- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

Biologia e fisiopatologia del fattore tissutale e sua rilevanza per la patologia cardiovascolare

Serena Del Turco, Raffaele De Caterina

Cattedra di Cardiologia, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti, e Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa

Key words:
Acute coronary syndromes; Atherosclerosis; Thrombosis.

Tissue factor (TF) is a transmembrane glycoprotein, currently considered as being the major regulator of the coagulation cascade and the initiator of thrombogenesis *in vivo*. When TF comes in contact with blood, it forms a high-affinity complex with factors VII/VIIa, activating factors IX and X and thus leading to the formation of an insoluble fibrin clot. The regulation of TF-VIIa activity plays a key role in blood-vessel wall interactions. Selective patterns of cellular expression of TF are observed in tissues. TF is constitutively localized only on the surface of cells anatomically separated from the blood, where it plays an essential role in hemostasis by limiting hemorrhage after vessel wall injury. A number of pathophysiologic stimuli are capable of inducing TF transcription and activity in endothelial cells and monocytes. An aberrant TF expression in contact with blood is implicated in thrombotic complications of atherosclerosis, including acute myocardial infarction. Recent findings have demonstrated cell-derived microparticles containing TF in the circulating blood of patients with acute coronary syndromes, capable of triggering and propagating thrombus growth. This observation suggests a new view of thrombosis that does not necessarily require the exposure of vessel wall-derived TF at the site of vascular injury to initiate and propagate thrombosis.

(Ital Heart J Suppl 2003; 4 (7): 559-568)

© 2003 CEPI Srl

Ricevuto il 28 gennaio 2003; nuova stesura l'11 giugno 2003; accettato il 23 giugno 2003.

Per la corrispondenza:

Prof. Raffaele De Caterina

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

Introduzione

Il fattore tissutale (*tissue factor*-TF) è una glicoproteina transmembranaria, considerata il principale fattore di regolazione della cascata coagulativa e della trombogenesi *in vivo*. Una volta esposto al flusso sanguigno, il TF forma un complesso ad alta affinità con il fattore VII/VIIa circolante, che induce l'attivazione dei fattori IX e X e, in ultimo, generazione di trombina, deposizione di fibrina e attivazione piastrinica[1]. L'espressione altamente selettiva del TF rappresenta un "espediente" emostatico, pronto ad attivare la cascata coagulativa solo quando l'integrità vascolare viene persa. Molti mediatori infiammatori coinvolti nella formazione e nella progressione della placca aterosclerotica sono in grado di indurre l'espressione del TF nelle cellule della placca e la sua liberazione in microparticelle apoptotiche di membrana, determinando complicazioni trombotiche associate all'aterosclerosi[2]. Molti studi hanno evidenziato la presenza di vescicole lipidiche contenenti TF, circolanti nel sangue di pazienti con sindromi coronariche acute, in grado di innescare e propagare la formazione del trombo[3]. È stato inoltre recentemente osservato che il complesso TF-VIIa ha un ruolo non emostatico nella traduzione del segnale intracellulare, attivando specifiche vie metaboliche coinvolte in processi angiogenetici e di crescita tumorale[4]. Questa revisione ha lo scopo di puntualizzare le conoscenze attuali sul ruolo emostatico e recettoriale del TF e sui suoi potenziali inibitori farmacologici. Questi ultimi sono potenziali strumenti nel trattamento delle sindromi coronariche acute.

Struttura del fattore tissutale

Il TF è una glicoproteina integrale di membrana, di 47 KDa, costituita da 263 aminoacidi organizzati in un dominio extracellulare di 219 aminoacidi, una regione idrofobica di 23 aminoacidi transmembrana, una piccola regione intracellulare di 21 aminoacidi (Fig. 1). La regione extracellulare funziona come un recettore per il fattore VII/VIIa, ed appartiene alla famiglia dei recettori per le citochine di classe II, di cui fanno parte gli interferoni α, β, γ, e l'interleuchina-10. La cristallografia a raggi X del dominio extracellulare del TF, espresso e isolato da *Escherichia coli*[5], mostra due

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

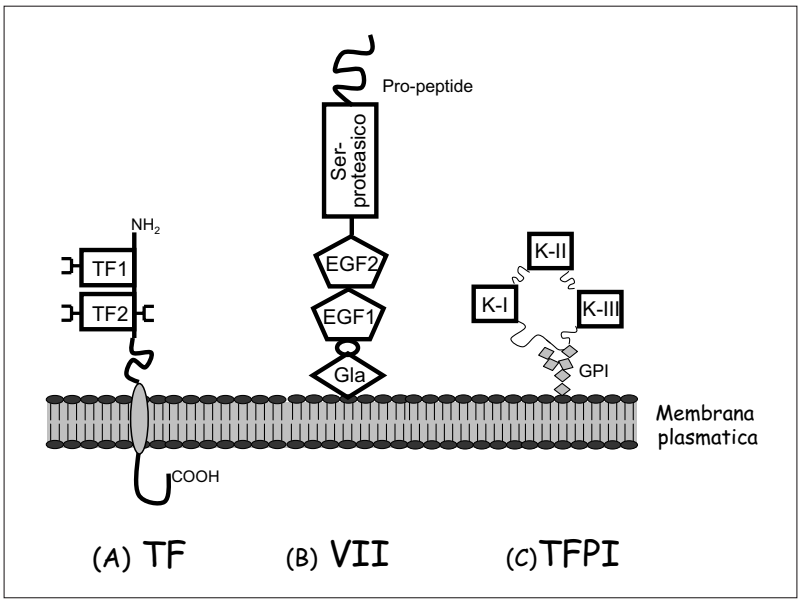

Figura 1. *Struttura del fattore tissutale (TF), del fattore VII, e del tissue factor pathway inhibitor (TFPI). (A) Il TF è costituito da un dominio extracellulare, una regione transmembranaria e da un corto dominio citoplasmatico. Il dominio extracellulare ha funzione recettoriale per il fattore VII circolante, è costituito da due domini di fibronectina di tipo III (TF1 e TF2) contenenti tre domini di glicosilazione. (B) Il fattore VII è una proteasi serinica che si lega ai fosfolipidi anionici di membrana tramite un aminoacido inusuale, l'acido gamma-carbossi-glutamico (Gla). Vicino al dominio Gla ci sono due domini, simili al fattore di crescita epidermico (EGF1 e EGF2), un dominio serin-proteasico e un propeptide che viene tagliato al momento dell'attivazione in fattore VIIa. (C) Il TFPI è caratterizzato dalla presenza di tre domini proteasici di tipo Kunitz ripetuti in tandem (KI, KII, KIII). La maggior parte del TFPI intravascolare è legato alla parete vasale, e tale ancoraggio, nelle cellule endoteliali, è mediato dal glicosil-fosfatidilinositolo (GPI).*

domini di fibronectina di tipo III (TF1 e TF2), contenenti catene β con *folding* antiparallelo, analoghe al dominio costante delle immunoglobuline, e la presenza di due legami disolfuro[6]. Esistono tre siti *N-linked* di glicosilazione nel dominio extracellulare del TF, e il fattore VII si lega in una zona di confine tra due di questi siti. Il collegamento tra la regione extracellulare e il dominio transmembrana è chiamato "regione gambo", e sembra che proprio la flessibilità di questa regione permetta al dominio extracellulare di adottare vari orientamenti rispetto alla membrana plasmatica[5]. Un gruppo di 4 aminoacidi basici, posto al confine tra il dominio transmembrana e quello citoplasmatico, rappresenta un motivo tipico delle proteine integrali di membrana, che hanno l'estremità aminoterminale in ambiente extracellulare. Nel dominio citoplasmatico è presente una cisteina acilata ad un palmitato o ad uno stearato dal significato fisiologico incerto, e due residui serinici, che rappresentano due putativi siti di fosforilazione[7].

Ruolo emostatico del fattore tissutale

Struttura del fattore VII. Il fattore VII è una proteina plasmatica glicosilata che viene sintetizzata principalmente nel fegato e che circola nel plasma sotto forma di fattore VII attivato (1%) o sotto forma di zimogeno (99%) privo di attività catalitica. Il fattore VII è composto da distinti moduli (Fig. 1): il modulo più vicino all'estremità aminoterminale contiene un aminoacido inusuale, l'acido gamma-carbossi-glutamico (Gla)[8]. Questo dominio, chiamato dominio Gla, lega ioni Ca^{++}, e contiene residui idrofobici che conferiscono al fattore VII la capacità di legare reversibilmente i fosfolipidi anionici della membrana cellulare[8,9]. Vicino al dominio Gla, e a volte considerato parte di esso, si ha un corto tratto di residui idrofobici chiamato "*stack* aromatico idrofobico" e, vicino a questo, due moduli simili al fattore di crescita epidermico (*epidermal growth factor*-EGF): EGF1 ed EGF2, ad attività proteasica[8].

Formazione del complesso fattore tissutale-fattore VIIa. La formazione del complesso TF-VIIa costituisce l'evento scatenante della via estrinseca della coagulazione (Fig. 2). Il complesso TF-VIIa può essere attivato dal fattore VIIa circolante o dallo stesso complesso TF-VIIa, mediante un meccanismo di autoattivazione, o attraverso un'attivazione a *feedback* positivo da parte di altre proteasi (Xa, IXa, trombina). L'unione dei due fattori favorisce l'allineamento del sito attivo di VIIa con il sito di scissione del substrato legato alla membrana[6]. I substrati fisiologici di tale complesso sono i fattori IX e X, che si legano reversibilmente ai fosfolipidi anionici di membrana[8]. Il fattore X può essere attivato sia attraverso il complesso VIIa-TF, sia attraverso il complesso IXa-VIIIa-fosfolipidi-Ca^{++}. Il fattore IXa si assembla sui fosfolipidi di membrana, e in presenza del suo cofattore, il fattore VIIIa, catalizza l'attivazione del fattore Xa, che in ultimo induce attivazione piastrinica e formazione di un coagulo insolubile di fibrina[10]. I fosfolipidi anionici di membrana, in par-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

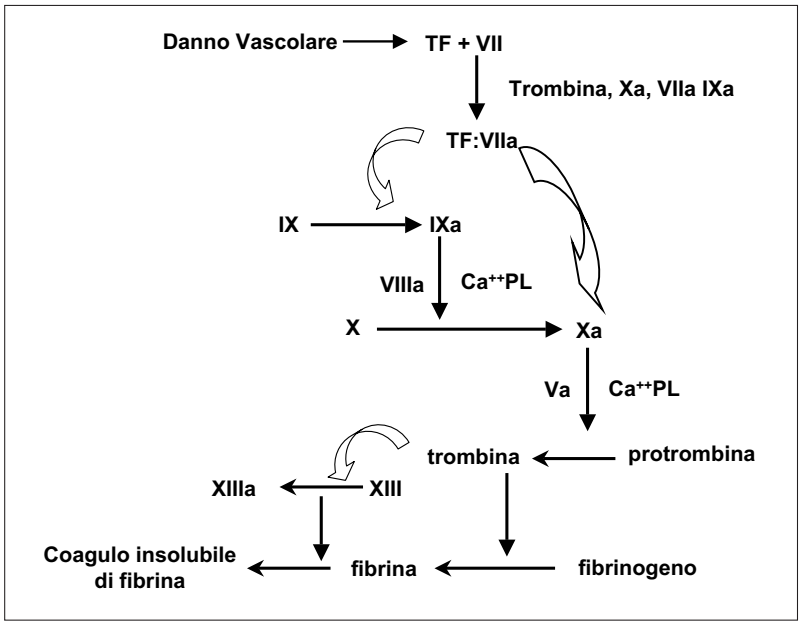

Figura 2. *La via estrinseca della coagulazione ha inizio dopo un danno tissutale ed esposizione del fattore tissutale (TF) al sangue. La figura indica le reazioni a catena di attivazione dei fattori coagulativi, che avvengono sulla superficie fosfolipidica delle cellule, e che in ultimo inducono la formazione di un coagulo insolubile di fibrina. PL = fosfolipidi; i fattori coagulativi attivati sono designati con un numero romano seguito da un indice "a".*

ticolare la fosfatidilserina, giocano un ruolo importante nell'inizio della coagulazione TF-dipendente, promuovendo sia l'attività del complesso TF-VIIa sia il legame dei fattori IX e X nelle vicinanze del complesso TF-VIIa.

Regolazione catalitica del complesso fattore tissutale-fattore VIIa. Il solo inibitore fisiologico del complesso TF-VIIa è il *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI). Il TFPI è una proteasi serinica costituita da un dominio carbossiterminale basico, seguito da tre domini proteasici ripetuti in tandem, denominati domini Kunitz (KI-II-III), e una regione aminoterminale acida (Fig. 1). Il TFPI è sintetizzato principalmente dall'endotelio vascolare, una piccola percentuale si ritrova nelle piastrine o circolante nel plasma, in forma libera e/o associata alle lipoproteine. Il meccanismo di inibizione della via estrinseca della coagulazione da parte del TFPI avviene in due fasi[11,12] (Fig. 3): 1) il TFPI si lega al fattore X, tramite il dominio KII, e ne inibisce l'attività. Anche l'estremità basica carbossi-terminale è richiesta per una rapida ed efficiente inibizione del fattore Xa; 2) il complesso TFPI-Xa si lega e neutralizza l'attività catalitica del complesso VIIa-TF: in presenza di ioni Ca^{++}, si forma un complesso quaternario TFPI-Xa-VIIa-TF.

Espressione e ruolo del fattore tissutale nella patologia aterosclerotica

I disordini tromboembolici sono comunemente associati a malattie cardiovascolari, infezioni e neoplasie. A livello fisiopatologico, l'evento scatenante principale della trombosi è un eccessivo innesco della coagulazione a causa di un'aberrante espressione del TF, come si riscontra nelle lesioni aterosclerotiche complicate e nella coagulazione intravascolare disseminata. Il TF non è espresso basalmente da monociti e cellule endoteliali, ma è presente costitutivamente in tutti quei distretti fisicamente separati dalla circolazione (sottoendotelio vasale, epiteli glomerulari, capsule fibrose di fegato, milza e cuore), nei quali la coagulazione è attivata solo dopo un danno vascolare. L'espressione del TF nei vasi sanguigni è strettamente regolata per prevenire l'attivazione della coagulazione: fisiologicamente, il TF è sintetizzato dai fibroblasti nell'avventizia e dalle cellule muscolari lisce nella tunica media[13]. Nella lesione intimale della placca aterosclerotica il TF è stato identificato, in colocalizzazione con il TFPI, nel monostrato endoteliale che riveste la placca, nei macrofagi, nelle cellule schiumose, nelle cellule muscolari lisce e nel *core* lipidico acellulare[14]. Nelle aree apoptotiche della placca sono state identificate microparticelle apoptotiche di origine macrofagica e linfocitaria. È stato dimostrato che la presenza del TFPI nelle placche aterosclerotiche umane è associata ad una ridotta attività del TF[15]. La rottura o la fissurazione della placca aterosclerotica è un evento chiave nella patogenesi dell'angina instabile e dell'infarto miocardico: l'esposizione al sangue di una superficie procoagulante dà origine a generazione di trombina, aggregazione piastrinica, deposizione di fibrina e formazione del trombo, che può precipitare un evento coronarico acuto. Non tutte le placche aterosclerotiche, dopo la rottura, sviluppano trombosi: alcuni dati emersi dallo studio sull'espressione differente di TF in pazienti con angina instabile, infarto del miocardio e an-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

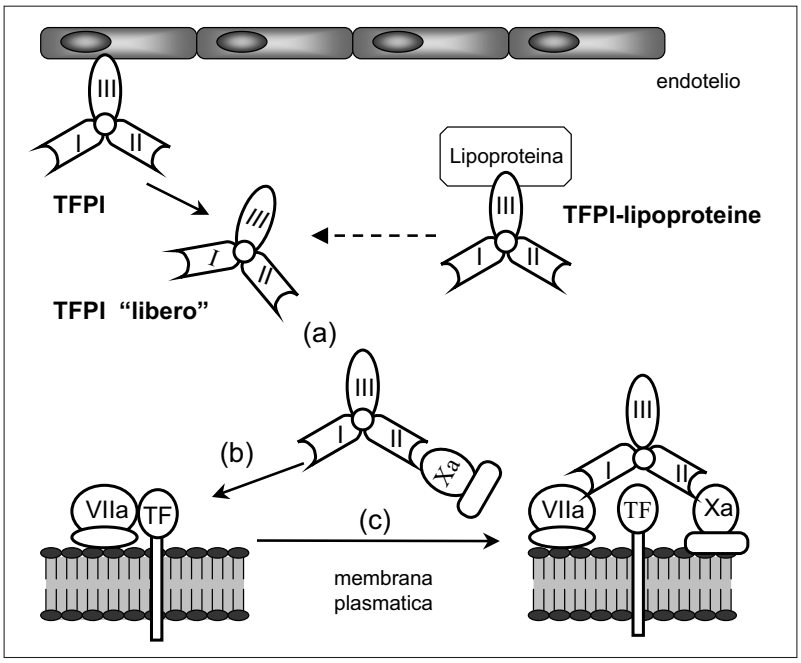

Figura 3. *Regolazione del complesso fattore tissutale (TF)-fattore VIIa e meccanismo d'azione del tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Il TFPI è un inibitore proteasico con tre domini inibitori ripetuti in tandem (I, II, III) localizzato soprattutto sulla superficie endoteliale; il restante è libero nel plasma e legato alle lipoproteine. Meccanismo d'azione: inizialmente il TFPI libero (a) lega e inibisce il fattore Xa (b); successivamente il complesso TFPI-Xa neutralizza il complesso VIIa-TF formando un complesso quaternario (c).*

gina stabile, suggeriscono che la quantità di TF contenuta nella placca può determinare differenti risposte trombotiche nelle arterie coronarie umane[16]. L'espressione e l'attività del TF risultano maggiori nelle placche di pazienti con angina *de novo*, angina instabile o infarto del miocardio rispetto a quelle di pazienti con angina stabile o con ristenosi[17]. È bene sottolineare, quindi, che la fissurazione e la rottura della placca aterosclerotica sono eventi necessari, ma non sufficienti ad innescare una sindrome coronarica acuta. È necessario, infatti, tener conto delle condizioni locali del flusso, dell'abbondanza del materiale lipidico, e dello stato di attivazione del sistema emostatico, quest'ultimo determinato dall'equilibrio tra l'attività delle piastrine, del sistema della coagulazione e del sistema fibrinolitico[18]. La maggiore o minore espressione vascolare di TF, tuttora oggetto di studio quanto ai meccanismi cellulari coinvolti, può rendere conto della variabile trombogenicità di placche aterosclerotiche in diverse condizioni cliniche. È possibile che uno stato "infiammatorio" della lesione aterosclerotica, caratterizzato da un'abbondante produzione di citochine, possa essere responsabile dell'aumentata espressione del TF nelle lesioni alla base delle sindromi coronariche instabili.

Il fattore tissutale circolante: nuovo fattore scatenante della trombosi arteriosa

Nuove evidenze sperimentali hanno dimostrato la presenza di microparticelle lipidiche ricche di TF in circolo, sia in condizioni fisiologiche sia patologiche, che contribuiscono ad amplificare il potenziale coagulativo in diverse condizioni trombotiche. Giesen et al.[19] hanno infatti dimostrato la formazione di un trombo ricco di fibrina, ad opera del TF, sulla media dell'arteria di maiale (che solitamente non contiene TF) e su vetrini da laboratorio rivestiti di collagene, dopo aver esposto queste superfici ad un flusso di sangue umano: da questi campioni di sangue è stata isolata una forma attiva di TF circolante di origine leucocitaria. Aumentati livelli di TF di origine piastrinica, leucocitaria ed endoteliale sono stati trovati in pazienti affetti da malattie cardiovascolari, da disordini ematologici e coagulativi, come nel caso della coagulazione intravascolare disseminata, e in tutti gli stati patologici che sono associati ad un'aumentata trombogenicità del sangue[20-22]. Pazienti con infarto miocardico acuto e angina instabile hanno livelli di TF circolante più alti rispetto a pazienti con angina stabile e soggetti di controllo[23]. È stato dimostrato che i leucociti e gli elementi cellulari della placca aterosclerotica costituiscono una sorgente di microparticelle trombogeniche nel sangue circolante, rappresentando, così, un ulteriore fattore di rischio per il verificarsi di eventi trombotici[3] (Fig. 4). I leucociti sono considerati attivi almeno nel momento in cui il trombo si sta formando. All'interno del trombo, il TF è rilasciato in strutture vescicolari, le microparticelle, che possono essere trasferite in parte dai leucociti alle piastrine, attraverso l'interazione tra il ligando CD15, colocalizzato con il TF sulle microparticelle, e la P-selectina, molecola di adesione che media l'arresto e il rotolamento

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

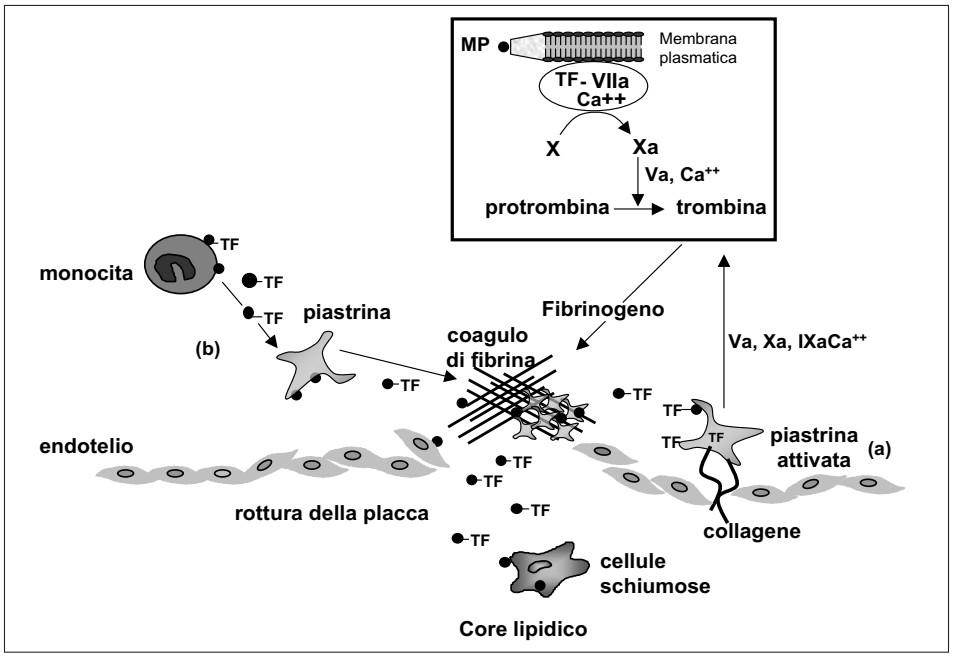

Figura 4. *Nella figura sono rappresentate le principali fonti di microparticelle trombogeniche (MP) (monociti, cellule endoteliali e cellule schiumose), che contribuiscono ad amplificare e propagare la risposta coagulativa dopo rottura della placca aterosclerotica. Nel quadrato in alto della figura è rappresentato l'inizio della cascata coagulativa sulla superficie delle MP lipidiche ad opera del fattore tissutale (TF), che culmina nella generazione di un coagulo insolubile di fibrina. (a) Le piastrine attivate dopo contatto con le strutture subendoteliali (fattore von Willebrand e collagene), espongono sulla loro superficie il TF, liberano MP contenenti TF e contribuiscono alla generazione di trombina, assemblando sulla loro superficie il complesso protrombinasico (Va, Xa, Ca^{++}). Inoltre, (b) le piastrine sono direttamente coinvolte nella propagazione del trombo, in quanto i leucociti trasferiscono sulla loro superficie MP trombogeniche.*

dei monociti sulle piastrine attivate e sull'endotelio[24]. È stato inoltre osservato che il TF è presente costitutivamente negli α-granuli delle piastrine[25,26]. Dopo attivazione piastrinica, il TF viene rilasciato dai granuli intracellulari ed esposto sulla superficie piastrinica e sulle microparticelle liberate dalla membrana plasmatica. Questo fenomeno chiaramente favorirebbe la crescita del trombo, dato che i fattori IXa e Xa, iniziali prodotti della via estrinseca della coagulazione, potrebbero essere generati sulle vescicole contenenti TF a livello della superficie piastrinica, riducendo così la distanza tra la sorgente del TF e le piastrine. Quindi appare plausibile che la trombosi sia innescata dal TF esposto sul lume vasale, come dopo rottura della placca aterosclerotica, ma che la propagazione e la stabilizzazione del trombo dipendano anche dall'esposizione di TF sulle piastrine e sulle microparticelle circolanti. La rottura della placca aterosclerotica contribuisce alla liberazione in circolo di microparticelle contenenti TF, altamente trombogeniche. Il processo apoptotico caratterizza molte fasi dello sviluppo della placca aterosclerotica e interessa le regioni ricche di cellule e citochine infiammatorie, in cui è stata colocalizzata un'elevata attività trombogenica dipendente dalla presenza di TF[27]. L'attività del TF è strettamente dipendente dalla presenza dei fosfolipidi di membrana, in particolar modo dalla fosfatidilserina. Poiché le cellule apoptotiche sono caratterizzate dall'esposizione della fosfatidilserina sul foglietto esterno della membrana plasmatica e dalla successiva liberazione di microparticelle ricche di fosfatidilserina, è stato ipotizzato che il processo apoptotico sia direttamente responsabile dell'attivazione del TF all'interno della placca aterosclerotica. Le microparticelle circolanti possono anche contribuire allo stato di trombogenicità di pazienti con iperlipidemia o con elevate concentrazioni plasmatiche di glucosio; questi fattori di rischio sono responsabili di un aumento dell'attività apoptotica *in vitro*[28,29]. Oltre al loro effetto diretto nella promozione e nell'amplificazione della cascata coagulativa, le microparticelle possono partecipare a molteplici processi infiammatori, trasmettendo il "messaggio" protrombotico anche in siti lontani da quelli in cui vengono prodotte. Recentemente è stato dimostrato che microparticelle di origine leucocitaria possono stimolare anche la liberazione di citochine e l'induzione di TF in cellule endoteliali[30]. Studi di microscopia elettronica hanno evidenziato la presenza di microparticelle ricche di TF all'interno del trombo, adese alla membrana delle piastrine e ai filamenti di fibrina. Studi sugli animali e sull'uomo hanno dimostrato l'efficacia di anticorpi specifici contro il TF nel ridurre la trombosi e l'iperplasia intimale dopo danno vasale. Inoltre, risultati emersi da studi in cui è stata dimostrata l'efficacia di anticorpi specifici contro la P-selectina e il ligando CD15 nel prevenire la trombosi coronarica sottolineano come l'inibizione del trasferimento di TF alle piastrine costituisca un nuovo potente approccio terapeutico per la prevenzione della trombosi in molte patologie[31,32], giustificando appieno il grande interesse intorno a questa molecola.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

Ruolo del fattore tissutale come recettore nelle vie di traduzione del segnale intracellulare

Nonostante la principale funzione fisiologica del TF sia la regolazione dei processi di emostasi e trombosi, molti studi hanno suggerito che il TF abbia anche un ruolo non emostatico nella vascolarizzazione embrionale[33], nell'angiogenesi e nelle metastasi tumorali[34]. Nell'animale adulto la crescita del tumore e soprattutto la tendenza alla metastatizzazione sono influenzate dalla presenza del TF, il cui coinvolgimento nella vascolarizzazione/angiogenesi appare critica. Un'aumentata espressione del TF contribuisce a regolare le proprietà angiogenetiche delle cellule tumorali, alterando la produzione di molecole regolatrici della crescita endoteliale, come il *vascular endothelial growth factor*, attraverso un meccanismo distinto da quello coagulativo. L'espressione del TF influenza anche l'adesione cellulare e la motilità. Il suo ruolo nella migrazione cellulare spiega l'adesione e il passaggio delle cellule tumorali attraverso la barriera endoteliale. Recenti studi hanno anche dimostrato l'importanza del TF nell'adesione e nella successiva transmigrazione dei fagociti mononucleati attraverso l'endotelio[35]. Una conoscenza più approfondita della struttura del TF, che mostra omologie di sequenza con la superfamiglia dei recettori per le citochine, ha indotto a studiare i meccanismi intracellulari innescati in seguito al legame con il fattore VII, mentre, sulla superficie extracellulare, una serie di reazioni danno inizio alla via estrinseca della coagulazione. Le tappe iniziali della trasduzione del segnale innescata dal complesso TF-VIIa sono ancora poco note. Tuttavia alcuni studi condotti in linee cellulari hanno dimostrato che, diversamente dai recettori per le citochine, il dominio citoplasmatico del TF non è sempre direttamente coinvolto[36]. L'ipotesi corrente è che il TF non si comporti tanto come un recettore, quanto determini una modificazione conformazionale del fattore VIIa, tale da attivare proteoliticamente una proteina di membrana, probabilmente identificata nel recettore *protease activated receptor-2* (PAR-2)[37]. PAR-2 è un tipico recettore accoppiato a proteine G, la cui attivazione coinvolge diverse proteine di questa classe, e la fosforilazione di chinasi, che a loro volta danno luogo a cascate successive di fosforilazione, determinanti un'amplificazione del segnale e l'attivazione di specifiche vie metaboliche (Fig. 5). Il complesso TF-VIIa induce la mobilizzazione del Ca^{++} intracellulare dopo attivazione di proteine G-fosfolipasi C, l'attivazione di piccole proteine G (*Rac*, *Cdc42*), la fosforilazione di tirosinchinasi della famiglia *Src* che a loro volta attivano la fosfatidilinositolo 3-chinasi (*phosphatidylinositol 3-kinase*-PI3K)[4,38]. La PI3K fosforila la proteinchinasi B (anche nota come *Akt*), responsabile della riorganizzazione del citoscheletro e della migrazione cellulare, ed innesca, tramite *Rac* e *Cdc42*, la fosforilazione delle *mitogen activated protein kinases* (MAP-chinasi) che, una volta traslocate nel nucleo, inducono l'espressione dei cosiddetti *"immediate-early genes*", geni la cui espressione avviene in assenza di una precedente sintesi proteica[36]. L'attivazione delle MAP-chinasi può avvenire direttamente da parte di *Rac* e *Cdc42*, e ad opera della proteinchinasi C, a sua volta indotta dall'aumento di Ca^{++} intracellulare. In alcune linee cellulari sono stati identificati questi geni, indotti dal TF, che codificano fattori di trascrizione, fattori di crescita, recettori, regolatori dell'organizzazione cellulare e della motilità, e citochine, suggerendo così la presenza di un *feedback* positivo nell'aumentare l'espressione del TF[36].

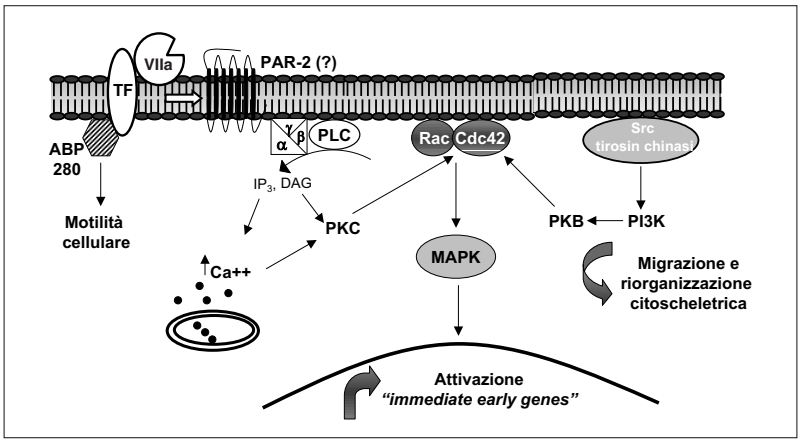

Figura 5. *Rappresentazione schematica delle vie di trasduzione del segnale attivate dal complesso fattore tissutale (TF)-fattore VIIa. Il segnale è trasmesso agli enzimi citosolici tramite una scissione proteolitica di un recettore protease activated receptor (PAR)-2, accoppiato a proteine G eterotrimeriche (subunità α, β e γ). Le mitogen activated protein kinases [MAP-chinasi (MAPK)] sono attivate dalle piccole proteine G (Rac, Cdc42) o indirettamente da tirosinchinasi della famiglia Src, che a loro volta attivano la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e la proteinchinasi B (PKB), coinvolte nella migrazione cellulare. Un'altra via che induce l'attivazione delle MAPK è l'aumento del Ca^{++} intracellulare ad opera della fosfolipasi C (PLC), che coinvolge la formazione di secondi messaggeri: il fosfatidilinositolo-3 fosfato (IP_3) stimola il rilascio del Ca^{++}intracellulare, il diacilglicerolo (DAG), con il Ca^{++}, attiva la via proteinchinasi C-Rac/Cdc42-MAPK. La fosforilazione delle MAPK induce un aumento della trascrizione degli immediate-early genes. Nella figura è rappresentato anche il legame diretto tra il dominio citoplasmatico del TF e l'actin-binding protein (ABP) 280, coinvolta nella migrazione cellulare.*

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

Alcuni studi hanno rilevato che il potenziale prometastatico del TF è legato, tuttavia, anche al dominio citoplasmatico. Il dominio intracellulare del TF può appunto interagire direttamente con le componenti citoscheletriche mediante una proteina, la filamina-1 (anche nota come *actin-binding protein* 280), formando un complesso proteico coinvolto nel rimodellamento dei filamenti di actina, responsabili della morfologia e della motilità cellulare[39].

La complessità dei differenti meccanismi attraverso cui il complesso TF-VIIa influenza la morfologia e la motilità cellulare, e induce l'espressione di *immediate-early genes*, indica uno stato di attivazione generale della cellula, indotto dal TF, rilevante per una crescita incontrollata e/o una metastatizzazione di cellule tumorali, a loro volta spesso esprimenti TF sulla loro superficie. Ulteriori studi sono necessari per stabilire in quali tipi cellulari e in quali condizioni si ha l'attivazione di questo spettro di geni, soprattutto, tenendo conto che la somministrazione del fattore VIIa ricombinante è usata come profilassi antiemorragica nell'emofilia.

Approcci terapeutici

Negli ultimi anni sono stati identificati e sviluppati trattamenti antitrombotici innovativi che mirano all'inibizione non solo delle prime fasi della via estrinseca della coagulazione, ma anche degli effetti mediati da un'alterata espressione del TF, come l'infiammazione e la proliferazione cellulare. Gli agenti in grado di inibire l'attività del TF o del complesso TF-VIIa possono essere raggruppati in due categorie: il primo gruppo comprende gli inibitori specifici del TF, del fattore VIIa e/o del complesso TF-VIIa, il secondo gruppo include una varietà di molecole non specifiche nell'inibire il TF (Tab. I).

Anticorpi specifici contro il TF riducono la trombogenicità della placca aterosclerotica[40] e prevengono la formazione del trombo e la riocclusione dopo somministrazione di un agente fibrinolitico[41]. Recentemente è stato proposto che questi anticorpi riducano il danno miocardico da ischemia/riperfusione, inibendo la trombosi intravascolare innescata dal TF e l'amplificazione del processo infiammatorio attraverso la diminuzione dell'espressione delle chemochine e il reclutamento leucocitario[41]. È stata sintetizzata e sperimentata una forma solubile di TF, con attività ridotta ed in grado di legarsi al fattore VIIa, riducendo l'efficienza catalitica del fattore X. La somministrazione di questa molecola in conigli con danno carotideo determina un potente effetto antitrombotico, al prezzo di una modesta tendenza al sanguinamento[42]. L'inibizione del complesso TF-VIIa induce un ampio spettro di benefici che va oltre l'inibizione del processo trombotico, influenzando positivamente anche la ristenosi dopo angioplastica e il danno da ischemia/riperfusione.

Il ruolo del TF anche al di fuori dello stretto ambito coagulativo è stato dimostrato in modelli animali di ristenosi. L'inibizione del complesso TF-VIIa può prevenire la ristenosi, che avviene dopo angioplastica o aterectomia nel 30-50% dei pazienti a causa della proliferazione intimale e del rimodellamento arterioso. La trombosi innescata dal TF determina generazione di trombina e attivazione piastrinica. La trombina è un mitogeno per le cellule muscolari lisce, e le piastrine attivate liberano fattori di crescita e citochine che contribuiscono ad amplificare il processo infiammatorio, la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce e la deposizione di matrice extracellulare. Forme ricombinanti del fattore VIIa (*active site-inactivated recombinant factor VIIa, VIIai*) e del TFPI (rTFPI) esercitano un pronunciato effetto antitrombotico, inibiscono l'accumulo di fibrina e la formazione dell'iperplasia intimale[43,44].

È stata prodotta una forma ricombinante di TFPI (rTFPI) che previene la formazione del trombo in una varietà di modelli sperimentali. La somministrazione di rTFPI in seguito a danno carotideo indotto da palloncino riduce l'espressione di TF, l'attività del fattore Xa, e attenua la formazione del trombo nel sito del danno[44]. Recentemente, è stato dimostrato che rTFPI è in grado di ridurre la mortalità di pazienti con sepsi[45]. Alcuni studi hanno dimostrato che l'inibizione della trombosi intravascolare avviene con concentrazioni di rTFPI superiori a quelle plasmatiche, e in concomitanza ad un aumentato tempo di sanguinamento[46]. A causa delle elevate dosi di rTFPI necessarie per ottenere un effetto antitrombotico, negli ultimi anni sono stati sviluppati modelli di transfezione genica, *in vivo,* del gene umano di rTFPI: la transfezione di questo gene nelle arterie ca-

Tabella I. Inibitori specifici e non specifici del fattore tissutale (TF) e del complesso TF-VIIa.

Inibitori specifici	Inibitori non specifici
Fattore VIIa ricombinante	Eparina a basso peso molecolare
Anticorpi monoclonali anti-TF	Statine
TF solubile ricombinante	Acidi grassi polinsaturi n-3
TFPI ricombinante	ACE-inibitori/antagonisti del recettore 1 dell'angiotensina II
NAPc2	Ticlopidina/aspirina

NAPc2 = *nematode anticoagulant protein c2*; TFPI = *tissue factor pathway inhibitor*.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

rotidi umane previene la trombosi e la riduzione del flusso a livello della sede del danno arterioso[47,48].

Il fattore VIIa ricombinante privo di attività catalitica nei confronti dei fattori IX e X, (F VIIai) ha un'elevata affinità per il TF, e possiede un'emivita e un effetto antitrombotico prolungati nel tempo, per tutte le 24 ore successive alla somministrazione, senza considerevoli effetti sistemici che ne possano impedire l'uso clinico[49]. In modelli animali, in cui è stato indotto danno da ischemia/riperfusione, la somministrazione del fattore ricombinante VIIai determina una riduzione della deposizione piastrinica e del fibrinogeno nel miocardio post-ischemico[50]. Il danno da ischemia/riperfusione (ipossia/riossigenazione) sposta la bilancia ossido-riduttiva cellulare verso un aumento dello stress ossidativo intracellulare, promuovendo la generazione di radicali dell'ossigeno (*reactive oxygen species*-ROS) da parte di differenti sorgenti enzimatiche tra cui la NADPH ossidasi, la xantina ossidasi ed i citocromi mitocondriali[51]. I ROS contribuiscono alla formazione e alla crescita del trombo all'interno dell'apparato vascolare aumentando l'attività della via estrinseca della coagulazione, attraverso un effetto combinato sulla stimolazione dell'attività endoteliale del TF e l'inibizione della via fibrinolitica, e favorendo l'attivazione e la successiva aggregazione piastrinica[52]. Cellule endoteliali in coltura esposte a ROS promuovono la sintesi *de novo* del TF ed un aumento dell'attività procoagulante di superficie. Modelli animali di cuore isolato e perfuso in cui sia stato indotto danno da riperfusione, condizione associata ad un aumento di ROS, mostrano un aumento di TF nella circolazione coronarica[53]. Questo aumento di TF durante la fase di riperfusione postischemica è accompagnato da una diminuzione significativa del flusso coronarico[53]. La somministrazione di sostanze antiossidanti e/o di inibitori specifici delle componenti enzimatiche possono, quindi, costituire un valido aiuto nel limitare il danno cellulare indotto dalla riossigenazione.

Una nuova molecola, il peptide *nematode anticoagulant protein c2* (NAPc2) isolata dalla saliva del verme *Ancylostoma caninum*, è in questi anni sotto indagine in diversi studi clinici per il trattamento delle condizioni trombotiche. Il NAPc2 ha un meccanismo d'azione simile al TFPI. Esso infatti si lega al sito catalitico dei fattori X e Xa, inibendo così l'attività del complesso TF-VIIa. In modelli animali di trombosi coronarica e carotidea, la somministrazione di una forma ricombinante di NAPc2 ha mostrato avere un effetto antitrombotico maggiore delle eparine a basso peso molecolare[54].

Tra i farmaci che inibiscono in modo non specifico l'attività e/o l'espressione del TF troviamo le eparine a basso peso molecolare, le statine e gli acidi grassi polinsaturi della serie n-3. Le eparine a basso peso molecolare aumentano i livelli circolanti e l'attività del TFPI[55]. L'eparina determina una liberazione di TFPI dall'endotelio vascolare, la formazione di complessi eparina-TFPI sulla superficie cellulare e la successiva liberazione dei complessi in circolo. Inoltre l'eparina coniugata alla membrana citoplasmatica dei monociti attivati inibisce l'espressione monocitaria del TF[56]. È stato dimostrato che la somministrazione farmacologica di statine e la supplementazione dietetica con acidi grassi polinsaturi della serie n-3 riducono l'espressione e l'attività del TF. Il trattamento con statine, inibitori dell'enzima chiave della sintesi del colesterolo, l'idrossimetilglutaril-coenzima A reduttasi, riduce l'espressione monocitaria del TF in pazienti ipercolesterolemici e interferisce con la biosintesi e l'attività del TF nei macrofagi e nelle cellule endoteliali in coltura[57,58]. Negli ultimi anni sono stati riportati dati sperimentali sul possibile legame tra l'effetto antitrombotico degli acidi grassi n-3 ed espressione del TF in modelli animali di trombosi arteriosa e venosa[59-61]. Uno studio condotto su monociti isolati da pazienti ipertrigliceridemici, poi trattati *ex vivo* con lipopolisaccaride batterico, ha dimostrato che l'assunzione per più di 18 settimane di acido eicosapentaenoico e acido docosaesaenoico riduce l'attività procoagulante dei monociti, a causa di una ridotta espressione del TF[62]. Questo risultato è stato confermato da altri studi *in vitro* condotti su linee monocitoidi U937 e THP-1[63,64], esposte cronicamente (per più di 72 ore) ad acido docosaesaenoico.

Recentemente è stato osservato che la terapia antipiastrinica a base di ticlopidina e aspirina inibisce la liberazione di TF nel circolo coronarico di pazienti con patologia coronarica stabile e instabile[65]. Studi *in vitro* hanno pure dimostrato che l'uso di ACE-inibitori e di antagonisti del recettore 1 per l'angiotensina II inibiscono l'espressione del TF in monociti umani stimolati con lipopolisaccaride. Inoltre gli ACE-inibitori diminuiscono i livelli plasmatici di TF e di *monocyte chemoattractant protein-1* in pazienti con infarto miocardico acuto, suggerendo così che il loro meccanismo antitrombotico possa, in parte, essere legato alla loro capacità di inibire l'espressione del TF e l'accumulo di monociti e macrofagi[66].

Conclusioni

La ricerca di base sta dunque offrendo numerosi spunti per una migliore comprensione del meccanismo d'azione del TF. Lo sviluppo di nuove molecole in grado di inibirne l'azione è avanzato al punto di un prossimo inizio di studi clinici nei pazienti con patologie su base aterotrombotica o nella coagulazione intravascolare disseminata.

Queste molecole offriranno presto al cardiologo delle nuove armi per il trattamento delle sindromi coronariche acute.

Riassunto

Il fattore tissutale (TF) è una glicoproteina transmembranaria considerata il maggiore attivatore della

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

cascata coagulativa. Quando in contatto con il sangue, esso forma un complesso con i fattori VII/VIIa, attivando i fattori IX e X, così portando alla formazione del coagulo di fibrina. Il TF è localizzato costitutivamente solo sulla superficie di cellule anatomicamente separate dal sangue. Studi recenti hanno però dimostrato, nel sangue di pazienti con sindromi coronariche acute, la presenza di microparticelle derivate da cellule, contenenti TF, capaci di scatenare e propagare la crescita del trombo.

Parole chiave: Aterosclerosi; Sindromi coronariche acute; Trombosi.

Bibliografia

1. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. Thromb Haemost 1991; 66: 67-79.
2. Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson Y. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. Thromb Haemost 1997; 78: 247-55.
3. Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. Trends Cardiovasc Med 2000; 10: 139-43.
4. Petersen LC, Freskgard P, Ezban M. Tissue-factor-dependent factor VIIa signaling. Trends Cardiovasc Med 2000; 10: 47-52.
5. Harlos K, Martin DMA, O'Brien DP, et al. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. Nature 1994; 370: 662-6.
6. Muller YA, Ultsch MH, Kelley RF, de Vos AM. Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. Biochemistry 1994; 33: 10864-70.
7. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. Thromb Res 1996; 81: 1-41.
8. Morrissey JH, Neuenschwander PF, Huang Q, McCallum CD, Johnson AE. Factor VIIa-tissue factor: functional importance of protein-membrane interactions. Thromb Haemost 1997; 78: 112-6.
9. Banner DW, D'Arcy A, Chene C, et al. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. Nature 1996; 380: 41-6.
10. Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. Blood 1995; 86: 1794-801.
11. Rapaport SI, Rao LV. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". Thromb Haemost 1995; 74: 7-17.
12. Sandset PM. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) - an update. Haemostasis 1996; 26: 154-65.
13. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2839-43.
14. Moons AH, Levi M, Peters RJ. Tissue factor and coronary artery disease. Cardiovasc Res 2002; 53: 313-25.
15. Kaikita K, Takeya M, Ogawa H, Suefuji H, Yasue H, Takahashi K. Co-localization of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in coronary atherosclerosis. J Pathol 1999; 188: 180-8.
16. Ardissino D, Merlini PA, Arlens R, et al. Tissue factor in human coronary atherosclerotic plaques. Clin Chim Acta 2000; 291: 235-40.
17. Annex BH, Denning SM, Channon KM, et al. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. Circulation 1995; 91: 619-22.
18. Lorenzoni R, Gensini GF, De Caterina R. Antithrombotic therapy for unstable angina in non-Q myocardial infarct. G Ital Cardiol 1998; 28: 468-80.
19. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 2311-5.
20. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost 1998; 79: 276-81.
21. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. J Clin Invest 1999; 104: 93-102.
22. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. Circulation 1999; 99: 2908-13.
23. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, et al. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. Am J Cardiol 1998; 81: 22-6.
24. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. Blood 2000; 96: 170-5.
25. Muller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. FASEB J 2003; 17: 476-8.
26. Camera M, Brambilla M, Frigerio M, et al. L'attivazione piastrinica induce l'espressione di tissue factor immunoreattivo (irTF) sulla superficie cellulare. (abstr) In: Abstracts Congresso Nazionale della Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi. Chieti, 2002: C26.
27. Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombosis disease. Circ Res 2001; 88: 998-1003.
28. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. Diabetes 1995; 44: 1323-7.
29. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: a mechanistic clue to the "response to injury" hypothesis. Circulation 1997; 95: 1760-3.
30. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. J Biol Chem 1999; 274: 23111-8.
31. Connolly ES, Winfree CJ, Prestigiacomo CJ, et al. Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. Circ Res 1997; 81: 304-10.
32. Ikeda H, Ueyama T, Murohara T, et al. Adhesive interaction between P-selectin and sialyl Lewis^x plays an important role in recurrent coronary arterial thrombosis in dogs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1083-90.
33. Carmeliet P, Mackman M, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature 1996; 383: 73-5.
34. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, Thorpe PE. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumour vasculature. Science 1997; 275: 547-50.
35. Randolph GJ, Luther T, Albrecht A, Magdolen V, Muller WA. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. Blood 1998; 2: 4167-77.
36. Wiiger MT, Prydz H. Cellular effects of initiation of the ex-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 3.133.144.217 Mon, 29 Apr 2024, 12:43:06

trinsic pathway of blood coagulation. Trends Cardiovasc Med 2000; 10: 360-5.
37. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 5255-60.
38. Peppelenbosh MP, Versteeg HH. Cell biology of tissue factor, an unusual member of the cytokine receptor family. Trends Cardiovasc Med 2001; 11: 335-9.
39. Ott I, Fischer EG, Miyagi Y, Mueller BM, Ruf W. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. J Cell Biol 1998; 140: 1241-53.
40. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. Circulation 1999; 99: 1780-7.
41. Erlich JH, Boyle EM, Labriola J, et al. Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct size after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation. Am J Pathol 2000; 157: 1849-62.
42. Kelley RF, Refino CJ, O'Connell MP, et al. A soluble tissue factor mutant is a selective anticoagulant and antithrombotic agent. Blood 1997; 89: 3219-27.
43. Golino P, Ragni M, Cirillo P, et al. Antithrombotic effects of recombinant human, active site-blocked factor VIIa in a rabbit model of recurrent arterial thrombosis. Circ Res 1998; 82: 39-46.
44. St Pierre J, Yang LY, Tamirisa K, et al. Tissue factor pathway inhibitor attenuates procoagulant activity and upregulation of tissue factor at the site of balloon-induced arterial injury in pigs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2263-8.
45. Abraham E. Tissue factor inhibition and clinical trial results of tissue factor pathway inhibitor in sepsis. Crit Care Med 2000; 28 (Suppl): S31-S33.
46. Oltrona L, Speidel CM, Recchia D, Wickline SA, Eisenberg PR, Abendschein DR. Inhibition of tissue factor-mediated coagulation markedly attenuates stenosis after balloon-induced arterial injury in minipigs. Circulation 1997; 96: 646-52.
47. Zoldhelyi P, Chen ZQ, Shelat HS, McNatt JM, Willerson JT. Local gene transfer of tissue factor pathway inhibitor regulates intimal hyperplasia in atherosclerotic arteries. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 4078-83.
48. Golino P, Cirillo P, Calabrò P, et al. Expression of exogenous tissue factor pathway inhibitor in vivo suppresses thrombus formation in injured rabbit carotid arteries. J Am Coll Cardiol 2001; 38: 569-76.
49. Rao LV, Ezban M. Active site-blocked activated factor VII as an effective antithrombotic agent: mechanism of action. Blood Coagul Fibrinolysis 2000; 11 (Suppl 1): S135-S143.
50. Golino P, Ragni M, Cirillo P, et al. Recombinant human, active site-blocked factor VIIa reduces infarct size and no-reflow phenomenon in rabbits. Am J Physiol 2000; 278: H1507-H1516.
51. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol 2002; 282: C227-C241.
52. Ambrosio G, Tritto I, Golino P. Reactive oxygen metabolites and arterial thrombosis. Cardiovasc Res 1997; 34: 445-52.
53. Golino P, Ragni M, Cirillo P, et al. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. Nat Med 1996; 2: 35-40.
54. Rote W, Oldeschulte GL, Dempsey EM, Vlasuk GP. Evaluation of a novel small protein inhibitor of the blood coagulation factor VIIa/tissue complex in animal models of arterial and venous thrombosis. (abstr) Circulation 1996; 94: I-695.
55. Hoppensteadt DA, Walenga JM, Fasanella A, Jeske W, Fareed J. TFPI antigen levels in normal human volunteers after intravenous and subcutaneous administration of unfractionated heparin and a low molecular weight heparin. Thromb Res 1995; 77: 175-85.
56. Abbate R, Gori AM, Modesti PA, et al. Heparin, monocytes, and procoagulant activity. Haemostasis 1990; 20 (Suppl 1): S98-S100.
57. Camera M, Gaviraghi M, Tremoli E. Fluvastatin inhibits TNF-α and LPS-induced c-Rel/p-65 nuclear translocation and tissue factor expression in human endothelial cells. (abstr) Atherosclerosis 1997; 134: 197.
58. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 265-72.
59. Andriamampandry MD, Leray C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Antithrombotic effects of (n-3) polyunsaturated fatty acids in rat models of arterial and venous thrombosis. Thromb Res 1999; 93: 9-16.
60. Thorwest M, Balling E, Kristensen SD, et al. Dietary fish oil reduces microvascular thrombosis in a porcine experimental model. Thromb Res 2000; 99: 203-8.
61. Harker LA, Kelly AB, Hanson SR, et al. Interruption of vascular thrombus formation and vascular lesion formation by dietary n-3 fatty acids in fish oil in nonhuman primates. Circulation 1993; 87: 1017-29.
62. Tremoli E, Eligini S, Colli S, et al. n-3 fatty acid ethyl ester administration to healthy subjects and to hypertriglyceridemic patients reduces tissue factor activity in adherent monocytes. Arterioscler Thromb 1994; 14: 1600-8.
63. Chu AJ, Moore J. Differential effects of unsaturated fatty acids on modulation of endotoxin-induced tissue factor activation in cultured human leukemia U937 cells. Cell Biochem Funct 1991; 9: 231-8.
64. Chu AJ, Walton MA, Prasad JK, Seto A. Blockade by polyunsaturated n-3 fatty acids of endotoxin-induced monocytic tissue factor activation is mediated by the depressed receptor expression in THP-1 cells. J Surg Res 1999; 87: 217-24.
65. Marco J, Ariens RA, Fajadet J, et al. Effect of aspirin and ticlopidine on plasma tissue factor levels in stable and unstable angina pectoris. Am J Cardiol 2000; 85: 527-31.
66. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1999; 34: 983-8.