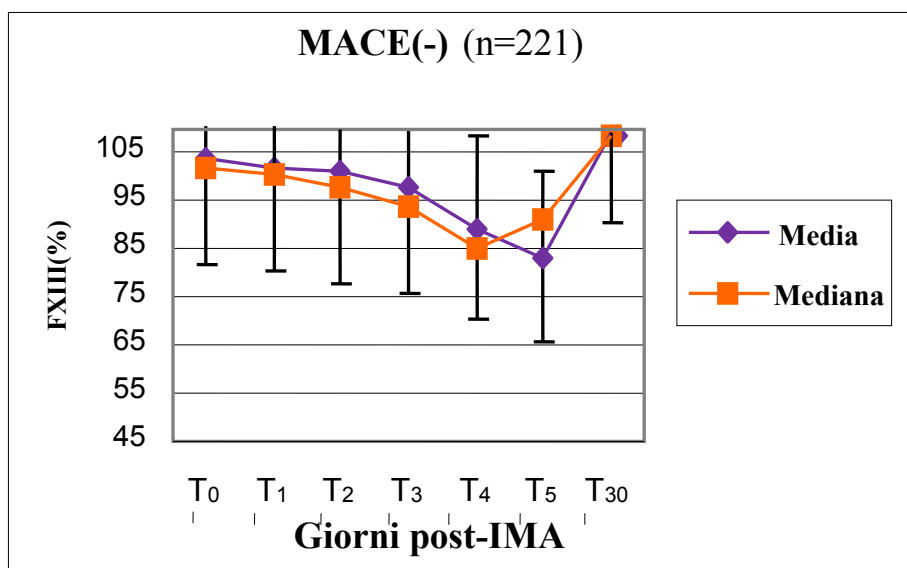


Grafico 7. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi dei pazienti che NON hanno manifestato eventi avversi (MACE -) (in viola). In Arancione i valori mediani degli stessi pazienti.

I risultati ottenuti confrontando i gruppi erano tutti statisticamente significativi, più precisamente, il gruppo MACE(+) ha mostrato un maggiore abbassamento di FXIII: (MACE+ vs MACE-: $P_{t_0}=0.0086$; $P_{t_{4-5}}=0.03$; $P_{t_{30}}=0.06$). Valutando intra-caso i risultati erano simili: (MACE+: t_0 vs t_{4-5} , $P=0.01$; MACE-: t_0 vs t_{4-5} , $P=0.0001$).

4.4 Livelli di FXIII post-IMA ed endpoint

Infine variazioni nel decremento di FXIII si sono valutate in base al differente endpoint considerato. L'*Heart Failure*, come si vede nel **Grafico 8**, ha mostrato particolari riduzioni di FXIII, con cinetica: t_0 94.4 ± 32.9 ; t_{4-5} 74.7 ± 5.2 ; t_{30} 101.3 ± 29.2 (valori di mediana: t_0 88.7, t_{4-5} 76.4, t_{30} 95.9) e Δ_{medio} di consumo pari a circa 20%. I livelli di fattore XIII rilevati al t_{4-5} risultavano significativamente più bassi ($P < 0.0001$) se confrontati con i rispettivi valori di baseline al tempo t_0 .

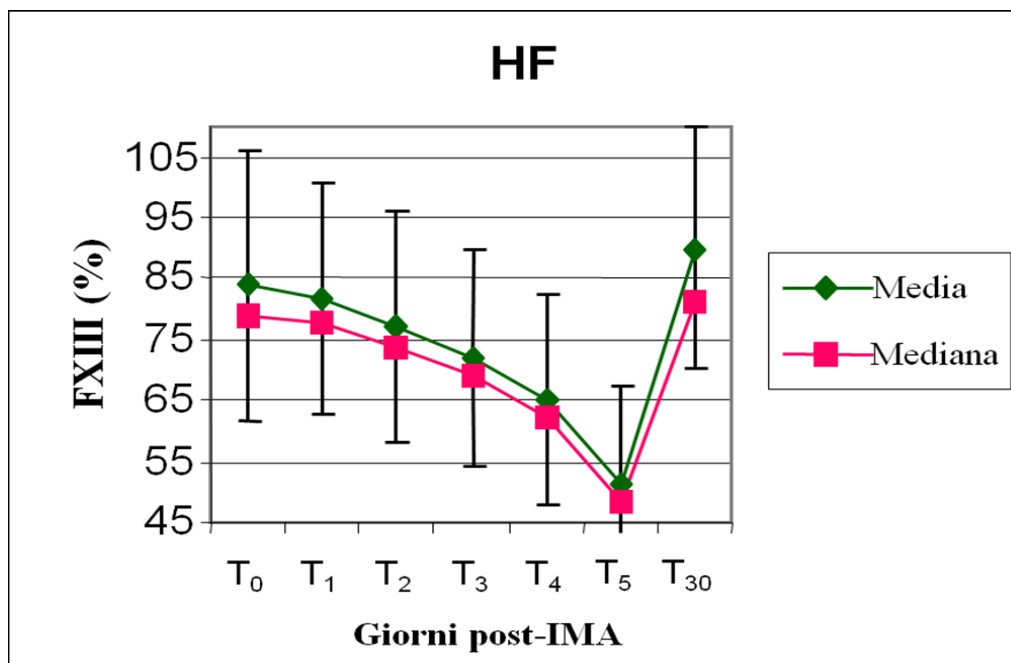
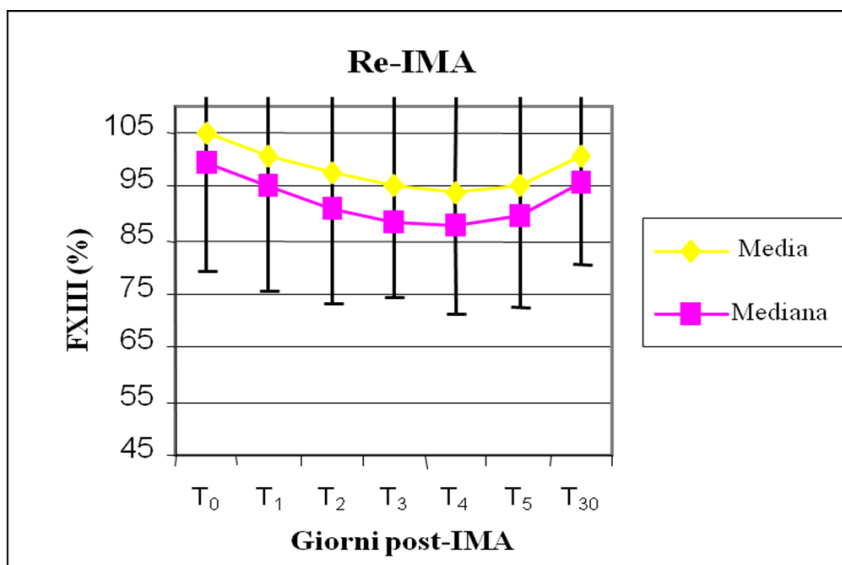
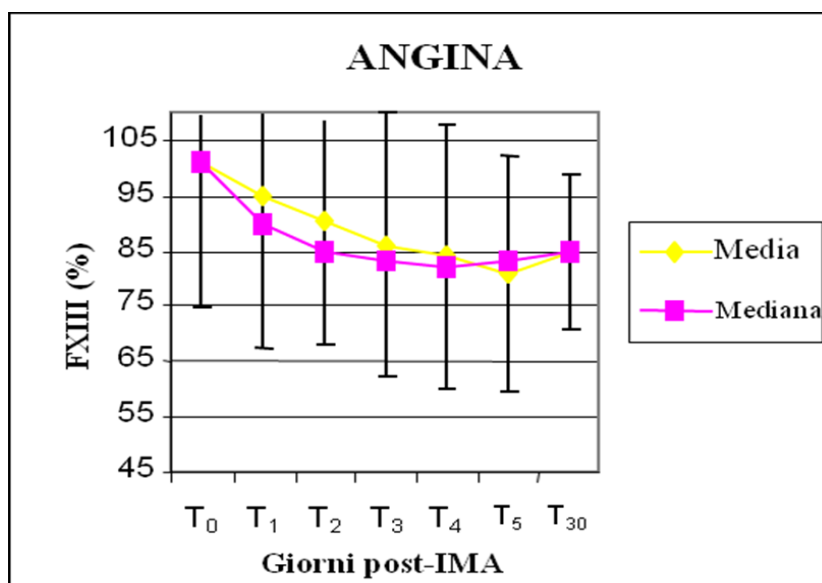


Grafico 8. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi dei pazienti con Heart Failure (in blu). In rosa i valori mediani degli stessi pazienti.

L'Angina instabile e il re-IMA a differenza degli altri MACE non sembravano essere influenzati dall'abbassamento dei livelli di FXIII. Per quanto riguarda l'Angina instabile non si sono riscontrati picchi di consumo ma per lo più un graduale abbassamento poi mantenuto anche al giorno T₃₀, questo probabilmente dovuto al fatto che l'angina è una condizione di continua re-stenosi di conseguenza il FXIII viene comunque e continuamente consumato. La cinetica per l'angina risultava: t₀ 98.9±38.6; t₄₋₅ 67.7±20.25; t₃₀ 87.2±7.3 (valori di mediana: t₀ 89.2, t₄₋₅ 68.5, t₃₀ 87.2). In questo caso i valori riferiti a t₄₋₅ si sono mostrati comunque più bassi (P=0,04) se riferiti ai valori a t₀ (**Grafico 9**). L'endpoint del re-IMA, sembrava mantenere un andamento per lo più lineare (FXIII% valore medio più basso (t₄₋₅): 94.7±34.8) (**Grafico 10**).



Grafici 9 e 10. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate e a 4 settimane di follow-up post-IMA, ottenuta dai valori medi (in giallo) dei pazienti con angina instabile (sopra) e con reinfarto (sotto). In rosa i valori mediani degli stessi pazienti degli stessi due gruppi.

Al contrario i casi morti durante i primi 5 giorni dopo l'infarto presentavano un significativo abbassamento dei livelli di FXIII fin dall'arruolamento (t_0), con valori medi percentuali di FXIII (t_{4-5}) pari a 69.5 ± 28.5 , (**Grafico 11**).

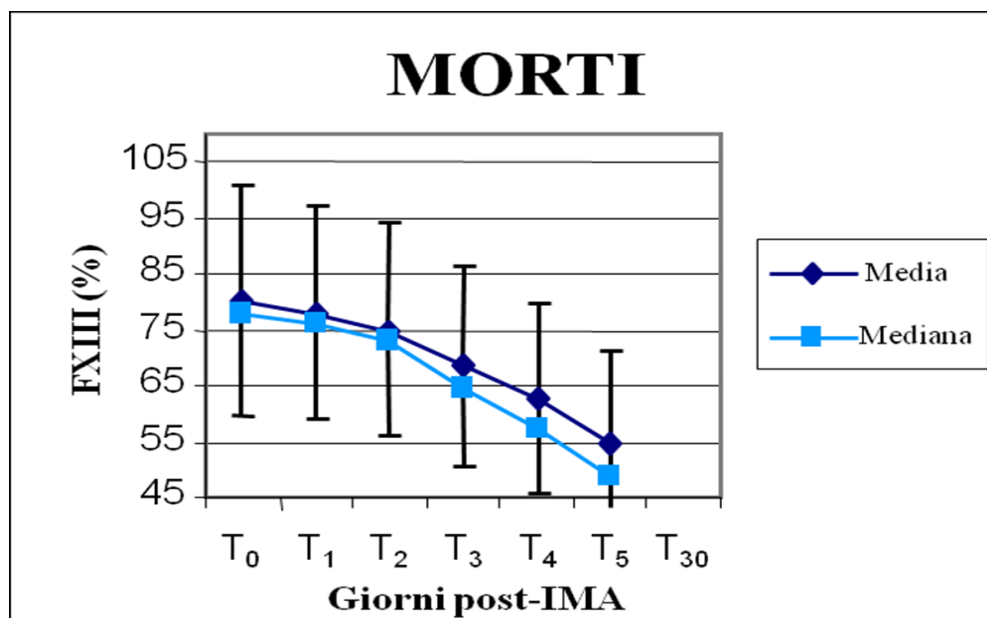


Grafico 11. Cinetica dei livelli di FXIII nelle prime 5 giornate post-IMA, ottenuta dai valori medi dei pazienti morti durante la prima settimana (in blu). In Azzurro i valori mediani degli stessi pazienti.

4.5 Analisi di Sopravvivenza (Kaplan-Meier survival analysis)

1 anno di follow up

Constatato l'abbassamento riscontrato dopo l'infarto in particolare tra la 4° e la 5° giornata, è stata valutata la sopravvivenza ad un anno di follow-up; il cut-off di FXIII restituito dall'analisi dei dati con curva ROC era pari a 74.9% (Sensibilità: 74.29%; Specificità: 67.01%; $P < 0.0001$). Heart Failure e morte, i due MACE che hanno mostrato un maggior picco di abbassamento, sono stati anche valutati come endpoint composito. L'intero gruppo di pazienti ha mostrato differenze significative nella curva di sopravvivenza con un'augmentata percentuale di sopravvivenza presente tra i pazienti con una percentuale media di FXIII al 4° giorno maggiore del 74.9% ($P = 0.04$). Di conseguenza, i pazienti con minori livelli di FXIII dopo 4-5 giorni dall'evento ischemico avevano la probabilità maggiore di sviluppare HF o di morte di circa 1.51 volte ($HR = 1.51$; 95% CI, 1.01-2.22) rispetto ai pazienti con livelli superiori a 74,9% (**Figura 16**). La stessa analisi di sopravvivenza considerando lo stesso endpoint composito è stata valutata a 30 giorni

dall'infarto e anche in questo caso i pazienti con valori inferiori a 74.9% in 4°-5° giornata presentavano una maggior probabilità di HF e morte di circa 2 volte ($P= 0.02$), ($HR= 2.10$; 95% CI, 1.14-2.22).

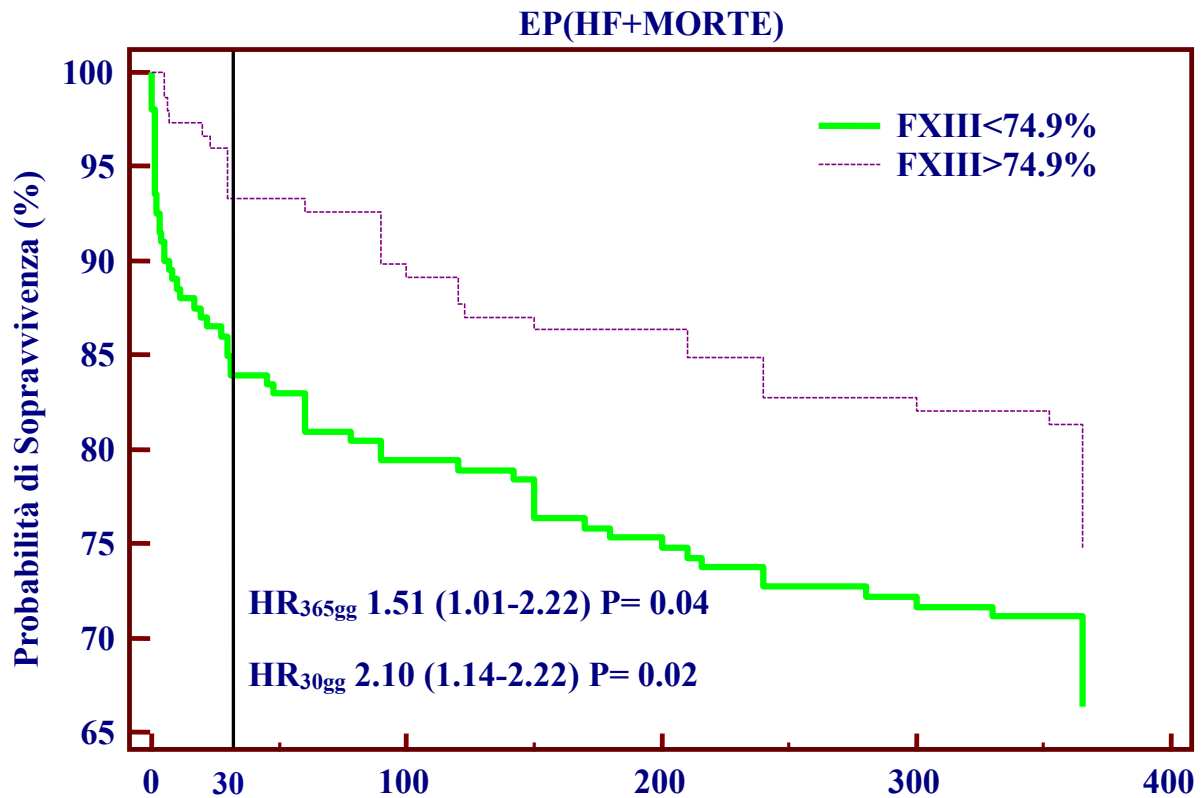


Figura 16. *Analisi di sopravvivenza ad 1 anno do follow-up nel gruppo totale stratificato per il cut-off di FXIII=74.9%; $P<0.0001$.*

4.6 Altre variabili con valore prognostico per MACEs

E' stata, infine, eseguita la valutazione della probabilità di sviluppare MACEs associato alle classiche variabili cardiovascolari e al valore soglia individuato di FXIII (74.9%). Sono state considerate come variabili l'età >69 (valore mediano dell'intero gruppo di pazienti), il diabete, il fumo, il precedente IMA, la FE%<50, la classe Killip >1 e il FXIII<74.9%, considerando sia l'endpoint totale che composito di HF e morte, a un anno di follow-up. Tali parametri considerati nell'analisi monovariata risultavano essere fattori prognostici significativi e indipendenti sia per quanto riguarda l'endpoint di tutti i MACEs sia per l'endpoint di HF e morte, ad eccezione del valore soglia di FXIII<74.9% che ha mostrato significatività border-line (P=0.09) e il fumo che restituisce significatività prognostica solo per quanto riguarda l'endpoint composito HF+Morte (P= 0.005) nell'analisi monovariata. La significatività prognostica era mantenuta anche per l'analisi multivariata (P<0.0001), tranne che per le variabili diabete, FE%<50 e FXIII<74.9% e Fumo. In entrambe le valutazioni, monovariata e multivariata e per entrambi gli endpoint considerati, il valore maggiormente significativo che indicava un aumento del rischio di MACE ad un anno di follow-up era attribuito al precedente IMA (MACE totale: P<0.0001 monovariata; P= 0.0001 multivariata; HF+Morte: P=0.0003 monovariata, P= 0.0006 multivariata) **(Tabella 9)**.

Variabili	Hazard Ratio (95% CI)	
	P	P
	MACE totale	HF+Morte
<u>Analisi Monovariata</u>		
Età (anni)	2.56 (1.77-3.71)	3.21 (2.08-4.94)
	<0.0001	<0.0001
FE%<50	1.5 (1.05-2.15)	1.51 (1.01-2.25)
	0.02	0.04
Classe Killip>1	2.04 (1.32-3.13)	2.78 (1.79-4.31)
	0.002	<0.0001
Fumo	0.62 (0.44-0.88)	2.02(1.54-3.26)
	0.008	0.005
IMA precedente	2.32 (1.63-3.29)	2.14 (1.44-3.17)
	<0.0001	0.0003
Diabete	1.86 (1.28-2.71)	1.81 (1.19-2.76)
	0.002	0.0078
FXIII <74.9%	1.40 (0.99-2.20)	1.37 (0.45-2.21)
	0.09	0.122
<u>Analisi Multivariata</u>		
Età (anni)	1.99 (1.35-2.95)	2.30 (1.46-3.61)
	0.0005	0.0003
Classe Killip>1	1.91 (1.23-2.97)	2.40 (1.52-3.80)
	0.003	0.0002
IMA precedente	2.07 (1.42-3.02)	2.05 (1.36-3.08)
	0.0001	0.0006

Tabella 9. Cox proportional hazards regression test. Calcolo delle variabili predittive nel gruppo totale di pazienti per endpoint composito. **Età:** minore vs maggiore di 69 (valore mediano); **Classe Killip:** 1 vs ≥ 2 ; **FE%:** minore vs maggiore 50%; **FXIII<74.9%:** minore vs maggiore 74.9%; **IMA precedente, Fumo, Diabete:** presente vs assente.

5. Discussione

Nel presente studio è stato analizzato il ruolo dei livelli di FXIII in un gruppo di 350 pazienti nelle prime fasi di un evento acuto di infarto del miocardio e sono stati valutati inoltre gli effetti sulla sopravvivenza a 30 giorni e ad un anno di follow-up.

L'analisi retrospettiva dei livelli di FXIII circolanti dopo infarto associata a quella prospettica sulla sopravvivenza ha permesso di valutare e chiarire meglio il ruolo che questo poliedrico fattore ha nella progressione e nella prognosi di una malattia così complessa quale l'infarto miocardico.

Il principale risultato di questo studio è stato l'attribuzione al FXIII di un ruolo prognostico associato a insorgenza di complicanze post evento (MACEs), e in particolare morte e *Heart Failure*. Questa conclusione deriva dall'osservazione che i pazienti analizzati sia come gruppo totale che come vari sottogruppi definiti e caratterizzati in base al differente MACE manifestato, presentavano nel corso dei 6 giorni di monitoraggio una diminuzione significativa dei livelli circolanti di FXIII alla 4°-5° giornata post-IMA. L'analisi ha restituito un livello soglia di FXIII (74,9%) al di sotto del quale i pazienti mostravano sia nel breve (30 giorni) che nel prolungato (1-anno) follow-up una probabilità di sopravvivenza diminuita rispettivamente di 1.5 e 2.1 volte ($P=0.04$ e $P=0.02$). Inoltre, la sottoanalisi eseguita per i differenti endpoints considerati mostrava un'augmentata probabilità di sviluppare eventi avversi dopo l'infarto in particolare l'HF e morte. La minor probabilità di sopravvivenza legata al basso valore di FXIII, è stata riscontrata, seppur border-line, anche nell'analisi monovariata ad un anno ($P=0.09$). La classica condizione di rischio di pregresso infarto, nell'analisi di regressione proporzionale di COX ha attribuito, come ci si potrebbe aspettare, un'importante significatività statistica per quanto riguarda la manifestazione di MACEs; tale variabile sia analizzata singolarmente che associata ad altre variabili è risultata molto influente ($P<0.0001$ monovariata; $P=0.0001$ multivariata).

Per lungo tempo il FXIII è stato considerato un fattore con un ruolo prevalente nelle ultime fasi della cascata coagulativa. Il riconoscimento di ulteriori funzioni in differenti situazioni fisiopatologiche hanno recentemente attribuito al FXIII un ruolo di proteina multifunzionale con capacità regolatorie nonché di riparazione tessutale con numerose implicazioni in diverse aree della medicina incluse le patologie cardio e cerebro-vascolari.

I risultati da noi descritti sono in linea con recenti lavori che attribuiscono al FXIII un ruolo nella guarigione del tessuto miocardico dopo un evento acuto d'infarto. In uno studio condotto in

modello murino, è stato riportato che costitutivi bassi livelli di FXIII circolanti (0%-70%) associavano a morte nel 100% dei topi dopo infarto del miocardio indotto sperimentalmente [36]. Inoltre, lo studio dimostrava un'anomala guarigione della lesione al miocardio nei topi reinfusi con FXIII nonostante sopravvivevano all'evento. Tale anomalia rilevata mediante RMN era imputabile ad eccessivi livelli di MMP-9 circolanti, responsabili dell'outcome clinico negativo nei topi deficitari di FXIII (*Knock-out*). Inoltre i topi *wild-type* e i topi *Knock-out* sottoposti a terapia sostitutiva nei primi 5 giorni post-IMA mostravano sopravvivenza paragonabile ai topi WT non infusi. In linea con questo, un precedente studio del nostro gruppo mostrò le capacità del FXIII di promuovere la proliferazione cellulare in colture di fibroblasti umani contrastando gli effetti dannosi delle Metalloproteinasi (MMPs) [95]. Un altro studio mostrava come il livello di attività del FXIII a livello della lesione nel muscolo cardiaco permetteva di prevedere l'outcome di guarigione e il rimodellamento del ventricolo sinistro post-IMA [42] e sottolineava una bassa attività di FXIII a livello tissutale nei pazienti con scarsa guarigione dopo l'evento [96,97]. Il trattamento con FXIII induceva inoltre una diminuzione dei tempi di risoluzione della risposta neutrofila, un aumento nel reclutamento dei macrofagi e dell'angiogenesi a livello della lesione in via di guarigione.

Tali osservazioni ci portano a sostenere che la molecola di FXIII debba essere necessaria in sede di lesione cardiaca per lo svolgimento di funzioni legate ad una ottimale e precoce guarigione del tessuto danneggiato. Quando si verifica un infarto miocardico, l'outcome clinico è dipendente anche dall'estensione della lesione e dalle modalità di guarigione [98]; il FXIII esplica la sua azione in tutti quei meccanismi che come l'angiogenesi, la sintesi di fibrina e collagene, la migrazione e proliferazione cellulare, nonché la modulazione/inibizione delle MMPS, sono rivolti alla riparazione tissutale e responsabili della formazione di una cicatrice stabile [99]. Questo importante ruolo del FXIII nel processo di *healing* non può essere svolto in modo ottimale durante/dopo un evento trombotico/ischemico a causa del fisiologico consumo di FXIII [41] inevitabile durante tali processi. Un case report affronta la problematica della rottura del cuore in tre pazienti con carenza di FXIII utilizzando terapia sostitutiva per favorire la guarigione osservando che i pazienti con uguali caratteristiche cliniche non trattati morivano per shock cardiogeno [96]. La terapia sostitutiva è stata utilizzata con successo anche in un case-report riguardante un paziente affetto da carenza congenita di FXIII con finalità mirate però ad evitare il rischio di sanguinamento [100].

I risultati qui esposti sono in linea con le nostre osservazioni a favore di una prognosi migliore e aumentata sopravvivenza associate a un minor consumo di FXIII a prescindere dai livelli

costitutivi osservati a t_0 . Riassumendo l'investigazione del FXIII, la cui attività è anche modulata dalle varianti geniche, è da tenere in alta considerazione sia per quanto riguarda processi di guarigione post-IMA che per una minor estensione del danno cardiaco, entrambi fattori con diretto riscontro sullo scompenso cardiaco e quindi sulla sopravvivenza.

Infine anche se in questo lavoro non sono state prese in considerazione è bene ricordare che le numerose varianti polimorfiche del FXIII potrebbero a loro volta avere influenza su una così complessa patologia.

6. Conclusioni

Nel presente lavoro si dimostra quella che possiamo definire “cardio-protezione” cioè una migliore prognosi post-infarto osservata nei pazienti con basso consumo di FXIII e quindi caratterizzati da minor probabilità di sviluppare MACEs e un aumento della probabilità di sopravvivenza sia a breve che a lungo termine.

Ad oggi sono stati proposti limitati approcci per migliorare la guarigione locale del cuore dopo IMA, al fine di limitare l’espansione della lesione, prevenire e ridurre la dilatazione del ventricolo sinistro, scongiurare un anomalo rimodellamento cardiaco. Tra questi, la restrizione passiva del ventricolo sinistro [104-106], l’iniezioni di materiali biocompatibili (FXIII-Fibrino-Alginati) [107] e i trapianti cellulari [108-110] non hanno dato risultati attesi anche a causa della intrinseca complessità di tali approcci. La presente ricerca evidenzia l’importante coinvolgimento del FXIII nei meccanismi di *Healing* cardiaco, dimostrato carente in quelle condizioni di scarsa disponibilità del fattore. Si potrebbe quindi auspicare l’utilizzo della molecola FXIII in primis come marker prognostico utile al riconoscimento precoce di quei pazienti a rischio di prognosi negativa e come molecola candidata a terapia profilattica post-IMA in grado di accelerare e migliorare la guarigione, aiutando nel complesso le performance cardiache e evitando in particolar modo l’*Heart Failure* oggi causa primaria di morte post-IMA e/o ospedalizzazione.

Infine riconoscere un livello soglia e/o un range di riferimento (cut-off) sotto il quale la prognosi si rivela negativa e associarli eventualmente a caratteristiche specifiche del paziente, quali ad esempio le varianti polimorfiche della molecola, permetterà di selezionare in anticipo quei casi che realmente necessitano il trattamento sostitutivo con FXIII, evitando il rischio di potenziali effetti pro-trombotici dell’infusione.

7. Bibliografia

1. Norris RM. The natural History of acute myocardial infarction, *Heart*, 2000;83 (6).
2. Sillesen H. The natural history of patients with carotid stenosis, *Pathophysiol Haemost Thromb.*, 2002; 32(5-6).
3. Muller-Wieland D, Faust M, Kotzka J, Krone W. [Mechanisms of plaque stabilization], *Hertz*, 1999; 24(1).
4. Campbell JH, Campbell GR. Cell biology of atherosclerosis, *J Hypertens Suppl.* 1994; 12(10).
5. American Heart Association. Manuale di ACLS. Emergency Cardiovascular Care Program 1997-99. Centro Scientifico Editore.
6. Lloyd-Jones, D. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009; 119(3).
7. Hurts, IL Cuore, Valentin Fuster; R. Wayne Alexander; Robert A. O'rourke; Robert Roberts; Spencer B. King III; Ira S. Nash; Eric N. Prystowsky. 11° Ediziona, McGraw-Hill, 2005
8. Giornale Emodinamica n°27 Organo Ufficiale del GISE: Società Italiana di Cardiologia Invasiva, www.emodinamica.gise.it
9. ACC/AHA Guidelines for the mwith acute myocardial infarction. Journal of American College of Cardiology 1999.
10. BU Goldmann, LK Newby, EM Ohman. Cardiac Markers for Decision Making in Acute Ischemic Syndromes. *Journal of American College of Cardiology* 2000.
11. EJ. Topol. Textbook of Cardiovascular Medicine. Associate Editors 1997
12. Jugdutt BI, Khan MI, Jugdutt SJ, et al. Impact of left ventricular unloading after late reperfusion of canine anterior myocardial infarction on remodeling and function using isosorbide-5-mononitrate. *Circulation* 1995, 92(4).
13. Stults KR, Brown DD, Schug VL, et al. Prehospital defibrillation performer by emergency medical technicians in rural communities. *N Engl J Med* 1984, 310(4).
14. JS Alpert, GS Francis. Manuale di terapia intensive coronarica. Centro Scientifico Editore 1999.
15. Kennedy JW. Thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: A brief review. *Herat Lung* 1987, 16(6 Pt 2).

16. Smith et al. ACC/AHA Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention (Revision of the 1993 PTCA Guidelines). *Journal of American College of Cardiology* 2001, 37.
17. Lowe HC, Neill BD, Van de Werf F, Jang IK. Pharmacologic reperfusion therapy for acute myocardial infarction, *J Thromb Thrombolysis.*, 2002, 14(3).
18. Armstrong PW, Collen D. Fibrinolysis for acute myocardial infarction: current status and new horizons for pharmacological reperfusion, part 1, *Circulation*, 2001, 103(24).
19. Wikipedia, www.wikipedia.org
20. Taylor MJ, Scuffham PA, McCollam PL, Newby DE. Acute coronary syndromes in Europe: 1-year costs and outcomes. *Curr Med Res Opin.* 2007, 23(3).
21. Piscitelli P, Iolascon G, Gimigliano F, Muratore M, Camboa P, Borgia O, Forcina B, Fitto F, Robaud V, Termini G, Rini GB, Gianicolo E, Faino A, Rossini M, Adami S, Angeli A, Distante A, Gatto S, Gimigliano R, Guida G. Incidence and costs of hip fractures compared to acute myocardial infarction in the Italian population: a 4-year survey. *Osteoporos Int.* 2007, 18(2).
22. Huikuri HV, Stein PK. Heart rate variability in risk stratification of cardiac patients. *Prog Cardiovasc Dis.* 2013, 56(2).
23. Ross J Jr, Gilpin EA, Madsen EB, Henning H, Nicod P, Dittrich H, Engler R, Rittelmeyer J, Smith SC Jr, Viquerat C. A decision scheme for coronary angiography after acute myocardial infarction. *Circulation.* 1989,79 (2).
24. Federazione Italiana di Cardiologia. Documento di Consenso: Sindromi coronariche acute senza sopralivellamento del tratto ST. Importante documento sull'appropriata gestione dei pazienti con sindrome coronarica acuta senza sopraslivellamento del tratto ST. *G Ital Cardiol* 2009, 10 (Suppl 1-6).
25. Perugini E, Maggioni AP, Boccanelli A, Di Pasquale G. Epidemiology of acute coronary syndromes in Italy, *G Ital Cardiol.* 2010, 11(10).
26. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Arnouyel P. Contribution of trends in survival "False-positive" and coronary-event rates to changes in coronary heart dis-cardiac catheterization laboratory activation among patients ease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project with suspected ST-segment elevation myocardial infarction populations. *Monitoring trends and determinants in cardio-vascular disease. Lancet* 1999, 353.
27. Mauri F. Epidemiologia, patogenesi e fisiopatologia degli eventi dopo infarto miocardico acuto. *G. Ital.* 2008, 9 (suppl 1-7).

28. Malattie del Sangue e degli Organi Ematopoietici, Gianluigi Castoldi e Vincenzo Liso McGraw-Hill; 5° Edizione: Settembre 2007.
29. Egbring R, Kroniger A, Seitz R. Factor XIII deficiency: pathogenic mechanisms and clinical significance, *Semin Thromb Hemost.*, 1996, 22(5).
30. Dickneite G, Metzner H, and Nicolay U. Prevention of suture hole bleeding using fibrin sealant: Benefits of Factor XIII. *Journal of Surgical Research*, 2000, 93(2).
31. Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. Human Factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem.* 1973, 248(4).
32. Board PG, Webb GC, McKee J, Ichinose A. Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24-p25. *Cytogenet Cell Genet.* 1988, 48(1).
33. Webb GC, Coggan M, Ichinose A, Board PG. Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. *Hum Genet.* 1989, 81(2).
34. J. McDonagh, R. Seitz, R. Biochemistry of fibrin-stabilizin factor FXIII. Factor XIII, second International conference Marbug, Egbering 1993
35. E. Cario, H. Goebell & A. U. Dignass. Factor XIII Modulates intestinal epithelial wound healing in vitro. *Scandinavian J. Gastroenterology* 1999, 34(5).
36. Nahrendorf M, Hu K, Frantz S, Jaffer FA, Tung CH, Hiller KH, Voll S, Nordbeck P, Sosnovik D, Gattenlöhner S, Novikov M, Dickneite G, Reed GL, Jakob P, Rosenzweig A, Bauer WR, Weissleder R, Ertl G. Factor XIII deficiency causes cardiac rupture, impairs wound healing, and aggravates cardiac remodeling in mice with myocardial infarction. *Circulation.* 2006 113(9).
37. Dardik R, Loscalzo J. and Inbal A. Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *Journal of Thromb. And Haemost.*, 2005, 4(1).
38. Dardik R, Loscalzo J. Eskaraev R. and Inbal A. Molecular Mechanisms underlying the proangiogenic effect of Factor XIII. *Atheroscler. Thromb. and Vasc. Biol.* 2005, 25(3).
39. Dardik R, Leor J, Skutelsky E, Castel D, Holbova R, Schiby G, Shaish A, Dickneite C, Loscalzo J and Inbal A. Evaluation of pro-angiogenic effect of factor XIII in heterotopic mouse heart allografts and FXIII-deficient mice. *Thromb. Haemost* 2006; 95(3).
40. Kilian O, Fuhrmann R, Alt V et al. Plasma transglutaminase factor XIII induces microvessel ingrowth into biodegradable hydroxyapatite implants in rats. *Biomaterials* 2005; 26(14).

41. Alkjaersig N, Fletcher AP, Lewis M, Ittyerah R. Reduction of coagulation factor XIII concentration in patients with myocardial infarction, cerebral infarction, and other thromboembolic disorders. *Thromb Haemost.* 1977, 38(4).
42. Nahrendorf M, Aikawa E, Figueiredo JL, Stangenberg L, van den Borne SW, Blankesteyn WM, Sosnovik D, Jaffer FA, Tung CH and Weissleder R. Transglutaminase activity in acute infarcts predicts healing outcome and left ventricular remodeling: implications for FXIII therapy and antithrombin use in myocardial infarction. *European heart Journal*, 2008, 29(4).
43. The National Center For Biotechnology Information NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP.
44. de Lange M, Andrew T, Snieder H, Ge D, Futers TS, Standeven K, Spector TD, Grant PJ, Ariëns RA. Joint linkage and association of six single-nucleotide polymorphisms in the factor XIII-A subunit gene point to V34L as the main functional locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006, 26(8).
45. Kohler HP, Ariens RA Whitaker P, Grant PJ. A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIII Val34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb Haemost.*, 1998, 80(4).
46. Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, Tognazzo S, Moratelli S, Resca R, Moretti M, Scapoli GL. A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (VAL34Leu): a risk factor for primary intracerebral hemorrhage is protective against atherothrombotic diseases. *Am J Hematol.* 2001, 67(3).
47. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1998, 79(1).
48. Wartiovaara U, Perola M, Mikkola H, Tötterman K, Savolainen V, Penttilä A, Grant PJ, Tikkanen MJ, Vartiainen E, Karhunen PJ, Peltonen L, Palotie A. Association of FXIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. *Atherosclerosis.* 1999, 142 (2).
49. Yucel O, Karahan O, Zorlu A, Manduz S. Familial genetic risk factors in premature cardiovascular disease: a family study. *Mol Biol Rep.* 2012, 39(5).
50. Loukianos S, Rallidis, Marianna Politou, Christoforos Komporozos, Demosthenes B. Panagiotakos, Chrisoula I. Belessi, Anthi Travlou, John Lekakis, Dimitrios T. Kremastinos. Factor XIII Val34Leu polymorphism and risk of myocardial infarction under the age of 36 years. *Thromb. Haemost* 2008, 99(6).

51. Silvain J, Pena A, Vignalou JB, Hulot JS, Galier S, Cayla G, Bellemain-Appaix A, Barthélémy O, Beygui F, Bal-dit-Sollier C, Drouet L, Weisel JW, Montalescot G, Collet JP. FXIII-A Leu34 genetic variant in premature coronary artery disease: a genotype-phenotype case control study. *Thromb Haemost.* 2011, 106(3).
52. Siegerink B, Algra A, Rosendaal FR. Genetic variants of coagulation factor XIII and the risk of myocardial infarction in young women. *Br J Haematol.* 2009, 146(4).
53. Gemmati D, Tognazzo S, Serino ML, Fogato L, Carandina S, De Palma M, Izzo M, De Mattei M, Ongaro A, Scapoli GL, Caruso A, Liboni A, Zamboni P. Factor XIII V34L polymorphism modulates the risk of chronic venous leg ulcer progression and extension. *Wound Repair Regen.* 2004, 12(5).
54. Onrat ST, Akci O, Söylemez Z, Onrat E, Avşar A. Prevalence of myocardial infarction polymorphisms in Afyonkarahisar, Western Turkey. *Mol Biol Rep.* 2012, 39(9).
55. Heng CK, Lal S, Saha N, Low PS, Kamboh MI. The impact of factor XIIIa V34L polymorphism on plasma factor XIII activity in the Chinese and Asian Indians from Singapore. *Hum Genet.* 2004, 144(2).
56. Kohler HP, Futers TS, Grant PJ. Prevalence of three common polymorphisms in the A-subunit gene of factor XIII in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 1999, 81(4).
57. Gallivan L, Markham AF, Anwar R. The Leu564 factor XIIIa variant results in significantly lower plasma factor XIII levels than the Pro564 variant. *Thromb Haemost.* 1999, 82(4).
58. Yee VC, Pedersen LC, Trong IL, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. Three-dimensional structure of transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 91(15).
59. van Wersh JWJ, Peters C, Ubachs JMH. Coagulation factor XIII in plasma of patient with benign and malignant gynaecological tumors. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994, 32(9).
60. Kangsadalampai S, Board PG. The Val34Leu polymorphism in the A subunit of coagulation factor XIII contributes to the large normal range in activity and demonstrates that the activation peptide plays a role in catalytic activity. *Blood.* 1998, 92(8).
61. Anwar R, Gallivan L, Edmonds SD, Markham AF. Genotype/phenotype correlations for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity. *Blood.* 1999, 93(3).

62. Ariëns RA, Kohler HP, Mansfield MW, Grant PJ. Subunit antigen and activity levels of blood coagulation factor XIII in healthy individuals. Relation to sex, age, smoking, and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999, 19(8).
63. Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, Longstreth WT Jr, Hindorff LA, Teramura G, Rosendaal FR, Gaur LK, Psaty BM, Siscovick DS. Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke.* 2001, 32(11).
64. D. Martijn, O. Pruissen, Arjen J. C. Slooter, Frits R. Rosendaal, Yolanda van der Graaf, and Ale Algra. Coagulation factor XIII gene variation, oral contraceptives, and risk of ischemic stroke. *Blood* 2007, 111.
65. Komanasin N, Futers TS, Ariens RAS, Grant PJ. A novel polymorphism in the factor XIII B subunit (His95Arg) relates to subunit dissociation and venous thrombosis. *J. Thromb. Haemostas.* 2005, 3(11).
66. Doggen CJ, Reiner AP, Vos HL, Rosendaal FR. Two factor XIII gene polymorphisms associated with a structural and functional defect and the risk of myocardial infarction in men. *J Thromb Haemost.* 2003, 1(9).
67. Reiner AP, Heckbert SR, Vos HL, Ariens RAS, Lemaitre RN, Smith NL, Lumley T, Rea TD, Hindorff LA, Schellenbaum GD, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. Genetic variants of coagulations factor XIII, postmenopausal estrogen therapy, and risk of nonfatal myocardial infarction. *Blood* 2003, 102(1).
68. Gemmati D, Federici F, Campo G, Tognazzo S, Serino ML, De Mattei M, Valgimigli M, Malagutti P, Guardigli G, Ferraresi P, Bernardi F, Ferrari R, Scapoli GL, Catozzi L. Factor XIII A-V34L and factor XIII B-H95R gene variants: effects on survival in myocardial infarction patients. *Mol Med.* 2007,13(1-2).
69. Yamada Y, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S et al. Assessment of genetic risk for myocardial infarction, *Thromb Haemost.*, 2006; 96(3).
70. Keeley EC, Grines CL. Primary percutaneous coronary intervention for every patient with ST-segment elevation myocardial infarction: what stands in the way? *Ann Intern Med.* 2004, 141(4).
71. Radke PW, Kaiser A, Frost C, Sigwart U. Outcome after treatment of coronary in-stent restenosis; results from a systematic review using meta-analysis techniques. *Eur Heart J.* 2003, 24(3).
72. Marcucci R, Brogi D, Sofi F, Giglioli C, Valente S, Liotta AA, Lenti M, Gori AM, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. PAI-1 and homocysteine, but not lipoprotein (a) and

- thrombophilic polymorphisms, are independently associated with the occurrence of major adverse cardiac events after successful coronary stenting. *Heart*. 2006, 92(3).
73. Stone GW, Brodie BR, Griffin JJ, Costantini C, Morice MC, St Goar FG, Overlie PA, Popma JJ, McDonnell J, Jones D, O'Neill WW, Grines CL. Clinical and angiographic follow-Up after primary stenting in acute myocardial infarction: the Primary Angioplasty in Myocardial Infarction (PAMI) stent pilot trial. *Circulation*. 1999, 99(12).
 74. Heggund PS, Harjai KJ, Stone GW, Mehta RH, Marsalese DL, Boura JA, O'Neill WW, Grines CL. Procedural success versus clinical risk status in determining discharge of patients after primary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004, 44(7).
 75. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med*. 2003, 349(20).
 76. Nahrendorf M. Imaging of infarct healing predicts left ventricular remodeling and evolution of heart failure: focus on protease activity. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011, 4(4).
 77. Roger VL. Epidemiology of heart failure. *Circ Res*. 2013, 113(6).
 78. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000, 101(25).
 79. Nahrendorf M, Wiesmann F, Hiller KH, Hu K, Waller C, Ruff J, Lanz TE, Neubauer S, Haase A, Ertl G, Bauer WR. Serial cine-magnetic resonance imaging of left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Magn Reson Imaging*. 2001, 14(5).
 80. Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, Stickland M, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val 34 Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 1998, 29(4).
 81. Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood*. 1999, 93(3).
 82. Schroeder V, Kohler HP. New developments in the area of factor XIII. *J Thromb Haemost*. 2013, 11(2).
 83. Nussbaum M, Morse BS. Plasma Fibrin Stabilizing Factor Activity In Various Diseases. *Blood*. 1964, 23.

84. Merskey C, Johnson AJ, Kleiner GJ, Wohl H. The defibrination syndrome: clinical features and laboratory diagnosis. *Br J Haematol.* 1967, 13(4).
85. Mc Kay DG. Disseminated intravascular coagulation. Pathology, diagnosis and therapy of disseminated intravascular coagulation. *Proc R Soc Med.* 1968, 61.
86. Loof TG, Mörgelin M, Johansson L, Oehmcke S, Olin AI, Dickneite G, Norrby-Teglund A, Theopold U, Herwald H. Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood.* 2011.
87. Mansfield MW, Kohler HP, Ariëns RA, McCormack LJ, Grant PJ. Circulating levelsof coagulation factor XIII in subjects with type 2 diabetes and in their first-degree relatives. *Diabetes Care.* 2000, 23(5).
88. Inbal A, Muszbek L. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. *Semin Thromb Hemost.* 2003, 29(2).
89. Ichinose A, Asahina T, Kobayashi T. Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and perinatal management. *Curr Drug Targets.* 2005, 6(5).
90. Aeschlimann D, Mosher D, Paulsson M. Tissue transglutaminase and factor XIII in cartilage and bone remodeling. *Semin Thromb Hemost.* 1996, 22(5).
91. Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res.* 2000, 41(1).
92. Nakano Y, Al-Jallad HF, Mousa A, Kaartinen MT. Expression and localization of plasma transglutaminase factor XIIIa in bone. *J Histochem Cytochem.* 2007, 55(7).
93. Schroeder V, Kohler HP. Thrombelastographic studies on factor XIII. *Thromb Haemost.* 2010, 104(6).
94. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem.* 1966, 15(1).
95. Zamboni P, De Mattei M, Ongaro A, Fogato L, Carandina S, De Palma M, Tognazzo S, Scapoli GL, Serino ML, Caruso A, Liboni A, Gemmati D. Factor XIII contraststhe effects of metalloproteinases in human dermal fibroblast cultured cells. *VascEndovascular Surg.* 2004, 38(5).
96. Nahrendorf M, Weissleder R, Ertl G. Does FXIII deficiency impair wound healing after myocardial infarction? *PLoS ONE.* 2006, 1:e48.
97. Vanhoutte D, Heymans S. Factor XIII: the cement of the heart after myocardial infarction? *Eur Heart J.* 2008, 29(4).
98. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005, 66(1).

99. Inbal A, Dardik R. Role of coagulation factor XIII (FXIII) in angiogenesis and tissue repair. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006, 35(1-2).
100. Szántó T, Salmela B, Mäkiperna A, Armstrong E, Lassila R. Management of acute myocardial infarction in a patient with factor XIII deficiency using prophylactic factor replacement therapy. *Haemophilia*. 2008, 14(1).
101. Lim BC, Ariëns RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet*. 2003, 361(9367).
102. Liu W, Jawerth LM, Sparks EA, Falvo MR, Hantgan RR, Superfine R, Lord ST, Guthold M. Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. *Science*. 2006 Aug 4;313
103. Berezky Z, Katona E, Muszbek L. Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003, 33(5-6).
104. Blom AS, Pilla JJ, Gorman RC 3rd, Gorman JH, Mukherjee R, Spinale FG, Acker MA. Infarct size reduction and attenuation of global left ventricular remodeling with the CorCap cardiac support device following acute myocardial infarction in sheep. *Heart Fail* 2005, 10(2).
105. Blom AS, Mukherjee R, Pilla JJ, Lowry AS, Yarbrough WM, Mingoia JT, Hendrick JW, Stroud RE, McLean JE, Affuso J, Gorman RC, Gorman JH 3rd, Acker MA, Spinale FG. Cardiac support device modifies left ventricular geometry and myocardial structure after myocardial infarction. *Circulation*. 2005, 112(9).
106. Kelley ST, Malekan R, Gorman JH 3rd, Jackson BM, Gorman RC, Suzuki Y, Plappert T, Bogen DK, Sutton MG, Edmunds LH Jr. Restraining infarct expansion preserves left ventricular geometry and function after acute anteroapical infarction. *Circulation*. 1999, 99(1).
107. Mukherjee R, Zavadzka JA, Saunders SM, McLean JE, Jeffords LB, Beck C, Stroud RE, Leone AM, Koval CN, Rivers WT, Basu S, Sheehy A, Michal G, Spinale FG. Targeted myocardial microinjections of a biocomposite material reduces infarct expansion in pigs. *Ann Thorac Surg*. 2008, 86(4).
108. Leor J, Rozen L, Zulloff-Shani A, Feinberg MS, Amsalem Y, Barbash IM, Kachel E, Holbova R, Mardor Y, Daniels D, Ocherashvili A, Orenstein A, Danon D. Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation*. 2006, 114.

- 109.** Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ, Sakai T, Tomita S, Schwartz L, Iwanochko M, Husain M, Cusimano RJ, Burns RJ, Yau TM. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000, 119(1).
- 110.** Yau TM, Li G, Weisel RD, Reheman A, Jia ZQ, Mickle DA, Li RK. Vascular endothelial growth factor transgene expression in cell-transplanted hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004, 127(4).