GIDM
24, 43-50, 2004
Lavoro originale

Emostasi nei pazienti diabetici e uremici: impatto del trapianto di rene e pancreas

P. Fiorina*, F. Folli*, F. Bifari*, M.B. Ventre*, G. Finzi***, G. Mazzolari*, C. Fedeli*, V. Guzzi*, P. Della Valle**, C. Placidi***, D. Belloni*, E. Ferrero*, C. Capella***, A. D'Angelo**, A. Secchi*°

*Dipartimento di Medicina Interna; **Unità di Ricerca Coagulazione e Trombosi;
***Dipartimento di Patologia dell'Università di Varese; °Università Vita e Salute, San Raffaele, Milano

riassunto

Razionale e obiettivi. Abbiamo condotto uno studio trasversale arruolando 12 pazienti con diabete mellito tipo 1 (T1DM), 30 pazienti uremici diabetici tipo 1 in trattamento dialitico (U-T1DM), 12 pazienti uremici diabetici di tipo 1 che hanno ricevuto un trapianto di solo rene (KD), 27 pazienti uremici diabetici di tipo 1 che hanno ricevuto un trapianto di rene e pancreas (KP) e 13 controlli sani (C), al fine di valutare l'effetto del trapianto di rene e di rene e pancreas sulle alterazioni dell'emostasi presenti nei pazienti diabetici e uremici.
Metodi. Abbiamo valutato la funzionalità piastrinica, mediante la misurazione della concentrazione di calcio intracellulare a riposo e dopo stimolo, i recettori piastrinici, i marker di ipercoagulabilità e l'assetto della coagulazione.
Risultati. Nel gruppo U-T1DM si è evidenziata una riduzione dell'espressione piastrinica di CD41 ($p < 0,05$). Le piastrine dei soggetti diabetici presentavano un'aumentata espressione dei recettori per la trombina (PAR-1 e PAR-3) rispetto ai non diabetici ($p < 0,01$). I livelli di $Ca^{2+}_{(in)}$ a riposo sono risultati più elevati nei gruppi U-T1DM e KD che in quelli KP e C. I pazienti diabetici hanno mostrato un incremento dei livelli dei marker protrombotici [tempo di protrombina (PT), il tempo di tromboplastina attivata parziale (aPTT), fibrinogeno (Fg), D-dimero di fibrina, frammenti di protrombina (F_{1+2})] e una riduzione dell'attività anticoagulante (antitrombina (AT), proteina C (PC) e proteina S. Abbiamo notato che questi parametri sono alterati nel gruppo U-T1DM e in misura minore nei KD, ma nel gruppo KP sono paragonabili ai controlli.
Conclusioni. Le alterazioni dell'emostasi presenti nei pazienti U-T1DM, sono parzialmente regredite nel gruppo KD e non sono più presenti nei pazienti KP. Questo potrebbe concorrere alla minore mortalità cardiovascolare osservata nel gruppo KP rispetto al gruppo KD e U-T1DM.
Parole chiave. Uremia, diabete mellito tipo 1, piastrine, alterazione dell'emostasi, attività anticoagulante.

summary

Normalization of multiple haemostatic abnormalities in uremic type 1 diabetic patients after kidney-pancreas transplantation.
***Background and aims**. To evaluate the effects of kidney or kidney-pancreas transplantation on platelet and haemostatic abnormalities in uremic type 1 diabetic patients, we conducted a cross-sectional study involving 12 type 1 diabetic patients (T1DM), 30 uremic type 1 diabetic patients (U-T1DM), 27 uremic type 1 diabetic kidney-pancreas transplanted patients (KP), 12 uremic type 1 diabetic kidney-alone transplanted patients (KD), 13 healthy controls (C).*
***Method and result**. We evaluated platelet and function, including intracellular calcium level, and clotting system. Resting calcium level were significantly higher in U-T1DM and KD group than KP/C groups (U-T1DM = 137.6 ± 11.2, KD = 133.3 ± 16.6, T1DM = 60.9 ± 7.7, KP = 97.2 ± 9.2, C = 72.0 ± 11.0 nM, $p < 0.01$). CD41 expression was significantly reduced in platelet from U-T1DM group compared to the other groups (U-T1DM = 53.2 ± 7.7%, KP = 75.7 ± 6.2%, KD = 80.4 ± 4.3%, C = 81.6 ± 2.2%, T1DM = 82.6 ± 3.4%, $p < 0.05$). Diabetic patients showed higher levels of thrombin platelet expression than non diabetic patients. Levels of hypercoagulability markers in the KP group, and to a lesser extent KD group but not the U-T1DM group, were similar to those of the C group. A reduction in the natural anticoagulants was evident in U-T1DM group, while near-normal values were observed in KP and KD groups.*
***Conclusions**. Haemostatic abnormalities were not observed in KP patients, but were present in KD patients and in U-T1DM patients. This could contribute to the lower cardiovascular mortality observed in KP patient compared to KD and U-T1DM patients.*
Key-words. *Uremia, type 1 diabetes mellitus, platelets, haemostatic abnormalities, anticoagulant activity.*

Introduzione

Il diabete mellito è associato a un aumentato rischio di sviluppare malattia cardiovascolare (CVD) (1-3) come l'infarto miocardico (4), l'ictus (5), la vasculopatia periferica, la cardiomiopatia e lo scompenso cardiaco congestizio (2-4), tanto da esserne considerato un fattore di rischio maggiore (1, 2). Questa condizione è ancora più evidente nei diabetici affetti da insufficienza renale terminale (ESRD) (6); infatti, tra i pazienti diabetici e uremici le CVD causano più della metà dei decessi (7). Il trapianto combinato di rene e pancreas si è dimostrato in grado di ridurre la progressione di malattia cardiovascolare (8, 9). Nei pazienti diabetici vi sono diverse alterazioni che contribuiscono, con effetto moltiplicativo, allo sviluppo della placca aterosclerotica come l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia, la disfunzione endoteliale e lo squilibrio dell'emostasi in senso proaggregante. L'emostasi è un complesso processo in grado di garantire l'integrità della parete vascolare. Un ottimale equilibrio tra le reazioni aggreganti (fattori della coagulazione, attivazione piastrinica, formazione di fibrina) e antiaggreganti (molecole anticoagulanti e fibrinolisi) è necessario per prevenire episodi emorragici o trombotici. Il diabete sembra alterare questo equilibrio in più punti provocando disfunzioni che favoriscono uno stato protrombotico. Nei pazienti diabetici è stato osservato un incremento del volume piastrinico medio (10), del turnover piastrinico (11), un'alterata trombocitopoiesi (12) e un aumento del numero di alcune glicoproteine di membrana come GP Ib-IX (13, 14), il recettore del fibrinogeno GPIIa/IIIb (14) e della molecola di P-selectina (CD 62) (15).

Inoltre, si è osservata un'alterazione delle proprietà dinamiche della membrana plasmatica (16, 17) associata a un aumento del numero di vescicole di membrana ricche in glicoproteine (GP Ib, IIb/IIIa, P-selectina ecc.), rilasciate dalle piastrine attivate, importanti per l'interazione piastrine-endotelio e quindi in grado di alimentare lo stato pro-aggregante (18). La concentrazione di calcio intracellulare regola importanti segnali di trasduzione dell'attivazione piastrinica (fig. 1), che portano alla degranulazione e alla aggregazione delle piastrine e quindi alla formazione del trombo.

Numerosi studi hanno valutato l'omeostasi del calcio nelle piastrine di pazienti diabetici; le alterazioni maggiormente riportate da più gruppi riguardano l'aumento della concentrazione basale $Ca^{2+}_{(in)}$ e le alterazioni del $Ca^{2+}_{(in)}$ in risposta allo stimolo con trombina (19-22). Interessante è notare come queste alterazioni sembrino aggravarsi con il peggiorare della malattia diabetica (21).

I pazienti diabetici uremici trapianti di rene e pancreas rispetto ai non trapiantati hanno una ridotta progressione delle lesioni arterosclerotiche (23) così come dei principali fattori di rischio cardiovascolare tra cui l'ipertensione (24), l'omocisteinemia, il fattore di vonWillebrand e la funzione endoteliale (25). Gli studi fin qui condotti sembrano sottolineare l'importanza del diabete nella progressione della malattia cardiovascolare, infatti, i pazienti diabetici uremici dopo trapianto di rene e pancreas mostrano una maggiore riduzione complessiva del rischio cardiovascolare rispetto al trapianto di rene da solo. Questa riduzione si osserva anche nei pazienti diabetici trapiantati di solo pancreas (26).

In questo studio abbiamo voluto valutare l'effetto del trapianto combinato e di quello di solo rene, nei pazienti diabetici e uremici, sui differenti aspetti dell'emostasi.

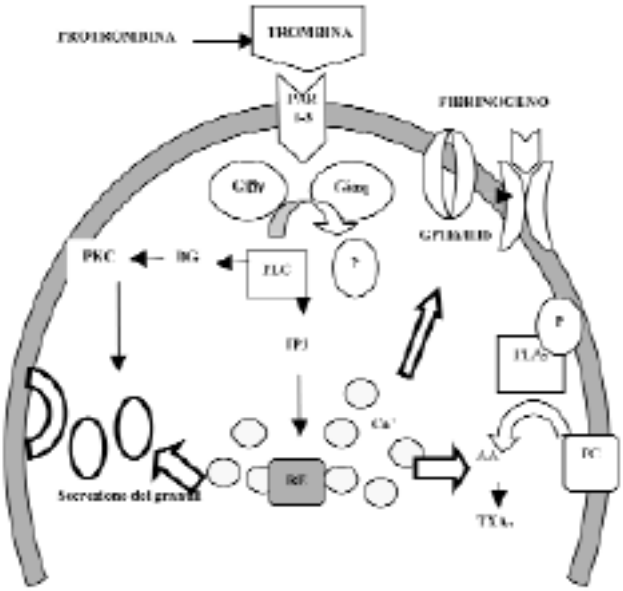

Fig. 1. L'interazione della trombina con recettori di membrana specifici (PAR 1-3) associati a proteine G (Giαq e Giβγ) porta alla fosforilazione della fosfolipasi C (PLC) che induce un aumento di inositolo trifosfato (PI3) e diacilglicerolo (DAG) con conseguente incremento di $Ca+_{in}$ e attivazione della proteinchinasi C (PKC). L'aumento del $Ca^{2+}_{(in)}$ e la fosforilazione dei residui di serina/treonina in differenti proteine permette la completa attivazione delle piastrine. La fosforilazione della fosfolipasi A2 (PLA2) provoca un aumento, via ciclossigenasi, di trombossano A2 (TAX2). I recettori per il fibrinogeno (GPIIa/IIIb) passano da una bassa a un'alta affinità, si ha una riorganizzazione del citoscheletro che porta alla secrezione dei granuli, all'esposizione sulla membrana di molecole di adesione (P-selectina) e una modificazione della conformazione delle piastrine stesse.

Materiali e metodi

Pazienti e controlli

Sono stati arruolati in uno studio trasversale cinque gruppi di pazienti: 12 pazienti con diabete mellito tipo 1 (T1DM); 30 pazienti diabetici tipo 1 e uremici in trattamento dialitico (U-T1DM); 12 pazienti diabetici di tipo 1 che hanno ricevuto un trapianto di solo rene (KD); 27 pazienti che hanno ricevuto un trapianto di rene e pancreas (KP) e 13 controlli sani (C).
Sono stati considerati i pazienti con trapianto d'organo da più di un anno e con una buona funzionalità. Tutti i soggetti del gruppo KP erano insulino-indipendenti, mentre quelli del gruppo KD e U-T1DM eseguivano una terapia insulinica intensiva sottocute. Venivano esclusi pazienti con chiari segni di infezione sistemica, malattie linfoproliferative, infezioni urinarie, aumento della velocità di eritrosedimentazione (VES) o della proteina C reattiva, e tutti quelli in terapia anticoagulante. I pazienti dei gruppi KP, KD e U-T1DM assumevano trattamento antiaggregante. Volontari sani sono stati arruolati come gruppo di controllo.
Tutti i pazienti e controlli sono stati sottoposti a un prelievo di sangue eseguito a digiuno in posizione supina dopo almeno 10 minuti di riposo.

Trapianto e immunosoppressione

Gli organi per il trapianto sono stati ottenuti da donatori cadaveri attraverso la Nord Italian Transplant (NITp, Milano). Dopo un'induzione con ATG (IMTIX, SANGSTAT), l'immunosoppressione è stata mantenuta con ciclosporina (range compreso tra 100-250 ng/mL), mofetil micofenolato (posologia: 500-2000 mg/die) e metilprednisone (posologia: 10 mg/die). La terapia steroidea è stata sospesa dopo 3-6- mesi dopo il trapianto. Eventuali episodi di rigetto del trapianto sono stati trattati con boli di 500 mg di metilprednisone. I casi di rigetto steroido-resistente sono stati trattati con OK3 o ATG.

Misurazione del calcio intracellulare nelle piastrine

La frazione di plasma arricchito di piastrine (PRP) è stata ottenuta raccogliendo sangue intero in una provetta contenente una soluzione ACD (0,065 mol acido citrico) (RiedLe, Hannover, German), 0,085 mol di sodio citrato (Farmitalia, Milan, Italy), 2% di glucosio monoidrato (Riedel) e centrifugando a 220 giri per 15 minuti a temperatura ambiente. Il $Ca^{2+}_{(in)}$ è stato misurato con il metodo a fluorescenza con FURA-2 precedentemente descritto (23). Sono state valutate le risposte del $Ca^{2+}_{(in)}$ con tre differenti concentrazioni di trombina (0,05; 0,1 e 0,5 U/mL). I parametri analizzati sono stati: $Ca^{2+}_{(in)}$ in condizioni basale, $Ca^{2+}_{(in)}$ al raggiungimento del massimo valore (picco) e al raggiungimento del plateau.

Citofluorimetria (FACS) (fig. 2)

L'espressione di GpII/IIIa (CD41), P-selectina (CD63) e dei recettori della trombina attivati dalla proteasi-1 e 3 (PAR1 e PAR 3) è stata ottenuta con analisi al citofluorimetro di aliquote di PRP ottenute come descritto sopra. Gli anticorpi utilizzati sono stati: anticorpi policlonali anti-recettore trombinico (PAR-1) e anti-PAR-3; anticorpi monoclonali anti-P-selectina (CTB201) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-human CD-41a (BD Biosciences, San Diego, CA), un anticorpo di coniglio IgG anti-goat coniugato con fluoresceina (FITC) (Chemicon International, Temecula, CA), e l'anticorpo IgG FITC-coniugato AffiniPure goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch-Stratech Scientific, Bedfordshire, UK). Per l'immunofluorescenza sono state incubate 10^5 piastrine con gli anticorpi primari e seguente reazione con il secondario specifico FITC-coniugato.

Analisi di laboratorio

Sono stati valutati i valori ematici di creatinina, glicemia, ciclosporina, emoglobina glicata, C-peptide, insulina, colesterolo totale e trigliceridi. Su plasma "Platelet poor", ottenuto con una centrifugazione di 10 minuti a 1500 giri di sangue intero (eseguita entro 2 ore dal prelievo), è stata misurata: la concentrazione del tempo di protrombina (PT), il tempo di tromboplastina attivata parziale (aPTT), fibrinogeno (Fg), antitrombina (AT), D-dimero di fibrina, proteina C (PC) e proteina S. Queste analisi sono state effettuate con un misuratore automatico della coagulazione (STA; Diagnostica Stago, Asnier sur Seine, France). Sono stati inoltre analizzati i livelli dei frammenti di protrombina (F_{1+2}) tramite un'analisi ELISA (Enzygnost by F1+2; Dade-Behring).

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il programma SPSS (statistical package for Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois). Le variabili quantitative sono state espresse come medie ± deviazione standard e analizzate con test Kolmogorov-Smirnov e con il test di Levene per valutare l'omogeneità della varianza. È stata eseguita un ANOVA (per dati parametrici) o un test di Kurskal-Wallis (per dati non parametrici) per confrontare 2 o più gruppi. È stato considerato statistico un valore di p

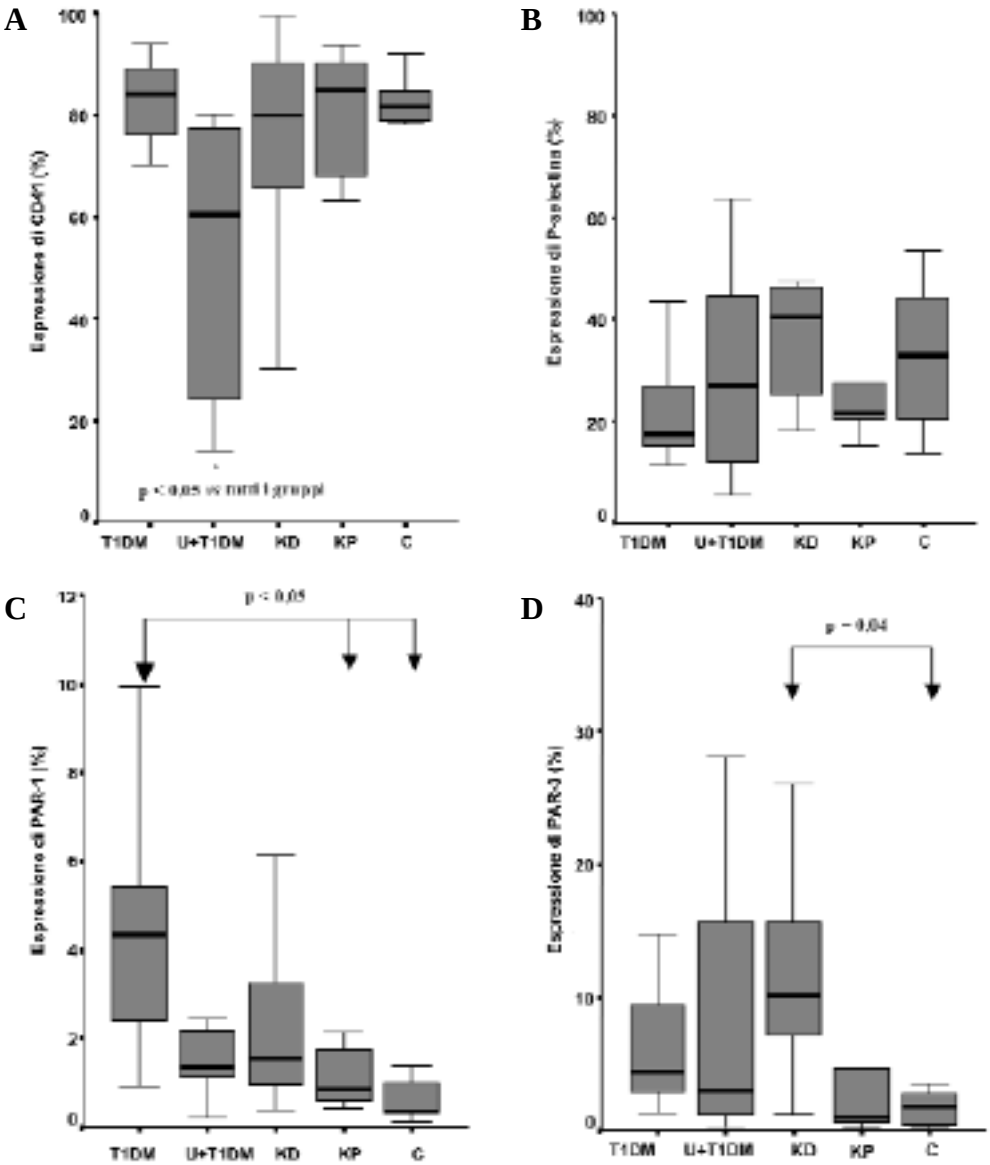

Fig. 2. Citofluorimetria di CD41 (A), PAR-1/PAR-3 (C-D) e P-selectina (B) nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 (T1DM), diabete tipo 1 e uremia (U-T1DM), diabetici sottoposti a trapianto renale (KD), quelli sottoposti a trapianto combinato di rene e pancreas (KP) e i controlli (C). Nel gruppo KP l'espressione piastrinica di CD41, PAR-1 e PAR-3 è completamente normalizzata.

< 0,05 (test a due code).

Risultati

I gruppi di pazienti erano omogenei per le caratteristiche generali (tab. I), anche se quelli del gruppo C e DM erano più giovani. I gruppi di soggetti trapiantati avevano un simile follow-up di trapianto. In tutti i gruppi, eccetto i controlli, era simile la prevalenza di malattie cardiovascolari, profilo lipidico, abitudine al fumo e terapia antiaggregante.

Calcio piastrinico: i livelli di $Ca^{2+}_{(in)}$ basale sono risultati statisticamente più elevati nei gruppi U-T1DM e KD che in quelli C, T1DM e KP ($p < 0,01$) (tab. II). Dopo lo stimolo con trombina la concentrazione di $Ca^{2+}_{(in)}$ di picco è risultata maggiore nei gruppi trapiantati che in quelli U-T1DM, T1DM e C. Nelle piastrine dei gruppi KP e KD, ma non nel gruppo U-T1DM, i livelli di $Ca^{2+}_{(in)}$ dopo stimolo (plateau), ritornavano a valori normali. *Recettori piastrinici:* tra i gruppi è stata osservata una differente espressione di CD41 ($p = 0,003$), PAR-1 ($p = 0,02$) e PAR-3 (0,007), ma non di P-selectina. Il gruppo U-T1DM ha mostrato una riduzione statisticamente

Tab. I. Caratteristiche generali dei pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 (T1DM), diabete tipo 1 e uremia (U-T1DM), diabetici sottoposti a trapianto renale (KD), quelli sottoposti a trapianto combinato di rene e pancreas (KP) e i controlli (C)

	T1DM (12 pts)	U-T1DM (30 pts)	KD (12 pts)	KP (27 pts)	C (13 pts)
Età	33,3 ± 2,3	48,5 ± 1,9	45,6 ± 2,2	40,5 ± 1,3	26,1 ± 0,8
Sesso (M/F)	9/3	20/10	6/6	16/11	7/6
Durata della dialisi	√	3,0 ± 0,6	3,9 ± 0,8	3,3 ± 0,3	√
Durata del T1DM	15,7 ± 1,7	31,1 ± 2,7	30,9 ± 3,6	25,7 ± 1,4	√
Follow-up del trapianto (mesi)	√	√	62,5 ± 23,3	51,1 ± 6,8	√
Creatinina	0,8 ± 0,3	7,7 ± 0,6	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,3
HbA_{1c}	8,8 ± 0,4	8,7 ± 0,3	9,2 ± 0,6	5,6 ± 0,1	5,2 ± 0,2
F-IRI	19,8 ± 3,9	29,1 ± 5,7	28,2 ± 8,9	13,9 ± 1,2	7,8 ± 1,1
C-pep	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	3,6 ± 0,7	2,1 ± 0,3

significativa ($p < 0,05$) dell'espressione di CD41 rispetto agli altri gruppi. Le piastrine dei diabetici (gruppi U-T1DM, T1DM e KD) esprimevano più PAR-1 e PAR-3 rispetto ai gruppi C e KP ($p < 0,01$). Nel gruppo KP abbiamo riscontrato un pattern di espressione (CD41, PAR-1 e PAR-3) simile a quello dei controlli.

Marker protrombotici: i valori di Fg sono risultati più elevati nei gruppi U-T1DM, KD, KP rispetto ai controlli ($p < 0,01$), ma il gruppo KP mostrava livelli minori se paragonato a U-T1DM ($p = 0,02$). F_{1+2} e il D-dimero sono risultati più elevati nel gruppo U-T1DM confrontato con T1DM e C ($p < 0,05$). Tutti questi marker hanno mostrato un simile andamento: livelli molto elevati nel gruppo U-T1DM, elevati nei gruppi KD e KP e normali in T1DM e C (fig. 3).

Attività anticoagulante: l'attività dell'AT è risultata ridotta nel gruppo U-T1DM rispetto agli altri ($p < 0,05$). In questo gruppo sono stati inoltre evidenziati livelli inferiori di attività di PC rispetto ai controlli ($p = 0,04$) e dell'attività antigenica di PS rispetto a T1DM ($p = 0,03$) e KP ($p < 0,01$).

Tab. II. Analisi della concentrazione di calcio intracellulare in condizioni basali e dopo stimolo con differenti concentrazioni di trombina (0,05, 0,1, 0,5 U/mL) nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 (T1DM), diabete tipo 1 e uremia (U-T1DM), diabetici sottoposti a trapianto renale (KD), quelli sottoposti a trapianto combinato di rene e pancreas (KP) e i controlli (C)

	T1DM (12 pts)	U+T1DM (30 pts)	KD (12 pts)	KP (27 pts)	C (13 pts)
Calcio basale* (mM)	60,9 ± 7,6	137,6 ± 11,2	133,3 ± 16,6	97,2 ± 9,2	72,0 ± 11,0
Plateau a 0,05 U (mM)	200,4 ± 22,2	306,4 ± 19,1	262,2 ± 17,4	285,2 ± 31,2	173,7 ± 14,3
Plateau a 0,1 U (mM)	221,5 ± 29,6	320,6 ± 21,3	285,2 ± 19,0	286,5 ± 17,2	182,2 ± 16,8
Plateau a 0,5 U (mM)	225,3 ± 30,5	374,3 ± 17,7	291,5 ± 17,7	302,5 ± 21,1	205,7 ± 15,2

*$p < 0,01$

Discussione

Questi risultati mostrano come le alterazioni della funzionalità piastrinica insieme a una generale compromissione della coagulazione siano correlate alla presenza di diabete e uremia. In questo studio risulta inoltre evidente come il ripristino dell'euglicemia e la normalizzazione dall'uremia siano in grado di far regredire tutte le alterazioni dell'emostasi presenti nei pazienti U-T1DM. L'assetto maggiormente pro-aggregante presente nel gruppo KD (aumento dei livelli di D-Dimero, Fg e disfunzioni dell'omeostasi del $Ca^{2+}_{(in)}$ piastrinico) rispetto a KP, evidenzia l'effetto benefico aggiuntivo del trapianto combinato. Questo è in accordo con la minore progressione di CVD presente nei pazienti KP rispetto a KD e U-T1DM, già dimostrata in precedenti studi (8, 9, 23-26). I recettori di membrana della trombina PAR-1 e PAR-3 risultano aumentati in tutti i gruppi di diabetici (U-T1DM, T1DM, KD). A differenza di PAR-1, che sembra svolgere maggiormente il ruolo di attivazione del segnale dopo stimolo con trombina nelle piastrine mature (27), PAR-3 è solo minimamente presente (circa il 10-20% di PAR-1) (28) sulle piastrine mature ma molto espresso nei megacariociti (29). L'aumento del recettore PAR-3, presente nei pazienti diabetici potrebbe significare la non completa maturazione piastrinica, questo sarebbe in accor-

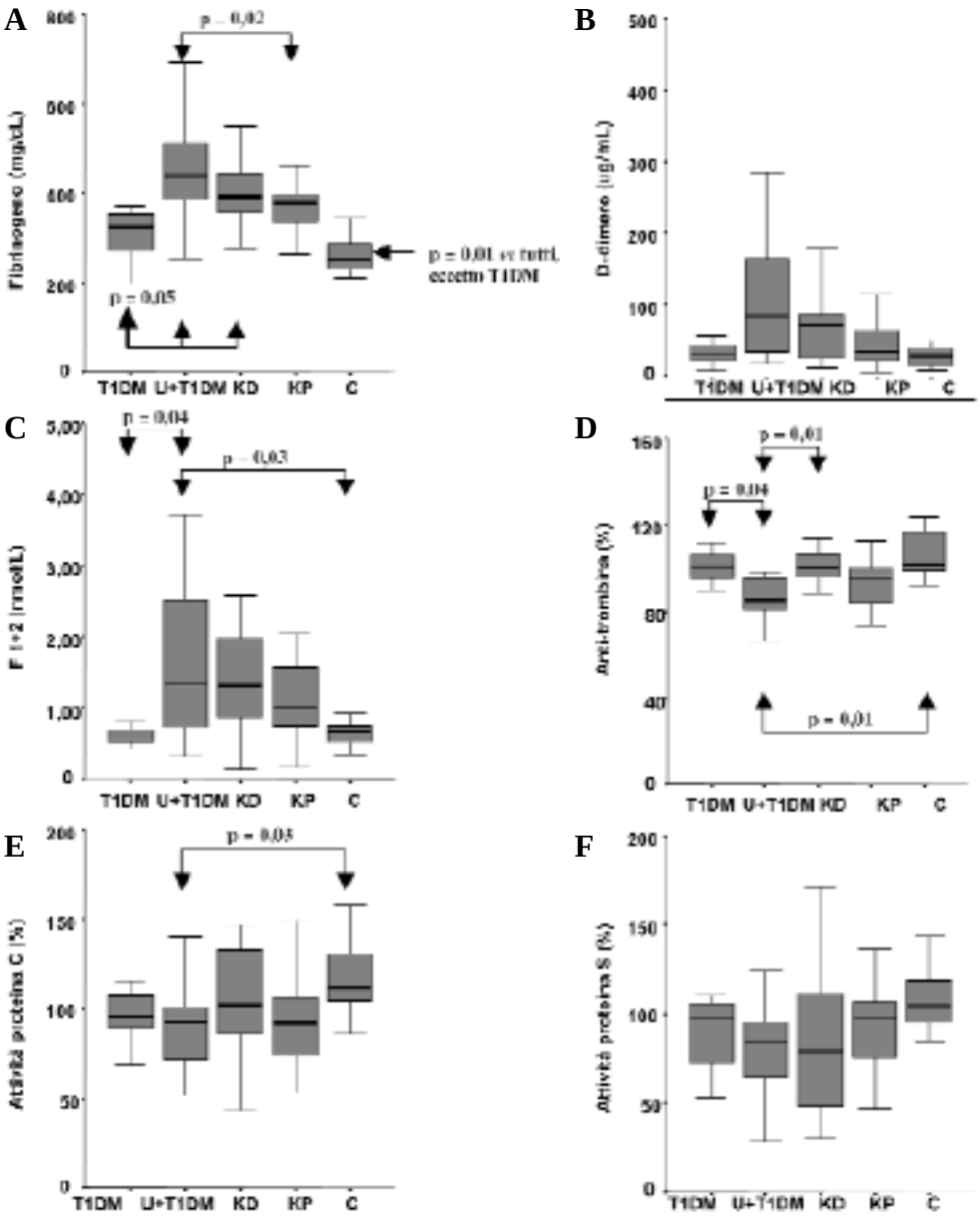

Fig. 3. Marker protrombotici nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 (T1DM), diabete tipo 1 e uremia (U-T1DM), diabetici sottoposti a trapianto renale (KD), quelli sottoposti a trapianto combinato di rene e pancreas (KP) e i controlli (C). Il gruppo KP, e parzialmente il gruppo KD, mostrano livelli inferiori dei marker protrombotici (3A, 3B, 3C) e un aumento dell'attività di antitrombina (AT) (3D), di proteina C (3E) e dell'attività antigenica della proteina S (3F) rispetto al gruppo U+T1DM.

do con l'ipotesi di un'alterata trombocitopoiesi.
Le modificazioni dell'espressione dei recettori di membrana delle piastrine sono risultate associate a importanti alterazioni funzionali. Il $Ca^{2+}_{(in)}$ è un importante messaggero di attivazione piastrinica (30) (fig. 1). Nei pazienti diabetici con precario compenso il $Ca^{2+}_{(in)}$ è risultato aumentato rispetto ai diabetici in buon compenso e ai controlli, a prescindere dalla presenza di complicanze (21). L'aumento di $Ca^{2+}_{(in)}$ in condizioni basali, presente nei pazienti U-T1DM, sembra correlato con un'attivazione cronica delle piastrine. Il perpetuarsi di questa attivazione sembrerebbe provocare modificazioni nella funzione piastrinica. Infatti le piastrine in queste condizioni non sono in grado di ripristinare adeguatamente la concentrazione di $Ca^{2+}_{(in)}$ dopo lo stimolo con trombina. Oltre all'alterazione del $Ca^{2+}_{(in)}$, questa attivazione cronica sembra essere correlata con la riduzione dei livelli di CD41 osservata nel

gruppo U-T1DM. Un minor numero di recettori CD41 potrebbe risultare in un'incapacità delle piastrine di legarsi al fattore di Von Willebrand e al fibrinogeno con un conseguente aumento della tendenza al sanguinamento.

I meccanismi con cui avviene questa attivazione cronica delle piastrine non sono ancora del tutto chiari. Un ruolo importante potrebbe averlo la riduzione di ossido nitrico (NO) presente nell'endotelio e nelle piastrine dei pazienti diabetici e uremici (31-34). Questo infatti, insieme alla PGI_2, è in grado di inibire le concentrazioni di $Ca^{2+}_{(in)}$ inattivando vie cruciali per l'aggregazione piastrinica con un meccanismo cAMP e cGMP chinasi dipendente (32). In particolare l'NO si è dimostrato, *in vitro*, in grado di inibire il flusso di calcio dai compartimenti sia intra- sia extracellulari, inibendo la pompa Ca-ATP dipendente e la chinasi PIK3 (35). Altrettanto importante sembrerebbe l'aumento di F_{1+2}, presente sia nei T1DM sia U-T1DM, che potrebbe stimolare in maniera cronica i recettori PAR-1 e PAR-3 già overespressi in questi gruppi di pazienti. L'attivazione di questi recettori (associati a proteine Gαq) porta alla fosforilazine della fosfolipasi C (PLC) in grado quindi di idrolizzare il fosfoinositolo4,5bifosfato (PIP2) in inositolo trifosfato (PI3) e diacilglicerolo (DAG), con conseguente incremento della concentrazione intracellulare di calcio $Ca^{2+}_{(in)}$. Probabilmente sia la presenza di piastrine più immature sia l'aumento della produzione di trombina, l'overespressione dei recettori della trombina e la riduzione della concentrazione di NO e della sua azione a livello piastrinico, provocano un malfunzionamento a più livelli della piastrina che risulta in un incremento dello stato protrombotico. A questa disfunzione piastrinica si aggiungono nel diabete altre alterazioni dell'emostasi. Recenti ricerche dimostrano che nei soggetti diabetici c'è un aumento dei fattori della coagulazione (36), una diminuzione delle molecole anticoagulanti (36, 37) e un'alterazione dei processi di fibrinolisi (38, 39). Nel nostro studio si conferma una riduzione dell'attività anticogulante dell'antitrombina osservata nei pazienti U+T1DM ma non nel gruppo KP.

In conclusione, tutti i nostri risultati concordano nel descrivere nei pazienti diabetici e uremici uno stato di cronica attivazione delle piastrine e di spostamento dell'intero sistema dell'emostasi in senso proaggregante. Sono state osservate alterazioni a più livelli della funzionalità piastrinica (messaggeri intracellulari, espressione di glicoproteine di membrana) e dell'emostasi in generale indotte dal diabete e aggravate dall'uremia. Tutte queste alterazioni non sono più presenti nei pazienti che hanno ricevuto il trapianto combinato di rene e pancreas e sono meno gravi in quelli con trapianto di solo rene. Questo potrebbe spiegare la minor incidenza di eventi cardiovascolari nei pazienti dopo trapianto combinato di rene e pancreas, rispetto a quelli che hanno ricevuto un trapianto di solo rene e, ancora di più, se confrontati con pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 in insufficienza renale terminale.

Bibliografia

1. Kannel WB, McGee DL: Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. JAMA **241** (19), 2035-2038, 1979
2. The SuRF report 1: Surveillance of risk factors related to noncomunicable disease. Corrent status of global data, WHO 2003
3. Diabetes Mellitus: A Major Risk Factor for Cardiovascular Disease: A Joint Editorial Statement by the American Diabetes Association; the National Heart, Lung, and Blood Institute; the Juvenile Diabetes Foundation International; the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; and the American Heart Association Circulation **100** (10), 1132-1133, 1999
4. Redberg RF, Greenland P, Fuster V, Pyörälä K, Blair SN, Folsom AR, Newman AB, O'Leary DH, Orchard TJ, Psaty B, Schwartz JS, Starke R, Wilson PWF: MDAHA Conference Proceedings: Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease Writing Group III: Risk Assessment in Persons With Diabetes. Circulation **105**, 144, 2002
5. Tuomilehto J, Rastenyte D, Jousilahti P, Sarti C, Vartiainen E, Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR: Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke. Prospective study of the middle-aged Finnish population. Stroke **27** (2), 210-215, 1996
6. Rostand S, Brunzell J, Cannon R: Cardiovascular complications in renal failure. J Am Soc Nephrol **2**, 1053-1058, 1991
7. Sarnak M, Levey A: Epidemiology of cardiac disease in dialysis patients. Semin Dial **12**, 69-76, 1999
8. Secchi A, Caldara R, La Rocca E, Fiorina P, Di Carlo V: Cardiovascular disease and neoplasm after pancreas transplantation. Lancet **352**, 9121, 1998
9. La Rocca E, Fiorina P, Di Carlo V, Astorri E, Rossetti C, Lucignani G, Fazio F, Giudici D, Cristallo M, Bianchi G, Pozza G, Secchi A: Cardiovascular outcomes after kidney-pancreas and kidney-alone transplantation. Kidney International **60**, 1964-1971, 2001
10. Sharpe PC, Trinick T: Mean platelet volume in diabetes mellitus. Q J Med **86**, 739-742, 1993
11. Garg SK, Lackner H, Karpatkin S: The increased percentage of megathrombocytes in various clinical disorders. Ann Intern Med **77**, 361-369, 1972
12. Tschope D, Schwippert B, Schettler B, Kiesel U, Rothe H, Roesen P, Gries FA: Increased GPIIB/IIIA expression and altered DNA-ploidy pattern in megakaryocytes of diabetic BB-rats. Eur J Clin Invest **22** (9), 591-598, 1992
13. Tschoepe D, Roesen P, Kaufmann L, Schauseil S, Kehrel B,

Ostermann H et al: Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus. Eur J Clin Invest **20**, 166-170, 1990
14. Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Gries FA: Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia. Diabetes **44**, 890-894, 1995
15. Jilma B, Fasching P, Ruthner C, Rumplmayr A, Ruzicka S, Kapiotis S et al: Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus. Thromb Haemost **76**, 328-332, 1996
16. Winocour PD: Platelet abnormalities in diabetes mellitus. Diabetes **41**, 26, 1992
17. Mazzanti L, Rabini RA, Fumelli P, Martarelli D, Staffolani R, Salvolini E, Curatola G: Altered platelet membrane dynamic properties in type 1 diabetes. G Diabetes **46** (12): 2069-2074, 1997
18. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR: Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. Circulation. **99** (19), 2577-2582, 1999
19. Vicari AM, Taglietti MV, Pellegatta F, Spotti D, Melandri M, Galli L, Ronchi P, Folli F: Deranged platelet calcium homeostasis in diabetic patients with end-stage renal failure. A possible link to increased cardiovascular mortality? Diabetes Care **19**, 1062-1066, 1996
20. Bergh, CH, Hjalmarson A, Holm G, Angwald E, Jacobbsson B: Studies on calcium exchange in platelets in human diabetes. Eur J Clin Invest **18**, 92-97, 1988
21. Pellegatta, F, Folli F, Ronchi P, Caspani L, Galli L, Vicari AM: Deranged platelet calcium homeostasis in poorly controlled IDDM patients. Diabetes Care **16**, 178-183, 1993
22. Tschope, D, Rosen P, Gries FA: Increase in the cytosolic concentration of calcium in platelets of diabetes type II. Thromb Res **62**, 421-428, 1991
23. Jukema JW, Smets YF, van der Pijl JW, Zwinderman AH, Vliegen HW, Ringers J, Reiber JH, Lemkes HH, van der Wall EE, de Fijter JW: Impact of simultaneous pancreas and kidney transplantation on progression of coronary atherosclerosis in patients with end-stage renal failure due to type 1 diabetes. Diabetes Care **25** (5), 906-911, 2002
24. Elliott MD, Kapoor A, Parker MA, Kaufman DB, Bonow RO, Gheorghiade M: Improvement in hypertension in patients with diabetes mellitus after kidney/pancreas transplantation. Circulation. **104** (5), 563-569, 2001
25. Fiorina P, La Rocca E, Venturini M, Minicucci F, Fermo I, Paroni R, D'Angelo A, Sblendido M, Di Carlo V, Cristallo M, Del Maschio A, Pozza G, Secchi A: Effects of kidney-pancreas transplantation on atherosclerotic risk factors and endothelial function in patients with uremia and type 1 diabetes. Diabetes **50** (3), 496-501, 2001
26. Coppelli A, Giannarelli R, Mariotti R, Rondinini L, Fossati N, Vistoli F, Aragona M, Rizzo G, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P: Pancreas transplant alone determines early improvement of cardiovascular risk factors and cardiac function in type 1 diabetic patients. Transplantation **76** (6), 974-976, 2003
27. Coughlin SR: Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature **407** (6801), 258-264, 2000
28. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR: Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. Nature **386** (6624), 502-506, 1997
29. Schmidt VA, Nierman WC, Maglott DR, Cupit LD, Moskowitz KA, Wainer JA, Bahou WF: The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene identification within a PAR gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelet. J Biol Chem **273**, 15061-15068, 1998
30. Levy-Toledano S: Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a "hierarchy"? Haemostasis **29** (1), 4-15, 1999
31. Akai T, Naka K, Okuda K, Takemura T, Fujii S: Decreased sensitivity of platelets to prostacyclin in patients with diabetes mellitus. Horm Metab Res **15**, 523-526, 1983
32. Amado JA, Salas E, Botana MA, Poveda JJ, Berrazueta JR: Low levels of intraplatelet cGMP in IDDM. Diabetes Care **16**, 809-811, 1993
33. Martina V, Bruno GA, Trucco F, Zumpano E, Tagliabue M, Di Bisceglie C, Pescarmona G: Platelet cNOS activity is reduced in patients with IDDM and NIDDM. Thromb Haemost **79**, 520-522, 1998
34. Rabini RA, Staffolani R, Fumelli P, Mutus B, Curatola G, Mazzanti L: Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients. Diabetologia **41**, 101-104, 1998
35. Schaeffer G, Wascher TC, Kostner GM, Graier WF: Alterations in platelet Ca^{2+} signalling in diabetic patients is due to increased formation of superoxide anions and reduced nitric oxide production. Diabetologia. **42** (2), 167-176, 1999
36. Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. J Diabetes Complications **15**, 44-54, 2001
37. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL et al: Platelet dysfunction in type 2 diabetes. Diabetes Care **24**, 1476-1485, 2001
38. Romano M, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Chiesa PL, Chiarelli F: Endothelial perturbation in children and adolescents with type 1 diabetes: association with markers of the inflammatory reaction. Diabetes Care **24**, 1674-1678, 2001
39. Festa A, D'Agostino R, Mykkanen L, Tracy RP, Zaccaro DJ, Hales CN, Haffner SM: Relative contribution of insulin and its precursors to fibrinogen and PAI-1 in a large population with different states of glucose tolerance: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**, 562-568, 1999

Corrispondenza a: prof. Antonio Secchi, Medicina Interna, Istituto Scientifico San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano e-mail: antonio.secchi@hsr.it

Pervenuto in Redazione il 26/4/2004 – Accettato per la pubblicazione il 5/5/2004