

**MARCATORI DI MALATTIA**

# PIASTRINE E FATTORE TESSUTALE: NUOVI RUOLI PER VECCHI ATTORI NELL'ATEROTROMBOSI

## Platelets and Tissue factor: new roles for old players in atherothrombosis

**MARINA CAMERA<sup>1,2</sup>, MARTA BRAMBILLA<sup>2</sup>, LAURA ROSSETTI<sup>2</sup>,  
CHIARA ZARA<sup>2</sup>, ELENA TREMOLI<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

<sup>2</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano

**SUMMARY**

Platelets are anucleated cells derived from the fragmentation of megakaryocytes in the bone marrow. The role played by platelets in the haemostatic and thrombotic process is very well known and has been extensively studied. Recently, however, it has been revised taking into account that a subset of platelets expresses Tissue Factor. This feature allows platelets, by one hand, to play an active role in triggering and controlling the activation of blood coagulation and, on the other hand, it supports the concept of the heterogeneity of platelet functions. Platelets, indeed, are not only involved in the haemostatic function, but they take an active part in many other functions ranging from inflammation to immunity and angiogenesis. In line with this new vision of the functions ascribed to platelets, the role of these cells in atherothrombotic pathology is no longer confined to the formation of the thrombus, but extends to the onset and progression of the atherosclerotic plaque.

**Key words:** *platelets; tissue factor; atherothrombosis; megakaryocytes.*

**Introduzione**

Piastrine e fattore tissutale (TF, Tissue Factor) sono i due attori principali responsabili della formazione del trombo che si

organizza in seguito alla fissurazione di una placca aterosclerotica.

Le piastrine, da un lato, sono riconosciute storicamente come le cellule responsabili dell'emostasi primaria; il fattore tissutale, dall'altro, è la proteina fondamentale per l'attivazione della cascata della coagulazione, processo chiave dell'emostasi secondaria.

Il progresso scientifico degli ultimi venti anni ha considerevolmente implemen-

*Indirizzo per la corrispondenza*

Prof.ssa Marina Camera  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e  
Biomolecolari  
Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano  
E-mail: marina.camera@unimi.it - marina.camera@ccfm.it

tato le nostre conoscenze sia sugli aspetti molecolari e sul ruolo fisiopatologico delle piastrine, sia sulla biologia e sull'espressione cellulare del TF. Ciò ha modificato profondamente il classico scenario emostatico-trombotico che vedeva la piastrina come cellula che, una volta attivata e aggregata, forniva in modo quasi passivo la superficie fosfolipidica per l'assemblaggio dei fattori della coagulazione, i quali si attivavano per opera del TF espresso dalla parete vasale ("vessel wall-derived TF"). Tale visione è stata rivisitata alla luce dell'evidenza che le piastrine stesse esprimono TF e quindi possono essere artefici dirette dell'innescò della cascata della coagulazione con formazione di trombina e deposizione di fibrina. Il ruolo del TF espresso dalla parete vasale è stato quindi a sua volta rivisto alla luce del fatto che questa proteina è espressa anche da cellule attivate (monociti, neutrofilii, piastrine) ed elementi subcellulari (microvescicole derivate da cellule che esprimono TF) presenti nel sangue, costituendo in tal modo una riserva di TF circolante ("blood-borne TF"). Focalizzandoci sul contributo delle piastrine nel processo emostatico, è importante sottolineare il fatto che non tutte le piastrine contengono TF che viene espresso sulla superficie plasmatica in seguito ad attivazione: questa osservazione porta al concetto dell'eterogeneità funzionale piastrinica. I dati della letteratura indicano, da una parte, come non tutte le piastrine posseggano le caratteristiche fondamentali per sostenere il processo emostatico (espressione di fosfatidilserina sul versante extracellulare del doppio strato fosfolipidico della membrana e capacità di legare i fattori della coagulazione in seguito ad attivazione) e, dall'altra, come esse prendano parte attiva in numerose altre funzioni che spaziano dai processi infiammatori a quelli immunitari, angiogenetici, etc.

Verosimilmente questa eterogeneità funzionale è determinata da un proteoma e da un trascrittoma di derivazione megacariocitaria specifici per ciascuna funzione. Va ricordato infatti, a tal proposito, che le piastrine, pur non avendo un nucleo, contengono ~ 2000-7000 trascritti (1). L'evidenza che le piastrine possono utilizzare gli RNA messaggeri per eseguire *de novo* sintesi proteica in risposta all'attivazione cellulare è di estrema importanza, in quanto questi meccanismi permettono alle piastrine di modificare il loro proteoma e, di conseguenza, le loro funzioni (2-4).

In linea con questa nuova visione allargata delle funzioni svolte dalle piastrine, anche il loro ruolo nella patologia aterotrombotica è stato ampiamente rivisto: esso infatti non è più confinato solo alla fase finale del processo, cioè alla formazione del trombo in seguito alla fissurazione della placca, ma comprende anche le fasi iniziali di formazione della placca aterosclerotica, quando le piastrine attivate, rilasciando mediatori infiammatori e chemotattici, contribuiscono alla perturbazione endoteliale, *primum movens* in questo processo.

Questo articolo vuole riassumere l'evoluzione di questi concetti sottolineando la loro rilevanza sia fisiologica che patologica nel contesto dell'aterotrombosi e della malattia coronarica.

### **Piastrine ed emostasi: una funzione caratteristica di una sottopopolazione piastrinica**

Le piastrine sono elementi cellulari anucleati che derivano dalla frammentazione dei megacariociti siti nel midollo osseo. Sono le più piccole cellule del nostro organismo, con una dimensione media compresa tra 1 e 3 micron, e circolano nel sangue ad una concentrazione di 200.000-400.000/ $\mu$ l.

Il ruolo chiave svolto dalle piastrine nel processo emostatico e trombotico è noto da tempo ed è stato ampiamente studiato. Le piastrine aderiscono e si aggregano in concomitanza di un danno vasale per bloccare l'emorragia. Contemporaneamente la loro membrana fosfolipidica diventa la sede dove i fattori della coagulazione di legano, si organizzano a formare i complessi tenasici (TF, FVII e FX) e protrombinasici (FXa, FVa e FII) in modo tale che la generazione di trombina rimanga confinata alla sede del danno e non si verifichi una attivazione sistemica della coagulazione del sangue (5).

### **TF di parete, TF circolante e TF piastrinico**

Il TF è l'unico fattore della coagulazione del sangue che non viene prodotto dal fegato e liberato nella circolazione sanguigna. Proprio a causa del fatto che il suo ruolo fisiologico è formare un complesso con il FVII attivandolo e innescando quindi la coagulazione del sangue, questa peculiare modalità di sintesi è da intendersi come un fine controllo del processo emostatico allo scopo di impedire un'attivazione impropria della coagulazione. Seguendo questa logica, il TF è espresso costitutivamente da tutte le cellule che formano le capsule dei nostri organi, come ad esempio i fibroblasti della tonaca avventizia dei vasi, per costituire una barriera emostatica che possa prontamente bloccare un processo emorragico in caso di necessità. Cellule a diretto contatto col sangue, e quindi con gli altri fattori della coagulazione, quali le cellule endoteliali, i monociti, i granulociti e cellule della parete vasale, quali le cellule muscolari lisce, possono invece esprimere il TF in modo inducibile, quando ad esempio stimolate da citochine infiammatorie, da lipopolisaccaridi batterici, da lipoprotei-

ne modificate, etc. aumentando pertanto il loro potere protrombotico attraverso un meccanismo dipendente dal fattore di trascrizione NF $\kappa$ B (6). A livello di placca aterosclerotica la quantità di TF è molto elevata: essa è concentrata soprattutto nel core lipidico/necrotico prodotta dai macrofagi e dalle cellule muscolari lisce, ma può essere espressa anche dall'endotelio perturbato. Fino alla fine del secolo scorso si è ritenuto che questo TF di parete fosse il solo a contribuire alla trombogenicità della placca stessa (7).

Tra la fine del secolo scorso e l'inizio del nuovo millennio, compare nel panorama emostatico-trombotico un nuovo attore, il TF circolante. Questo termine viene introdotto inizialmente per alludere a microvescicole circolanti che esprimevano TF sulla loro superficie (MV TF<sup>+</sup>) e che si potevano fondere con la membrana delle piastrine (8, 9). In quegli anni infatti vengono pubblicati i primi studi che documentano come il plasma di soggetti sani sia in grado di generare trombina in modo TF-dipendente e ciò sia dovuto alla presenza di MV TF<sup>+</sup>. La concentrazione di queste microvescicole è significativamente più elevata in pazienti affetti da malattie cardiovascolari ed ematologiche, nella sepsi e nella coagulazione intravascolare disseminata, determinando in questi pazienti un aumento della trombogenicità del sangue (10-13).

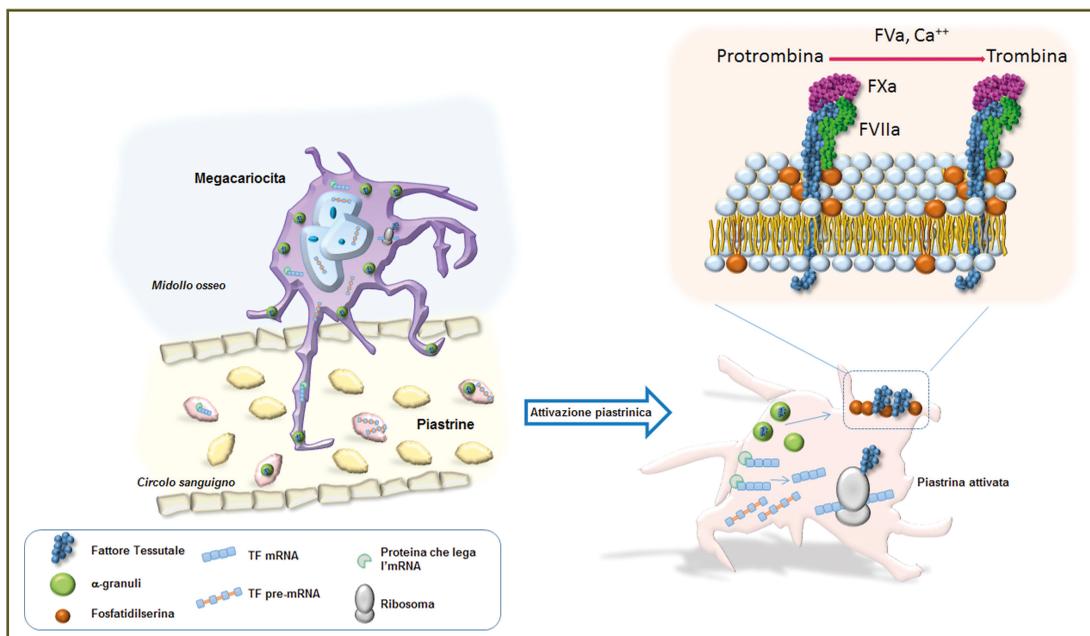
La presenza in circolo di piastrine che esprimono TF (TF piastrinico) è stata descritta e caratterizzata per la prima volta nel laboratorio di Yale Nemerson da parte di Giesen et al. nel 1999 e da Rauch et al. nel 2000 (8, 14). Questi autori proposero che microvescicole circolanti che esprimono TF potevano fondersi con le piastrine attivate attraverso un meccanismo dipendente dall'interazione tra CD15 e P-selettina. Queste piastrine TF<sup>+</sup> acquisiscono

pertanto la capacità di attivare in modo indipendente la cascata della coagulazione.

La rilevanza fisiopatologica del TF piastrinico viene ben circostanziata da Nemerson che, integrando queste nuove evidenze con studi di cinetica enzimatica con i fattori della coagulazione, propone un meccanismo riveduto di attivazione della coagulazione nel contesto di formazione del tappo piastrinico/trombo. Tale meccanismo prevede un'azione concertata del TF di parete e di quello piastrinico. Il primo è fondamentale nella fase iniziale di formazione del trombo, mentre il secondo deve sostenere la fase di propagazione e crescita del trombo stesso (9). La necessità di una fonte extra di TF, in aggiunta a quello di parete, nella formazione del trombo, era dettata dalla dimostrazione che le piastrine stesse e la fibrina, man mano che si formano e si accumulano nel sito della lesione, ostacolano l'interazione

del TF di parete con il FVII circolante e quindi ostacolano l'attivazione del FIX e FX, e di conseguenza la generazione dell'attività protrombinasica sulla superficie del trombo in crescita (15). In questo scenario, pertanto, il TF associato alle piastrine è fondamentale per sostenere la fase di propagazione della formazione del trombo.

Da allora, diversi gruppi hanno dimostrato la presenza del TF nelle piastrine umane. In particolare si è osservato che il TF, che in condizioni fisiologiche è contenuto nel citoplasma delle piastrine, viene traslocato sulla membrana plasmatica in modo tempo e concentrazione-dipendente in seguito a stimolazione con i classici agonisti piastrinici quali l'adenosina difosfato (ADP), la trombina, l'adrenalina, l'analogo del trombossano U46619 e il calcio ionoforo A23187 (16-21). Il TF esposto in membrana è funzionalmente



**Figura 1 - TF piastrinico.** I megacariociti rilasciano in circolo una sottopopolazione di piastrine che contengono nel proprio citoplasma TF proteina e/o RNA messaggero. In seguito ad attivazione la piastrina espone sulla sua membrana il TF che è funzionalmente attivo, in grado quindi di legare il FVIIa, in presenza di fosfatidilserina e di calcio, e di generare trombina.

attivo, in grado cioè di legare il FVIIa e di innescare la generazione di trombina e la formazione di fibrina (*Figura 1*) (18, 22). Un'altra informazione importante che è emersa da questi studi è che le piastrine contengono l'RNA messaggero che codifica per il TF che può essere utilizzato per fare *de novo* sintesi proteica (18, 22-24).

Poiché sia le piastrine che il TF sono coinvolti nell'eziopatogenesi di molte malattie, diversi studi nel corso degli anni hanno valutato come l'espressione di TF piastrinico si modificasse in condizioni patologiche quali la malattia coronarica, il diabete, la trombocitemia essenziale e i tumori (22, 25-27).

Nell'ambito della malattia coronarica è stato osservato che non solo il numero di piastrine circolanti che esprimono TF e di aggregati piastrine-monociti TF<sup>+</sup> è significativamente maggiore nei pazienti con sindrome coronarica acuta rispetto ai pazienti con angina stabile o ai volontari sani, ma che la quantità di proteina espressa da ciascuna piastrina è significativamente più elevata (il doppio), determinando globalmente un maggior potere protrombotico (22). Questi risultati, suggerendo che le piastrine e gli aggregati TF<sup>+</sup> possono contribuire alla formazione di trombi in seguito alla rottura delle placche forniscono, da un lato, una spiegazione della maggiore trombogenicità documentata nella sindrome coronarica acuta. Dall'altro lato, gettano le basi per speculare che il TF piastrinico possa essere responsabile della generazione del trombo in presenza di una placca erosa dove, per definizione, non c'è esposizione del core lipidico/necrotico e quindi del TF di parete.

Diversi meccanismi possono essere responsabili dell'aumento del numero di piastrine TF<sup>+</sup> osservate nei pazienti con sindrome coronarica acuta, e sono qui di seguito discussi.

### Meccanismi responsabili della presenza di TF nelle piastrine

Dalla scoperta del TF piastrinico e fino a pochi anni fa si riteneva che tre fossero i meccanismi responsabili della presenza di TF nelle piastrine:

- 1) attraverso la fusione di microvescicole TF<sup>+</sup>;
- 2) con l'accumulo all'interno degli  $\alpha$  granuli e del sistema canalicolare aperto;
- 3) mediante la *de novo* sintesi proteica a partire dall'RNA messaggero specifico per il TF (28).

Pur ritenendo che questi meccanismi non siano reciprocamente esclusivi e che un meccanismo possa prevalere sull'altro a seconda delle condizioni fisiopatologiche, nel 2015 abbiamo fornito l'evidenza che anche i megacariociti umani contengono TF proteina e RNA messaggero (29). L'RNA messaggero che codifica per il TF e la proteina rilevabili nelle piastrine sono pertanto, *in primis*, il risultato di un trasferimento diretto dai megacariociti. Utilizzando un modello *in vitro* di megacariociti umani in grado di produrre piastrine, abbiamo fornito l'evidenza che il TF è una proteina che caratterizza la maturazione dei megacariociti umani. Il suo livello di espressione infatti è basso nei megacarioblasti e aumenta col differenziamento a megacariocita. Questo approccio *in vitro* ci ha consentito di studiare l'espressione del TF (sia RNA messaggero che proteina) nelle piastrine in assenza di interazioni con altre cellule o microvescicole. In queste condizioni sperimentali è stato possibile osservare l'esistenza di un trasferimento diretto di TF da megacariociti ad una sottopopolazione di piastrine (20-30% dell'intera popolazione) dove contribuisce alla loro capacità di generare trombina. Di particolare interesse è il dato che la percentuale di piastrine rilasciate *in vitro* che esprimono TF è mol-

to simile alla quantità che si riscontra nel sangue di individui sani. Inoltre va sottolineato come il megacariocita trasferisca l'RNA messaggero che codifica per il TF (pre-mRNA e RNA maturo) ad una sottopopolazione di piastrine che esprime bassi livelli di TF proteina.

Questi dati sono particolarmente suggestivi e suggeriscono che un meccanismo finemente regolato è responsabile della presenza del TF esclusivamente in una sottopopolazione di piastrine. Tale meccanismo necessita, al momento, di ulteriori studi per approfondire quali vie molecolari siano coinvolte nella sua regolazione. Nel loro insieme queste osservazioni supportano il concetto che, in condizioni fisiologiche, i megacariociti sono programmati per rilasciare nel torrente sanguigno un numero ben definito di piastrine che esprimono TF e che assolvono al compito emostatico. L'aumento del numero di piastrine TF<sup>+</sup> documentato in condizioni patologiche,

come nel paziente con malattia coronarica, può essere il risultato di due diversi meccanismi. Da una parte lo stato infiammatorio e i fattori di rischio cardiovascolari possono direttamente agire a livello del midollo inducendo un aumento del numero dei megacariociti che esprimono TF con conseguente aumento delle piastrine TF<sup>+</sup> immesse in circolo. Dall'altra, considerando il potenziale biosintetico delle piastrine, è speculabile che la sottopopolazione piastrinica che ha ricevuto dai megacariociti l'RNA messaggero che codifica per il TF lo utilizzi per *de novo* sintesi proteica, aumentando di conseguenza il numero di piastrine TF<sup>+</sup> (Figura 2).

Sebbene siano necessari ulteriori studi per dimostrare queste ipotesi nel contesto della malattia coronarica, abbiamo recentemente osservato che in ratti ipertesi la percentuale di piastrine circolanti TF<sup>+</sup> è direttamente correlata alla pressione sanguigna ed è il risultato di un aumento

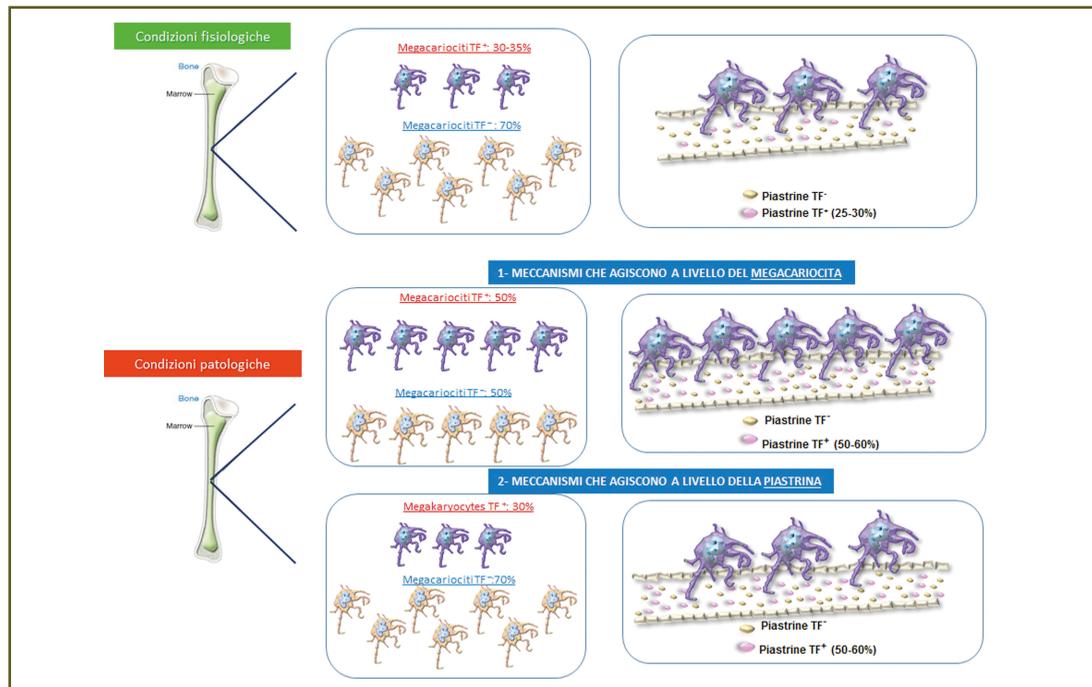


Figura 2 - Produzione di piastrine TF<sup>+</sup> in condizioni fisiologiche e patologiche. Vedi il testo per i dettagli.

del numero di megacariociti nel midollo osseo che esprimono TF e che rilasciano nel flusso sanguigno un numero maggiore di piastrine TF<sup>+</sup> (Brambilla M et al, manoscritto in revisione).

### **Eterogeneità piastrinica: la sottopopolazione emostatica**

I meccanismi molecolari alla base della eterogeneità piastrinica non sono stati ancora chiariti e saranno oggetto di intense ricerche nel prossimo futuro. La presenza in circolo di una frazione di piastrine che esprimono TF è solo un altro indizio che supporta il concetto della eterogeneità funzionale piastrinica ed in particolare dell'esistenza di una sottopopolazione con ruoli prevalentemente emostatici. Esso infatti si aggiunge ad altre due caratteristiche che le piastrine devono possedere per poter sostenere la funzione emostatica (capacità di esposizione in membrana, in seguito ad attivazione, di fosfatidilserina e di FV piastrinico) e che vengono qui brevemente discusse.

In condizioni di fisiologiche, di non attivazione, le membrane plasmatiche di tutte le cellule eucariotiche, e quindi anche delle piastrine, sono arricchite sul versante extracellulare di fosfolipidi contenenti colina, come sfingomieline e fosfatidilcolina, mentre la fosfatidilserina e la fosfatidiletanolamina sono localizzate sul versante citoplasmatico (30, 31). In questa conformazione, la membrana piastrinica fornisce una superficie non procoagulante (32). In seguito ad attivazione il meccanismo di flip-flop, catalizzato da specifiche traslocasi, permette l'arricchimento di fosfatidilserina sul versante extracellulare, conferendo alle piastrine la superficie procoagulante necessaria per l'assemblaggio e l'attivazione dei fattori della coagulazione (5, 33, 34). È importante sottolineare a

questo proposito che, quando le piastrine di soggetti sani vengono attivate con concentrazioni fisiologiche di agonisti come trombina o collagene, l'esposizione di fosfatidilserina si verifica solo in una frazione di piastrine attivate compresa tra il 4 e il 30%, al massimo, a seconda dell'agonista usato (35-37). Questi dati evidenziano chiaramente il fatto che solo una sottopopolazione di piastrine attivate è in grado di esporre la fosfatidilserina sulla superficie della membrana per sostenere il processo emostatico.

La generazione di trombina avviene ad opera del complesso protrombinasico, un complesso stechiometrico tra il FVa ed il FXa che, legandosi sulla superficie piastrinica ricca di fosfatidilserina in presenza di calcio, attiva la protrombina (38). Nel nostro sangue esistono due pool di FV: l'80% circola libero nel sangue, mentre il 20% è immagazzinato negli  $\alpha$  granuli piastrinici. Quest'ultimo deriva direttamente dai megacariociti che lo fagocitano e lo trasferiscono negli  $\alpha$  granuli che passeranno poi alle piastrine (39, 40). È stato calcolato che la concentrazione di FV piastrinico è di 100 volte superiore rispetto a quella plasmatica. La sua liberazione dagli  $\alpha$  granuli in seguito ad attivazione piastrinica fornirebbe pertanto una concentrazione locale di FV molto alta, cruciale per la generazione di attività protrombinasica (41). Nel 2010, Fager e colleghi hanno fornito l'evidenza che solo una frazione, ~30% delle piastrine attivate che esprimono P-selettina, esprimono anche FV e, nelle stesse condizioni sperimentali, solo una frazione di piastrine attivate legano il FXa. Questi dati sostengono il concetto secondo cui la capacità delle piastrine attivate di generare trombina tramite il complesso protrombinasico viene nuovamente definita solo da una sottopopolazione di piastrine (42).

Tutte queste osservazioni ottenute *in*

*vitro* concordano molto bene con dati ottenuti *in vivo* da Stalker e colleghi che hanno dimostrato come il grado di attivazione delle piastrine che costituiscono un tappo emostatico non sia uniforme (43). Esso infatti risulta costituito da un core centrale ricco di piastrine fortemente attivate, che esprimono P-selettina, fosfatidilserina e sono in grado di assemblare i fattori della coagulazione e di generare fibrina. Questo core è poi rivestito da uno strato di piastrine che non esprimono P-selettina e fosfatidilserina, e non sono in grado di sostenere la generazione di trombina e la formazione di fibrina. Studi dell'ultrastruttura di trombi eseguiti negli anni '60 con microscopia elettronica avevano già evidenziato la presenza di piastrine con diversi gradi di attivazione (44-46). Più recentemente Palmerini et al. ha confermato questi dati fornendo anche l'evidenza *in vivo* che non tutte le piastrine del trombo coronarico esprimono TF (47).

È interessante sottolineare che le piastrine che esprimono TF sono le stesse che esprimono P-selettina ed espongono il FV (21, 48). Globalmente questi dati sottolineano che la risposta piastrinica all'attivazione non è omogenea bensì eterogenea e danno ulteriore credito alla teoria, proposta dal gruppo di Nemerson 15 anni fa, secondo la quale il TF piastrinico, espresso da una sottopopolazione piastrinica, sia necessario e fondamentale per sostenere la fase di propagazione del trombo (15).

### **Piastrine: non solo emostasi, ma un ruolo chiave nell'insorgenza della placca aterosclerotica**

Uno degli eventi che si verificano in seguito ad attivazione piastrinica è il rilascio del contenuto dei granuli nello spazio extracellulare. Gli  $\alpha$  granuli contengono molecole di adesione, chemochine, cito-

chine, fattori della coagulazione e della fibrinolisi, fattori di crescita, etc. I granuli  $\delta$  contengono ioni calcio, magnesio, fosfato e pirofosfato, nonché ATP, GTP, ADP e il neurotrasmettitore serotonina. La secrezione dei granuli libera quindi mediatori trombo-infiammatori nel sito dell'attivazione piastrinica e provoca l'espressione di molecole di adesione, non normalmente espresse sulla superficie delle piastrine, che mediano interazioni omotipiche ed eterotipiche.

Gli studi degli ultimi 15-20 anni hanno documentato come le piastrine non siano solo coinvolte nel processo emostatico, ma attraverso il rilascio e anche la sintesi dei mediatori sopracitati esse prendano parte a numerosi altri processi che spaziano dall'integrità vascolare all'infiammazione, all'immunità, alla metastasi tumorale ecc. (Figura 3). Proprio in considerazione del fatto che l'aterotrombosi è una patologia infiammatoria, anche il contributo delle piastrine nell'eziopatogenesi della malattia è stato rivisto.

Numerosi dati sperimentali ottenuti con modelli animali supportano infatti il contributo della piastrina attivata e dei suoi mediatori al processo infiammatorio e all'insorgenza e crescita della placca aterosclerotica. Se si impedisce infatti l'adesione delle piastrine al vaso mediante l'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro la GpIb $\alpha$  oppure nel topo che non esprime il fattore von Willebrand la formazione e la progressione della lesione aterosclerotica è significativamente ridotta (49, 50). Al contrario, l'infusione cronica di piastrine attivate e di aggregati eterotipici piastrine-leucociti nel topo dislipidemico favorisce l'aterogenesi attraverso un meccanismo che è P-selettina dipendente (51). In linea con queste evidenze sono anche i dati ottenuti utilizzando topi transgenici in cui piastrine non esprimono JAM-A. JAM-

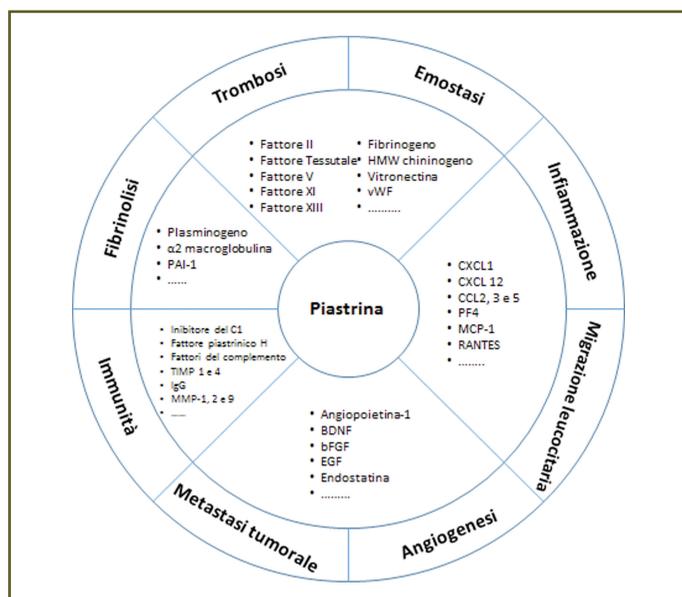
A è un regolatore negativo dell'attivazione piastrinica. Se JAM-A non è espresso (o è inibito) le piastrine sono iper-reattive, aderiscono maggiormente al collagene e se i topi vengono alimentati con dieta ateroge-

na lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche è maggiore rispetto ai topi che esprimono JAM-A (52).

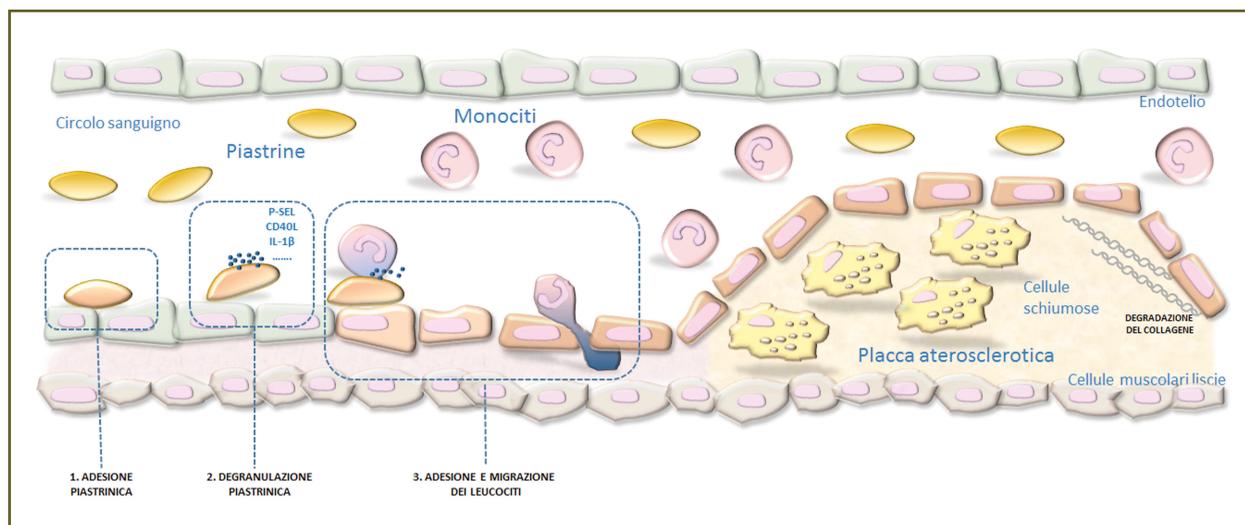
Nei conigli ipercolesterolemici e nei topi ApoE<sup>-/-</sup>, la microscopia intravitale ha dimostrato che le piastrine attivate aderiscono al sito delle lesioni aterosclerotiche prima che queste ultime siano rilevabili (49, 53).

Infine, studi in un modello di animale di aterosclerosi accelerata hanno dimostrato che il trattamento precoce con una tienopiridina, che blocca il recettore dell'ADP sulle piastrine, può ridurre la dimensione delle placche fino al 48% e migliorare la stabilità delle lesioni aterosclerotiche aumentando la percentuale di placca fibrosa del 31% (54).

È sulla base di tutte queste evidenze sperimentali che si è formulata la teoria che le piastrine forniscono la base infiammatoria necessaria per la formazione della placca aterosclerotica. Le piastrine quindi insieme all'endotelio attivato mediano il reclutamento delle cellule infiammatorie portando alla formazione e progressione della placca (Figura 4).



**Figura 3 - Eterogeneità funzionale piastrinica.** Elenco non esaustivo dei processi fisiopatologici in cui le piastrine sono coinvolte mediante il rilascio di numerosi mediatori.



**Figura 4 - Contributo piastrinico nell'insorgenza e progressione della placca aterosclerotica.** L'attivazione piastrinica determina il rilascio di mediatori infiammatori e chemiotattici che contribuiscono alla perturbazione endoteliale ed al reclutamento dei monociti circolanti.

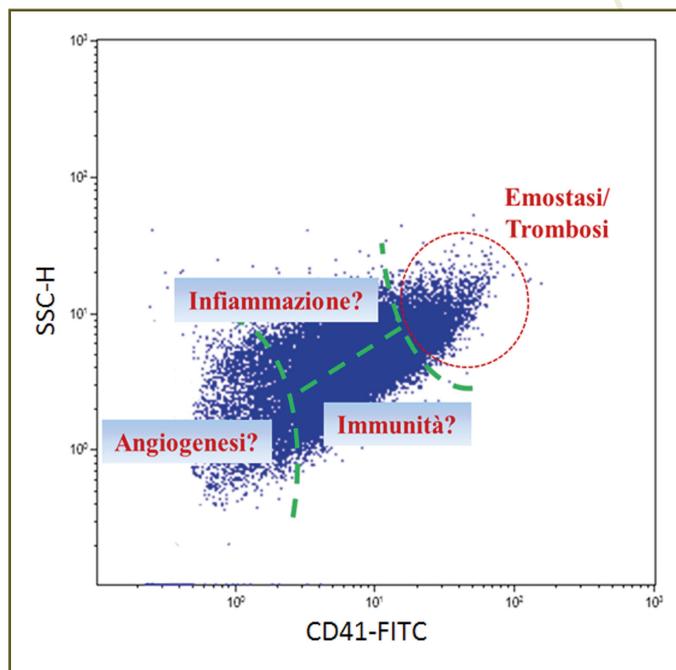
## Conclusioni e prospettive

Le ricerche degli ultimi 20 anni hanno profondamente cambiato la nostra visione delle caratteristiche e delle funzioni svolte dalle piastrine.

Oggi sappiamo che queste cellule non sono fondamentali solo nell'emostasi o nella trombosi, ma sono coinvolte in numerose altre funzioni. Sappiamo che hanno un trascrittoma, che deriva dai loro precursori, che può essere utilizzato per fare sintesi proteica e quindi hanno la possibilità di cambiare il loro proteoma in base alle circostanze fisiopatologiche e agli stimoli a cui sono sottoposte.

Gli studi che hanno portato all'identificazione del TF nelle piastrine supportano anche il concetto che, verosimilmente, l'eterogeneità funzionale è il risultato di un'eterogeneità fenotipica, ossia della presenza - all'interno dell'apparente omogenea nuvola piastrinica - di sottopopolazioni diverse, dotate *ab origine* di trascrittori e proteomi diversi proprio per assolvere le diverse funzioni (Figura 5).

La sfida del prossimo futuro sarà quella di analizzare queste sottopopolazioni per definire il loro peso relativo all'interno dell'intera popolazione piastrinica sia in condizioni fisiologiche che patologiche.



**Figura 5** - Eterogeneità fenotipica delle piastrine. La “nuvola” piastrinica, apparentemente omogenea quando osservata al citofluorimetro, racchiude al suo interno sottopopolazioni dotate di trascrittori e proteomi specifici per svolgere funzioni differenti.

Non è da escludere infine che le informazioni che si otterranno con questo approccio possano portare all'identificazione di nuovi bersagli farmacologici o ad un uso ottimizzato degli attuali farmaci antiplastrinici al fine di meglio controllare il rischio emorragico.

### RIASSUNTO

Le piastrine sono elementi cellulari anucleati che derivano dalla frammentazione dei megacariociti siti nel midollo osseo. Il ruolo svolto dalle piastrine nel processo emostatico e trombotico è noto da tempo ed è stato ampiamente studiato. Recentemente tuttavia esso è stato rivisto alla luce del fatto che una sottopopolazione di piastrine esprime Fattore Tessutale. Questa caratteristica da una parte conferisce alle piastrine un ruolo attivo nell'innesco e nel controllo della coagulazione e dall'altra supporta il concetto dell'eterogeneità funzionale delle piastrine. Esse infatti non svolgono solamente la funzione emostatica, ma prendono parte attiva in numerose altre funzioni che spaziano dai processi infiammatori a quelli immunitari, angiogenetici, ecc. In linea con la nuova visione delle funzioni svolte dalle piastrine, anche il ruolo di queste cellule nella patologia aterotrombotica non è più confinato alla formazione del trombo, ma si estende alle fasi iniziali di formazione della placca aterosclerotica.

**Parole chiave:** piastrine; fattore tessutale; aterotrombosi; megacariociti.

## Bibliografia

- Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weismann D, et al. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood*. 2003; 101: 2285-2293.
- Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, Elstad MR, et al. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 5556-6551.
- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*. 2001; 154: 485-490.
- Evangelista V, Manarini S, Di Santo A, Capone ML, et al. De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res*. 2006; 98: 593-595.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 381-389.
- Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J*. 1995; 9: 883-9.
- Tremoli E, Camera M, Toschi V, Colli S. Tissue factor in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999; 144: 273-283.
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 2311-2315.
- Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7: 273-277.
- Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, et al. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1997; 134: 253-259.
- Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, et al. Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1998; 91: 4216-4223.
- Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Aoi K, et al. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 1998; 26: 2005-2009.
- Asakura H, Kamikubo Y, Goto A, Shiratori Y, et al. Role of tissue factor in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*. 1995; 80: 217-224.
- Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*. 2000; 96: 170-175.
- Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med*. 2000; 10: 139-143.
- Zillmann A, Luthe T, Muller I, Kotsch M, et al., Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281: 603-609.
- Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, et al. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets*. 2002; 13: 247-253.
- Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, et al. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1690-1696.
- Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J*. 2003; 17: 476-478.
- Camera M, Brambilla M, Toschi V, Tremoli E. Tissue factor expression on platelets is a dynamic event. *Blood*. 2010; 116: 5076-5077.
- Camera M, Brambilla M, Boselli D, Facchinetti L, et al. Response: Functionally active platelets do express tissue factor. *Blood*. 2012; 119: 4339-4341.
- Brambilla M, Camera M, Colnago D, Marenzi G, et al. Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte aggregates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 947-953.
- Schwartz H., Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006; 203: 2433-2440.
- Panes O, Matus V, Saez CG, Quiroga T, et al. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*. 2007; 109: 5242-5250.
- Gerrits AJ, Koekman CA, van Haeften TW, Akkerman JW. Platelet tissue factor synthesis in type 2 diabetic patients is resistant to inhibition by insulin. *Diabetes*. 2010; 59: 1487-1495.
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and 7inflammatory molecules. *Exp Hematol*. 2007; 35: 702-711.
- Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, et al. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thromb Res*. 2008; 122: 604-9.
- Camera M, Brambilla M, Facchinetti L, Canzano P, et al. Tissue factor and atherosclerosis: not only vessel wall-derived TF, but also platelet-associated TF. *Thromb Res*. 2012; 129: 279-284.
- Brambilla M, Facchinetti L, Canzano P, Rossetti L, et al. Human megakaryocytes confer tissue factor to a subset of shed platelets to stimulate

- thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2015; 114: 579-592.
30. van Meer G, Voelke DR, GW Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 112-124.
  31. Lhermusier T, Chap H, Payrastra B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost.* 2011; 9: 1883-1891.
  32. Zwaal RF, Comfurius P, van Deenen LL. Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature.* 1977; 268: 358-360.
  33. Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HC, et al. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem.* 1982; 122: 429-436.
  34. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal, RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta.* 1983; 736: 57-66.
  35. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, et al. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood.* 1993; 81: 2554-2565.
  36. London FS, Marcinkiewicz M, Walsh PN. A subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. *J Biol Chem.* 2004. 279: 19854-1989.
  37. Wolfs JL, Comfurius P, Rasmussen JT, Keuren JF, et al. Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 1514-1525.
  38. Kalafatis M, Egan JO, van 't Veer C, Cawthern KM, et al. The regulation of clotting factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1997; 7: 241-280.
  39. Bouchard BA, Williams JL, Meisler NT, Long MW, et al. Endocytosis of plasma-derived factor V by megakaryocytes occurs via a clathrin-dependent, specific membrane binding event. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 541-551.
  40. Gould WR, Simioni P, Silveira JR, Tormene D, et al. Megakaryocytes endocytose and subsequently modify human factor V in vivo to form the entire pool of a unique platelet-derived cofactor. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 450-456.
  41. Weiss HJ, Lages B, Zheng S, Hayward CP. Platelet factor V New York: a defect in factor V distinct from that in factor V Quebec resulting in impaired prothrombinase generation. *Am J Hematol.* 2001; 66: 130-139.
  42. Fager AM, Wood JP, Bouchard BA, Feng P, et al. Properties of procoagulant platelets: defining and characterizing the subpopulation binding a functional prothrombinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 2400-2407.
  43. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood.* 2013; 121: 1875-1885.
  44. Jorgensen L, Rowsell HC, Hovig T, Mustard JF. Resolution and organization of platelet-rich mural thrombi in carotid arteries of swine. *Am J Pathol.* 1967; 51: 681-719.
  45. Stehbens WE, Biscoe TJ. The ultrastructure of early platelet aggregation in vivo. *Am J Pathol.* 1967; 50: 219-243.
  46. White JG. Platelet structural physiology: the ultrastructure of adhesion, secretion, and aggregation in arterial thrombosis. *Cardiovasc Clin.* 1987; 18: 13-33.
  47. Palmerini T, Tomasi L, Barozzi C, Della Riva D, et al. Detection of tissue factor antigen and coagulation activity in coronary artery thrombi isolated from patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *PLoS One.* 2013; 8: e81501.
  48. Camera M, Toschi V, Brambilla M, Lettino M, et al. The Role of Tissue Factor in Atherothrombosis and Coronary Artery Disease: Insights into Platelet Tissue Factor. *Semin Thromb Hemost.* 2015; 41: 737-746.
  49. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002; 196: 887-896.
  50. Methia N, Andre P, Denis CV, Economopoulos M, et al. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood.* 2001; 98: 1424-1428.
  51. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003; 9: 61-67.
  52. Karshovska E, Zhao Z, Blanchet X, Schmitt MM, et al. Hyperreactivity of junctional adhesion molecule A-deficient platelets accelerates atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Circ Res.* 2015; 116: 587-599.
  53. Theilmeyer G, Michiels C, Spaepen E, Vreys I, et al. Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood.* 2002; 99: 4486-4493.
  54. Afek A, Kogan E, Maysel-Auslender S, Mor A, et al. Clopidogrel attenuates atheroma formation and induces a stable plaque phenotype in apolipoprotein E knockout mice. *Microvasc Res.* 2009; 77: 364-369.