

Rola czynnika tkankowego i jego inhibitora w procesie krzepnięcia krwi oraz w powikłaniach zakrzepowych

The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in blood coagulation and in thrombotic complications

Maria Kotschy, Daniel Kotschy, Wojciech Witkiewicz

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy, Oddział Angiologiczny, Wrocław

CZYNNIK TKANKOWY

Właściwości czynnika tkankowego i udział w procesie krzepnięcia krwi

Czynnik tkankowy (TF, *tissue factor*) jest znany od dawna jako tromboplastyna tkankowa i III czynnik krzepnięcia krwi. Tkankami bogatymi w TF są mózgowie, płuca, łożysko, a także płyn owodniowy i niektóre tkanki nowotworowe (np. raka piersi i *melanoma*). Broze i wsp. [1] po raz pierwszy oczyścili TF z ludzkiego mózgowia. Czynnik tkankowy jest białkiem o masie cząsteczkowej 47 kDa, którego gen znajduje się w 1. chromosomie i obejmuje 6 eksonów [2]. W ścianie naczyń TF występuje w komórkach endotelialnych i subendotelialnych, czyli w komórkach mięśni gładkich naczyń, których uszkodzenie powoduje odsłonięcie TF. W przeciwieństwie do komórek mięśni gładkich, komórki śródbłonna i monocyty w warunkach fizjologicznych nie wykazują lub wykazują śladową ekspresję TF. Nie dochodzi zatem do kontaktu komórkowego TF z krążącą krwią i do aktywacji procesu krzepnięcia. Dopiero w odpowiedzi na różne bodźce, np. cytokiny i mediatory zapalenia, mogą występować w tych komórkach ekspresja i aktywność TF. Czynnik tkankowy jest komórkowym receptorem osoczowego czynnika VII. Kaskada krzepnięcia krwi w torze zewnątrzpochnym rozpoczyna się z chwilą zetknięcia się komórkowego TF z krążącym osoczowym czynnikiem VII, który przekształcony do postaci aktywnej VIIa tworzy z TF kompleks TF/VIIa aktywujący czynniki krzepnięcia IX i X. Czynnik Xa z udziałem czynnika V i jonów wapnia katalizuje konwersję protrombiny do trombiny, która wykrzepia fibrynogen do fibryny i prowadzi do wytworzenia zakrzepu [3, 4]. Ilustruje to rycina 1.

Udział czynnika tkankowego w niektórych innych procesach biologicznych

Czynnik tkankowy uczestniczy również w stanach zapalnych i procesach związanych z proliferacją i migracją komórek śródbłonna oraz mięśni gładkich naczyń. Jest on także odpowiedzialny za neowaskularyzację nowotworów i tworzenie przerzutów. Komórki nowotworowe wytwarzają w sposób ciągły i niekontrolowany duże ilości TF, co wiąże się z ich rozprzestrzenianiem się oraz częstym powstawaniem powikłań zakrzepowo-zatorowych [5]. Czynnik tkankowy jest białkiem transbłonowym i w jego strukturze wyodrębniono 3 części:

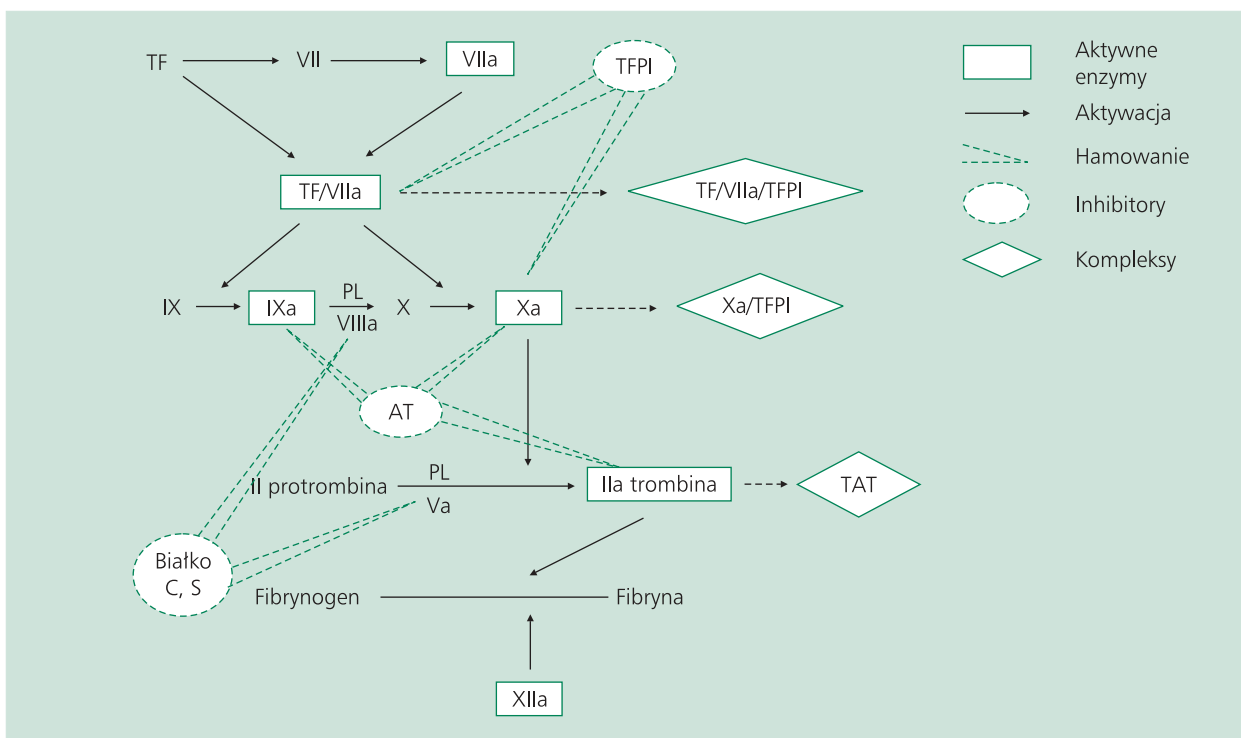
- wewnątrzkomórkową (podbłonową), zawierającą 21 aminokwasów;
- przezbłonową, zawierającą 23 aminokwasów;
- nadbłonową (najdłuższą), zawierającą 219 aminokwasów, która może zostać oddzielona od komórki i przechodzić do krwi i płynów ustrojowych. W części nadbłonowej występuje fragment łańcucha zbudowanego z dwóch domen fibronektyny połączonych ze sobą koniec do końca. W cząsteczce TF występują dwa mostki siarczkowe w pozycjach 49–57 oraz 186–209 [6].

Prawidłowy śródbłonek naczyń nie udostępnia TF. Wytwarzanie TF w komórkach śródbłonna naczyń jest indukowane przez liczne cytokiny (TNF α , interleukinę 1 β , ligand CD-40), biogenne aminy (serotoninę, histaminę) oraz inne mediatory (np. trombinę, utlenione LDL lub VEGF). Prawdopodobnie TF pobudza wzrost śródbłonna za pośrednictwem naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Mechanizm współdziałania TF i VEGF mimo prowadzonych badań nie jest dokładnie poznany.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Maria Kotschy, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy, Oddział Angiologiczny, ul. H.M. Kamińskiego 73a, 51–124 Wrocław, tel: +48 71 327 04 56, e-mail: obr@wssk.wroc.pl

Praca wpłynęła: 03.02.2010 r. Zaakceptowana do druku: 10.02.2010 r.



Rycina 1. Udział czynnika tkankowego i jego inhibitora w procesie krzepnięcia krwi

Wiadomo jednak, że niekiedy podczas mutacji genu TF dochodzi do powstania nieprawidłowego czynnika VEGF. Rozwój embrionalnych naczyń krwionośnych także zależy od TF. Stężenie białka TF syntetyzowanego w komórkach naczyń nie zawsze koreluje z aktywnością TF, prawdopodobnie jest to związane z równoczesną syntezą TFPI (inhibitora TF; *tissue factor pathway inhibitor*) przez komórki śródbłonna [7, 8]. W błonie środkowej prawidłowych tętnic, podobnie jak w hodowlach komórek mięśni gładkich naczyń, nie znajdowano lub znaleziono śladowe ilości TF. Stymulacja tych komórek cytokinami i różnymi zapalnymi mediatorami (podobnie jak komórek śródbłonna) zwiększa nieco ekspresję TF, jednak znacznie słabiej niż w komórkach śródbłonna i monocytach. Występowanie TF stwierdzono także w nabłonku pęcherzyków płucnych. Monocyty i makrofagi nie wykazują także lub wykazują śladową ekspresję TF, która zwiększa się znacznie pod wpływem bodźców towarzyszących zapaleniom, np. pod wpływem reaktywnego białka C i innych. Limfocyty T pomocnicze typu 1 nie wykazują ekspresji TF, ale wydzielając prozapalne mediatory, zwiększają ekspresję TF w układzie monocytów/makrofagów, a cytokiny z limfocytów T typu 2 hamują ten efekt. Obecność czynnika tkankowego, który nie zawsze jest wykrywalny w komórkach naczyń czy leukocytach, może być wykazana we krwi. Określa się go jako TF krążący (*circulating*), rozpuszczalny (*soluble*) lub „powstały we krwi” (*blood borne TF*). Ta postać TF jest głównie związana z mikrocząsteczkami pochodzącymi z komórek śródbłonna, mięśni gładkich naczyń, leukocytów czy płytek krwi, ale również ze złożeń miazdy-

cowych. Ponieważ nie wykazano obecności TF w megakariocytach szpiku (komórki macierzyste płytek), sądzi się, że TF płytek pochodzi z monocytów. Natomiast aktywne płytki krwi zawierające TF indukują ekspresję TF w ludzkich komórkach śródbłonna i mięśni za pośrednictwem uwalniania rozpuszczalnych mediatorów, takich jak serotonina i płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, *platelet derived growth factor*) [8–10].

Stężenie czynnika tkankowego we krwi oraz jego udział w patogenezie niektórych chorób i ich powikłań

W 2008 roku Parhami-Seren i wsp. [11] oceniali obecność i stężenie TF w różnych materiałach biologicznych: w osoczu lub surowicy krwi, a także w łożysku, lizatach komórkowych, błonach komórkowych i w preparatach rekombinowanego czynnika tkankowego przy użyciu różnych metod: immunoenzymatycznej, fluorescencyjnej, immunoblotingu i cytometrii przepływowej. Producent testu „Imubind TF ELISA KIT” American Diagnostica nie podaje norm laboratoryjnych w celu oceny stężenia TF, ale zaleca tworzenie własnych grup kontrolnych. W publikacjach z lat 1995–2003 podano stężenia TF od 61 ± 59 pg/ml do $187,3 \pm 103,7$ pg/ml. Najczęściej powtarzają się wartości około 140 pg/ml z rozrzutem 18–290 pg/ml [11]. Uszyński i wsp. [12] zbadali stężenia TF i TFPI w osoczu krwi kobiet ciężarnych, w płynie owodniowym oraz tkance mięśnia macicy i łożyska.

Czynnik tkankowy odgrywa ważną rolę w patogenezie wielu schorzeń, zwłaszcza w chorobach sercowo-naczynio-

wych i nowotworowych. Szczegółowe dane dotyczące układu sercowo-naczyniowego opisali w 2006 roku Steffel i wsp. [7]. Poglądy te pochodzą zarówno z badań doświadczalnych w hodowlach komórkowych, jak i z badań przeprowadzonych na zwierzętach (szczególnie szczurach i królikach), a także z obserwacji klinicznych. Wszystkie najważniejsze czynniki ryzyka miażdżycy tętnic, takie jak: nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia, cukrzyca i palenie tytoniu, podwyższają stężenie TF we krwi pacjentów [8]. Antygen osocznego TF u osób z nadciśnieniem tętniczym jest znacznie wyższy w porównaniu z osobami z prawidłowym ciśnieniem, a różne leki przeciw nadciśnieniu wyraźnie obniżają stężenie TF [13]. Angiotensyna II oraz wysokie stężenia utlenowanych LDL wywołują ekspresję TF w hodowlach komórkowych śródbłonka, mięśni gładkich naczyń oraz w izolowanych monocytach [14]. Również w cukrzycy TF jest znacznie podwyższony, a wyrównanie glikemii normalizuje jego stężenie [15]. Także statyny stosowane w hiperlipidemiach redukują podwyższone stężenie TF [16]. Czynniki tkankowy odgrywa zasadniczą rolę w patogenezie miażdżycy tętnic, w której uczestniczy TF monocytów/makrofagów i komórek piankowatych, a następnie TF komórek śródbłonka i mięśni gładkich naczyń indukowanych zapalnymi cytokinami. Dlatego też stężenia TF w blaszkach miażdżycowych, zarówno tętnic wieńcowych, jak i szyjnych, są duże w porównaniu z jego zawartością w osoczu krwi pacjentów z ewidentną miażdżycą tętnic [17, 18]. Leki przeciwplatekcyjne, szczególnie klopidoogrel, zmniejszają ekspresję TF w komórkach naczyń oraz stężenie TF we krwi [19]. Natomiast leczenie doustnymi antykoagulantami typu warfaryny zwiększa stężenie TF we krwi chorych leczonych z powodu zawału serca. Efekt ten tłumaczy się brakiem zużycia TF podczas zahamowania tworzenia zakrzepów w naczyniach [20]. Endotoksyny zwiększają ekspresję TF, która wyraźnie się obniża po zastosowaniu simwastyny i leków przeciwpalnych. Również zabiegi interwencyjne w zawałach serca, jak transluminalna wieńcowa angioplastyka lub implantacja stentów, wpływają na zmniejszenie stężenia rozpuszczalnego TF. Natomiast wzrost jego stężenia we krwi po zabiegach może być markerem restenozы tętnic [21]. Do czynników powodujących neutralizację zwiększonej aktywności TF należą inhibitory hamujące aktywność czynnika VIIa, rekombinowany TFPI, rekombinowany NAPc2 (*nematode anticoagulant protein c2*) — wyodrębniony ze ślinianki nicienia „hookworm” [23].

INHIBITOR ZALEŻNEJ OD CZYNNIKA TKANKOWEGO DROGI KRZEPNIĘCIA

Budowa i występowanie TFPI

Inhibitor TF został po raz pierwszy wyizolowany z hodowli linii nowotworowej hepatocytów (Hep G2) [24], natomiast Wun i wsp. w 1988 roku [25] opisali jego budowę. Jest on glikoproteiną o masie cząsteczkowej 34–40 kD, co wiąże się z rodzajem lipoprotein, z którymi jest połączony. Inhibitor TF o najmniejszej cząsteczce związanej z LDL składa się

z 276 aminokwasów. Należy do dużej rodziny białkowych inhibitorów typu Kunitza [25].

W rekombinowanym TFPI można wyróżnić 3 domeny:

- k-1 — bliższa końcowi anionowemu, hamuje aktywny czynnik VII (VIIa), tworząc kompleks TF/VIIa/TFPI zależnie od obecności wapnia;
- k-2 — hamuje aktywny czynnik X (Xa), tworząc z nim kompleks Xa/TFPI niezależnie od obecności wapnia;
- k-3 — bierze udział w wiązaniu TFPI z lipoproteinami osocza [25].

Największa ilość TFPI występuje w śródbłonku naczyń (50–80% puli naczyniowej). Około 10% TFPI występuje w płytkach krwi, które go uwalniają po aktywacji trombiną. Około 10–50% TFPI jest związane z lipoproteinami osocza [26, 27]. Poza komórkami śródbłonka naczyń TFPI może być syntetyzowany przez pobudzone fibroblasty, monocyty i megakariocyty.

Hamowanie TFPI w procesie krzepnięcia krwi i proliferacji komórek śródbłonka

Działania hamujące proces krzepnięcia krwi przez TFPI polega na odwracalnym hamowaniu czynnika Xa i utworzeniu kompleksu Xa/TFPI, który następnie hamuje kompleks TF/VIIa. Inhibitor TF odgrywa zatem w procesie krzepnięcia rolę podwójnego inhibitora czynnika Xa i kompleksu TF/VIIa. Jest on jedynym inhibitorem działającym we wstępnej fazie krzepnięcia krwi niedopuszczającym do wytworzenia trombiny. Według American Diagnostica, producenta testu „Imubind Total TFPI ELISA”, stężenie TFPI we krwi osób zdrowych wynosi 75–125 ng/ml (śr. 89,5 ± 22,3). W warunkach klinicznych TFPI zapobiega inicjowanej przez TF zakrzepicy i okluzji naczyń w przebiegu chorób zapalnych, posocznicy i stanach odrzucania przeszczepów. Działa korzystnie w zespole wewnątrznaczyniowego wykrzepiania (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) [25–27]. Odgrywa również zasadniczą rolę w regulacji czynności komórek śródbłonka naczyń, a mianowicie hamuje ich proliferację. Jest głównie związany z powierzchnią endotelium i może być markerem jego dysfunkcji. Gen TFPI-1 zlokalizowany w chromosomie 2q31–q32 składa się z 9 eksonów. Podobny gen nazwany TFPI-2 zlokalizowano w chromosomie 7q22, którego produkt poza aktywnością TFPI ma własności pobudzania wzrostu komórek pigmentowych siatkówki oka. Opisano 4 polimorfizmy genu TFPI. Uszkodzenie genu TFPI powoduje u myszy wewnątrzmaciczną śmierć płodu [28, 29]. Stężenie TFPI wzrasta po posiłkach, a heparyna podawana dożylnie jest czynnikiem uwalniającym TFPI ze ściany naczyń i zwiększającym jego stężenie we krwi 3–10-krotnie [30].

Stężenie TFPI w stanach fizjologicznych i niektórych chorobach

Niskie stężenie TFPI we krwi jest czynnikiem ryzyka dla powstania zakrzepicy w różnych chorobach. Białko C stymuluje hamowanie przez TFPI czynnika tkankowego. Aktywność

Tabela 1. Charakterystyka czynnika tkankowego i jego inhibitora

	Czynnik tkankowy	Inhibitor czynnika tkankowego
Występowanie	Komórki śródbłonka i mięśni gładkich naczyń, monocyty/makrofagi, krew, komórki nowotworowe	Komórki śródbłonka, monocyty, fibroblasty, megakariocyty, krew
Pobudzenie syntezy i uwalniania	Uszkodzenie komórek; cytokiny i mediatory zapalenia	Trombina, heparyna
Występowanie genu	Chromosom 1. (obejmuje 6 eksonów)	Chromosom 2. (obejmuje 9 eksonów)
Masa cząsteczkowa	47 kD	34–40 kD, w zależności od lipoprotein, z którymi jest połączony
Działanie w krzepnięciu krwi	Aktywacja czynnika VIIa i tworzenie kompleksu TF/VIIa, który aktywuje czynniki IX i X, inicjuje zakrzepicę	Hamuje czynnik X i kompleks TF/VIIa, nie dopuszcza do generacji trombiny, zapobiega zakrzepicy
Inne działania biologiczne	Pobudza proliferację i migrację komórek śródbłonka i mięśni gładkich naczyń, bierze udział w zapaleniach i neowaskularyzacji nowotworów	Hamuje proliferację komórek śródbłonka, zapobiega zakrzepicy i reokluzji naczyń w przebiegu chorób zapalnych, posocznicy i w odrzuceniu przeszczepów
Stężenia we krwi ludzi zdrowych	Okolo 140 (18–290) pg/ml	Okolo 89,5 ± 22,3 (75–125) ng/ml
Preparaty do oznaczania stężenia	Imubind Tissue Factor ELISA KIT American Diagnostica	Imubind Total TFPI ELISA KIT American Diagnostica
Czynniki ryzyka zakrzepicy	Wysokie stężenia	Niskie stężenia

TFPI jest zmniejszona w niedoborach białka C i S. Inhibitor TF wiąże się z płytkową trombospondyną i jest rozkładany przez trombinę, leukocyтарne proteazy i metaloproteinazy w macierzy komórkowej. Inhibitor ten wykryto w komórkach trofoblastu, ludzkich płodach, w tkance łożyska, mięśni macicy, płynie owodniowym oraz w osoczu krwi kobiet rodzących [12, 31]. Jego obecność stwierdzono także we krwi osób chorych na miażdżycę oraz w prawidłowych i zmienionych miażdżycowo tętnicach [18, 32–34]. Inhibitor TF hamuje również syntezę czynnika martwicy nowotworów (TNF α , *tumor necrosis factor α*) przez monocyty. Opisano także występowanie TFPI w makrofagach pęcherzyków płucnych, w zespole ARDS (*adult respiratory distress syndrome*) [35]. Krew noworodków zawiera 40–50% TFPI znajdującego się we krwi osób dorosłych. W 2001 roku Radziwon i wsp. [34] wykazali w osoczu krwi 100 zdrowych osób podobne wartości dla aktywności i całkowitego stężenia TFPI. Autorzy ci nie wykazali zależności stężenia TFPI od płci, wieku i palenia tytoniu. Zaobserwowali natomiast, że rekombinowany TFPI (rTFPI) hamuje *in vitro* aPTT, PT i generację trombiny [34]. W miażdżycowo zmienionych tętnicach mRNA TFPI występuje często wraz z TF w komórkach śródbłonka pokrywających blaszkę miażdżycową, w mikronaczyńkach, w błonie środkowej, w komórkach mięśni gładkich oraz w makrofagach otaczających martwiczy środek blaszki. Radziwon i wsp. [34] stwierdzili we krwi chorych na zarostową miażdżycę tętnic kończyn dolnych, chorobę Buergera i hiperlipidemię podwyższone stężenia TFPI. Podwyższone stężenia TFPI występują często w chorobach, w których nadkrzepliwości krwi towarzyszą zespoły DIC z wysokimi stężeniami kompleksów trombina–antytrombina (TAT) i d-dimerów. U osób z zaawan-

sowanymi nowotworami złośliwymi jelita grubego, trzustki, żołądka, sutka i gruczołu krokowego opisano zwiększone stężenie TFPI. Inhibitor ten nie jest jednak wytwarzany przez komórki nowotworowe tak jak TF, ale powstaje głównie w śródbłonku małych naczyń krwionośnych [36, 37]. Wyższe stężenie TFPI występuje także w cukrzycy typu 1 oraz w chorobie niedokrwiennej serca [38, 39]. Obniżoną zawartość TFPI zaobserwowano natomiast w chorobach wątroby oraz u kobiet przyjmujących doustne środki antykoncepcyjne [40]. Podwyższone stężenia TFPI opisano u dzieci z meningokokowym zapaleniem mózgu, nerczycą i u chorych z przewlekłym zapaleniem kłębków nerkowych, z uogólnionym tocznieniem rumieniowatym, a także w chorobie Alzheimera [41–43]. Istnieją duże możliwości terapeutyczne stosowania rekombinowanego rTFPI — w powikłaniach zakrzepowo-zatorowych, szczególnie w chorobach układu sercowo-naczyniowego i nowotworach (tab. 1) [44].

Praca zrealizowana w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu w ramach projektu „WROVASC — Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej”, finansowanego w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego oraz z budżetu państwa — Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 2007–2013 1.1.

Piśmiennictwo

1. Broze GJ, Leykam JE, Schwartz BD, Miletich JP. Purification of human brain tissue factor. *J Biol Chem*, 1985; 260: 10917–10920.
2. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry*, 1989; 28: 1755–1762.

3. Nemerson Y, Luther T, Kotzchy M, Müller M. Tissue factor: then and now. *Thromb Haemost*, 1995; 74: 180–184.
4. Naumnik B, Małyżko J, Myśliwiec M. Rola czynnika tkankowego i jego inhibitora w hemostazie. *Przegl Lek*, 1998; 55: 68–73.
5. Gouin-Thibault I, Achkar A, Samama MM. The thrombophilic state in cancer patients. *Acta Haematol*, 2001; 106: 33–42.
6. Müller Y, Ultsch M, Kelly RF, de Vos AM. Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry*, 1994; 33: 10864–10867.
7. Steffel J, Thomas F, Lüscher MD, Felix C, Tanner MD. Tissue factor in cardiovascular diseases. *Circulation*, 2006; 113: 722–731.
8. Carmeliet P, Mackman N, Moons L et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*, 1996; 383: 73–75.
9. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B et al. Blood borne tissue factor, another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 2311–2315.
10. Sztowski B, Antoniak S, Poller W et al. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Cir Res*, 2005; 96: 1233–1239.
11. Parhami-Seren B, Butenas J, Krudysz-Amblo J, Mann KG. Immunologic quantitation of tissue factors. *Thromb Haemost*, 2006; 4: 1749–1755.
12. Uszyński M, Żekanowska E, Uszyński W, Kuczyński J. Tissue factor (TF) and tissue pathway inhibitor (TFPI) in amniotic fluid and blood plasma, implication for the mechanism of amniotic fluid embolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001; 95: 163–166.
13. Felmelden DC, Spencer CG, Clung NA et al. Relation of thrombogenesis in systematic hypertension to angiogenesis and endothelial damage (dysfunction) a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Cardiol*, 2003; 92: 400–405.
14. He M., He X., Xie Q, Chen F, He S. Angiotensin II induced the expression of tissue factor and its mechanisms in human monocytes. *Thromb Res*, 2005; 4: 33–36.
15. Lim HS, Blann AD, Lip GY. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin 6 and tissue factor in diabetes mellitus, relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation*, 2004; 109: 2524–2528.
16. Eto M, Kozai T, Cosentino F et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells; role of Rho/Rho-kinase and akt pathway. *Circulation*, 2002; 105: 1756–1759.
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: 619–622.
18. Migdalski A, Kotschy M, Jawień A. Tissue factor, tissue pathway inhibitor and vascular endothelial growth factor in carotid atherosclerotic plaques. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005; 30: 41–47.
19. Molero L, Lopez-Farre A, Mateos-Caceres PJ et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. *Br J Pharmacol*, 2005; 146: 419–424.
20. Seljeflot I, Hurten M, Arnesen H. Increased level of soluble tissue factor during longterm treatment with warfarin patients after an acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 2004; 2: 726–730.
21. Tutar E, Oscan M, Kilicap M et al. Elevated whole blood tissue factor procoagulant activity as a marker of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and stent implantation. *Circulation*, 2003; 108: 1581–1584.
22. Crillo P, Galino P, Ragni M et al. Long-lasting antithrombotic effects of a single dose of human recombinant active site-blocked factor VII, insights into possible mechanism of action. *Thromb Haemost*, 2003; 1: 992–998.
23. Moons AH, Peters RJ, Bijsterveld NR et al. Recombinant nematode anticoagulant protein c2, an inhibitor of the tissue factor/factor VIIa complex in patients undergoing elective coronary angioplasty. *Am Coll Cardiovasc*, 2003; 41: 2147–2153.
24. Broze GJ Jr., Miletich JP. Isolation of the tissue factor inhibitor produced by HepG2 hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 1886–1890.
25. Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ et al. Cloning and characterization of cDNA coding for the lipoprotein associated inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz type inhibitory domains. *J Biol Chem*, 1988; 263: 6001–6004.
26. Rucińska M, Gacko M, Skrzydlewski Z. Inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia krwi (TFPI) i jego znaczenie w patologii. *Post Hig Med Dośw*, 1997; 51: 421–430.
27. Witt I. Tissue factor pathway inhibitor biochemistry molecular biology, physiology and pathophysiology. *Haemostaseologie*, 2002; 22: 30–35.
28. Girard TJ, Eddy R, Wesserschmidt RL et al. Structure of the human lipoprotein-associated coagulation inhibitor gene. Intro/ex on gene organization and localization of the gene to chromosome 2. *J Biol Chem*, 1991; 263: 6001–6004.
29. Sayer MS, Cole VJ, Baker R, Staton JM. Polymorphism in the tissue factor pathway inhibitor gene are not associated with ischemic stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007; 18: 703–708.
30. Gori AM, Pepe G, Attanasio M et al. Tissue factor reduction and tissue factor pathway inhibitor release after heparin administration. *Thromb Haemost*, 1999; 81: 589–593.
31. Edstrom CS, Calhoun DA, Christiansen RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in human fetal and placental tissues. *Early Hum Dev*, 2000; 59: 77–84.
32. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Simira RD. Presence of tissue factor inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation*, 1998; 98: 1051–1053.
33. Gosk-Bierska I, Wysokiński W, Karnicki K, Adamiec R. Tissue factor, tissue pathway factor inhibitor and risk factors of atherosclerosis in patients with chronic limbs ischemia: preliminary study. *Int Angiol*, 2008; 27: 296–301.
34. Radziwon P, Bielawiec M, Kłoczko J et al. Tissue pathway inhibitor (TFPI) in patients with occlusive arterial diseases in consideration with risk factors and conservative treatment of the disease. *Acta Angiol*, 2001; 7: 43–54.
35. Ameri H, Hyers TM, Tricomi S et al. Transcriptional expression of tissue pathway inhibitor (TFPI) in alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Blood*, 1997; 78: 107.
36. Yamamuro M, Wada H, Kumeda K et al. Changes in plasma tissue factor pathway inhibitor levels during the clinical course of disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998; 9: 491–497.
37. Iversen N, Lindahl AK, Abildgaard U. Elevated TFPI in malignant disease: relation to cancer type and hypercoagulation. *Br J Haematol*, 1998; 102: 889–895.
38. Leurs PB, van Oerle R, Wolffenbutel BH. Increased tissue factor pathway inhibitor TFPI and coagulation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost*, 1997; 77: 472–476.
39. Falciani M, Gori AM, Fedi S et al. Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischemic heart disease patients. *Thromb Haemost*, 1998; 78: 495–499.
40. Harris GM, Stendt CL, Vollenhoven BJ et al. Decreased plasma tissue factor pathway inhibitor in women taking combined oral contraceptives. *Am J Hematol*, 1999; 60: 175–180.
41. Eling M, Stephens AC, Oragui EE et al. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) levels in the plasma and urine of children with meningococcal disease. *Thromb Haemost*, 2001; 85: 240–244.
42. Ariens RA, Moia M, Rivolta E et al. High levels of tissue factor pathway inhibitor in patients with nephrotic proteinuria. *Thromb Haemost*, 1999; 82: 1020–1023.
43. Naumnik B, Borawski J, Chyczewski L et al. Tissue factor and its inhibitor in human non-crescentic glomerulonephritis-immunostaining vs plasma and urinary levels. *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21: 3450–3457.
44. Bajaj MS, Bajaj SP. Tissue factor pathway inhibitor potential therapeutic applications. *Thromb Haemost*, 1997; 78: 471–477.