

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ Α. ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (N.5343/1932, άρθρο 202).

Γενικά στοιχεία διδακτορικής διατριβής

Ημερομηνία αίτησης της κα. Ανδρομάχης Δημητρίου: 18/01/2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 18/01/2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

κ. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-ΚλινικήςΧημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη:

κ. Δημόκριτος Τσουκάτος, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

κ. Ιωάννης Γουδέβενος, Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού Θέματος: 21/032008

Θέμα: «Μελέτη του ρόλου βιοδραστικών αιμοπεταλιακών παραγόντων στην αθηρογένεση»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 11/2/2011

1. κ. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-ΚλινικήςΧημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
2. κ. Δημόκριτος Τσουκάτος, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
3. κ. Ιωάννης Γουδέβενος, Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. κα. Σόνια-Αθηνά Καραμπίνα, Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Παν/μίου Pierre Et Marie Curie, Παρίσι, Γαλλία
5. κα. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
6. κα. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
7. κ. Χαράλαμπος Μηλιώνης, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 24/02/2011

Στις μικρές και τις μεγάλες «αδυναμίες» μου

Στην οικογένεια μου

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας (Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών) του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Ιανουάριο του 2008 έως τον Φεβρουάριο του 2011.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, ο οποίος μου ανάθεσε το θέμα της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, ενθαρρύνοντάς με σε όλες τις δυσκολίες που προέκυπταν. Τον ευχαριστώ επίσης για τη συμμετοχή μου σε ερευνητικά προγράμματα και την οικονομική ενίσχυση όποτε αυτό ήταν δυνατό και την καθοριστικής σημασίας συμβολής του στο πειραματικό και στο συγγραφικό κομμάτι αυτής της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων καθώς και τον κ. Ιωάννη Γουδέβενο, Καθηγητή της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής και κατά τη συνεργασία μας σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μωσή Ελισάφ για την άψογη συνεργασία μας κατά την συλλογή των κλινικών δειγμάτων. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συνεργάτες του στο εξωτερικό ιατρείο λιπιδίων αλλά και τους ειδικευμένους της Β' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την εξαιρετική συνεργασία μας στη συλλογή των κλινικών δειγμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην καθηγήτρια κα. Σόνια-Αθηνά Καραμπίνα του Πανεπιστημίου Pierre et Marie Curie στο Παρίσι στο INSERM U933, καθώς και στην καθηγήτρια κα. Ninio και στην Δρ. Stengel στο INSERM U525 αφού μέρος των πειραμάτων που αφορούσαν τη γονιδιακή έκφραση πραγματοποιήθηκαν υπό την επίβλεψη τους. Ευχαριστώ επίσης την κα. Καραμπίνα για την καλή της διάθεση, τις συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις της τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό κομμάτι αυτής της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ πολύ και τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς επιτροπής για την συμμετοχή τους στην εξεταστική μου επιτροπή.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στην Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης, η οποία μου χορήγησε υποτροφία ύψους 3000€ για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον κ. Σάββα Χρηστοφορίδη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών στα Ιωάννινα και τον μεταπτυχιακό φοιτητή του κ. Μπασαγιάννη Δημήτριο για την πολύτιμη παροχή των ενδοθηλιακών κυττάρων και τις συμβουλές τους. Επίσης, την κα. Carol Murphy και τους μεταπτυχιακούς της συνεργάτες για τη βοήθεια τους στη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Ευχαριστώ θερμά το Δρ. Γιάννη Μήτσιο, τον μέντορά μου στις μεθοδολογίες των αιμοπεταλίων και των μικροσωματιδίων των αιμοπεταλίων, για την πολύτιμη βοήθεια του στα πρώτα μου βήματα και τη φιλία του καθώς επίσης και τους φίλους και συνεργάτες μου στα πρώτα χρόνια της παρουσίας μου στο εργαστήριο τον Δρ. Λουκά Τσιρώνη, την Δρ. Ελένη Παπαβασιλείου, την Δρ. Ευαγγέλια Λουρίδα και την Δρ. Αφροδίτη Ταμπάκη για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Ευχαριστώ πολύ την φίλη μου Δρ. Μαρία Πετράκη για τη βοήθεια της ιδιαίτερος σε θέματα που αφορούσαν κύτταρα και τη συμπαράστασή της σε δύσκολες καταστάσεις όλο αυτόν τον καιρό. Τέλος, ευχαριστώ πολύ τις άμεσες συνεργάτιδες μου και πάνω από όλα φίλες μου Χρυστάλλα Κουμπαρή, Κλεοπάτρα Ρουσούλη και Τσουμάνη Μαρία και τους φίλους μου Βασίλη Χατζηχρήστο και Παναγιώτη Κουσιάππα για την στήριξη και την βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια αυτής της διατριβής. Παρά τις δύσκολες στιγμές, δεν ξεχνάω τις φορές που βγαίναμε έξω και γελάγαμε με τις ώρες. Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Κώστα Τέλλη για τις χρήσιμες συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθειά του σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε στο εργαστήριο.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τις φιλενάδες μου που τόσο καιρό με υποστήριζαν και με εμπύχωναν στις δυσκολίες που τυχόν αντιμετώπιζα. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Έλενα, που ήθελε δεν ήθελε έμαθε τα πάντα για τα κύτταρα και βρισκόμασταν όποτε αυτά μας το επέτρεπαν, τη Γιάννα και τη Δώρα για την αγάπη και συμπαράστασή τους.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Αχιλλέα για την υπομονή και την υποστήριξή του σε ψυχολογικό επίπεδο. Μετά από μία δύσκολη ημέρα ή μία αποτυχία ήταν αυτός που πάντα με ενθάρρυνε και μου έφτιαχνε τη διάθεση.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Ανδρέα και Κατερίνα καθώς και την αδελφή μου Θωμαΐτσα και την Κατερινούλα για την βοήθεια, την στήριξή τους και την αγάπη τους. Ήταν οι χορηγοί μου, τόσο σε υλικό όσο και ψυχολογικό επίπεδο, χωρίς τους οποίους δεν θα είχα τη δυνατότητα να ολοκληρώσω αυτή την προσπάθεια!

«Μετά από ένα δύσκολο χειμώνα, σα να βλέπω την άνοιξη!!!»

Μάχη Δημητρίου

Ιωάννινα, 2011

Συντμήσεις

AA	Αραχιδονικό οξύ
ABE-1	Πεδίο δέσμευσης ανιόντων-1
ABCA1	Μεμβρανικός μεταφορέας A1
ABCGs	Μεμβρανικοί μεταφορείς G
AC	Αδενυλοκυκλάση
AcLDL	Ακετυλιωμένη LDL
APC	Ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
Apo	Απολιποπρωτεΐνες
apoB-100	Απολιποπρωτεΐνη B-100
apoC	Απολιποπρωτεΐνη C
apoD	Απολιποπρωτεΐνη D
apoE	Απολιποπρωτεΐνη E
apoER2	Υποδοχέων των απολιποπρωτεϊνών E-2
Arg, R	Αργινίνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BSA	Αλβουμίνη από ορό βοδιού
[Ca ²⁺] _i	Συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου
cAMP	Κυκλικό 3'5'-αδενοσινο-μονοφωσφορικό οξύ
CD62P	P-σελεκτίνη
CD41a	α _{IIb} υπομονάδα του υποδοχέα α _{IIb} β ₃
CD61	B ₃ υπομονάδα του υποδοχέα α _{IIb} β ₃
CD36	Υποδοχέας εκκαθαριστής
CD54	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1
CD106	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1
CD31	Προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων
CD40L	Προσδέτης του CD40
cDNA	Συμπληρωματικό δειοξυριβονουκλεϊκό οξύ
CE	Εστέρες της χοληστερόλης
CETP	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης
CLEC-2	Όμοιος με τη λεκτίνη υποδοχέας 2 τύπου C
CM	Χυλομικρά
COX-1	Κυκλοξυγονάση-1
COX-2	Κυκλοξυγονάσης-2
CT	Κυκλικό όριο (cycle threshold)
Cu ²⁺	Χαλκός
Cys	Κυστεΐνη
DAG	Διακυλογλυκερόλη
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTNB	5,5-διθεο-δις-2-νιτροβενζοϊκό οξύ
DTS	Πυκνό σωληνοειδές σύστημα
ECGS	Αυξητικό συμπλήρωμα των ενδοθηλιακών κυττάρων
EDG-1	Γονίδιο διαφοροποίησης-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGF	Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EE	Ειδική Ενεργότητα

ELISA	Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφορική τεχνική
EMPs	Μικροσωματίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων
EPCs	Ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα
FC	Κυτταρομετρία ροής
FCS	Ορός εμβρύου μόσχου
Fg	Ινωδογόνο
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FnBPs	Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την φιβρονεκτίνη
G	Γουανίνη
GDP	Διφωσφορική γουανοσίνη
Glu	Γλουταμίνη
GP	Γλυκοπρωτεΐνες
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
15-HETE	15-υδροξοεικοσατετρανοϊκό οξύ
His	Ιστιδίνη
HIV-1	Ανοσοανεπάρκεια ιού τύπου I
HMWK	Μεγάλου μοριακού βάρους κινινογόνο
HOCI	Υποχλωριώδες οξύ
NaOCI	Υποχλωριώδες νάτριο
HPTLC	Υψηλής απόδοσης χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
HUVECs	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλίου λώρου
ICAM-1	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1
IDL	Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
IFN-γ	Ιντερφερόνη-γ
IL-1	Ιντερλευκίνη-1
IL-10	Ιντερλευκίνη-10
IL-1β	Ιντερλευκίνη-1β
IL-6	Ιντερλευκίνη-6
IL-8	Ιντερλευκίνη-8
IP₃	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LDL-FITC	LDL επισημασμένη με FITC
LFA-1	Σχετιζόμενο με τη λειτουργία αντιγόνου-1 των λεμφοκυττάρων
LIBS	Περιοχές πρόσδεσης επαγόμενες από τον προσδέτη
LOX-1	Υποδοχέας της oxLDL
Lp(a)	Λιποπρωτεΐνη a
LPA	Λυσοφωσφατιδυλοχολικό οξύ
LPL	Λιποπρωτεϊνική λιπάση
Lp-PLA₂	Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A ₂
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
Lys	Λυσίνη
Lyso-PC	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
MCP-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
MDA	Μηλονική διαλδεΰδη
MFI	Μέση ένταση φθορισμού
MLCK	Κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης
MMPs	Μονοκυτταρικά μικροσωματίδια

MPO	Μυελοϋπεροξειδάση
MPs	Κυτταρικά μικροσωματίδια
mRNA	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κB
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
NO₂	Διοξείδιο του αζώτου
NOO⁻	Υπεροξνιτρικό ανιόν
O[•]	Ρίζες οξυγόνου
O₂	Οξυγόνο
oxLDL	Οξειδωμένη LDL
QPCR	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PAAP	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την αιμοπεταλιακή συσσώρευση
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAGE	Πολυακρυλαμίδιο
PAI-1	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PARs	Ενεργοποιημένοι υποδοχείς των πρωτεασών
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDGF	Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PECAM-1	Προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κύτταρων
PF4	Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
PGI₂	Προσταγλαδίνη I ₂
PI	Φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη
PIP₂	4,5-δισφωφορική-φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη
PKC	Πρωτεϊνοκινάση C
PL	Φωσφολιπίδια
PLA₁	Φωσφολιπάση A ₁
PLA₂	Φωσφολιπάση A ₂
PLC	Φωσφολιπάση C
PLSCR	Αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων
PMPs	Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων
PPAR	Υποδοχέας πολλαπλασιαστικής- ενεργοποιητής υπεροξυσώματος
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
PSGL-1	Ο γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης
PTK	Πρωτεϊνοκινάση της τυροσίνης
PUFAs	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
REM	Σχετικής ηλεκτροφορητική κινητικότητα
RT	Αντίστροφη μεταγραφή
RT-PCR	Πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
Ser, S	Σερίνη
SM	Σφιγγομυελίνη
SMC	Λεία μυϊκά κύτταρα
-sn-	Στερεοειδική αρίθμηση
SOCE	Σύστημα μεταφοράς Ca ²⁺
SPP-1	Φωσφορική σφιγγοσίνη-1
SR-BI	Υποδοχέας εκκαθαριστής B τύπου I

TCA	Τριχλωροξικό οξύ
TF	Ιστικός παράγοντας
TG	Τριγλυκερίδια
TGF-β	Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α
Tpa	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
TRPC	Transient Receptor Potential channel
TTP	Θρομβοκυτοπενική πορφύρα
TS	Συνθάση του θρομβοξαίνιου
TxA₂	Θρομβοξάνιο A ₂
VCAM-1	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1
VEGF	Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου
VHDL	Πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
VLDL	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
vWF	Παράγοντας von Willebrand
X[•]	Ελεύθερη ρίζα

Σκοπός της Διατριβής

Μελέτες τα τελευταία χρόνια δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια, εκτός από τη θρόμβωση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην αθηρογένεση. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν πολλούς βιοδραστικούς παράγοντες των οποίων ο ρόλος στην αθηρογένεση παραμένει υπό διερεύνηση. Αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια ενσωματωμένοι σε μεμβρανικά κυστίδια γνωστά ως αιμοπεταλιακά μικροσωματίδια (PMPs). Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, τα PMPs ίσως αποτελούν έναν μηχανισμό στοχευμένης μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών από τα αιμοπετάλια σε άλλα κύτταρα οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να αναδείξουμε νέους μηχανισμούς με τους οποίους οι διάφοροι βιοδραστικοί παράγοντες των αιμοπεταλίων που βρίσκονται ενσωματωμένοι στα PMPs, πιθανά να συμβάλουν στην αθηρογένεση. Στα πλαίσια αυτά θα παραχθούν PMPs με διαφορετικούς αγωνιστές για να μελετηθούν οι διαφορές στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά τους. Κατόπιν θα προχωρήσουμε στη διερεύνηση του πιθανού ρόλου των PMPs στη φλεγμονή και τη θρόμβωση αρχίζοντας με τη μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης αυτών με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τις οξειδωμένες μορφές τους καθώς και τη σημασία αυτής της σύνδεσης στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα δείξουμε στον πιθανό ρόλο του οξειδωτικού στρες στην τροποποίηση της δομής και της λειτουργίας των PMPs. Ειδικότερα, θα μελετηθεί η επίδραση τόσο των PMPs όσο και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων. Τέλος, θα μελετήσουμε το ρόλο των PMPs στη γονιδιακή έκφραση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Περιεχόμενα

Πρόλογος-Ευχαριστίες	ix
Συντμήσεις	xiii
Σκοπός της Διατριβής	xvii
Περιεχόμενα	xix
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	1
Αιμοπετάλια	1
Γενικά χαρακτηριστικά.....	1
Κυτταρική δομή.....	3
Μηχανισμοί ενεργοποίησης	6
Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους	10
Αιμόσταση.....	18
Προσκόλληση των αιμοπεταλίων.....	19
Συσσώρευση των αιμοπεταλίων και σχηματισμός θρόμβου.....	21
Πήξη του αίματος	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	25
Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs)	25
Ορισμός και ιστορική αναδρομή	25
Γενικά χαρακτηριστικά και σύσταση	26
Γιατί τα κύτταρα απελευθερώνουν MPs	27
Μηχανισμός παραγωγής των μικροσωματιδίων	28
Μηχανισμοί που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και στην παραγωγή των MPs	33
Διαφορές μεταξύ της κυτταρικής απόπτωσης των κυττάρων και της παραγωγής των MPs από ενεργοποιημένα κύτταρα	40
Εξωσώματα.....	42
Κάθαρση των PMPs από την κυκλοφορία	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	45
Οι χαμηλής και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες του ανθρώπινου πλάσματος (LDL και HDL)	45
Εισαγωγή στις λιποπρωτεΐνες	45
Η χαμηλής πυκνότητα λιποπρωτεΐνη (LDL)	46
Φαινότυπος της LDL	48
Η υψηλής πυκνότητα λιποπρωτεΐνη (HDL)	49
Μηχανισμοί οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών	50
Μεταλλικά ιόντα	51
Μυελοϋπεροξειδάση (MPO).....	53
Πρόσδεση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών σε υποδοχείς εκκαθαριστές	56
Ο ρόλος των οξειδωμένων μορφών των LDL και HDL στην αθηρωμάτωση.....	57
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	 61
Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση	61
Αιμοπεταλιακοί παράγοντες που συμβάλουν στην αθηροθρόμβωση	61
Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα.....	63
Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....	69
Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα πρόδρομα κύτταρα	72
Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τις λοιμώξεις.....	75
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	 77
Ο ρόλος των PMPs στην αθηροθρόμβωση	77
Διαφορές στους λειτουργικούς ρόλους μεταξύ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs.....	77
Ο μηχανισμός δράσης των MPs.....	78
Ο ρόλος των PMPs στην πήξη.....	79
Ο ρόλος των PMPs στη φλεγμονή.....	86
Ο ρόλος των PMPs στην αγγειογένεση	89
Αθηροσκληρωτική πλάκα και PMPs	90
Ο ρόλος των MPs ως πιθανά θεραπευτικά εργαλεία	91

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο	93
Μεθοδολογίες	93
Απομόνωση των πλυμένων αιμοπεταλίων	93
Απομόνωση των PMPs	98
Ανάλυση των PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry).....	100
Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA	103
Απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις.....	105
Οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών LDL και HDL με μεταλλικά ιόντα Χαλκού	110
Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης	112
Μελέτη της πρόσδεσης (Binding) της επισημασμένης με FITC LDL ή HDL στα PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής.....	116
Οξειδωτική τροποποίηση των PMPs.....	118
Προσδιορισμός της ενεργότητας της Lp-PLA ₂	121
Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19%.....	123
Χρώση με νιτρικό άργυρο	130
Εκχύλιση των λιπιδίων των PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών τους με τη μέθοδο Bligh Dyer	133
Διαχωρισμός των λιπιδίων των PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών μορφών τους με υψηλή ανάλυση χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	134
Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφόρου στα φωσφολιπίδια	136
Προσδιορισμός των καταλοίπων των λυσινών	138
Έλεγχος της βιολογικής δράσης των PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών τους ή των συμπλεγμάτων των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου.....	140
Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώρο (HUVECs).....	142
Γενικά περί καλλιέργειών των HUVECs	145
Καλλιέργεια των HUVECs.....	146
Ενεργοποίηση των HUVECs με TNF-α και επίδραση με τις προς μελέτη ουσίες	150
Ανάλυση των HUVECs με χρήση κυτταρομετρίας ροής.....	152
Προσδιορισμός επιπέδων MCP-1 σε υπερκείμενο κυττάρων με την μέθοδο ELISA τύπου σάντουιτς	154

Ανοσοφθορισμός	158
Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των καλλιιεργειών των HUVECs.....	164
Απομόνωση αγγελιοφόρου RNA (mRNA) από HUVECs	166
Έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου mRNA με φασματοφωτομετρική Ανάλυση.....	169
Κατεργασία του mRNA με DNAση	170
Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT)	172
Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (QPCR) πραγματικού χρόνου	173
Στατιστική ανάλυση.....	180
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο.....	181
Αποτελέσματα	181
Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των PMPs που παράγονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων	181
Η σύνδεση των PMPs με τις λιπο πρωτεΐνες του πλάσματος και τις οξειδωμένες μορφές τους <i>in vitro</i>	187
Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα PMPs <i>in vitro</i>	193
Μελέτη της επίδρασης των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs στην ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων	202
Η πρόσδεση και η εσωτερίκευση των PMPs στα ενδοθηλιακά κύτταρα	213
Τα PMPs επάγουν γονιδιακή έκφραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα	216
Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος στην ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων.....	221
Μελέτη της επίδρασης των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων	225
Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων	228
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο.....	231
Συζήτηση	231

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	245
SUMMARY.....	249
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	253

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Αιμοπετάλια

Γενικά χαρακτηριστικά

Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα κύτταρα του αίματος και το μέγεθός τους όπως και η πυκνότητά τους ποικίλει μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Δημιουργούνται στον μυελό των οστών από τον θρυμματισμό του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων και γι' αυτό τον λόγο είναι απύρρηνα κύτταρα. Εκτός από πυρήνα, τα αιμοπετάλια δεν έχουν συσκευή Golgi, ενώ έχουν υπολείμματα του πυκνού ενδοπλασματικού δικτύου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κάθε μεγακαρυοκύτταρο δίνει 2×10^{11} αιμοπετάλια καθημερινά. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων κυμαίνεται από 150.000-400.000/mm³, έχουν διάμετρο 2-4 μm και κυτταρικό όγκο 10 fl. Η διάρκεια ζωής τους στο αίμα είναι 8-10 μέρες και στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται στα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα. Τα αιμοπετάλια επειδή δε διαθέτουν πυρήνα έχουν ελάχιστη ικανότητα για σύνθεση πρωτεϊνών. Επίσης, περιέχουν mRNA. Αν και απύρρηνα, τα αιμοπετάλια περιέχουν στο κυτταρόπλασμα διάφορα οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, ριβοσωμάτια, κυτταροσκελετό, καθώς και πολυάριθμα κοκκία, απαραίτητα για τη λειτουργία του αιμοπεταλίου και τη διατήρηση της φυσιολογικής αιμόστασης [1-3].

Σε κατάσταση ηρεμίας τα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα των οποίων η επιφάνεια δεν ξεπερνά τα 8 μm² και το οποίο υποστηρίζεται από τα μικρονημάτια που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Κατά την ενεργοποίησή τους όμως αλλάζουν σχήμα, αποκτούν ψευδοπόδια (*Εικόνα 1.1*), τα οποία αποτελούν προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων, η επιφάνειά τους αυξάνεται μέχρι και τα 13 μm² [4] και απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους μέσω του συστήματος των μικροσωληνίσκων. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από διάφορους αγωνιστές οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η θρομβίνη, η επινεφρίνη, το θρομβοξάνιο A₂ (TxA₂), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και το κολλαγόνο. Οι αγωνιστές αυτοί ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια διαμέσου

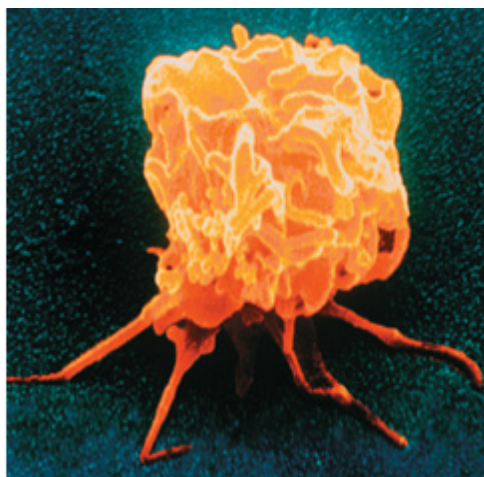
ειδικών υποδοχέων με αποτέλεσμα τη διέγερση διαφόρων ενδοκυττάρων μεταβολικών οδών, την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, τη μεταβολή της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου, την αποκοκκίωση καθώς επίσης και την ενεργοποίηση του υποδοχέα-ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$. Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η συσσώρευση και η προσκόλλησή τους στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο ή στον υπενδοθηλιακό χώρο.

Κατά την κυκλοφορία τους τα αιμοπετάλια τείνουν να συγκεντρώνονται στην περιφέρεια της αιματικής ροής και έτσι μπορούν να αναγνωρίσουν και να ανταποκριθούν γρήγορα σε οποιαδήποτε βλάβη του ενδοθηλίου. Η κύρια λειτουργία τους είναι η συσσώρευση η οποία γίνεται διάμεσου γεφυρών ινωδογόνου (Fg) παρουσία ιόντων Ca^{2+} . Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται συσσωρεύματα μεταξύ των αιμοπεταλίων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της αιμόστασης και της πήξης του αίματος. Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε διάφορες άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή και η αθηροσκλήρωση [5, 6].

A



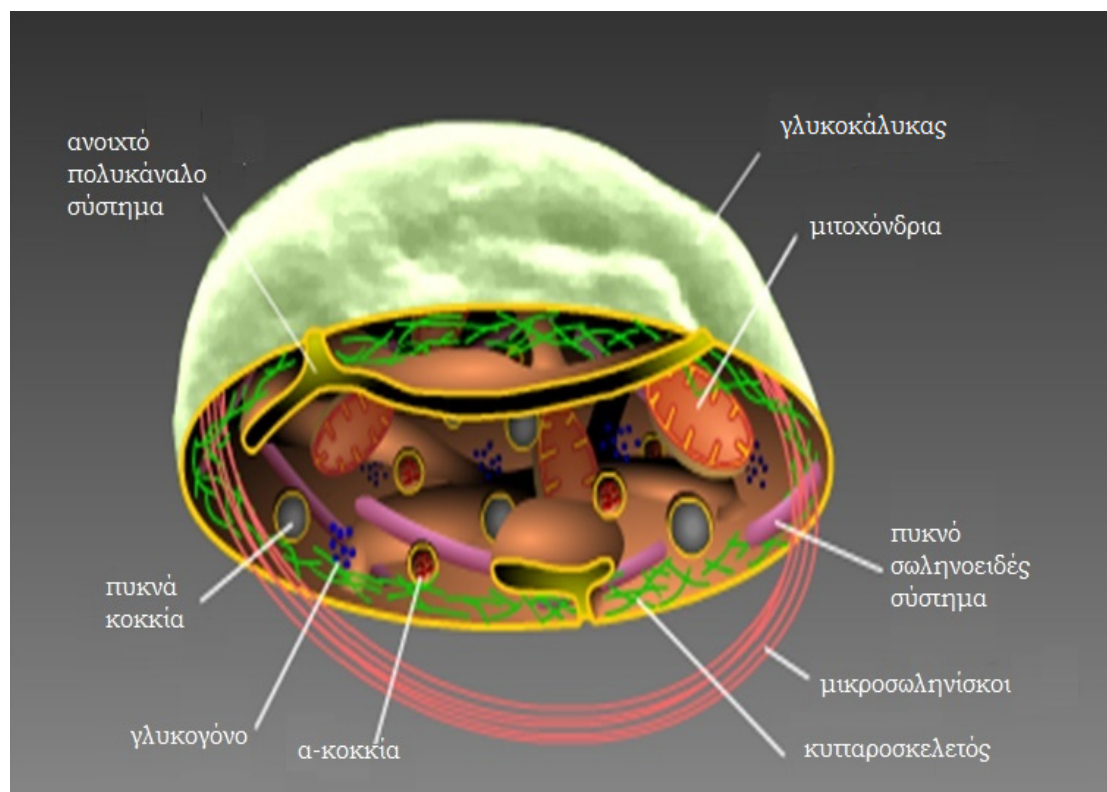
B



Εικόνα 1.1: Χαρακτηριστικό σχήμα αιμοπεταλίων σε ηρεμία (A) και μετά από ενεργοποίηση (B) [5].

Κυτταρική δομή

Η δομή του αιμοπεταλίου μπορεί να διαχωριστεί σε τέσσερις μορφολογικά διακριτές περιοχές: α) την περιφερική ζώνη, β) τη δομική ζώνη, γ) τη ζώνη των οργανιδίων και δ) τη ζώνη του μεμβρανικού συστήματος [5, 6] (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Το δισκοειδές σχήμα του αιμοπεταλίου και τα διάφορα συστατικά του.

α) Περιφερική ζώνη: αποτελείται από την κυτταρική μεμβράνη και τον γλυκοκάλυκα.

Ο γλυκοκάλυκας είναι μια λεπτή στοιβάδα που περιβάλλει την μεμβράνη των αιμοπεταλίων και αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, πολυσακχαρίτες και προσροφημένες πρωτεΐνες του πλάσματος [7-9]. Εξαιτίας του σιαλικού οξέος που είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, η μεμβράνη έχει ηλεκτρωνητικό φορτίο με

αποτέλεσμα να αποτρέπεται η προσκόλληση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας τους [10].

Η κυτταρική μεμβράνη εμφανίζει δομή τυπικής φωσφολιπιδιακής διπλοστοιβάδας στην οποία είναι βυθισμένες αρκετές γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και χοληστερόλη [8, 11, 12]. Τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι η σφιγγομυελίνη (SM) που καλύπτει το 17% της επιφάνειάς της, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) που καλύπτει το 27%, η φωσφατιδύλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδύλοϊννοσιτόλη (PI) που καλύπτουν το 10% και το 5% αντίστοιχα [13-15]. Τα φωσφολιπίδια αυτά είναι ασύμμετρα τοποθετημένα, γεγονός που βοηθάει στην αποφυγή της πήξης του αίματος υπό φυσιολογικές συνθήκες [16]. Η διαμόρφωση πολλών από τις γλυκοπρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μηχανισμούς προσκόλλησης έχουν διαμόρφωση υποδοχέα. Οι κυριότερες από αυτές είναι οι ιντεγκρίνες και οι πλούσιες σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνες [17]. Στον πίνακα 1.1, δίνονται οι σημαντικότεροι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και οι προσδέτες τους.

Πίνακας 1.1: Οι σημαντικότεροι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς των αιμοπεταλίων και οι προσδέτες τους.

<i>Γλυκοπρωτεϊνικοί Υποδοχείς</i>	<i>Προσδέτης (ligand)</i>
GPIa/IIa (VLA-2, $\alpha_2\beta_1$)	Κολλαγόνο I, II
GPIc/IIa (VLA-5, $\alpha_5\beta_1$)	Φιβρονεκτίνη
GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, vWF, θρομβοσπονδίνη
GPV	Υπόστρωμα θρομβίνης
GPIV (GPIIIb)	Θρομβοσπονδίνη, Κολλαγόνο
GPIb/IX	vWF, θρομβίνη
Υποδοχέας βιτρονεκτίνη ($\alpha_v\beta_3$)	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, vWF, θρομβοσπονδίνη
Περιοχή GPIc/IIa ($\alpha_6\beta_1$)	Λαμινίνη

β) Δομική ζώνη: Αποτελείται από τον κυτταροσκελετό, τους μικροσωληνίσκους και τον υπομεμβρανικό σκελετό. Στον κυτταροσκελετό που αποτελεί το μεγαλύτερο οργανίδιο του κυττάρου απαντάται κυρίως η ακτίνη και σε μικρότερο ποσοστό η μυοσίνη. Στις πρωτεΐνες αυτές στηρίζεται το δισκοειδές σχήμα των αιμοπεταλίων, η αλλαγή σχήματος και η αποκοκκίωση τους [18].

γ) Ζώνη οργανιδίων: Τα αιμοπετάλια περιέχουν τρεις τύπους αποθηκευτικών κοκκίων, τα α-κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσισώματα. Επίσης περιέχουν μιτοχόνδρια, γλυκογόνο και μικροϋπεροξεισώματα.

Τα α-κοκκία είναι τα μεγαλύτερα και αποτελούν τον κυριότερο τύπο κοκκίων των αιμοπεταλίων [19, 20]. Επίσης, αποτελούν τις κύριες αποθήκες φλεγμονοδών μεσολαβητών, όπως των κατιοντικών πρωτεϊνών, χημειοκινών της C-X-C και της C-C οικογένειας, ιντερλευκινών και προσκολλητικών πρωτεϊνών. Επίσης, περιέχουν πρωτεΐνες προσκόλλησης όπως το ινωδογόνο, τη φιβρονεκτίνη [21], ένζυμα όπως την α₁-αντιτρυψίνη, πρωτεΐνες όπως την α₂-μακροσφαιρίνη και παράγοντες πήξης. Επίσης, περιέχουν την ιντεγκρίνη α_{IIb}β₃ και την P-σελεκτίνη, οι οποίες κατόπιν ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων εκφράζονται στην μεμβράνη τους [22, 23].

Τα πυκνά κοκκία περιέχουν σεροτονίνη, ντοπαμίνη, ισταμίνη, ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ και τα νουκλεοτίδια ADP και ATP.

Τα αιμοπετάλια περιέχουν μόνο λίγα πρωτογενή και δευτερογενή λυσισώματα [24]. Τα λυσισώματα δημιουργούνται κατά την ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων πριν την ανάπτυξη των α-κοκκίων και [25] αποθηκεύουν έναν αριθμό όξινων υδρολασών, ενζύμων και φωσφατασών όπως την καθεψίνη D και E [26].

Τα μιτοχόνδρια είναι πολύ μικρού μεγέθους σωματίδια, στα οποία λαμβάνουν χώρα σημαντικές βιοχημικές αντιδράσεις όπως η φωσφορυλίωση.

Τα κοκκία του γλυκογόνου αποτελούν το κύριο συστατικό του κυτοσολίου. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι απαραίτητη για την παραγωγή του ATP που χρειάζεται για την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων.

δ) Ζώνη του μεμβρανικού συστήματος: Αποτελείται από το ανοιχτό σωληνοειδές σύστημα και το πυκνό σωληνοειδές σύστημα.

Το πυκνό σωληνοειδές σύστημα αποτελεί υπόλειμμα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου των μεγακαρυοκυττάρων και αποτελεί τη σημαντικότερη αποθήκη ιόντων ασβεστίου των αιμοπεταλίων και τα οποία απελευθερώνονται μετά από ενεργοποίησή τους [27]. Το πυκνό σωληνοειδές σύστημα, είναι το κύριο οργανίδιο που συμμετέχει στον

μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (AA), το οποίο οδηγεί στην παραγωγή TxA_2 , λευκοτριενίων, προσταγλανδινών και PAF, τα οποία συμμετέχουν με τη σειρά τους σε μια μεγάλη ποικιλία από φλεγμονώδεις αντιδράσεις [28].

Το ανοιχτό σωληνοειδές σύστημα είναι ένα σύστημα μικροσωληνίσκων που συνδέουν το κυτταρόπλασμα με τη επιφάνεια του αιμοπεταλίου και αποτελεί έναν εύκολο δρόμο για την είσοδο μορίων από το πλάσμα στα αιμοπετάλια και για την μετάβαση των ουσιών του ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου προς την εξωτερική επιφάνεια [29].

Μηχανισμοί ενεργοποίησης

«Μέσα-έξω» σηματοδότηση

Ο υποδοχέας-ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ αποτελεί το κέντρο μετάδοσης σημάτων μέσω διαφορετικών ενδοκυττάρων σηματοδοτικών πορειών. Τα γεγονότα μεταγωγής σήματος που αρχίζουν μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και επεκτείνονται από το εσωτερικό των αιμοπεταλίων προς την $\alpha_{IIb}\beta_3$ και προκαλούν την αλλαγή διαμόρφωσής της από χαμηλής σε υψηλής συγγένειας είναι γνωστά με τον όρο «μέσα-έξω» σηματοδότηση. Αποτέλεσμα αυτής της σηματοδότησης είναι η ανοδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που παίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα δέσμευσης της $\alpha_{IIb}\beta_3$ με το ινωδογόνο ή με άλλους προσδέτες [30].

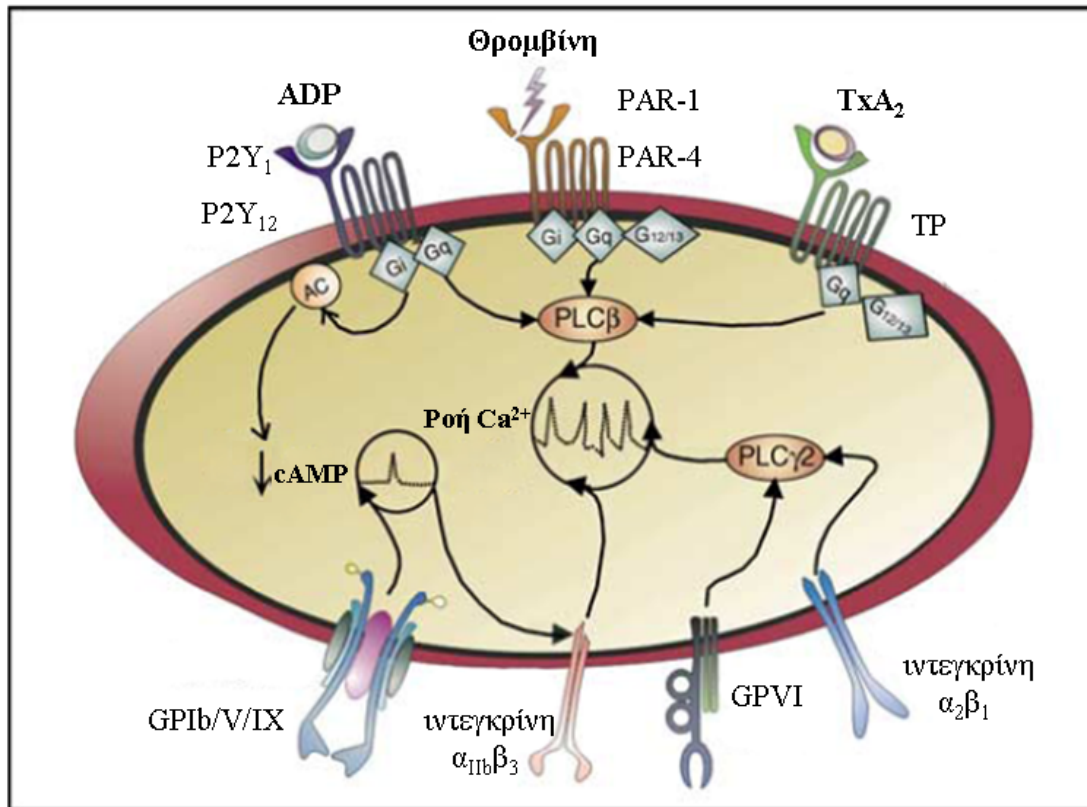
Σε γενικές γραμμές, η μέσα-έξω σηματοδότηση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μίας ή περισσότερων ισομορφών της φωσφολιπάσης C (PLC). Οι βήτα ισομορφές (PLC β) ενεργοποιούνται από τις G πρωτεΐνες ($G_{\alpha q}$ και/ή $G_{i\beta\gamma}$ πρωτεΐνες), ενώ οι γάμα (PLC $\gamma 2$) ρυθμίζονται από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης. Να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση της PLC β αποτελεί το πρωταρχικό μονοπάτι σηματοδότησης κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Η ενεργοποίηση της PLC οδηγεί στην αύξηση της κυτοσολικής συγκέντρωσης του Ca^{2+} και στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνοκινάσης C (PKC). Στα αιμοπετάλια η PKC φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα υποστρώματα: α) την ελαφριά αλυσίδα της Μυοσίνης [31] και β) την πλεκστρίνη [32]. Η φωσφορυλίωση των δυο αυτών

υποστρωμάτων σε θέσεις σερίνης και θρεονίνης είναι απαραίτητη για την έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων.

Οι υποδοχείς των διαφόρων αγωνιστών που βρίσκονται στο αιμοπετάλιο συνδέονται με ετεροτριμερείς πρωτεΐνες που δεσμεύουν το GTP, οι οποίες βοηθούν στην σύνδεση με τον υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PLC η οποία υδρολύει την 4,5 διφωσφο-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂) της κυτταρικής μεμβράνης για να σχηματιστεί η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) και η διακυλογλυκερόλη (DAG). Η IP₃ επάγει την απελευθέρωση Ca²⁺ από το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS) ενώ η DAG ενεργοποιεί την PKC, η οποία φωσφορυλιώνει μια σειρά σηματοδοτικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την έκκριση των κοκκίων και την ενεργοποίηση της α_{IIb}β₃, μία από τις οποίες είναι και η ταλίνη.

Η φωσφολιπάση A₂ ενεργοποιείται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου Ca²⁺ στο κυτοσόλιο και καταλύει την απελευθέρωση AA από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Το AA είναι η πρόδρομη ένωση πολλών εικοσανοειδών όπως του TxA₂. Το TxA₂ σχηματίζεται στα αιμοπετάλια από την κυκλοοξυγονάση (COX-1) και από την συνθετάση του θρομβοξανίου και μετά από την απελευθέρωσή του, διεγείρει την έκκριση των συστατικών των κοκκίων μέσω σύνδεσής του στον υποδοχέα του στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων [33].

Ανεξάρτητα από τους παραπάνω μηχανισμούς, τα αιμοπετάλια διαθέτουν και μηχανισμούς που αποτρέπουν την ενεργοποίησή τους. Η αδενυλική κυκλάση (AC) διεγείρεται από ανταγωνιστές της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, όπως η προσταγλανδίνη I₂ (PGI₂) και οδηγεί στον σχηματισμό του κυκλικού 3',5'-αδενοσινομονοφωσφορικού οξέος ή κυκλικό AMP (cAMP) που έχει ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Κάποιοι αγωνιστές αιμοπεταλίων, αναστέλλουν την AC μέσω της σύνδεσης των αντίστοιχων υποδοχέων τους με G_i πρωτεΐνες, ελαττώνοντας έτσι τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού cAMP σε αιμοπετάλια με υψηλή συγκέντρωση cAMP. Το cAMP μετατρέπεται πολύ γρήγορα σε 5' AMP από τις φωσφοδιεστεράσες των κυκλικών νουκλεοτιδίων Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την έκκριση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα της PGI₂ που αποτελεί φυσικό αναστολέα των αιμοπεταλίων, του μονοξειδίου του αζώτου NO, του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και του CD39 [33, 34]. Όλα αυτά μαζί παρέχουν μία οδό που αποτρέπουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ακατάλληλες στιγμές και μέρη (Εικόνα 1.3).

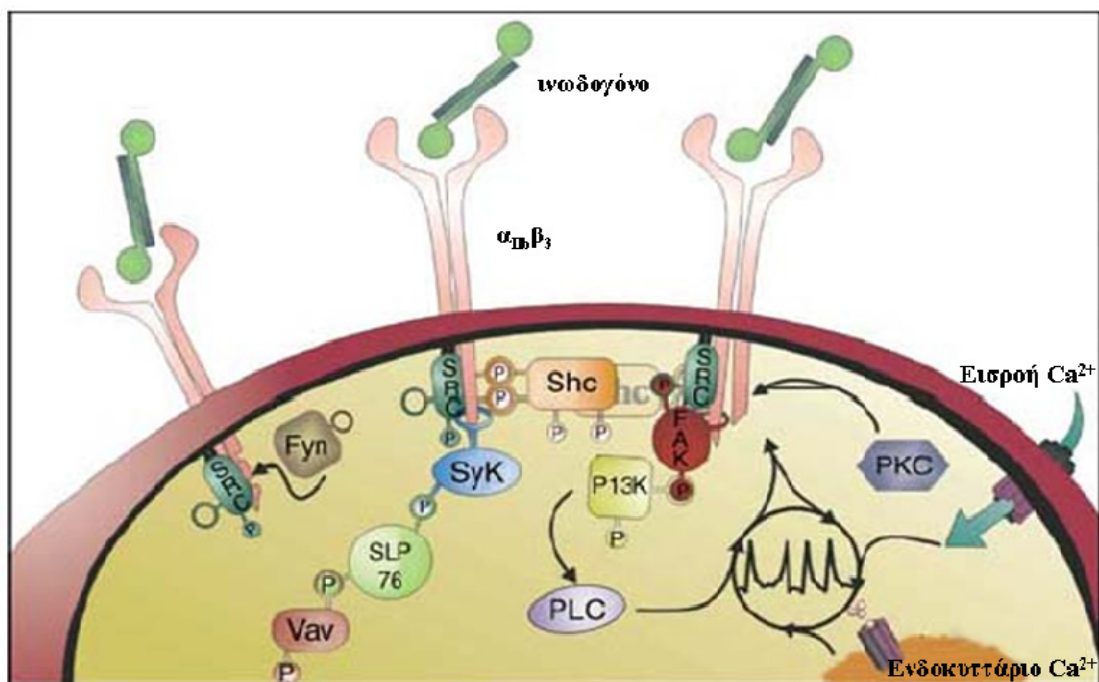


Εικόνα 1.3: Η «μέσα-έξω» σηματοδότηση και η ρύθμιση του κυττοσολικού Ca^{2+} κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [35].

«Έξω-μέσα» σηματοδότηση

Η σύνδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ οδηγεί στην ενεργοποίηση της «έξω-μέσα» σηματοδότησης η οποία προκαλεί αντιδράσεις φωσφορυλίωσης και ανασυγκρότησης του κυτταροσκελετού (Εικόνα 1.4) [34]. Αποτέλεσμα της δέσμευσης του προσδέτη στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι η ρύθμιση και σταθεροποίηση των αιμοπεταλίων, η εξάπλωση τους, η δευτερογενής τους συσσώρευση, η αποκοκκίωση τους, η συρρίκνωση του θρόμβου και πιθανώς η αύξηση της προπηκτικής ικανότητας του αιμοπεταλίου [36]. Η σύνδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα προκαλεί την εμφάνιση νέων επιτόπων γνωστών σαν LIBS (ligand induced-binding sites, περιοχές πρόσδεσης επαγόμενες από τον προσδέτη) [28]. Η διαμορφωτική αλλαγή του υποδοχέα μετά την πρόσδεση οδηγεί σε μη αντιστρεπτή σύνδεση ινωδογόνου- $\alpha_{IIb}\beta_3$ [37, 38]. Η σύνδεση του ινωδογόνου ή/και του vWF στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ προκαλεί ενδοκυττάρειες αντιδράσεις όπως είναι ο σχηματισμός συμπλεγμάτων υποδοχέων $\alpha_{IIb}\beta_3$, η φωσφορυλίωση της β_3 υπομονάδας από την

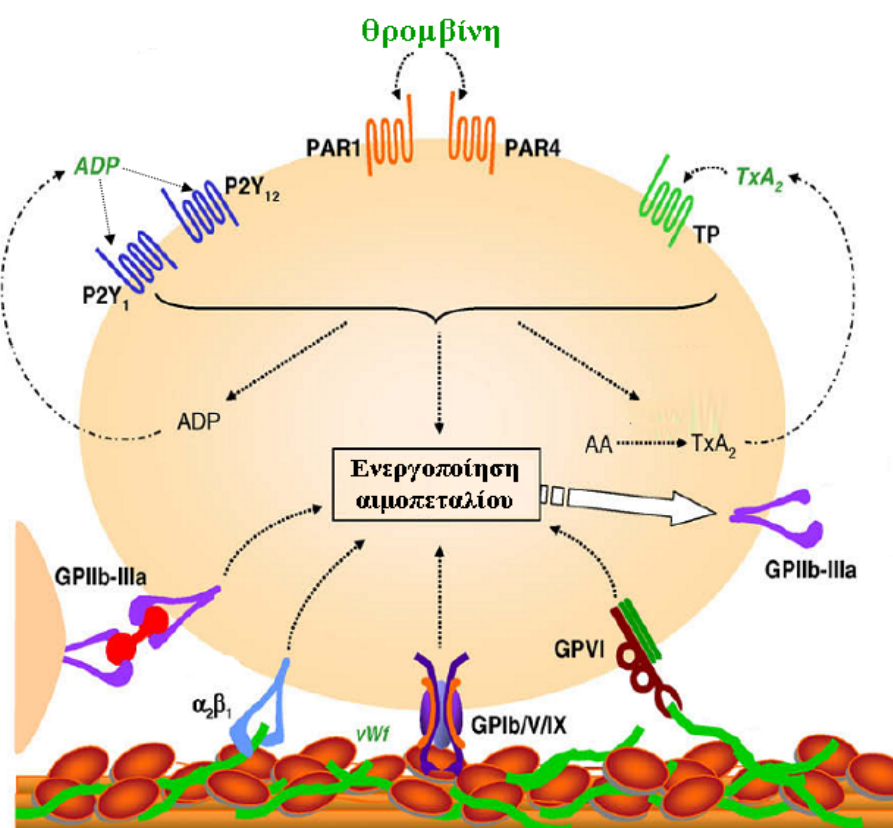
ενεργοποίηση της κινάσης Syk, Fyn και Shc [39, 40]. Η στρατολόγηση της Syk στην β_3 υπομονάδα μπορεί να συμβεί και χωρίς να φωσφορυλιωθεί η β_3 . Στα κυτταροπλασματικά άκρα της ουράς του υποδοχέα στρατολογούνται και η PI3 κινάση, η FAK και η Src. Μετά από λίγα δευτερόλεπτα, τα αιμοπετάλια αρχίζουν να σχηματίζουν μικροσκοπικά συσσωρεύματα. Η «έξω-μέσα» σηματοδότηση περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυτοπλασματικών τμημάτων της $\alpha_{IIb}\beta_3$, σηματοδοτικών μορίων και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η βινικουλίνη, η ταλίνη και η ακτινίνη. Οι αρχικές σηματοδοτικές αντιδράσεις συνεχίζουν τη συγκρότηση του συμπλέγματος προωθώντας τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, τον πολυμερισμό της ακτίνης και την ανασυγκρότηση του κυτταροσκελετού. Η πλήρης συσώρευση και εξάπλωση των αιμοπεταλίων συσχετίζεται με τις κινάσες της τυροσίνης και την ενεργοποίηση των κινασών της $pp60^{Src}$ και της $pp125^{FAK}$ [34].



Εικόνα 1.4: Ο μηχανισμός της 'έξω-μέσα' σηματοδότησης της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ [35].

Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους

Η δραστηριότητα των αιμοπεταλίων ελέγχεται από μια ποικιλία από υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνειά τους και οι οποίοι ρυθμίζουν πολλαπλές λειτουργίες τους. Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων επηρεάζονται από μια ποικιλία αγωνιστών (διεγέρτες) και προσκολλητικών πρωτεϊνών. Σε γενικές γραμμές η διέγερση των αιμοπεταλιακών υποδοχέων προκαλεί την εκκίνηση δύο ξεχωριστών διαδικασιών: (1) τη διέγερση ποικίλων σηματοδοτικών πορειών που καταλήγουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση των κοκκίων τους και (2) στην ικανότητα των αιμοπεταλίων να συνδέονται με άλλα αιμοπετάλια/προσκολλητικές πρωτεΐνες, οδηγώντας στην δημιουργία του θρόμβου. Επειδή και οι δύο αυτές διαδικασίες μπορούν να προκαλέσουν θρόμβωση και απόφραξη του αγγείου, αρκετοί από αυτούς τους υποδοχείς μελετώνται ως στόχοι για την αποφυγή της δημιουργίας θρόμβου [41]. Στην *Εικόνα 1.5*, φαίνονται οι κυριότεροι αγωνιστές των αιμοπεταλίων, οι υποδοχείς τους όπως θα αναλυθούν στις επόμενες σελίδες και ο μηχανισμός ενεργοποίησή τους.



Εικόνα 1.5: Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (τροποποιημένο από τους Hamilton et al. [42]).

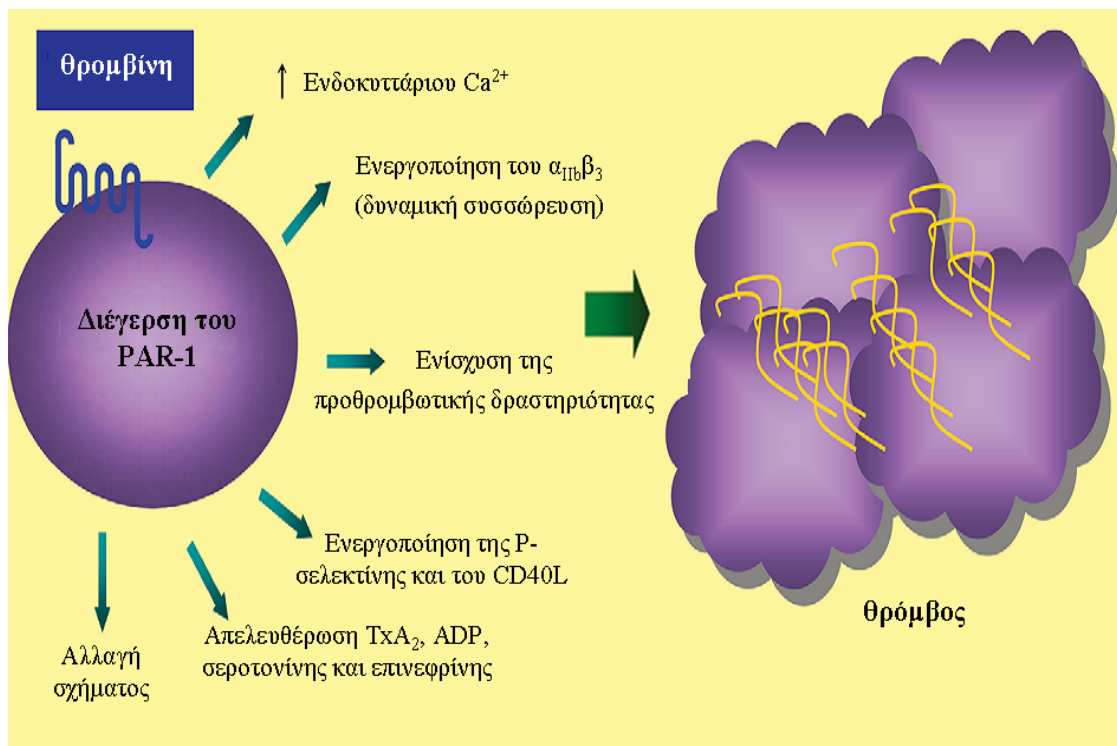
θρομβίνη

Η θρομβίνη είναι η κύρια πρωτεάση του συστήματος πήξης και από τους πιο ισχυρούς ενεργοποιητές των αιμοπεταλίων. Η τοπική παραγωγή της θρομβίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό μηχανισμό με τον οποίο τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διεγείρουν την διαδικασία της πήξης. Εντοπίζεται κυρίως στην ανενεργό της μορφή, ως προθρομβίνη, η οποία είναι μια σφαιρίνη του πλάσματος που συντίθεται στο ήπαρ. Κατά την ενεργοποίησή της, η οποία πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία της πήξης του αίματος, η προθρομβίνη μετατρέπεται σε α-θρομβίνη, μέσω της δράσης του μετατρεπτικού παράγοντα της προθρομβίνης, ο οποίος αποσπά ένα ανενεργό πεπτιδίο από το μόριο της. Η θρομβίνη στη συνέχεια, αναγνωρίζοντας ως υπόστρωμα το ινωδογόνο, και με την πρωτεολυτική της δράση, οδηγεί στο σχηματισμό ινώδους. Η θρομβίνη δεσμεύεται σε δύο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων, οι οποίοι είναι οι PARs (Protease Activated Receptors) και ο GPIIb-IX-V. Η θρομβίνη ενεργοποιεί τον κύκλο της PI, τον μεταβολισμό του AA και το σχηματισμό του TxA₂ και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου [Ca²⁺]_i, στην αποκοκκίωση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Οι υποδοχείς των PARs συνδέονται με τις G_q, τις G₁₂/G₁₃ και σε μερικές περιπτώσεις με τις G_i πρωτεΐνες [43, 44]. Έχουν βρεθεί τέσσερις υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των PARs. Από αυτούς οι PAR1 και PAR4 βρίσκονται στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, ενώ τα αιμοπετάλια των ποντικών εκφράζουν τους PAR3 και PAR4 [45], [46]. Μελέτες έδειξαν ότι ο PAR1 αποτελεί τον κύριο υποδοχέα της θρομβίνης και προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε μικρές συγκεντρώσεις θρομβίνης, ενώ ο PAR4 απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η διέγερση της συσσώρευσής τους από τον PAR-1 χαρακτηρίζεται από πολλαπλές διαδικασίες που οδηγούν στο σχηματισμό ενός πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου (Εικόνα 1.6). Η μεγαλύτερη δραστηριότητα της θρομβίνης στην ενεργοποίηση του PAR1 οφείλεται μάλλον στην παρουσία μιας αλληλουχίας αμινοξέων που υπάρχει στην ιρουδίνη κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του, η οποία διευκολύνει την πρόσδεση της θρομβίνης, ενώ αυτή απουσιάζει από τον PAR4 [47]. Η θρομβίνη περιέχει στο μόριό της ειδικές περιοχές που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου, οι οποίες εντοπίζονται μακριά από το ενεργό της κέντρο [48]. Η πρώτη περιοχή ονομάζεται πεδίο δέσμευσης ανιόντων-1 (anion-binding exosite-1, ABE-1) και αποτελείται από τα κατάλοιπα Arg67-Glu80, ενώ περιλαμβάνει και

τα αμινοξέα Arg35, Lys149e, Lys81, Lys110, Lys109 και Lys36. Το ABE-1 θεωρείται ότι συμμετέχει στη δέσμευση του ιωδογόνου. Η πρόσδεση της θρομβίνης στον PAR-1 ενεργοποιεί τον κύκλο της PI μέσω της ενεργοποίησης της PLC. Η θρομβίνη δεσμεύεται στο αμινοτελικό εξωκυττάριο άκρο του υποδοχέα και αλληλεπιδρά τόσο με το αμινοτελικό πεπτίδιο LDPR/S, μέσω του ενεργού της κέντρου, όσο και με την ομοιάζουσα με την ιριδούνη περιοχή του υποδοχέα, μέσω του πεδίου δέσμευσης ανιόντων. Ο υποδοχέας PAR-1 ενεργοποιείται από την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ Arg⁴¹ και Ser⁴² (LDPR/S), η οποία καταλύεται από τη θρομβίνη. Αποκαλύπτεται έτσι, ένα νέο αμινοτελικό άκρο, το οποίο λειτουργεί ως συνδεδεμένος προσδέτης [49, 50]. Το πεπτίδιο με την αλληλουχία Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN) που προκύπτει, δεσμεύεται ενδομοριακά με τον υποδοχέα και μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια απουσία θρομβίνης. Η μέτρια βαθμού συγγένεια του PAR1 με την θρομβίνη οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A₂ καθώς και στην απενεργοποίηση της αδενυλοκυκλάσης διάμεσου G πρωτεϊνών [51-53]. Συνθετικά πεπτίδια, όπως τα πεπτίδια του αγωνιστή της θρομβίνης (thrombin receptor agonist peptide-6, TRAP), είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα της θρομβίνης απουσία αυτής.

Ο GPIb-IX-V ανήκει στην οικογένεια των πλούσιων σε λευκίνη γλυκοπρωτεϊνών. Είναι ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από τις GPIba και GPIbβ οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Οι GPIba και GPIbβ συνδέονται με την GPIX και την GPV με μη ομοιοπολικούς δεσμούς σε αναλογία 2:2:2:1. Ο GPIb-IX-V συνδέεται με την α-θρομβίνη μέσω της αμινοτελικής σφαιρικής περιοχής της GPIba (περιοχή 1-282). Η ενεργοποίηση με α-θρομβίνη προκαλεί την ενεργοποίηση της ζ ισομορφής της PLA₂ που οδηγεί στο σχηματισμό του AA καθώς και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνοκινάσης της τυροσίνης (PTK). Οι παραπάνω δράσεις οδηγούν στην αύξηση του [Ca²⁺]_i, στην έκκριση των κοκκίων και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [54, 55].



Εικόνα 1.6: Η επαγόμενη από τον PAR-1 ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που διεγείρεται από την πρόσδεση της θρομβίνης χαρακτηρίζεται από πολλαπλές διαδικασίες που οδηγούν στο σχηματισμό ενός πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου [56].

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAF) είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό φωσφολιπίδιο, το οποίο είναι ικανό να προκαλεί, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ενεργοποίηση, συσσώρευση και έκκριση των κοκκίων των αιμοπεταλίων [57, 58]. Αποτελεί ένα χημικό διαβιβαστή, με παρόμοια λειτουργικότητα με αυτή των ορμονών και των κυτοκινών [59, 60]. Ο PAF εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, ο σχηματισμός θρόμβου και οι αλλεργικές αντιδράσεις [61]. Στα εν ηρεμία κύτταρα δεν ανιχνεύεται, ενώ μετά την διέγερση παράγεται και εκκρίνεται ή εκφράζεται στην μεμβράνη αυτών. Αν και η δομή του υποδοχέα του PAF δεν έχει ακόμα πλήρως περιγραφεί, γνωρίζουμε ότι στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων εντοπίζονται περίπου 300 αντίγραφα του υποδοχέα. Ο υποδοχέας του

PAF ελέγχεται από τη Ca^{2+} -εξαρτώμενη καλμοδουλίνη φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση [62].

Τα αιμοπετάλια βιοσυνθέτουν PAF (κυμαίνεται από: $0.25-3 \text{ pmoles}/10^8$ αιμοπετάλια) μετά την ενεργοποίησή τους από συγκεκριμένους αγωνιστές, όπως η θρομβίνη [63, 64] και το κολλαγόνο, ενώ παρουσία ADP και AA, τα κύτταρα δεν είναι σε θέση να παράγουν τον αγωνιστή. Η δράση του στα αιμοπετάλια, έχει ως αποτέλεσμα την αποκοκκίωση, την αλλαγή σχήματος, τη συσσώρευση, τη σύνθεση AA και TXA₂ και την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} . Τα αιμοπετάλια διαθέτουν μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων του PAF, ο οποίος στηρίζεται στη δράση της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (ή αλλιώς Lipo-protein associated phospholipase A₂, Lp-PLA₂), ενός ενζύμου που υδρολύει τον εστερικό δεσμό στη θέση sn-2 παράγοντας τον ανενεργό lyso-PAF [65].

ADP

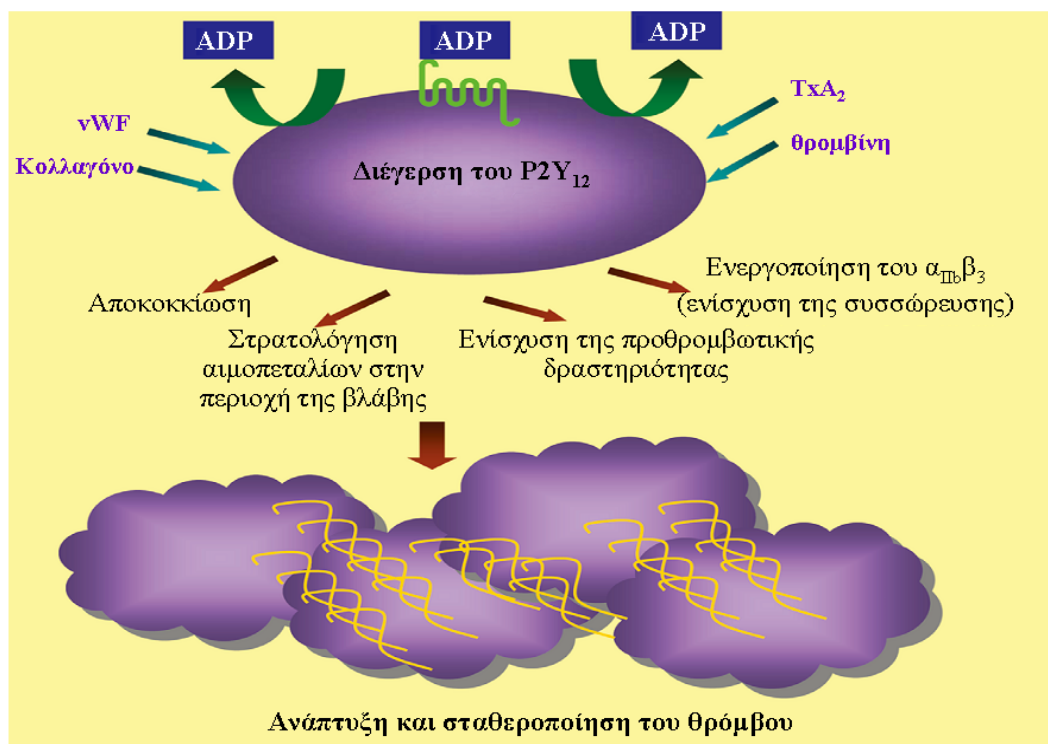
Το ADP σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι αποθηκευμένο στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων και απελευθερώνεται κατά την ενεργοποίησή τους [66]. Πρόκειται για έναν ασθενή αγωνιστή μικρού μοριακού βάρους που κατέχει ρόλο κλειδί στη λειτουργία των αιμοπεταλίων αφού ενισχύει την αρχική φυσιολογική αιμοστατική απόκριση [67, 68] ενεργοποιώντας τα αιμοπετάλια κατά έναν αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο. Το ADP απελευθερώνεται επίσης από κατεστραμμένα κύτταρα σε περιοχές ύπαρξης βλάβης του ενδοθηλίου. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το ADP πραγματοποιείται μέσω πουρινεργικών υποδοχέων όπως ο P2Y₁, ο P2X₁ και ο P2Y₁₂ [69, 70].

Ο P2Y₁ συνδέεται με μια G_q πρωτεΐνη η οποία ενεργοποιεί την PLCβ. Ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη το αν διεγείρεται και μία Rho κινάση μέσω μίας G_{α12/13} [44, 71]. Η ενεργοποίηση της PLCβ μέσω του P2Y₁ οδηγεί σε αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$, στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και τη συσσώρευσή τους [72, 73]. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει σε κύτταρα ποντικίου, απουσία του υποδοχέα, το ADP είναι σε θέση να αναστείλει την παραγωγή cAMP, αλλά η ικανότητα του να προκαλεί αύξηση του κυτοσολικού Ca^{2+} , αλλαγή σχήματος και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, είναι μειωμένη [74, 75].

Ο υποδοχέας P2Y₁₂ συνδέεται με μια G_{i2} πρωτεΐνη και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις βιοχημικές αντιδράσεις που προκαλούν την πλήρη ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων [76]. Ο υποδοχέας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στην μη-αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το ADP, το TxA₂ και το γνωστό πεπτίδιο SFLLRN [77, 78]. Επίσης, ο P2Y₁₂ συμμετέχει στη αποκοκκίωση των πυκνών κοκκίων [79] και στην ενεργοποίηση του υποδοχέα α_{IIb}β₃ [80-82]. Επίσης αναστέλλει την AC [83] αλλά δεν συμμετέχει στην κινητοποίηση του Ca²⁺ και στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων [77, 78]. Επομένως φαίνεται ότι αν και ο P2Y₁ έχει κάποιο ρόλο στη έναρξη της ενεργοποίησης, ο P2Y₁₂ είναι βασικός για μια πλήρη συσσώρευση κατά την ενεργοποίηση με ADP (Εικόνα 1.7).

Ο P2X₁ είναι ο τρίτος πουρινεργικός υποδοχέας που συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Το ATP είναι ο φυσιολογικός αγωνιστής του υποδοχέα αυτού, ενώ το ADP είναι ένας ανταγωνιστής του [84]. Ενεργοποίηση του P2X₁ οδηγεί στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων σε σφαιρικά χωρίς όμως να δημιουργούνται μεγάλες προεκτάσεις από φιλοπόδια [85, 86]. Επιπλέον, προκαλεί κεντροποίηση των κοκκίων χωρίς να απελευθερώνει το περιεχόμενό τους [87, 88], το οποίο μπορεί να βοηθήσει στην ενίσχυση της ανταπόκρισης των αιμοπεταλίων σε μικρότερες συγκεντρώσεις άλλων φυσιολογικών αγωνιστών όπως το κολλαγόνο.



Εικόνα 1.7: Ο ρόλος του P2Y₁₂ υποδοχέα στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [56].

Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο μαζί με τη θρομβίνη αποτελούν τους πιο ισχυρούς αγωνιστές των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν 18 τύποι κολλαγόνου, από τους οποίους τουλάχιστον οι 7 βρίσκονται στο αρτηριακό τοίχωμα. Έχουν βρεθεί αρκετές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, ιντεγκρίνες και μη, που φαίνεται ότι έχουν χαρακτηριστικά υποδοχέων ειδικά για το κολλαγόνο [89]. Οι σημαντικότεροι είναι η γλυκοπρωτεΐνη GPIa/IIa ή $\alpha_2\beta_1$, η GPVI αλλά και η GPIV ή CD36, η p65 πρωτεΐνη και η p85/90.

Η $\alpha_2\beta_1$ αποτελεί υποδοχέα του κολλαγόνου τύπου I και III κάτω από υψηλές τοιχωματικές διατμητικές δυνάμεις. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ο υποδοχέας αναγνωρίζει την αλληλουχία GFOGER του κολλαγόνου [90]. Η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο και η συμβολή της στη σταθεροποίηση του θρόμβου είναι μεγάλη [91]. Η αρχική ασθενής πρόσδεση των αιμοπεταλίων στον ακινητοποιημένο vWF διαμέσου του υποδοχέα GPIb σε περιοχές βλάβης του ενδοθηλίου, σταθεροποιείται στη συνέχεια με πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο μέσω της $\alpha_2\beta_1$ και της GPVI. Η πρόσδεση αυτή τα ενεργοποιεί. Στην ενεργοποίηση αυτή συμμετέχουν εκτός του κολλαγόνου και άλλοι αγωνιστές, όπως το ADP, η σεροτονίνη, η TxA_2 οι οποίοι εκκρίνονται από τα ίδια τα αιμοπετάλια. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ στον οποίο προσδένεται το ινωδογόνο, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου [91]. Η δέσμευση του κολλαγόνου στα αιμοπετάλια προκαλεί την ενεργοποίηση της οικογένειας των Src και Syk κινασών της τυροσίνης και η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLC γ_2 και τη δημιουργία πτυχωτών προεκτάσεων [92].

Η GPIV ή CD36 φαίνεται ότι συμμετέχει στην αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο, και μάλιστα τύπου V. Η p65 πρωτεΐνη συμπεριφέρεται ως υποδοχέας για το κολλαγόνο τύπου I και συμμετέχει στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στην έκκριση ATP. Τέλος, για την p85/90 πρωτεΐνη ελάχιστα είναι γνωστά. Αυτή φαίνεται να αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο και να συμμετέχει στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [89].

TxA₂

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, παρατηρείται αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$, και ενεργοποίηση του κύκλου της PI, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLA₂, η οποία καταλύει στη συνέχεια την απελευθέρωση του AA, που είναι εστεροποιημένο στην sn-2 θέση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Το TxA₂ παράγεται από το AA, το οποίο με τη δράση του ενζύμου COX-1 μετατρέπεται στα ασταθή ενδοϋπεροξειδία PGG₂ και PGH₂ και με τη δράση της συνθάσης του θρομβοξανίου σε TxA₂. Η δράση του TxA₂ είναι τοπικά περιορισμένη εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής. Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων που δεσμεύουν το TxA₂, αναγνωρίζουν και το ενδοϋπεροξειδίο PGH₂ και για αυτό ονομάστηκαν υποδοχείς TxA₂/PGH₂ [73]. Ο υποδοχέας TxA₂/PGH₂ μετονομάστηκε σε υποδοχέα TP από την International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors [93]. Ο υποδοχέας αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές α-έλικες που συνδέονται μεταξύ τους με εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια αλυσίδες [94]. Πρόκειται για έναν υποδοχέα της οικογένειας των προστανοϊδών, που είναι συζευγμένος με G πρωτεΐνες [95].

Σύμφωνα με μελέτες, εντοπίζονται δυο τύποι TxA₂/PGH₂ υποδοχέων: α) ένας με υψηλή συγγένεια, με 1166 αντίγραφα ανά αιμοπετάλιο, που σχετίζεται με την αλλαγή του σχήματος και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με μία G_{12/13}- πρωτεΐνη και β) ένας με χαμηλή συγγένεια, που εμπλέκεται στις διαδικασίες απελευθέρωσης του περιεχομένου των κοκκίων [96]. Γενικά ο ρόλος του TxA₂ είναι η ενίσχυση της αρχικής ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την στρατολόγηση τους στην περιοχή που έχει υποστεί βλάβη [97].

Επινεφρίνη

Η επινεφρίνη προκαλεί την έκκριση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αλλά όχι και την αλλαγή σχήματος τους. Από μόνη της δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια, αλλά ισχυροποιεί την επίδραση άλλων ενεργοποιητών μέσω του αδρενεργικού υποδοχέα α₂. Αυτός συνδέεται με την Gz πρωτεΐνη [98]. Σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν έφεραν τον αδρενεργικό υποδοχέα α₂, η επινεφρίνη δεν προκαλούσε την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η αιμορραγία ήταν χρονικά μέτρια παρατεταμένη και η δημιουργία σταθερού θρόμβου ήταν εξασθενημένη [99].

Προσταγλαυδίνη E₂ (PGE₂)

Η PGE₂ μπορεί να ισχυροποιήσει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω του EP3 υποδοχέα. Ο υποδοχέας EP3 συνδέεται με τις τύπου Gi πρωτεΐνες. Σε αιμοπετάλια ποντικών που δεν έχουν τον EP3 υποδοχέα οι αιμορραγικοί χρόνοι είναι αυξημένοι και η ισχυροποιητική επίδραση της PGE₂ ακυρώνεται [100, 101].

Αιμόσταση

Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει ένα περίπλοκο σύστημα, σχεδιασμένο ώστε να διατηρεί το αίμα σε κυκλοφορούσα κατάσταση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Το σύστημα αυτό είναι επίσης υπεύθυνο για να ελέγχει τη ροή του αίματος όταν η ακεραιότητα του αγγειακού συστήματος διαταραχθεί. Το φυσιολογικό αγγειακό ενδοθήλιο διατηρεί τη ρευστότητα του αίματος, αποτρέποντας την θρόμβωση του αίματος και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το ενδοθήλιο επίσης απομονώνει τα κύτταρα του αίματος και τους παράγοντες του πλάσματος από τους παράγοντες εκείνους που είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία θρόμβου. Οι παράγοντες αυτοί είναι πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως το κολλαγόνο και ο παράγοντας vWF καθώς και ο ιστικός παράγοντας (TF), μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα κύτταρα συνεκτικού ιστού και τα μακροφάγα και η οποία προκαλεί θρόμβωση του αίματος. Όταν το τοίχωμα ενός αγγείου τραυματιστεί, το κυκλοφορούν αίμα έρχεται σε επαφή με το υποενδοθήλιο, γεγονός το οποίο διεγείρει το σχηματισμό αιμοστατικής πλάκας προάγοντας την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την επακόλουθη θρόμβωση του αίματος.

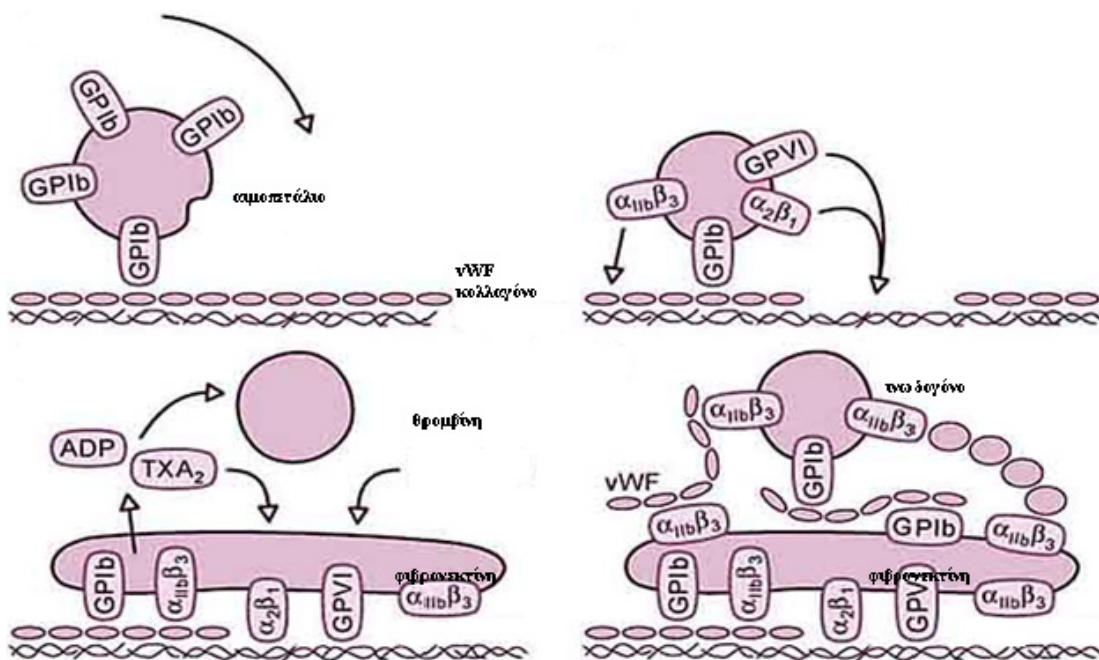
Τα αιμοπετάλια παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην αιμόσταση. Όταν λάβει χώρα ο τραυματισμός του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, τα αιμοπετάλια πραγματοποιούν μία ακολουθία γεγονότων, η οποία περιλαμβάνει: την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο τραυματισμού, την εξάπλωση των προσκολλημένων αιμοπεταλίων στην εκτεθειμένη υποενδοθηλιακή επιφάνεια, την έκκριση των κοκκίων τους που προκαλεί την περαιτέρω ενεργοποίηση άλλων αιμοπεταλίων, τη συσσώρευσή τους και το σχηματισμό του θρόμβου.

Η αιμόσταση, δηλαδή η επίσχεση της αιμορραγίας, γίνεται με τρεις βασικούς μηχανισμούς που συμβαίνουν αμέσως μετά τον τραυματισμό του αγγείου: α) αγγειοσυστολή που περιορίζει την αιμορραγία, β) σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου (λευκού θρόμβου) στην περιοχή της βλάβης, που φράζει παροδικά το άνοιγμα και γ) πήξη του αίματος που αποτελεί και την κύρια άμυνα κατά της αιμορραγίας. Η πήξη ολοκληρώνεται σε μερικά λεπτά και οδηγεί στο σχηματισμό του ερυθρού θρόμβου ή πήγματος αίματος [102].

Προσκόλληση των αιμοπεταλίων

Ως προσκόλληση ορίζεται το φυσικό και βιοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο τα αιμοπετάλια μετά από την επαφή τους με το κατεστραμμένο τοίχωμα των αγγείων αλλάζουν συμπεριφορά, μεταβάλλουν το φορτίο της μεμβράνης και το σχήμα τους και τελικά εμφανίζουν ψευδοπόδια με τη βοήθεια των οποίων απλώνονται και τελικά προσκολλώνται πάνω στην επιφάνεια της βλάβης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στο αίμα σε ήρεμη κατάσταση χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με άλλα κύτταρα του αίματος και η ενεργοποίησή τους αναστέλλεται τόσο από το μονοξειδίο του αζώτου (NO) όσο και από την προσταγλανδίνη I₂ που απελευθερώνουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε περίπτωση όμως τραυματισμού του αρτηριακού τοιχώματος, προκαλείται η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου και η έκθεση προς τον ενδοαγγειακό χώρο στοιχείων του υπενδοθηλιακού χώρου. Η προσκόλληση των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο κατεστραμμένο αρτηριακό τοίχωμα αποτελεί το αρχικό στάδιο της πρωτογενούς αιμόστασης [103] και οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας του αιμοπεταλίου που έχουν διαμόρφωση υποδοχέα, οι κυριότερες από τις οποίες είναι οι γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας των ιντεγκρινών και οι πλούσιες σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνες. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.8*, η πρώτη επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων και του υπενδοθηλιακού χώρου γίνεται μέσω του υποδοχέα GPIIb-IX-V ο οποίος αναγνωρίζει τον παράγοντα von Willebrand (von Willebrand factor, vWF), που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τα σωματίδια Weibel Palade καθώς και από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Η σταθεροποίηση της

αρχικής αυτής ασθenoύς πρόσδεσης γίνεται με πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο μέσω του υποδοχέα GPIa/IIa, τη βιτρονεκτίνη (διαμέσου του $\alpha_v\beta_3$), την φιβρονεκτίνη (διαμέσου του GPIc/IIa) και την λαμινίνη (διαμέσου του $\alpha_6\beta_1$) [5]. Η δέσμευση του κολλαγόνου από τον GPIa/IIa οδηγεί στην ενεργοποίηση και στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Στην ενεργοποίηση αυτή συμμετέχουν πέρα του κολλαγόνου και άλλοι αγωνιστές όπως η θρομβίνη, το TXA_2 , το ADP και ο PAF που εκκρίνονται από τα ίδια τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Αυτή η έκκριση έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση άλλων αιμοπεταλίων που δεν είχαν ενεργοποιηθεί πριν. Στην έναρξη της διαδικασίας της θρόμβωσης φαίνεται ότι διαδραματίζει ρόλο και η συνεργική αλληλεπίδραση των προσκολλητικών μορίων [104]. Το τελικό στάδιο της προσκόλλησης συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια κατανέμονται κατά μήκος του υπενδοθηλίου και στεγανοποιούν την εκτεθειμένη περιοχή του ενδοθηλίου από την έξοδο του αίματος.



Εικόνα 1.8: Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων με συστατικά του υπενδοθηλιακού χώρου και ο σχηματισμός γέφυρας ινωδογόνου μεταξύ δύο αιμοπεταλίων.

Συσσώρευση των αιμοπεταλίων και σχηματισμός θρόμβου

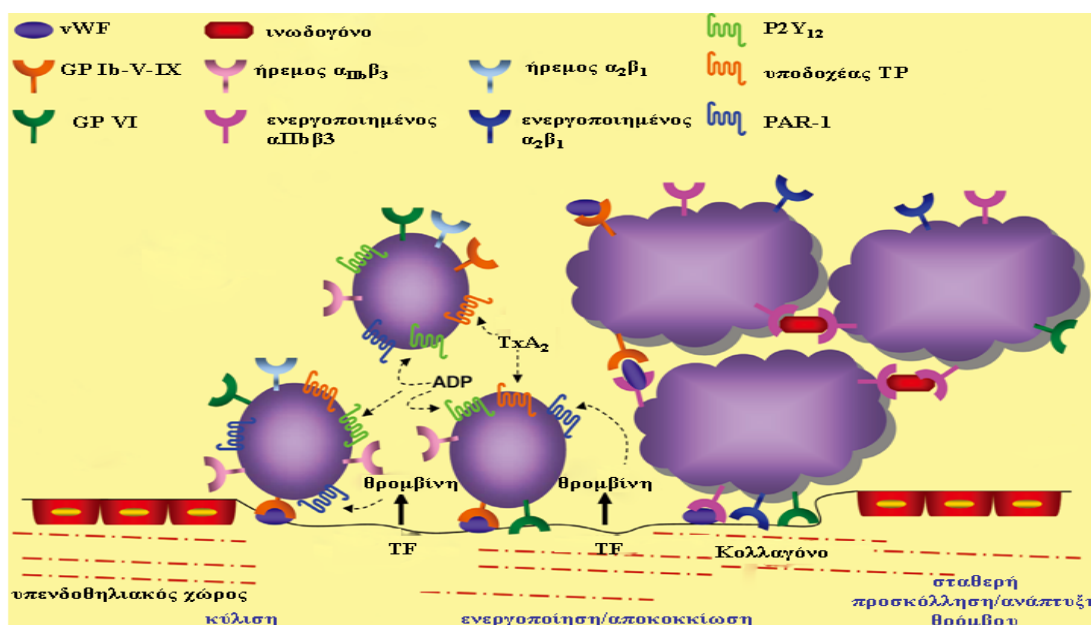
Συσσώρευση είναι η διαδικασία κατά την οποία δύο αιμοπετάλια προσκολλώνται μεταξύ τους. Μεταξύ όλων των γλυκοπρωτεϊνών-υποδοχέων, ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων, αφού παίζει τον κύριο ρόλο στο τελικό στάδιο συσσώρευσης τους. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ανεξάρτητα από τον ενεργοποιητή που την προκαλεί πραγματοποιείται με τη πρόσδεση μορίων ινωδογόνου (Fg) στον ενεργοποιημένο υποδοχέα. Όταν αυτός είναι ανενεργός το διαλυτό Fg του πλάσματος δε μπορεί να δεσμευτεί στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Η πρόσδεση αυτή απαιτεί την παρουσία Ca^{+2} και δεν επιτυγχάνεται απουσία δισθενών κατιόντων. Για να επιτευχθεί συσσώρευση απαιτείται κατανάλωση ενέργειας και κίνηση των αιμοπεταλίων. Σπουδαίο ρόλο παίζουν και οι τοιχωματικές διατμητικές δυνάμεις (shear stress) που αναπτύσσονται στην περιοχή της βλάβης οι οποίες είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια αν και οι μηχανισμοί αυτής της δράσης είναι ακόμη υπό διερεύνηση [28].

Διακρίνονται δύο φάσεις συσσώρευσης, η πρωτογενής συσσώρευση που είναι αντιστρέψιμη και η μη αντιστρεπτή δευτερογενής συσσώρευση. Στην πρωτογενή συσσώρευση τα αιμοπετάλια με τη βοήθεια γεφυρών ινωδογόνου συνδέονται χαλαρά μεταξύ τους. Στην δευτερογενή συσσώρευση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Σε ασθενείς με δυσλειτουργία στην έκκριση των αποθηκευτικών κοκκίων, η δευτερογενής συσσώρευση είναι ελαττωμένη ή απουσιάζει τελείως, κάτι που οδηγεί σε αιμορραγική [105].

Το πρωτογενές συσσώρευμα που σχηματίζεται είναι σχετικά ασταθές και συνεπώς είναι απαραίτητη η σταθεροποίηση του θρόμβου των αιμοπεταλίων, γεγονός που πραγματοποιείται με τη διαδικασία της δευτερογενούς αιμόστασης, η οποία ξεκινά με την ενεργοποίηση της αλληλουχίας της πήξης και το σχηματισμό της θρομβίνης και του ινώδους [106]. Επιπλέον, κατά την προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων σε τραυματισμένες περιοχές του ενδοθηλίου, οι ενεργοποιητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα ίδια τα αιμοπετάλια βοηθούν στη στρατολόγηση άλλων κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την επέκταση και τη σταθεροποίηση της αιμοστατικής πλάκας [107]. Σε αυτούς τους ενεργοποιητικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται το ADP, το TxA_2 , η σερετονίνη, το κολλαγόνο και η θρομβίνη [108].

Από αυτούς, ο πιο ισχυρός είναι η θρομβίνη [109, 110]. Η θρομβίνη παράγεται τοπικά στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από τον TF και διαμεσολαβεί στην παραγωγή του ινώδους από το ινωδογόνο, το οποίο συμβάλει στο σχηματισμό της αιμοστατικής πλάκας και στην ανάπτυξη του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Επιπλέον, η θρομβίνη ενεργοποιεί απευθείας τα αιμοπετάλια μέσω της διέγερσης του υποδοχέα τους PAR-1 [108]. Επίσης, η απελευθέρωση του ADP και του TxA_2 από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, προκαλεί πέραν της στρατολόγησης, την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, την έκφραση διαφόρων προφλεγμονωδών μορίων (όπως είναι η P-σελεκτίνη, ή το CD40L), την αύξηση της προθρομβωτικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων και την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα, από χαμηλής σε υψηλής συγγένειας. Αποτέλεσμα αυτών, είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε παθολογική θρόμβωση [66, 107, 108].

Στην *Εικόνα 1.9*, φαίνεται ο σχηματισμός του θρόμβου σε τρία στάδια: (α) την αρχική φάση που περιλαμβάνει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, (β) την φάση της επέκτασης στην οποία συμπεριλαμβάνονται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η στρατολόγηση άλλων αιμοπεταλίων και η συσσώρευσή τους και (γ) την φάση της διαίωσης που χαρακτηρίζεται από τη διέγερση των αιμοπεταλίων και τη σταθεροποίηση του θρόμβου.



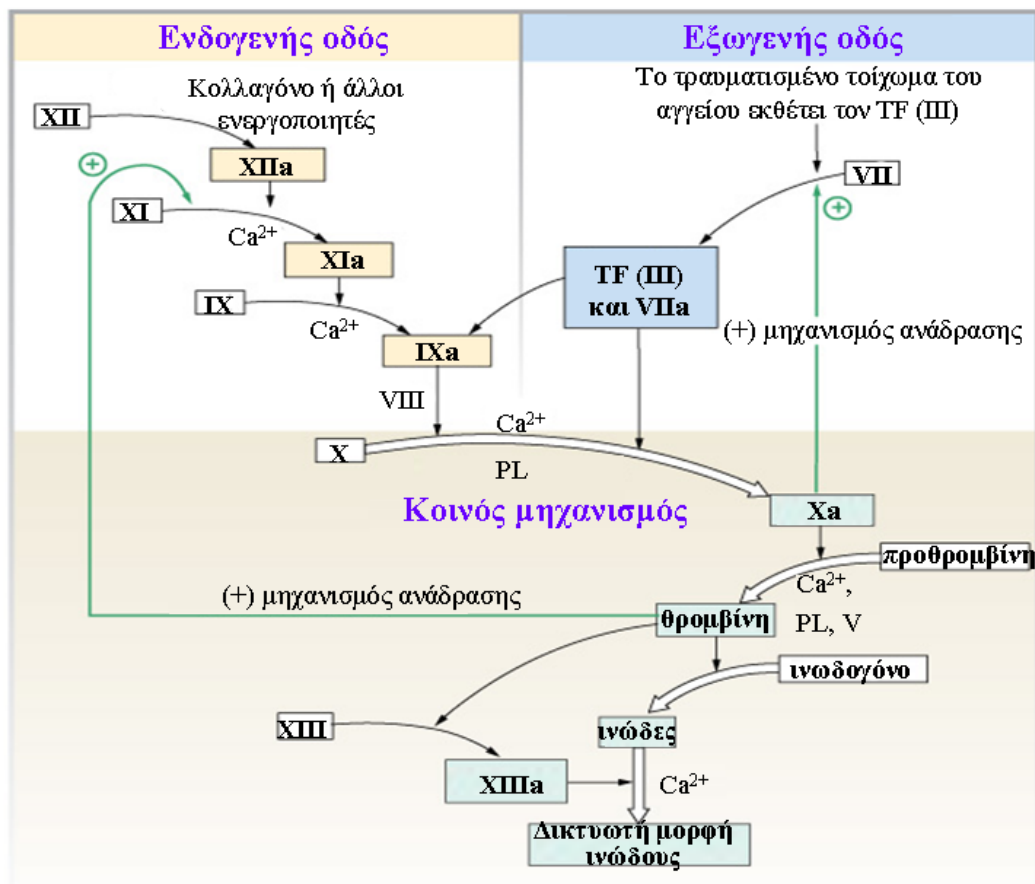
Εικόνα 1.9: Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων και η συσσώρευσή τους. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της GP Ib και του vWF οδηγεί στην κύλιση των αιμοπεταλίων στο κατεστραμένο ενδοθήλιο, οδηγώντας στην επακόλουθη αλληλεπίδραση της GPVI και του κολλαγόνου. Αυτό διεγείρει την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα σε υψηλής συγγένειας και την απελευθέρωση ADP και TxA_2 , οι οποίοι συνδέονται με τους P2Y₁₂ και TP υποδοχείς αντίστοιχα. Ο TF διεγείρει τοπικά την

παραγωγή θρομβίνης, η οποία συμβάλει στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της πρόσδεσής της με τον υποδοχέα PAR-1 [56].

Πήξη του αίματος

Κατά την πρωτογενή αιμόσταση τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο υπενδοθήλιο και σχηματίζουν τον πρωτογενή αιμοστατικό θρόμβο μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα αιμοπετάλια. Αυτός ο πρωτογενής αιμοστατικός θρόμβος είναι πλούσιος σε αιμοπετάλια, όμως είναι εύθραυστος και αποκολλάται εύκολα από την τραυματισμένη περιοχή του αγγειακού τοιχώματος. Η σταθεροποίηση του πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου γίνεται κατά τη δευτερογενή αιμόσταση [111]. Αυτή αρχίζει με την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και το σχηματισμό της θρομβίνης και του ινώδους (*Εικόνα 1.10*). Η πήξη είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός που συμμετέχουν διάφορες πρωτεΐνες που εκτός από την ιδιαίτερη ονομασία που έχει η καθεμιά, είναι γνωστές και σαν παράγοντες πήξης με έναν λατινικό αριθμό δίπλα. Όλες οι πρωτεΐνες, εκτός από το ινωδογόνο, είναι πρωτεολυτικά ένζυμα, κυρίως σερινοπρωτεάσες στην ανενεργό τους μορφή ή συνένζυμα. Κατά την πήξη αυτές οι πρωτεάσες ενεργοποιούνται διαδοχικά η μια μετά την άλλη [28]. Οι ενεργοποιημένες μορφές των παραγόντων πήξης συμβολίζονται με το γράμμα a δίπλα στον λατινικό αριθμό. Η κύρια αντίδραση στον μηχανισμό της πήξης του αίματος είναι η μετατροπή της διαλυτής πρωτεΐνης του πλάσματος ινωδογόνου, στο αδιάλυτο ινώδες με τη δράση της θρομβίνης. Η πήξη του αίματος μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια, τον σχηματισμό του μετατρεπτικού παράγοντα της προθρομβίνης, τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και την μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες και ρυθμίζεται από αναστολείς (αντιθρομβίνη III, πρωτεΐνες CS) που εμποδίζουν τη δράση παραγόντων πήξης [112, 113]. Επίσης η πορεία της αλληλουχίας της πήξης διακρίνεται στην ενδογενή οδό χωρίς την επαφή με ιστική βλάβη και στην εξωγενή οδό που ενεργοποιείται όταν τραυματιστεί ο ιστός [114]. Σε σχέση με την ενδογενή οδό, στην εξωγενή οδό που προχωρεί ραγδαία, ο TF (παράγοντας III) συνδέεται με την προκονβερτίνη (παράγοντας VII) και με Ca^{2+} σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που ενεργοποιεί τον παράγοντα X. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας Xα μαζί με τον παράγοντα V και με Ca^{2+} σχηματίζουν τον μετατρεπτικό παράγοντα της προθρομβίνης [112]. Κατά την ενδογενή οδό ο παράγοντας XII, XI, η προκαλλικρεΐνη και το μεγάλο μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK) δεσμεύονται σε αρνητικά φορτία του υπενδοθηλίου και επί της επιφάνειας των

αιμοπεταλίων και οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα V [115]. Η προθρομβίνη συνδέεται στα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια (PL) της μεμβράνης των συσσωρευμένων αιμοπεταλίων, όπως η PS, μαζί με τον μετατρεπτικό παράγοντα της προθρομβίνης που την μετατρέπει σε θρομβίνη. Η θρομβίνη προκαλεί την παραγωγή περισσότερου παράγοντα V και αυξάνει την παραγωγή του αντιαιμορροφιλικού παράγοντα (παράγοντας VIII) και ενεργοποιεί τον παράγοντα σταθεροποίησης του ινώδους (παράγοντας XIII). Το ινωδογόνο μετατρέπεται σε ινώδες κοντά στα συσσωρευμένα αιμοπετάλια το οποίο οδηγεί στη ενίσχυση του συσσωρεύματος.



Εικόνα 1.10: Τα στάδια της πήξης του αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs)

Ορισμός και ιστορική αναδρομή

Τα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs) είναι μικροσκοπικά μεμβρανικά κυστίδια που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους και εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα χαρακτηριστικά των κυττάρων προέλευσής τους. Εξαιτίας του πολύ μικρού τους μεγέθους δεν ανιχνεύονται με τις κλασσικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στα αιμοπετάλια. Οι κυριότεροι τρόποι μελέτης των PMPs είναι με κυτταρομετρία ροής και με ανοσοενζυμικό προσδιορισμό (μέθοδος ELISA). Από νωρίς τα PMPs απέκτησαν κλινική σημασία αφού εκφράζουν φωσφολιπίδια στην επιφάνειά τους προσδίδοντάς τους έναν προθρομβωτικό χαρακτήρα [116].

Στη δεκαετία του '40, παρατηρήθηκε ότι πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια έπηξε πολύ αργότερα από το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, υπονοώντας ένα ρόλο για τα αιμοπετάλια [117, 118]. Ο O' Brian το 1955 έδειξε ότι προσθέτοντας ορό σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια ελάττωνε ακόμη περισσότερο το χρόνο πήξης [118]. Πολλές από αυτές τις αντικρουόμενες παρατηρήσεις εξηγήθηκαν με την ανακάλυψη των μικροσωματιδίων των αιμοπεταλίων. Ο Wolf [119] το 1967 χαρακτήρισε την δράση αυτή με μια απλή φράση ως «αιμοπεταλιακή σκόνη», δηλώνοντας έτσι τα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων μετά από την ενεργοποίησή τους ή την αποθήκευσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ενεργότητα αυτή αρχικά χαρακτηρίστηκε ως αιμοπεταλιακός παράγοντας 3 (PF3) της οδού πήξης. Αργότερα το 1972 οι Warren και Vales [120] απέδειξαν την απελευθέρωση των μικροσωματιδίων από τα αιμοπετάλια μετά από προσκόλλησή τους στο αρτηριακό τοίχωμα. Το 1985, τα μικροσωματίδια αυτά παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικές μικρογραφίες και χαρακτηρίστηκαν ως προθρομβωτικά [121, 122]. Σήμερα αυτά τα μικροσωματίδια είναι ευρέως γνωστά ως PMPs.

Στην διεθνή επιστημονική κοινότητα δεν υπάρχει ακόμα κάποιο πρωτόκολλο για την ταυτοποίηση των PMPs. Έχει όμως προταθεί ότι αν ένας μικρού μεγέθους πληθυσμός σωματιδίων (μέχρι 1 μm) εκφράζει θετικότητα για την Αννεξίνη-V τότε τα σωματίδια αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως μικροσωματίδια. Είναι γνωστό ότι η Αννεξίνη-V είναι μια πρωτεΐνη που προέρχεται από τον πλακούντα και η οποία εμφανίζει αντιθρομβωτική δράση δεσμευόμενη με αρνητικά φωσφολιπίδια, διαμέσου γεφυρών Ca^{2+} [123]. Τα PMPs που παράγονται από τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίηση περιέχουν μεγάλη ποσότητα PS στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η επιφανειακή έκφραση της PS είναι το κύριο χαρακτηριστικό των PMPs. Η θετικότητα προς την Αννεξίνη-V όμως δεν είναι επαρκές στοιχείο ώστε να χαρακτηριστούν τα σωματίδια αυτά ως PMPs. Πρέπει τα σωματίδια αυτά να εκφράζουν και άλλες πρωτεΐνες χαρακτηριστικές των κυττάρων προέλευσής τους [124-126].

Κυτταρικά μικροσωματίδια (MPs) παράγονται από διάφορα κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα λεία μυϊκά κύτταρα κ.α. μετά από ενεργοποίησή τους μέσω αγωνιστών ή κατά την απόπτωση. Βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος υγιών ανθρώπων και τα επίπεδά τους αυξάνονται σε πολλές ασθένειες, ιδιαίτερα σε αυτές με υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης. Μεταξύ των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος, τα PMPs αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό. Εξαιτίας της σύστασής τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως στη θρόμβωση, στη φλεγμονή, στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και στην αγγειογένεση [116].

Γενικά χαρακτηριστικά και σύσταση

Τα PMPs αποτελούν το 70%-90% των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος [127, 128], ενώ δεν έχουν ανιχνευτεί στις αθηρωματικές πλάκες [129]. Τα PMPs είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυστιδίων που ποικίλουν ως προς το μέγεθος (0.1-1 μm), την πρωτεϊνική και λιπιδιακή τους σύσταση και έχουν αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια κυρίως την PS στην επιφάνειά τους [130, 131]. Παράγονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με διάφορους αγωνιστές όπως το κολλαγόνο, τη θρομβίνη, το Ca^{2+} -

ιονοφόρο (A23187) κ.λ.π [132]. Στην επιφάνεια των PMPs βρίσκονται μόρια που προέρχονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας-ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ [133], η P-σελεκτίνη [134], το CD36 [135], το CD40L [116, 136] το CD31 [137, 138] κ.τ.λ. Επίσης τα PMPs περιέχουν βιοδραστικά λιπίδια όπως το AA, τη φωσφορική σφιγγοσίνη-1 (SPP-1) και τον PAF [139].

Γιατί τα κύτταρα απελευθερώνουν MPs

Είναι ενδιαφέρον να προσπαθήσουμε να απαντήσουμε το ερώτημα γιατί τα κύτταρα απελευθερώνουν MPs, γιατί αν κάποιος συμφωνεί ότι η παραγωγή των PMPs είναι μια ενεργή διαδικασία, τότε θα υπάρχει κάποιος λόγος που τα κύτταρα το κάνουν. Πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι τα κύτταρα απελευθερώνουν MPs για να επικοινωνήσουν ή να έρθουν σε επαφή με άλλα κύτταρα, για να μεταφέρουν υποδοχείς ή για να ξεκινήσουν σηματοδότηση. Επομένως η απελευθέρωσή τους είναι δυνατόν να διαδραματίζει κάποιο ρόλο: ως ανταπόκριση στο στρες, στη φλεγμονή και στην αναγέννηση του ιστού. Τα κύτταρα είναι επίσης πιθανόν να απελευθερώνουν MPs ως έναν αμυντικό μηχανισμό για να αποφευχθεί η φαγοκυττάρωσή τους. Η παρουσία της PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των κυττάρων λειτουργεί ως δείκτης ότι είναι τραυματισμένα και ότι είναι έτοιμα για την απομάκρυνσή τους μέσω φαγοκυττάρωσης. Παρόλα αυτά, η έκθεση της PS μπορεί να γίνει και μετά τη διέγερση των κυττάρων και έτσι να είναι παροδική και όχι μόνιμη, και επομένως τα κύτταρα να μπορούν να επιδιορθωθούν. Τα κύτταρα μπορούν να επανέρθουν στη φυσιολογική τους λειτουργία και τότε η εξωτερικευμένη PS που αποτελεί αφενός μεν δείκτη θανάτου και αφετέρου επάγει την προσκόλληση των φαγοκυττάρων, πρέπει να απομακρυνθεί. Υπάρχουν 2 πιθανοί τρόποι με τους οποίους τα κύτταρα φροντίζουν την απομάκρυνση της PS: (α) με το να τη μεταφέρουν πίσω στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης που είναι μια πολύ αργή διαδικασία και απαιτεί μεταβολική ενέργεια ή (β) με το να παράγουν PS^+ MPs που δεν απαιτεί καθόλου μεταβολική ενέργεια και πραγματοποιείται γρηγορότερα. Επίσης η απελευθέρωσή τους μπορεί να διευκολύνει την απομάκρυνση του συμπλέγματος του συμπληρώματος C5b-9 ή άλλων πιθανά βλαβερών ουσιών ή παθογόνων από τα κύτταρα [140].

Μηχανισμός παραγωγής των μικροσωματιδίων

Πέντε ένζυμα συμμετέχουν στην ρύθμιση της φωσφολιπιδιακής ασυμμετρίας των κυτταρικών μεμβρανών και συμμετέχουν στην παραγωγή των μικροσωματιδίων: η γελσολίνη (που βρίσκεται μόνο στα αιμοπετάλια), η αμινοφωσφολιπιδιακή μετατοπάση, η φλοπάση, η αναδιοργανώση και η καλπαΐνη (*Εικόνες 2.1Α-1Δ*). Αυτά τα ένζυμα βοηθούν στη διατήρηση μιας δυναμικής ασύμμετρης σταθερής κατάστασης όπου η PC και η SM βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, ενώ η PS και η PE στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Όταν η συγκέντρωση του ασβεστίου στο κυτοσόλιο αυξηθεί, όπως για παράδειγμα κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η σταθερή αυτή κατάσταση αλλάζει, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τα φωσφολιπίδια να μετακινηθούν στην έξω πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ την ίδια στιγμή τα αμινοφωσφολιπίδια κατευθύνονται στην έσω πλευρά της μεμβράνης [137, [141-143].

Τελσολίνη

Η γελσολίνη είναι ένα ειδικό ένζυμο που συμμετέχει στην παραγωγή των PMPs και υπάρχει μόνο στα αιμοπετάλια. Ο ρόλος της είναι η απομάκρυνση των καλυπτήριων πρωτεϊνών Cap Z και αδουσίνης, που βρίσκονται στην άκρη των νημάτων της ακτίνης και επάγεται από την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η απομάκρυνση των καλυπτήριων πρωτεϊνών επιτρέπει στην ακτίνη να αναδιοργανωθεί και στο αιμοπετάλιο να αρχίσει να συστέλλεται [144].

Μετατοπάση των αμινοφωσφολιπιδίων

Η μετατοπάση των αμινοφωσφολιπιδίων είναι ένα ATP-εξαρτώμενο ένζυμο. Η δράση της είναι υψηλά εξειδικευμένη για τη μεταφορά των αμινοφωσφολιπιδίων (PS και PE) από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης στην εσωτερική. Για κάθε μόριο PS που μεταφέρεται χρειάζεται ένα μόριο ATP [145]. Η δράση της μετατοπάσης των αμινοφωσφολιπιδίων αναστέλλεται παρουσία αυξημένων επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου.

Φλοπάση

Η φλοπάση είναι ένα ATP-εξαρτώμενο ένζυμο που μεταφέρει λιπίδια από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης στην εξωτερική. Η δράση της δεν είναι ειδική για αμινοφωσφολιπίδια. Η δράση αυτής της πρωτεΐνης δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αν και πιθανώς δρα συνεργατικά με την μετατοπάση των αμινοφωσφολιπιδίων [143].

Αναδιοργανώση των λιπιδίων

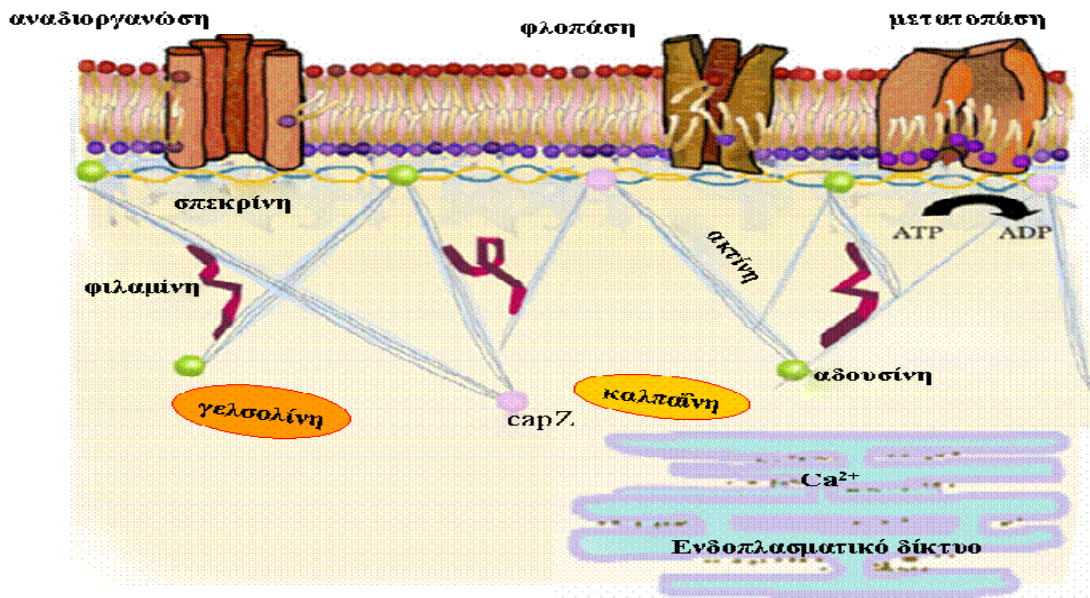
Η αναδιοργανώση των λιπιδίων βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη. Η δράση της επιτρέπει στα φωσφολιπίδια να περάσουν στην άλλη πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης [146]. Τα αυξημένα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου απενεργοποιούν την μετατοπάση των αμινοφωσφολιπιδίων, ενώ την ίδια στιγμή ενεργοποιούν την αναδιοργανώση των λιπιδίων. Αυτή η διαδικασία προκαλεί την απώλεια της φωσφολιπιδιακής ασυμμετρίας και την σταθερή έκφραση της PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Μία κληρονομούμενη ανωμαλία της αναδιοργανώσης των λιπιδίων εμφανίζεται στο σύνδρομο του Scott, μία σπάνια αυτοσωμική υποτελής διαταραχή της πηκτικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων [147], όπου το ένζυμο εμφανίζει μειωμένη ικανότητα κατάλυσης. Αυτό οδηγεί στη μειωμένη έκφραση της PS και στη μειωμένη παραγωγή PMPs. Αυτό έχει ως συνέπεια να μην ενεργοποιείται ο παράγοντας X και η προθρομβίνη και να προκαλείται σοβαρό πρόβλημα αιμορραγίας [148, 149].

Καλπαΐνη

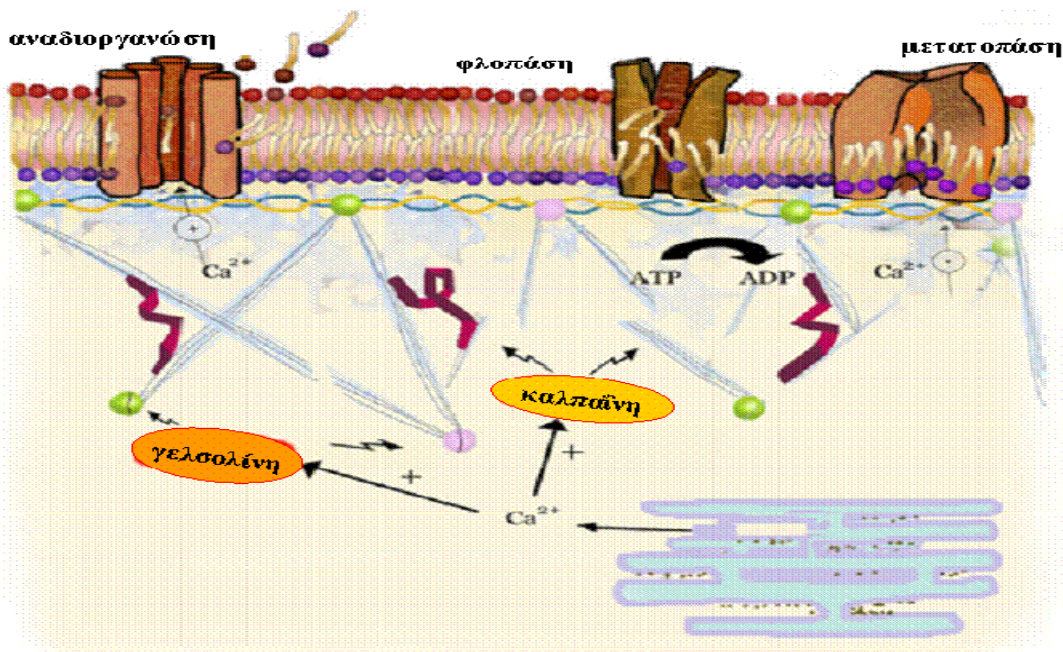
Τα αυξημένα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου ενεργοποιούν αρκετά κυτοσολικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης της καλπαΐνης. Αυτό το ένζυμο είναι μια πλούσια σε κυστεΐνη πρωτεΐνάση που ανήκει στην οικογένεια των παπαϊνών. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, όπως επίσης και κατά την απόπτωση και τη νέκρωση, το ασβέστιο απελευθερώνεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο οδηγώντας στην ενεργοποίηση της καλπαΐνης. Η καλπαΐνη εμφανίζει αρκετές δράσεις στην παραγωγή

των μικροσωματιδίων: διασπά τα κυτταροσκελετικά νημάτια, διευκολύνει την απελευθέρωση των μικροσωματιδίων και ενεργοποιεί την απόπτωση μέσω της προκασπάσης 3 και της Bcl-XL.

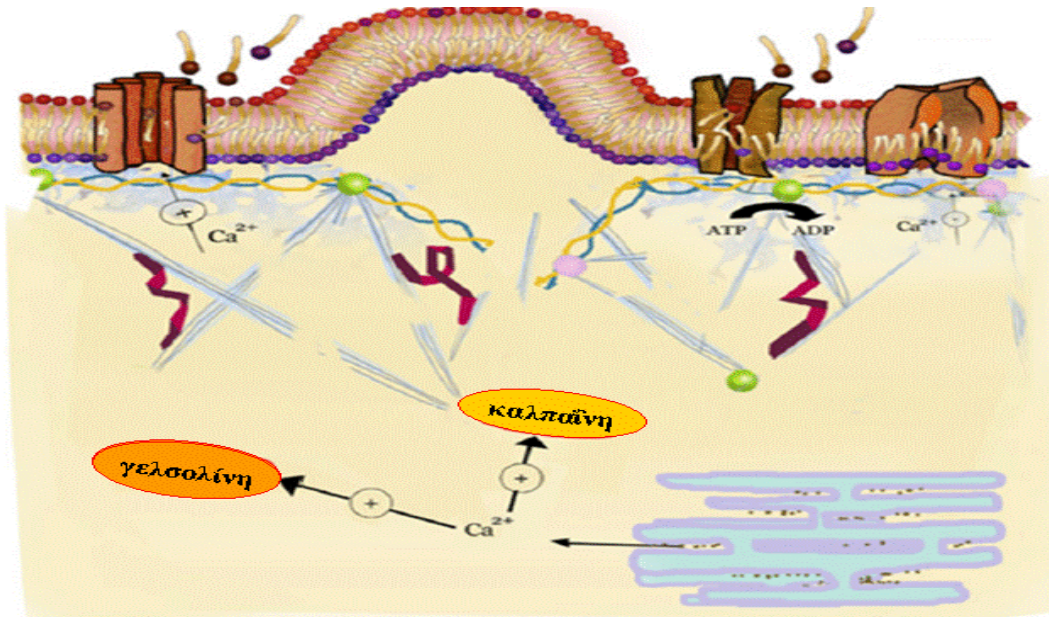
Μία ασθένεια που σχετίζεται με την παρουσία της καλπαΐνης στο πλάσμα και είναι στενά συνδεδεμένη με τα PMPs, είναι η θρομβοκυτοπενική πορφύρα (TTP) [150, 151]. Η TTP χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλων πολυμερών vWF στην κυκλοφορία. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτά τα εξαιρετικά προθρομβωτικά πολυμερή που απελευθερώνονται από τα σωματίδια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων, πρωτεολύονται γρήγορα με τη δράση μιας μεταλλοπρωτεάσης του πλάσματος. Συγγενείς ή ποσοτικές ή ποιοτικές διαταραχές αυτής της μεταλλοπρωτεάσης οδηγούν στην TPP, σχηματίζοντας μεγάλα συσσωρεύματα αιμοπεταλίων συνδεδεμένων με τον vWF [152]. Αυξημένα επίπεδα των PMPs ή και άλλων MPs όπως των ενδοθηλιακών μικροσωματιδίων (EMPs) που εκφράζουν την καλπαΐνη, κυκλοφορούν τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια φάση της TPP [151, 153]. Η ενεργοποίηση της καλπαΐνης έχει συσχετιστεί με την πρώιμη παραγωγή των MPs στην TPP [150]. Συγκεκριμένα αυτό το ένζυμο συμμετέχει στην αρχική παραγωγή αιμοπεταλιακών υποδοχέων, όπως είναι ο GPIb-X, όπως επίσης και στην διάσπαση νημάτων που υποστηρίζουν τη σύνδεση της κυτταρικής μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό [154]. Πρόσφατα, *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι τα EMPs μεταφέρουν vWF και επάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ακόμη πιο σταθερό τρόπο [155].



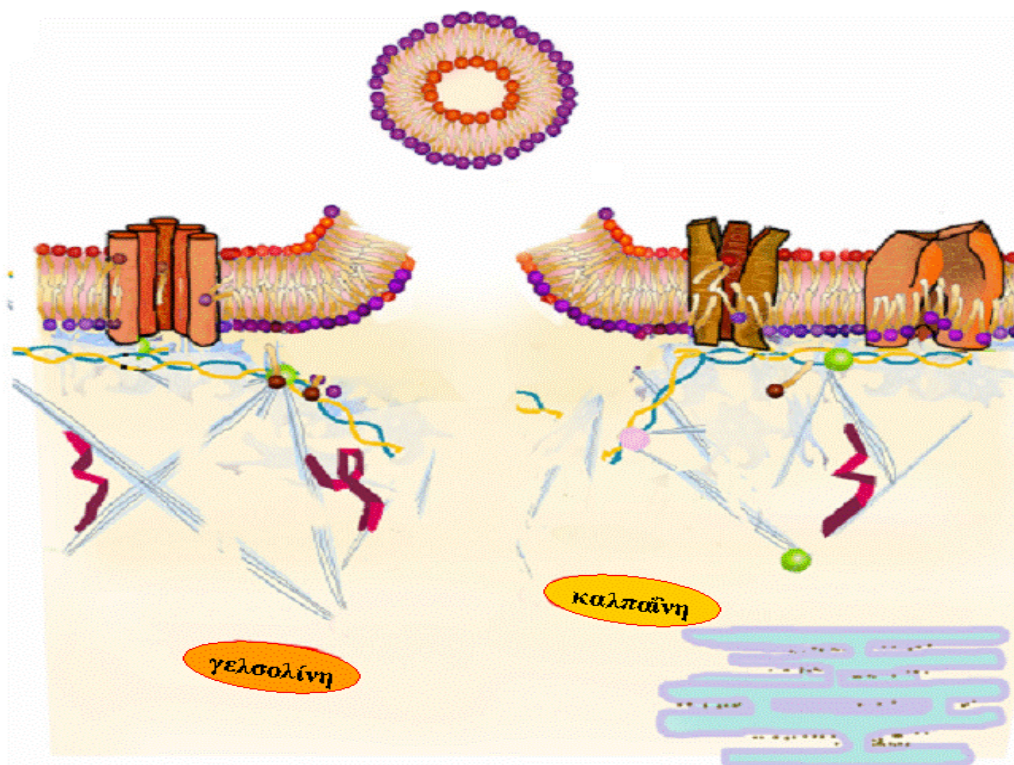
Εικόνα 2.1.A: Σχηματική αναπαράσταση ενός ήρεμου κυτταροσκελετού. Τα Ca^{2+} είναι αποθηκευμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αναδιοργάνωση των λιπιδίων είναι ανενεργή ενώ η μετατοπάση των αμινοφωσfolιπιδίων είναι ενεργή. Η μετατοπάση μεταφέρει την PS και την PE από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης στην εσωτερική. Ένα μόριο ATP χρειάζεται για κάθε μόριο PS που μεταφέρεται. Η φλοπάση είναι μία ATP-εξαρτώμενη πρωτεΐνη που συμβάλει στη διατήρηση της φωσfolιπιδιακής ασυμμετρίας [137].



Εικόνα 2.1.B: Η ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Τα Ca^{2+} απελευθερώνονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο οδηγώντας στην ενεργοποίηση της καλπαΐνης και της γελσολίνης. Η καλπαΐνη διασπά τα μεγάλα νημάτια της ακτίνης και η γελσολίνη τις καλυπτήριες πρωτεΐνες της ακτίνης. Η αυξημένη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} ενεργοποιεί επίσης την αναδιοργάνωση των λιπιδίων και απενεργοποιεί την μετατοπάση των αμινοφωσfolιπιδίων. Σε αυτό το σημείο ξεκινά η φωσfolιπιδιακή ασυμμετρία [137].



Εικόνα 2.1.Γ: Η διάσπαση του κυτταροσκελετού μετά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Η σπεκτρίνη και η ακτίνη διασπώνται. Σε αυτό το σημείο η πρωτεϊνική πρόσφυση στον κυτταροσκελετό διαταράσσεται, επιτρέποντας την αναδιοργάνωση της μεμβράνης [137].



Εικόνα 2.1.Δ: Η παραγωγή ενός μικροσωματιδίου που εκφράζει την PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του [137].

Μηχανισμοί που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και στην παραγωγή των PPs

Ο ρόλος των αιμοπεταλιακών αγωνιστών

Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια για να αποκτήσουν προθρομβωτική δράση θα πρέπει να ενεργοποιηθούν από ισχυρούς αγωνιστές όπως τη θρομβίνη, το κολλαγόνο ή το Ca^{2+} -ιονοφόρο. Είναι πιθανόν ότι η αυξημένη προθρομβωτική δραστηριότητά τους συνδέεται με μια αύξηση στο ποσοστό των αιμοπεταλίων που επιδεικνύουν μέγιστη έκφραση της PS, σε σχέση με ολόκληρο τον πληθυσμό των αιμοπεταλίων όπου τα αιμοπετάλια προοδευτικά εκφράζουν την PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης τους [156]. Οι λόγοι για τους οποίους ο ίδιος αγωνιστής προκαλεί διαφορετική ανταπόκριση στην έκφραση της PS και την παραγωγή των PMPs από τα αιμοπετάλια δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, μπορεί όμως να οφείλονται σε διαφορές: (1) της ομοιόστασης του ασβεστίου των αιμοπεταλίων και (2) της πυκνότητας των υποδοχέων των αγωνιστών και που είναι πιθανόν να σχετίζεται με την ηλικία των αιμοπεταλίων. Τα νέα αιμοπετάλια εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα σχηματισμού των λεγόμενων καλυμμένων αιμοπεταλίων (coated-platelets), ενός υποπληθυσμού που παρουσιάζει ισχυρή έκφραση της PS μετά από διπλή ενεργοποίηση με θρομβίνη και κολλαγόνο και επιδεικνύουν δραστηριότητα προθρομβινάσης. Τα καλυμμένα αιμοπετάλια εμφανίζουν αυξημένη έκφραση καλσεΐνης και συγκρατούν στην μεμβράνη τους ένα μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών που περιέχονται στα α -κοκκία συμπεριλαμβανομένου του vWF, του ινωδογόνου, του παράγοντα V, της φιβρονεκτίνης και της θρομβοσπονδίνης [157].

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία ο καλύτερος αγωνιστής για την παραγωγή των PMPs είναι αυτός που προκαλεί αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης. Με βάση μελέτες *in vitro*, η ισχύς των αγωνιστών, όσον αφορά την ικανότητά τους να επάγουν το σχηματισμό PMPs, ακολουθεί την εξής σειρά: ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 > C5b9-του συστήματος του συμπληρώματος > συνδυασμός θρομβίνης και κολλαγόνου > θρομβίνη ή κολλαγόνο > επινεφρίνη [116]. Άλλοι αγωνιστές ή διεγερτικές συνθήκες που επάγουν την

αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης είναι το CD40L, το ADP, οι υψηλές διατμητικές δυνάμεις και το οξειδωτικό στρες [140, 158, 159].

Στα ήρεμα αιμοπετάλια, η αποσταθεροποίηση της ακτίνης του κυτταροσκελετού είναι δυνατόν να επάγει την παραγωγή των PMPs χωρίς να είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του υποδοχέα-ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ ή η συσσώρευση των αιμοπεταλίων [131]. Σε αντίθεση με την παραγωγή των PMPs μέσω ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από διάφορους αγωνιστές, ο παραπάνω μηχανισμός δεν απαιτεί αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου ή την δραστηριότητα της καλπαΐνης ενώ είναι δυνατόν να περιλαμβάνει το σηματοδοτικό μονοπάτι της IP_3 , που είναι γνωστό ότι συνδέει τον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ με την ακτίνη [160].

Εξαιτίας της έλλειψης κατάλληλων αναστολέων, το ερώτημα εάν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η επακόλουθη έκφραση της PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης μπορούν να διαχωριστούν από την παραγωγή των PMPs παραμένει αδιευκρίνιστο. Το πιο πιθανό είναι ότι η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ασβεστίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.

Ο ρόλος του κυτταροσκελετού, της αναδιοργάνωσης της κυτταρικής μεμβράνης και του ενδοκυττάρου ασβεστίου

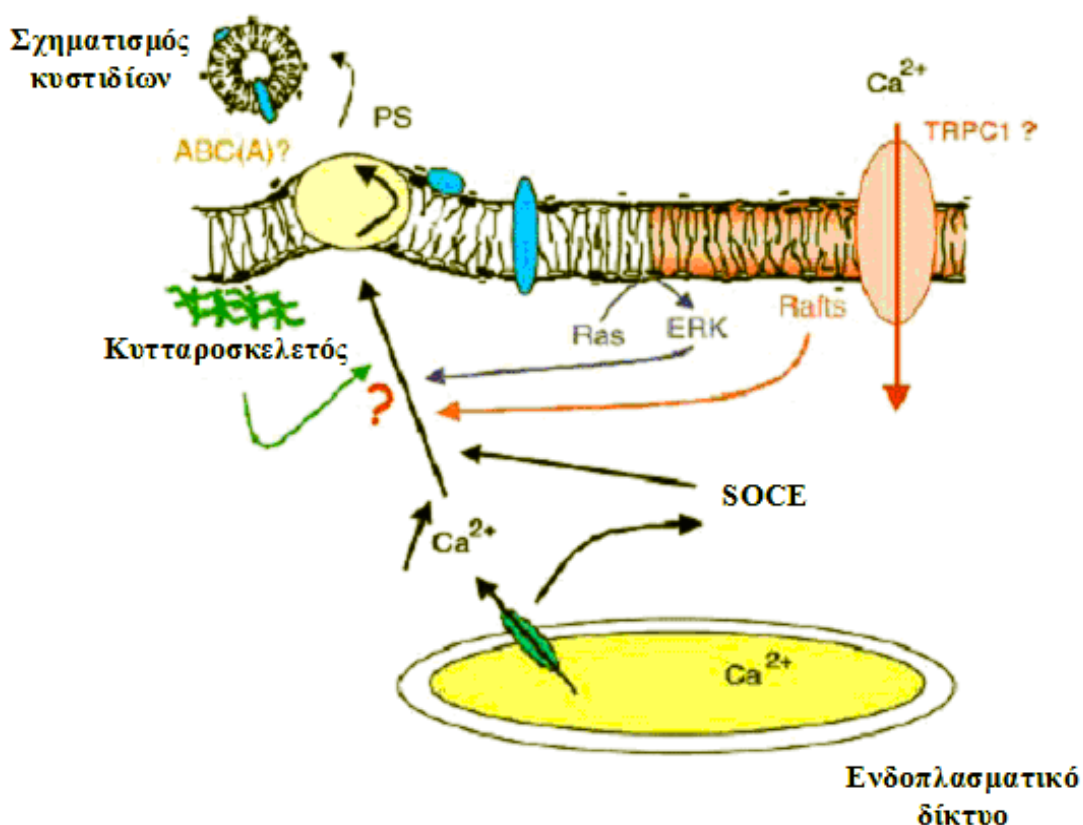
Ο κυτταροσκελετός και η είσοδος του ασβεστίου αποτελούν κάποιους άλλους παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό ροής της μετακίνησης των αμινοφωσφολιπιδίων. Η είσοδος του ασβεστίου επιδρά στην αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης με τους εξής τρόπους: (α) αναστέλλοντας την Mg^{2+} - και ATP- εξαρτώμενη μετατοπάση των αμινοφωσφολιπιδίων, μία φλιπάση που βρίσκεται στα ήρεμα κύτταρα, (β) διεγείροντας την αναδιοργάνωση των λιπιδίων και (γ) ενεργοποιώντας τις Ca^{2+} -εξαρτώμενες πρωτεάσες. Η ακεραιότητα του κυτταροσκελετού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μεμβρανικής ασυμμετρίας και του σχήματος των κυττάρων, ενώ η διάσπασή του διευκολύνει την αναδιοργάνωση της μεμβράνης των ενεργοποιημένων κυττάρων. Τα όμοια με την κασπάση 1 ένζυμα και οι καλπαΐνες είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και σχετίζονται πιθανά με την αναδιοργάνωση της μεμβράνης. Οι καλπαΐνες είναι Ca^{2+} -εξαρτώμενες

πρωτεάσες που κατέχουν ρόλο κλειδί στην απελευθέρωση των PMPs. Η αναστολή της καλπαΐνης μειώνει την παραγωγή των PMPs από τα ενεργοποιημένα με θρομβίνη και κολλαγόνο αιμοπετάλια [161]. Μία παρόμοια μείωση παρατηρήθηκε όταν τα αιμοπετάλια κατεργάστηκαν με κυτταροχλασίνη D, η οποία είναι αποπολυμεριστής της ακτίνης [162].

Ενώ η δραστηριότητα της καλπαΐνης στην γραμμή αναφοράς φαίνεται ότι είναι αναποτελεσματική για την αποικοδόμηση των συστατικών του κυτταροσκελετού, η επαγόμενη από αγωνιστές εισροή του ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη μέγιστη δραστηριότητα της πρωτεάσης [131]. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη διαμεμβρανική ανακατανομή της PS στα κύτταρα θηλαστικών [163]. Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι το σύστημα μεταφοράς ασβεστίου (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE ή capacitative Ca^{2+} entry) πιθανόν ρυθμίζει την έκθεση της PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Μερική αναστολή των διαύλων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά ασβεστίου σε μεγακαρυοκύτταρα (megakaryocytic HEL cells), έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας μεταφοράς της PS στην εξωτερική επιφάνεια των κύτταρων. Σε αυτά τα κύτταρα η ακεραιότητα μικροπεριοχών (rafts) και το SOCE στο οποίο συμμετέχουν το TRPC (transient receptor potential channel) και το cGMP φαίνεται ότι είναι σημαντικά για την πλήρη διαμεμβρανική ανακατανομή της PS [164-166]. Είναι ενδιαφέρον, ότι η Rho A, μία GTPάση έχει δείχθει ότι ρυθμίζει το SOCE και την έκθεση της PS στα HEL κύτταρα, μέσω της αναδιοργάνωσης της ακτίνης του κυτταροσκελετού [167]. Πρόσφατα δείχθηκε ότι τα Ca^{2+} -εξαρτώμενα K^+ Gardos κανάλια συμβάλουν στην έκθεση της PS κατά την διπλή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη και κολλαγόνο [168]. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η έλλειψη της προθρομβωτικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων ενός ασθενούς που πάσχει από το σύνδρομο του Scott, εν μέρει αποκαταστάθηκε με προκατεργασία με την βαλινομυκίνη, ένα εκλεκτικό K^+ -ιονοφόρο. Επομένως, το κυτοσολικό ασβέστιο δεν είναι το μοναδικό στοιχείο που επάγει την καταστροφή της μεμβρανικής ασυμμετρίας. Έχει δείχθει ότι η PIP_2 οδηγεί στην έκφραση της PS σε ερυθροκύτταρα [169] αλλά και σε αιμοπετάλια [170]. Μια πρόσφατη μελέτη της ομάδας O'Connell et al. [171] έδειξε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της παραγωγής των PMPs όταν τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με PIP_2 .

Φαίνεται ότι η κυτταρική μεμβράνη, και συγκεκριμένα μικροπεριοχές λιπιδίων (lipid Rafts), εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση [172]. Οι μικροπεριοχές λιπιδίων είναι λιγότερο ρευστές σε σχέση με την υπόλοιπη κυτταρική μεμβράνη διότι είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια αλλά και χοληστερόλη [173]. Η ακεραιότητα των

μικροπεριοχών αυτών είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του SOCE αλλά και την αναδιοργάνωση και μεταφορά της PS σε ενεργοποιημένα μεγακαρυοκύτταρα. Επιπρόσθετα, η παραπάνω δράση συσχετίζεται και με τη σηματοδοτική οδό ERK [164]. Στην *Εικόνα 2.2*, φαίνονται περιληπτικά οι μηχανισμοί που συμμετέχουν κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την παραγωγή των PMPs.

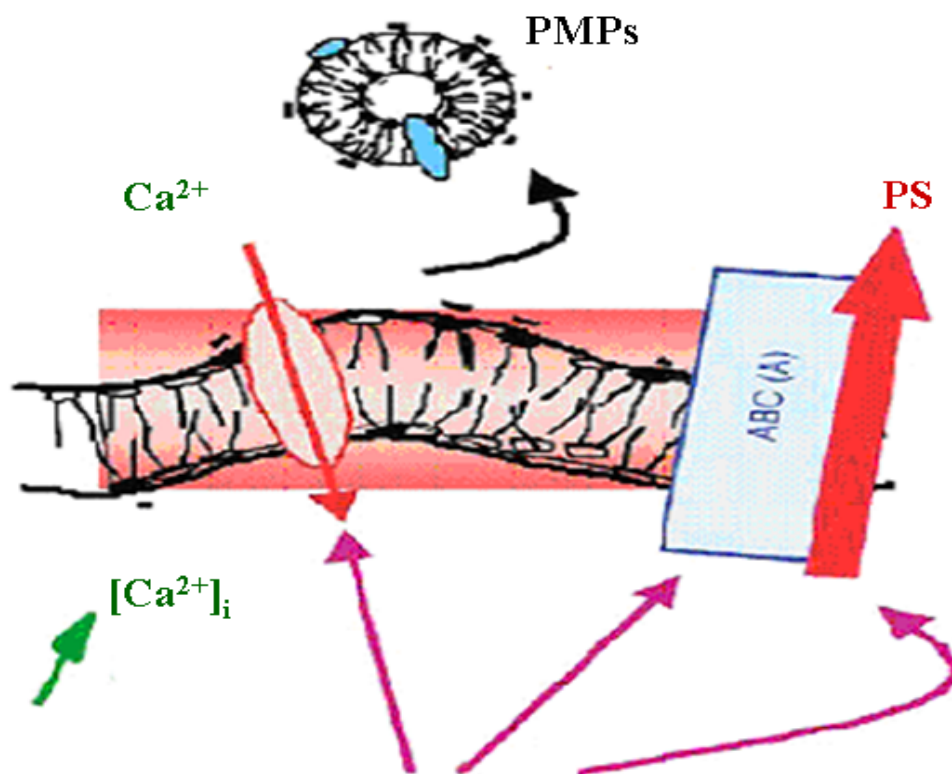


Εικόνα 2.2: Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαμεμβρανικής μετανάστευσης της PS στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και στην παραγωγή των PMPs. Μετά την ενεργοποίηση το ασβέστιο απελευθερώνεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Το ασβέστιο ενεργοποιεί το SOCE μέσω καναλιών στη μεμβράνη. Η ανακατανομή της PS βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του SOCE. Η ακεραιότητα μικροπεριοχών, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και οι MAP κινάσες (Ras-ERK) συμμετέχουν στον ανασχηματισμό της μεμβράνης, ενώ η ABCA1 συμμετέχει στην μεταφορά της PS [172].

Διαμεσολαβητές που επάγουν τη μεταφορά της PS

Η φύση των μεταφορικών μορίων που εμπλέκονται στην ανακατανομή της PS δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη της ομάδας του Sims et al. [174], έχει προταθεί ότι η μη ειδική, διπλής κατεύθυνσης, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, οφείλεται σε μια αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων (PL-scramblase, PLSCR), η οποία συμμετέχει και στην Ca^{2+} -εξαρτώμενη ή μη εξαρτώμενη δράση της ATP. Η ομάδα του Zhou et al. [175] χαρακτήρισε για πρώτη φορά τον PLSCR1. Στη συνέχεια άλλες ομάδες χαρακτήρισαν 3 μορφές πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια PLSCR [176]. Ποντικοί με έλλειψη της PLSCR1 δεν παρουσίασαν δυσλειτουργία στην αιμοστατική τους λειτουργία, αντίθετα παρουσίασαν πρόβλημα στην ανταπόκριση τους σε αυξητικούς παράγοντες του αιμοποιητικού συστήματος [177].

Μια οικογένεια πρωτεϊνών που φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην παραγωγή των MPs είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφορέας γνωστή και ως ABC (ATP-binding cassette). Οι ABC πρωτεΐνες αποτελούνται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές έξι ελίκων, οι οποίες δημιουργούν ένα μονοπάτι για τη μετατόπιση των υποστρωμάτων κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και από δύο περιοχές που δεσμεύουν το ATP [178-181]. Σχετικά πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι οι MDR 1 και 3, μέλη των ABC διαδραματίζουν ρόλο στην μεταφορά φωσφολιπιδίων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης εξαιρουμένου της PS [182]. Μέλος της οικογένειας ABC είναι η ABCA1 μια πρωτεΐνη 2261 αμινοξέων με μοριακό βάρος 240 kDa. Μελέτη των Young et al. έδειξε ότι έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ABCA1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά περίπου 70% της έκφρασης της PS. Βασικός ρόλος του ABCA1 που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων, είναι η μετακίνηση της χοληστερόλης από τα κύτταρα στις αρχέγονες μορφές της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) [183]. Επιπρόσθετα, σε πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες από ποντίκια με έλλειψη του ABCA1 ($ABCA1^{-/-}$) δείχθηκε μειωμένη έκφραση της PS σε αντίθεση με τον άγριο τύπο ($ABCA1^{+/+}$), όπου τα κύτταρα αυτά ενεργοποιήθηκαν με ιονοφόρο Ca^{2+} [184]. Κατά συνέπεια η ABCA1 μπορεί να συνδέει τη δυσλειτουργία στο μεταβολισμό της χοληστερόλης που συμβάλει στην αθηρογένεση, με τη θρόμβωση. Συνεπώς η ρύθμιση της ABCA1 θα μπορούσε να αποτελέσει μια καινούρια φαρμακευτική προσέγγιση για την καταπολέμηση θρομβωτικών επεισοδίων, μειώνοντας την έκφραση της PS με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των MPs (Εικόνα 2.3).



Στόχοι φαρμακευτικής αγωγής

Εικόνα 2.3: Πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι που ρυθμίζουν την απελευθέρωση των PMPs. Η ρύθμιση της τριαδικής σχέσης που περιλαμβάνει την είσοδο του ασβεστίου, την έκφραση της PS, και την εκροή χοληστερόλης θα μπορούσε να αποτελέσει μια καινούρια φαρμακευτική προσέγγιση για την καταπολέμηση θρομβωτικών επεισοδίων και δυσλειτουργιών στο μεταβολισμό της χοληστερόλης [172].

Ο ρόλος των κασπάσών και της μιτοχονδριακής διαπερατότητας

Αρκετά δεδομένα πάνω στις κασπάσες και τη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων δείχνουν μία στενή σχέση μεταξύ των όμοιων με την απόπτωση συμβάντων και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η χρήση ειδικών αναστολέων έδειξε ότι η έκθεση της PS, η παραγωγή των PMPs και η διάσπαση της μυοσίνης, μιας μεμβρανικής κυτταροσκελετικής συνδετικής πρωτεΐνης σχετίζονται με την κασπάση-3, ενώ άλλες λειτουργίες των αιμοπεταλίων όπως η έκκριση των α-κοκκίων, η αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και η συσσώρευσή τους παρέμειναν ανεπηρέαστες από τους αναστολείς της κασπάσης-3 [185]. Αυτά τα δεδομένα δείχθηκαν *in vivo*, από την ταυτόχρονη

παρατήρηση της αυξημένης δραστηριότητας της θρομβίνης, την παραγωγή των PMPs και τη δραστηριότητα της κασπάσης σε αιμοπετάλια ασθενών είχαν διαβήτη τύπου 2 [186].

Επιπλέον, η μιτοχονδριακή διαπερατότητα φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των PMPs. Σε αιμοπετάλια που ενεργοποιήθηκαν από το συνδυασμό θρομβίνης και κονβαλξίνης, η απελευθέρωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax προώθησε την μιτοχονδριακή εκπόλωση, την έκθεση της PS και την παραγωγή των PMPs [187]. Επίσης μελέτη έδειξε, ότι η φενυλαρσίνη και η διαμίδη που δυναμιτίζουν την μιτοχονδριακή διαπερατότητα, αύξησαν σημαντικά την παραγωγή των PMPs από καλυμμένα αιμοπετάλια [188]. Τα αιμοπεταλιακά μιτοχόνδρια μέσω ενός όμοιου με την απόπτωση μηχανισμού θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην έκθεση της PS απουσία εξωκυττάριου ασβεστίου. Επιπλέον η ντιμπουκαΐνη και η τετρακαΐνη, δύο λιποφιλικά τοπικά αναισθητικά, προώθησαν την αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοσολικού και του μιτοχονδριακού ασβεστίου, τη δράση της κασπάσης 3 και 9 από τις καλπαΐνες και την έκθεση της PS [189].

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω στοιχεία, προτείνεται ένας ειδικός μηχανισμός διάσπασης του κυτταροσκελετού που περιλαμβάνει κασπάσες, τα μιτοχόνδρια και επαρκή αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου.

Ο ρόλος του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$

Ο ρόλος που διαδραματίζει ο $\alpha_{IIb}\beta_3$ στο σχηματισμό κυστιδίων εξαρτάται από τον αγωνιστή. Έτσι, η αναστολή του $\alpha_{IIb}\beta_3$ κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη ή κολλαγόνο ή το συνδυασμό αυτών, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή σχηματισμού των PMPs [190-192]. Αντίθετα, η αναστολή του $\alpha_{IIb}\beta_3$ δεν επηρεάζει τον επαγόμενο από το ιονοφόρο Ca^{2+} , σχηματισμό των κυστιδίων [193]. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ μπορεί να λειτουργεί ως διάλυλος Ca^{2+} [194, 195]. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η τικλοπιδίνη, ανταγωνιστής του υποδοχέα του ADP, ανέστειλε την εισροή ασβεστίου διαμέσου του $\alpha_{IIb}\beta_3$ και την παράλληλη αναστολή της επαγόμενης από anti-CD9 παραγωγή PMPs [196]. Το ADP συμμετέχει στην εισροή

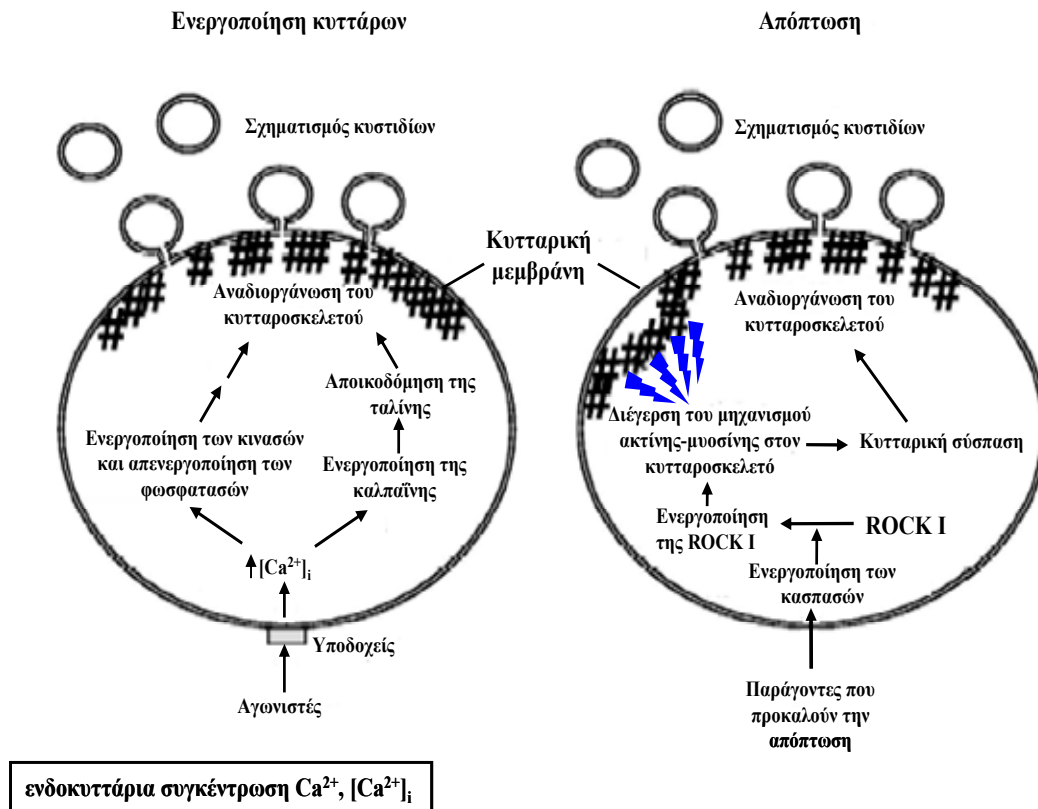
ασβεστίου το οποίο είναι απαραίτητο για την θρομβωτική του δραστηριότητα [197]. Έτσι, είναι πιθανό ο $\alpha_{IIb}\beta_3$ να επηρεάζει την παραγωγή των PMPs αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η πρόσδεση του ινωδογόνου στον ενεργοποιημένο υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ενεργοποιεί την καλπαΐνη και διευκολύνει την απελευθέρωση των PMPs [191-198]. Επίσης, οι κυτοσολικές περιοχές του $\alpha_{IIb}\beta_3$ συσχετίζονται με πολλά σηματοδοτικά μόρια τα οποία μπορούν επίσης να επάγουν τη μεταγωγή του σήματος για το σχηματισμό κυστιδίων [34].

Διαφορές μεταξύ της κυτταρικής απόπτωσης των κυττάρων και της παραγωγής των MPs από ενεργοποιημένα κύτταρα

Υπάρχουν βασικές διαφορές μεταξύ της απόπτωσης των κύτταρων και της παραγωγής των MPs από ενεργοποιημένα κύτταρα. Η παραγωγή των MPs κατόπιν ενεργοποίησης των κυττάρων υπό την δράση διαφόρων αγωνιστών, οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} [200-202], την ενεργοποίηση διαφόρων κινασών, την ενεργοποίηση της καλπαΐνης και την αποικοδόμηση της ταλίνης [132, 201-203]. Αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η παράγωγή των MPs (Εικόνα 6.2). Σημαντικό επίσης ρόλο στην παραγωγή των PMPs διαδραματίζει ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ και μάλιστα φαίνεται ότι η πρόσδεση του ινωδογόνου στον ενεργοποιημένο υποδοχέα διευκολύνει την παραγωγή τους [191].

Αντίθετα, κυστίδια που παράγονται με απόπτωση διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη λιπιδιακή τους σύσταση, τη σύστασή τους σε πρωτεΐνες αλλά και στον παθοφυσιολογικό ρόλο που διαδραματίζουν. Η απόπτωση των κύτταρων χαρακτηρίζεται από τη σύσπαση των κύτταρων, τον κατακερματισμό του DNA, και το σχηματισμό κυστιδίων [203, 204]. Στην απόπτωση, η συσπαστική δύναμη μεταξύ της ακτίνης και μυοσίνης του κυτταροσκελετού, πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην παραγωγή των κυστιδίων αυτών [205, 206]. Η απόπτωση βασίζεται στην ενεργοποίηση μιας Rho κινάσης που ονομάζεται ROCK I [203]. Η ROCK I διεγείρει το μηχανισμό της ακτίνης και μυοσίνης στον κυτταροσκελετό με αποτέλεσμα την κυτταρική σύσπαση αλλά και την

αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού [207]. Αποτέλεσμα της απόπτωσης είναι η μεταφορά θραύσματος του DNA από την πυρηνική περιοχή των κύτταρων προς τη μεμβράνη και στη συνέχεια στα αποπτωτικά κυστίδια [203] (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών που συμμετέχουν στη δημιουργία των MPs κατά την κυτταρική ενεργοποίηση και την απόπτωση [199].

Εξωσώματα

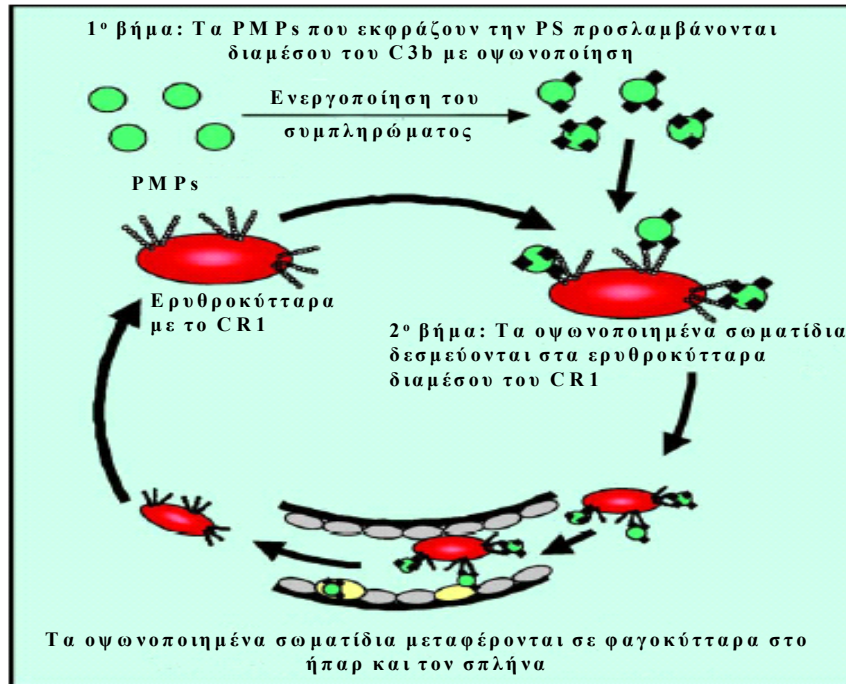
Παράλληλα με τα PMPs, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παράγουν και τα εξωσώματα των οποίων η λειτουργία παραμένει αδιευκρίνιστη. Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια που απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπετάλιων από τη σύντηξη των α -κοκκίων και των συνδεδεμένων με τη μεμβράνη ενδοαυλικών πολυκυστιδιακών σωματίων (MVBS) με τη μεμβράνη. Τα εξωσώματα και τα α -κοκκία έχουν παρόμοιο μέγεθος που κυμαίνεται από 40 μέχρι 100 nm σε διάμετρο και είναι μικρότερα από τα PMPs των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 100 έως 1 μ m [130]. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους τα εξωσώματα δεν ανιχνεύονται με την κυτταρομετρία ροής, αλλά με τη βοήθεια της προτεομικής ανάλυσης [208]. Τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα με MFG-E8, τετρασπανίνες (CD9, CD63, CD81, CD82) και αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου II [209]. Σε αντίθεση με τα PMPs, τα εξωσώματα εκφράζουν μικρό ποσοστό της PS στην επιφάνειά τους ή και καθόλου και εμφανίζουν μικρή αλληλεπίδραση με τον παράγοντα X, την προθρομβίνη ή την Αννεξίνη-V, γεγονός που δηλώνει την ελάχιστη ή την καθόλου συμμετοχή τους στο μηχανισμό της πήξης [210]. Επομένως τα εξωσώματα εμφανίζονται διαφοροποιημένα από τα PMPs τόσο βιοχημικά όσο και μορφολογικά. Η απελευθέρωσή τους σε περιοχές αγγειακού τραυματισμού, είναι δυνατόν να υποστηρίξει διαφορετικές εξωκυττάρια λειτουργίες. Ο εμπλουτισμός τους στο CD63 και σε μικρότερο ποσοστό στην P-σελεκτίνη υποδηλώνει ότι εμφανίζουν ειδικές λειτουργίες. Επειδή είναι γνωστό ότι οι τετρασπανίνες αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες και συμμετέχουν στη ρύθμισή τους, έχει δειχθεί ότι τα εξωσώματα ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και τα ουδετερόφιλα [210, 211]. Επίσης, φαίνεται ότι τα εξωσώματα μπορεί να αποτελούν έναν μεταφορέα αιμοπεταλιακών μορίων με ανοσολογική ή αποπτωτική δραστηριότητα. Η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού παραγωγής τους και της σύστασής τους θα δώσει νέες πληροφορίες για τον ακριβή ρόλο τους [130].

Κάθαρση των PMPs από την κυκλοφορία

Ο μηχανισμός κάθαρσης των MPs από την κυκλοφορία δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστός. Τα αιμοπετάλια έχουν διάρκεια ζωής περίπου 10 ημέρες, σε αντίθεση με αυτή των PMPs που προέρχονται από τα ποντίκια και είναι περίπου 30 λεπτά [212, 213], ή αυτή των PMPs των κουνελιών που είναι λιγότερο από 10 λεπτά [214]. Τα MPs είναι δυνατόν να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία του αίματος είτε με φωσφολιπάσες π.χ. την εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 [215], είτε με άμεσους μηχανισμούς όπου διαμέσου της PS φαγοκυτταρώνονται, είτε με έμμεσους μηχανισμούς όπου τα PMPs διαμέσου οψωνοποίησης αλληλεπιδρούν με διάφορες πρωτεΐνες όπως την πρωτεΐνη S, ή από συστατικά του συμπληρώματος [216].

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα PMPs συνδέονται με συστατικά του συμπληρώματος C3b και απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω της ανοσιακής πρόσφυσης [217-219]). Το C3b παράγεται από την πρωτεΐνη C3, της οποίας η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι 1.2 mg/ml. Η C3 διασπάται με τη δράση της C3 μετατροπάσης προς C3b [220]. Η πρωτεόλυση έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση ενός δεσμού θειοεστέρα, ο οποίος με τη σειρά του μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις τρανσακετυλίωσης με τις πυρηνόφιλες ομάδες που βρίσκονται στα αμινοφωσφολιπίδια, στους υδατάνθρακες και στις πρωτεΐνες [221-223].

Η κάθαρση των PMPs γίνεται διαμέσου της αλληλεπίδρασης της PS των PMPs με το C3 του συστήματος συμπληρώματος, σχηματίζοντας ένα οψωνοποιημένο σωματίδιο. Στην συνέχεια το σωματίδιο αυτό δεσμεύεται στα ερυθροκύτταρα διαμέσου του υποδοχέα 1 του συμπληρώματος (complement receptor 1, CR1) [219]. Τα οψωνοποιημένα σωματίδια μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος προς τα φαγοκύτταρα του ήπατος και τον σπλήνα, όπου καταβολίζονται περαιτέρω



Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση ενός πιθανού μηχανισμού κάθαρσης των PMPs [213].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Οι χαμηλής και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες του ανθρώπινου πλάσματος (LDL και HDL)

Εισαγωγή στις λιποπρωτεΐνες

Το πλάσμα του ανθρώπινου αίματος, αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό λιπιδίων. Όλα αυτά τα λιπίδια εκτός από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και ένα ποσοστό της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lyso-PC) μεταφέρονται με τη μορφή λιποπρωτεϊνών. Ως λιποπρωτεΐνες αναφέρονται τα μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων που περιέχουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες γνωστές ως απολιποπρωτεΐνες (apo). Οι απολιποπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα PL και την ελεύθερη χοληστερόλη (FC) και σχηματίζουν το πολικό εξωτερικό τμήμα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιβάλλει ένα μη πολικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από τριγλυκερίδια (TG) και εστέρες χοληστερόλης (CE). Οι απολιποπρωτεΐνες δεν έχουν μόνο δομικό ρόλο αλλά δρουν και ως συνένζυμα σε αντιδράσεις μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών. Επίσης συντελούν στην αναγνώριση των λιποπρωτεϊνών από τους κυτταρικούς υποδοχείς και στη σύνδεσή τους με αυτούς ή χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά CE, PL και TG μεταξύ των λιποπρωτεϊνών.

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ταξινομούνται σε 6 κύριες τάξεις με βάση τη διαφορετικότητα στην πυκνότητά τους: τα χυλομικρά (CM, $d < 0.096$ g/ml), τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL, $0.096 < d < 1.006$ g/ml), τις διάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL, $1.006 < d < 1.019$ g/ml), τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL, $1.019 < d < 1.063$ g/ml) και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL, $1.063 < d < 1.210$ g/ml). Στο βασικό αυτό διαχωρισμό έχει προστεθεί και η λιποπρωτεΐνη a (Lp(a), $1.060 < d < 1.100$ g/ml).

Ο κύριος ρόλος των λιποπρωτεϊνών είναι η μεταφορά λιπιδίων. Έτσι οι VLDL αποτελούν την κύρια μορφή μεταφοράς των TG, που βιοσυντίθενται ενδογενώς στο πλάσμα. Οι LDL είναι ο κύριος τροφοδότης των ιστών με χοληστερόλη, ενώ οι HDL είναι

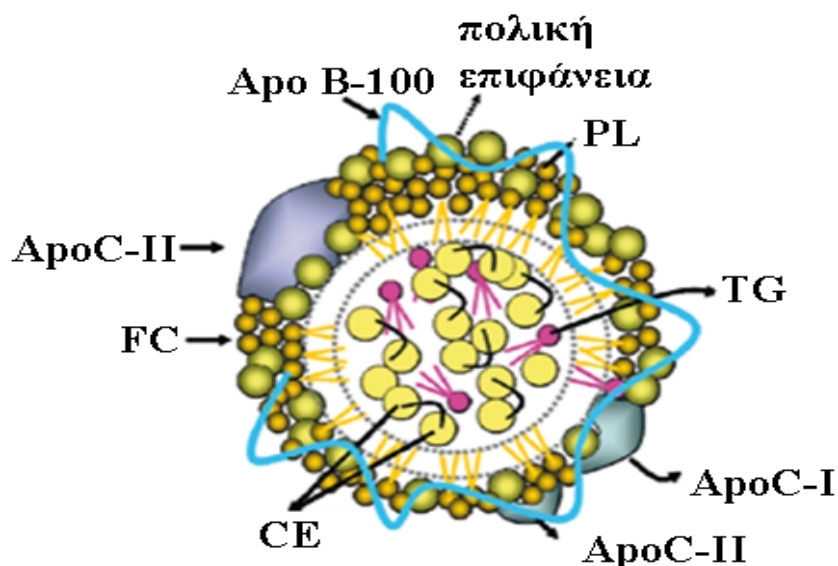
υπεύθυνες για την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τους ιστούς στο ήπαρ. Τα CM μεταφέρουν τα TG που προσλαμβάνονται με τις τροφές για λίγες ώρες μετά από ένα γεύμα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους με τις λιποπρωτεΐνες, τα λιπίδια υφίστανται ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές, οι οποίες οφείλονται στη δράση ενζύμων και πρωτεϊνών μεταφοράς που βρίσκονται συνδεδεμένα στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια.

Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL)

Η ανθρώπινη LDL ορίζεται ως ο πληθυσμός των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που απομονώνονται από το πλάσμα με υπερφυγοκέντρωση στην περιοχή πυκνοτήτων από 1.019 ως 1.63 g/ml. Ο πληθυσμός των σωματιδίων της LDL είναι ετερογενής σε ό,τι αφορά την πυκνότητα, το μέγεθος, τη σύσταση και τη δομή. Τα σωματίδια της LDL έχουν διάμετρο από 19-25 nm και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 1800-2800 kDa. Το σχήμα τους είναι σφαιρικό και αποτελούνται από έναν κεντρικό λιπόφιλο πυρήνα που περιβάλλεται από μία αμφιπαθητική μονοστοιβάδα. Ο λιπόφιλος πυρήνας αποτελείται περίπου από 170 μόρια TG και 1600 μόρια CE και η αμφίφιλη μονοστοιβάδα που τον περιβάλλει από 700 περίπου μόρια PL και από διάφορες πρωτεΐνες, κυρίως την απολιποπρωτεΐνη Β-100 (apoB-100) [224] (Εικόνα 3.1). Τα σωματίδια της LDL περιέχουν ακόμα περίπου 600 μόρια FC, από τα οποία το $\frac{1}{3}$ βρίσκεται στον πυρήνα και τα $\frac{2}{3}$ στην επιφάνεια [225]. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι ένα μικρό ποσοστό των TG και των CE που βρίσκονται στο λιπόφιλο πυρήνα, διεισδύουν προς την επιφάνεια του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου. Τα PL της LDL είναι κυρίως η PC, περίπου 450 μόρια/σωματίδιο και η SM, περίπου 185 μόρια/σωματίδιο. Υπάρχουν επίσης σε μικρότερες ποσότητες η lyso-PC, περίπου 80 μόρια/σωματίδιο [224], η PE, περίπου 10 μόρια/σωματίδιο [226], η DAG, περίπου 7 μόρια/σωματίδιο [227], το κεραμίδιο (CER), περίπου 2 μόρια/σωματίδιο [228] και η PI σε μικρό ποσοστό [229].

Τα σωματίδια της LDL, εκτός από λιπίδια, περιέχουν και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, κυρίως α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), περίπου 6 μόρια/σωματίδιο. Η δράση της βιταμίνης E ως αντιοξειδωτικό οφείλεται στην ικανότητά της να μετατρέπει τις αλυσίδες των σχηματιζόμενων ριζών υπεροξειδίου προς υδροϋπεροξειδία και ρίζα της βιταμίνης E, η οποία μπορεί να ανακυκλωθεί προς α-τοκοφερόλη διαμέσου της αντίδρασής της με κάποιο

άλλο αντιοξειδωτικό, κυρίως ασκορβικό οξύ. Επίσης σε μικρότερα ποσοστά απαντούν η γ-τοκοφερόλη, το α- και β-καροτένιο καθώς και άλλες υδρογονωμένες και οξυγονωμένες μορφές καροτενοειδών, όπως το λυκοπένιο, η κρυπτοξανθίνη, η λουτεΐνη και η ουβικινόλη-10 [224, 230].



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση του σωματιδίου της LDL [231].

Κάθε σωματίδιο της LDL περιέχει περίπου 2700 μόρια λιπαρών οξέων συνδεδεμένα στα διάφορα λιπίδια. Απ' αυτά, τα μισά περίπου είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), κυρίως λινελαϊκό (δεκαοκτενοϊκό) και μικρότερες ποσότητες αραχιδονικού (εικοσιτετραενοϊκό) και δοκοσαεξανοϊκό (εικοσιδυεξανοϊκό). Η σύσταση του σωματιδίου της LDL σε λιπαρά οξέα, όπως και σε αντιοξειδωτικά, διαφέρει από άτομο σε άτομο και καθορίζεται κατά κύριο λόγο από τις διατροφικές συνήθειες [224].

Τα σωματίδια της LDL βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία, με τη δομή και τις φυσικές τους ιδιότητες να εξαρτώνται από τη σύστασή τους σε λιπίδια και από τη διαμόρφωση της apoB-100. Η apoB-100 είναι η κυριότερη πρωτεΐνη σε κάθε σωματίδιο της LDL και μία από τις μεγαλύτερες γνωστές μονομερείς πρωτεΐνες, αποτελούμενη από 4536 αμινοξέα [232-234]). Το μοριακό της βάρος, σύμφωνα με την αλληλουχία των αμινοξέων που τη συνθέτουν, είναι 512.937 Da. Η apoB είναι γλυκοζυλιωμένη με

υδατάνθρακες, οι οποίοι αποτελούν το 8-10% του συνολικού της βάρους [224]. Η apoB είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα και έτσι παραμένει με το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο καθ' όλη την πορεία του μεταβολισμού του [235]. Για τον παραπάνω λόγο το μόριό της πρέπει να έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται στις αλλαγές δομής και σύστασης του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου στο οποίο ανήκει. Η apoB-100 βρίσκεται σε επαφή με τα λιπίδια τόσο της εξωτερικής όσο και της ενδιάμεσης στοιβάδας, και περιβάλλει ολόκληρη την επιφάνεια του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου σα «χταπόδι». Η apoB εκτός από το ρόλο που παίζει στη διατήρηση της ακεραιότητας του σωματιδίου της LDL, είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσληψη της LDL από τον κλασικό κυτταρικό υποδοχέα B/E που βρίσκεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα.

Φαινότυπος της LDL

Ο πληθυσμός των σωματιδίων της LDL είναι ετερογενής σε ότι αφορά την πυκνότητα, το μέγεθος, το μοριακό βάρος και τη σύσταση, ενώ εμφανίζει διαφορές στα ισοηλεκτρικά σημεία, στο καθαρό ηλεκτρικό φορτίο, στις υδροδυναμικές ιδιότητες, στην ανοσοδραστικότητα καθώς και στη διαμόρφωση της apoB - πράγμα που επηρεάζει την αλληλεπίδραση και την πρόσδεσή τους στον κλασικό υποδοχέα B/E [236-238]. Έχει δειχθεί ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων της LDL μειώνεται, όσο αυξάνει η πυκνότητά τους, ενώ και η δομή των σωματιδίων μεταβάλλεται ανάλογα με το μέγεθός τους [239]. Οι Austin et al [240] προτείνουν δύο κύριους φαινότυπους για τα σωματίδια της LDL. Το φαινότυπο A, όπου κυριαρχούν σωματίδια με διάμετρο μεγαλύτερη από 25.5 nm και το φαινότυπο B, όπου κυριαρχούν σωματίδια με διάμετρο μικρότερη από 25.5 nm. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των σωματιδίων της LDL αυξάνει με την αύξηση της πυκνότητας, ενώ αντίθετα το ποσοστό σε FC και TG μειώνεται. Τα μικρά και πυκνά σωματίδια της LDL (sdLDL) περιέχουν μικρότερες ποσότητες ουδέτερων υδατανθράκων και σιαλικού οξέος [241, 242]. Τα σωματίδια της LDL με μικρό περιεχόμενο σε σιαλικό οξύ έχουν αυξημένη συγγένεια με τις πρωτεογλυκάνες του αρτηριακού τοιχώματος [242], ενώ εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης με τον κλασικό υποδοχέα της LDL [238], με αποτέλεσμα να αυξάνει ο αθηρογόνος χαρακτήρας τους.

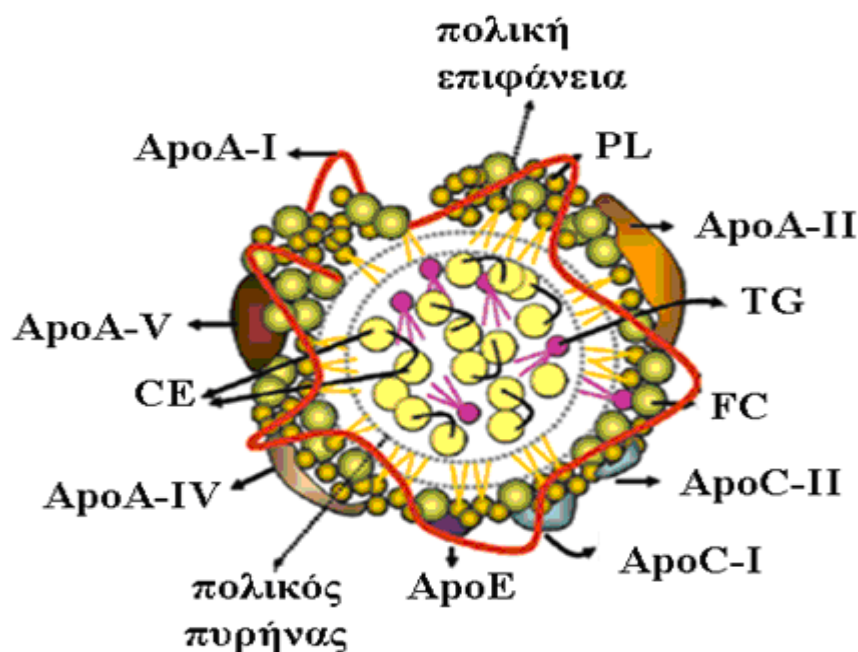
Η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL)

Η HDL του ανθρώπινου πλάσματος, αποτελεί έναν ετερογενή πληθυσμό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, τα οποία έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την υψηλή πυκνότητα και το μικρό μέγεθος. Τα σωματίδια αυτά, όπως και τα αντίστοιχα της LDL, εμφανίζουν διαφορές σε ότι αφορά το μέγεθος, την πυκνότητα, τη σύσταση, το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο και τις φυσικοχημικές ιδιότητες. Η πυκνότητα της HDL κυμαίνεται από 1.063-1.210 g/ml και η διάμετρός της από 5-17 nm. Τρία κύρια κλάσματα HDL έχουν ταυτοποιηθεί, τα προ-β-HDL και τα HDL₂ (d=1.063-1.125 g/ml) και HDL₃ (d=1.125-1.210 g/ml). Τα υποκλάσματα HDL₂ και HDL₃ μπορούν να διαχωρισθούν περαιτέρω σε HDL_{2b} (10.6 nm), HDL_{2a} (9.2 nm), HDL_{3a} (8.4 nm), HDL_{3b} (8.0 nm) και HDL_{3c} (7.6 nm) κατά ελαττωμένη σειρά όσον αφορά την διάμετρο του κάθε σωματιδίου. Τα ώριμα σωματίδια HDL στο πλάσμα κυκλοφορούν με τη μορφή των HDL₂ και HDL₃ σωματιδίων [243-245].

Η HDL μπορεί επίσης να διαχωριστεί σε δύο κύριους υποπληθυσμούς βάσει της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των σωματιδίων της: το κύριο υπόκλασμα κατά τον διαχωρισμό παρουσιάζει ίδια κινητικότητα με αυτήν της α-σφαιρίνης και καλείται α-HDL, ενώ το άλλο μετακινείται όμοια με την προ-β σφαιρίνη και καλείται προ-β HDL. Τα περισσότερα από τα HDL σωματίδια στο ανθρώπινο πλάσμα είναι α-HDL, ενώ στο υπόκλασμα προ-β HDL το ποσοστό της απολιποπρωτεΐνης A-I αντιστοιχεί μόνο στο 2-14% της ολικής apo A-I.

Τα περισσότερα HDL σωματίδια έχουν σφαιρικό σχήμα. Τα νεοσυντιθέμενα σωματίδια HDL στερούνται του κεντρικού μη πολικού πυρήνα και εμφανίζουν δομή δισκοειδούς διπλοστοιβάδας. Τα HDL σωματίδια αποτελούνται από έναν υδρόφοβο πυρήνα, ο οποίος περιλαμβάνει κυρίως CE και σε μικρότερες ποσότητες TG. Ο πυρήνας αυτός περιβάλλεται από μία μονοστοιβάδα PL, φορτισμένων λιπιδίων και διαφόρων απολιποπρωτεϊνών. Η μη εστεροποιημένη χοληστερόλη κατανέμεται μεταξύ της επιφάνειας και του πυρήνα της HDL. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη της HDL είναι η apoA-I, ενώ οι apoA-II, apoA-IV, apoC, apoE, apoJ apoH, apoM και apoL απαντώνται σε μικρότερα ποσοστά [246-252] (Εικόνα 3.2). Η απολιποπρωτεΐνη A-I (apoA-I) είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 28 kDa που αποτελείται από 243 αμινοξέα. Εκτός των 44 αμινοξέων που αποτελούν το N-τελικό κομμάτι της απολιποπρωτεΐνης, η υπόλοιπη

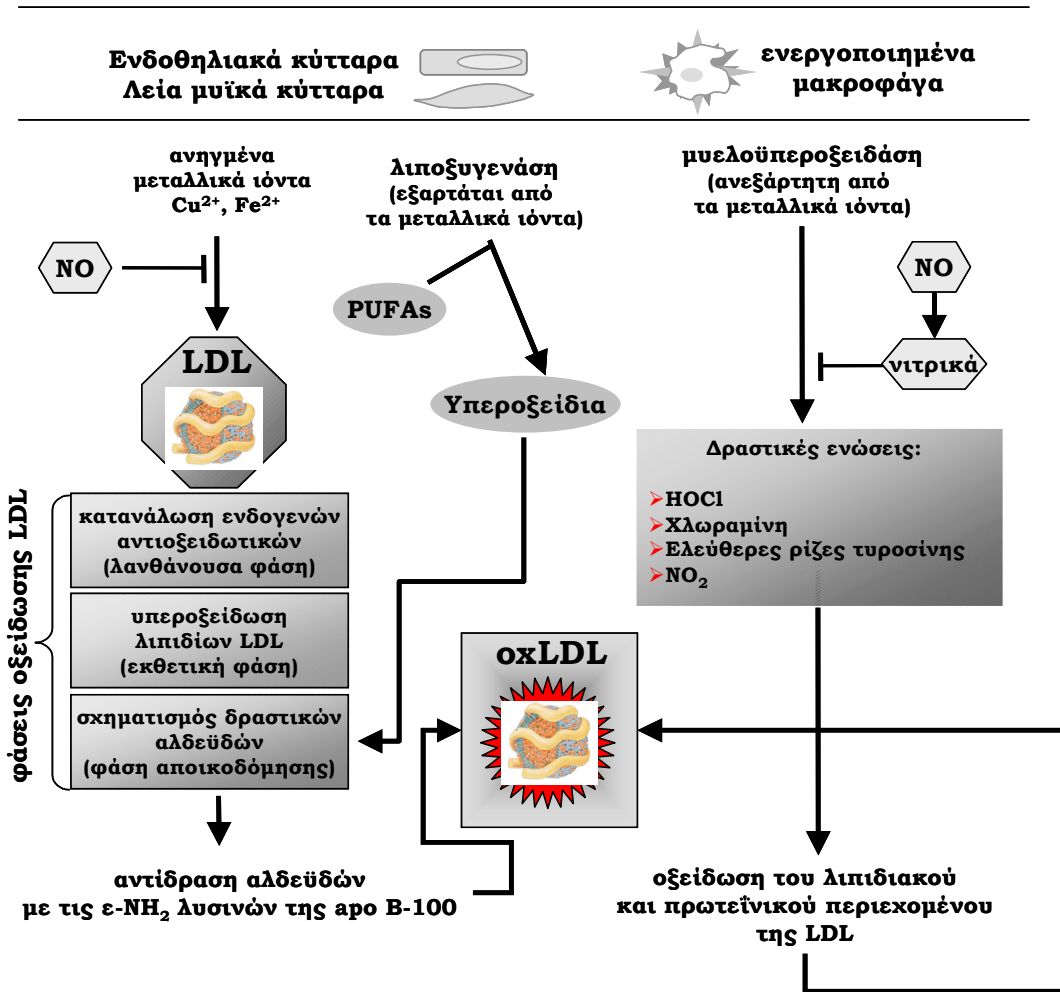
αμινοξική αλληλουχία της apoA-I κατατάσσεται σε οκτώ α -ελικοειδή τμήματα των 22 αμινοξέων και δύο των 11 αμινοξέων [253].



Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση του σωματιδίου της HDL [231].

Μηχανισμοί οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών

Διάφοροι μηχανισμοί, ενζυμικοί και μη ενζυμικοί, έχουν προταθεί για την οξείδωση της LDL και της HDL στηριζόμενοι σε μελέτες *in vitro*. Στους μηχανισμούς αυτούς εμπλέκονται δραστικά μόρια, όπως μεταλλικά ιόντα, θειόλες, η γλυκόζη, η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου, η λιποξυγονάση και η μυελοϋπεροξειδάση (Εικόνα 3.3). Η μη ενζυμική οξείδωση η οποία καταλύεται από διάφορα δραστικά μόρια εξαρτάται από την παρουσία υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων. Στις παρακάτω παραγράφους θα αναλύσουμε την οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών LDL και HDL με μεταλλικά ιόντα και με την μυελοϋπεροξειδάση.



Εικόνα 3.3: Μηχανισμοί οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών

Μεταλλικά ιόντα

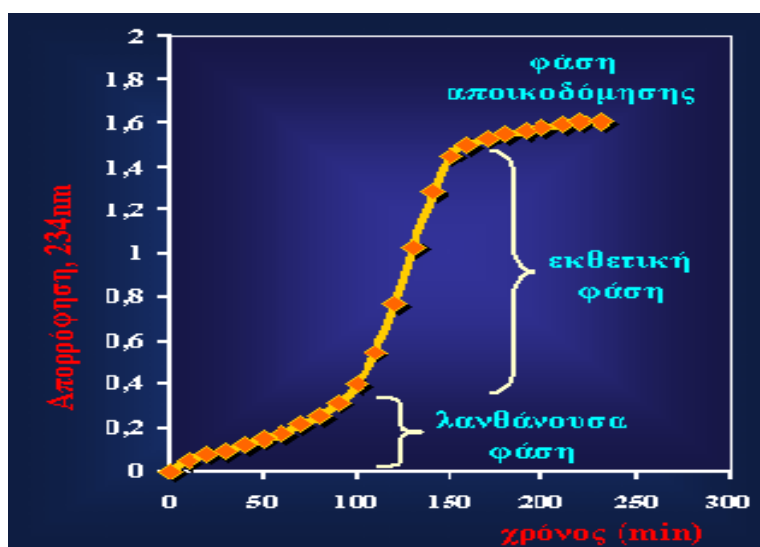
Ο χαλκός και άλλα δισθενή ιόντα οξειδώνουν ταχύτατα την LDL. Ενδεχομένως η διαδικασία της οξείδωσης να ξεκινά από την αναγωγή μεταλλικών ιόντων από αναγωγικά στοιχεία των κυττάρων όπως οιθειόλες και το ανιόν του υπεροξειδίου O_2^- . Παρόλο που έχει δειχθεί η ύπαρξη ελεύθερου σιδήρου και χαλκού σε περιοχές προχωρημένης

αθηρωμάτωσης [254], δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της αθηρωμάτωσης. Έχει βρεθεί ότι η ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) είναι ικανή να απελευθερώσει σίδηρο από την φερριτίνη [255], έτσι η ρίζα αυτή θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη της οξειδωτικής τροποποίησης όσο και στην παραγωγή μετάλλων μετάπτωσης στο αρτηριακό τοίχωμα.

Η οξείδωση της LDL από μεταλλικά ιόντα (Cu^{2+}) *in vitro* λαμβάνει χώρα σε τρεις φάσεις: Αρχικά καταναλώνεται η α-τοκοφερόλη και ακολουθούν τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά με τελευταίο το β-καροτένιο. Κατά τη λανθάνουσα φάση παράγεται ένας πολύ μικρός αριθμός υπεροξειδίων. Η μικρή ποσότητα αυτών οφείλεται στη δράση της βιταμίνης E η οποία αντιδρά με τις ρίζες των σχηματιζόμενων λιποϋπεροξειδίων.

Μετά την κατανάλωση των αντιοξειδωτικών της LDL, αρχίζει η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων και η οξείδωση της LDL οδηγείται στην εκθετική (παραγωγική) φάση. Οι ρίζες που έχουν σχηματιστεί από τη λανθάνουσα φάση, διαμέσου σειράς αλυσιδωτών αντιδράσεων, σχηματίζουν νέες ελεύθερες ρίζες λιποϋπεροξειδίων.

Το σημείο στο οποίο η παραγωγή των συζυγών διενίων είναι μέγιστη, σημαίνει το τέλος της παραγωγικής φάσης και την αρχή της φάσης αποικοδόμησης, στην οποία τα λιποϋπεροξειδία μετατρέπονται σε αλδεΐδες, όπως η μηλονική διαλδεΐδη (MDA) και 4-υδροξυνοενάλη (4-HNE), οι οποίες με τη σειρά τους θα αντιδράσουν με τις $\epsilon-NH_2$ των λυσινών της apoB-100 [256-259] (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Κινητική καμπύλη οξείδωσης της LDL από μεταλλικά ιόντα.

Όπως και με την LDL, έτσι και η οξειδωτική τροποποίηση της HDL με μεταλλικά ιόντα, λαμβάνει χώρα σε τρεις φάσεις. Αυτά που παρατηρούμε κατά την οξείδωση της με δισθενή ιόντα χαλκού είναι ότι έχουμε σημαντική αύξηση των δραστικών ουσιών θειοβαρβιτουρικών οξέων (TBARS) στα κλάσματα HDL₂ και HDL₃, γεγονός που υποδηλώνει λιπιδική υπεροξείδωση της HDL και αύξηση του αρνητικού τους φορτίου. Επίσης, παρατηρείται πρωτεολυτική αποικοδόμηση της κύριας απολιποπρωτεΐνης που βρίσκεται στην HDL, την apoA-I [260].

Μυελοϋπεροξειδάση (MPO)

Η MPO είναι ένα ένζυμο το οποίο απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και μονοκύτταρα σε σημεία όπου υπάρχει φλεγμονή και τα οξειδωτικά μόρια που προκύπτουν από τη δράση της έχουν συνδεθεί με πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου της αθηροσκλήρωσης [261, 262]. Η MPO είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 140-155 kDa [262]. Πρόκειται για μια τετραμερή πρωτεΐνη που αποτελείται από 2 διμερή, βαριών και ελαφριών αλυσίδων, που συνδέονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Κάθε μία από τις βαριές αλυσίδες περιέχει συνδεδεμένο ένα παράγωγο σιδήρου (III) προτοπορφυρίνης που εμφανίζει ανεξάρτητη δράση [263]. Ένας μεγάλος αριθμός από ιόντα όπως Cl⁻, Br⁻, I⁻ ή και SCN⁻, CN⁻, N₃⁻, NO₂⁻ μπορούν να συνδεθούν ή να βρίσκονται κοντά στην αίμη [264, 265] ενώ μεγαλύτερα οργανικά υποστρώματα συνδέονται σε μια υδροφοβική θηλιά στην επιφάνεια της MPO [266]. Η κατιονική (υψηλά θετικά φορτισμένη) φύση αυτής της πρωτεΐνης, οδηγεί σε δυνατές ιοντικές αλληλεπιδράσεις και στη σύνδεσή της με πολύ-ανιονικά υλικά, όπως για παράδειγμα με διάφορες πρωτεΐνες ή την LDL [267, 268].

Η MPO καταλύει το σχηματισμό ενός ισχυρού οξειδωτικού, κατά κύριο λόγο του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα H₂O₂ και ιόντα Cl⁻ αλλά και άλλων δραστικών μορίων όπως χλωραμίνες, τυροσυλο-ελεύθερες ρίζες και διοξειδίο του αζώτου (NO₂). Παρόλα αυτά επειδή οι συγκεντρώσεις αυτών των ανιόντων ποικίλουν στα βιολογικά υγρά (π.χ. η συγκέντρωση στο πλάσμα των Cl⁻ κυμαίνεται από 100-140 mM, για τα Br⁻ από 20-100 mM, για τα I⁻ <1 μM και για τα SCN⁻ από 20-100 mM), έχει

δειχθεί ότι το HOCl και το HOSCN σχηματίζονται περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο στο πλάσμα και σε άλλα βιολογικά υγρά [269].

Τα κύρια υποστρώματα για οξείδωση από το HOCl είναι δραστικές αμινομάδες της apoB-100. Συγκεκριμένα, η δράση της μυελοϋπεροξειδάσης στις πρωτεΐνες αρχίζει με τη μετατροπή της L-τυροσίνης, ενός φαινολικού αμινοξέος (το οποίο απαντά στο πλάσμα) σε τυροσυλο-ελεύθερη ρίζα. *In vitro* οι τυροσυλο-ρίζες αντιδρούν διασταυρωτά με τυροσίνες πρωτεϊνών σχηματίζοντας *ο,ο'*-διτυροσίνη. Η *ο,ο'*-διτυροσίνη σχηματίζεται στην LDL όταν αυτή επωαστεί με μυελοϋπεροξειδάση παρουσία H₂O₂ και Cl⁻, όχι όμως όταν η LDL επωαστεί μόνο με περίσσεια ιόντων Cu²⁺ [256, 258, 270]. Το HOCl τροποποιεί την LDL αυξάνοντας το αρνητικό της φορτίο και μετατρέποντάς τη σε μια μορφή η οποία επάγει τη συσσώρευση εστέρων της χοληστερόλης στα μακροφάγα [271]. Από πειραματικά δεδομένα έχουν προκύψει σημαντικά στοιχεία όσον αφορά το μηχανισμό με τον οποίο το σύστημα της MPO-H₂O₂-Cl⁻ αντιδρά με την LDL.

(1) Το παραπάνω σύστημα οξειδώνει κυρίως πρωτεϊνικά συστατικά της LDL και μάλιστα όταν χρησιμοποιείται σε μικρή μοριακή αναλογία, ενώ όταν αυτή αυξάνεται το ποσοστό της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών μειώνεται και ξεκινά η λιπιδική τροποποίηση (HOCl>200 φορές πάνω σε σχέση με την LDL), αν και πάντα υπερισχύει η πρωτεϊνική από την λιπιδιακή οξείδωση. (2) Δεν είναι όλα τα συστατικά της LDL ισοδύναμα προσβάσιμα από το HOCl. Για παράδειγμα τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα Met και Tyr συχνά βρίσκονται σε υδροφοβικές περιοχές μέσα στις πρωτεϊνικές δομές, γεγονός που επιδεινώνεται από τη δομή και το μέγεθος του σωματιδίου της LDL. Επίσης, ο υδροφοβικός πυρήνας του σωματιδίου της LDL είναι μόνο κατά ένα μέρος διαπερατός από το HOCl, επομένως περιμένουμε να είναι μειωμένο το % ποσοστό της οξειδωτικής τροποποίησης των λιπιδίων και των λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών της [272, 273]. (3) Είναι γνωστό ότι η αντίδραση του HOCl με διάφορα πρωτεϊνικά κατάλοιπα, όπως τη Lys, την His, τις α-NH₂ ομάδες, ή με τις πλευρικές αλυσίδες της apoB-100 οδηγεί στη δημιουργία των δραστικών μορφών χλωραμινών (RNHCl) που με τη σειρά τους δημιουργούν δευτερογενείς οξειδωτικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι πιθανόν να τροποποιούν και άλλα συστατικά της LDL, όπως λιπίδια ή αντιοξειδωτικά [273-276]. (4) Η σειρά με την οποία χάνονται τα αμινοξέα των πλευρικών αλυσίδων της apoB-100 κατά την έκθεση της LDL με το HOCl είναι η ακόλουθη: Met~Cys>Lys~Tyr>His~Arg. Το φαινόμενο αυτό είναι δοσο- και PH-εξαρτώμενο. Έχει δειχθεί ότι η πιο γρήγορη και η πιο ολοκληρωμένη οξειδωτική τροποποίηση της LDL από το σύστημα της MPO-H₂O₂-Cl⁻

συμβαίνει σε χαμηλά PH (π.χ ~5) από ότι σε ουδέτερα, πιθανώς επειδή το HOCl σχηματίζεται πιο γρήγορα σε αυτές τις χαμηλές τιμές PH [261, 276]. (5) Το παραπάνω σύστημα της MPO-H₂O₂-Cl⁻ μετά την πρωτεϊνική τροποποίηση της LDL και τη συσσώρευσή της, οδηγεί με δευτερογενείς οξειδωτικές αντιδράσεις στην λιπιδιακή τροποποίηση όπου παράγονται συζυγή διένια, TBARS, υδροϋπεροξειδία και βάσεις του Schiff's [277]. Αυτό γίνεται όταν οι τυροσυλο- ελεύθερες ρίζες που παράγονται από την MPO αντιδράσουν με δραστικά ανιόντα υπεροξειδίου (O₂⁻) και δημιουργήσουν έναν μεγάλο αριθμό από ασταθή υπεροξειδία της τυροσίνης που προωθούν τη λιπιδιακή υπεροξείδωση [264]. Επίσης το HOCl παράγει στην LDL λυσοφωσφολιπίδια [278], προϊόντα πλασμαλογόνων [279], μετατρέπει την χοληστερόλη σε μια οικογένεια χλωριωμένων στερολών [280] και τροποποιεί τις κεφαλές της PE και της PS [281, 282]. (6) Τέλος, το HOCl σε μεγάλες συγκεντρώσεις τροποποιεί και τα αντιοξειδωτικά της LDL ακολουθώντας τη σειρά Q₁₀>λυκοπένιο>α-τοκοφερόλη>β-καροτένιο. Τα συστατικά αυτά της LDL δεν αποτελούν τους κύριους στόχους του HOCl, ειδικά όταν το οξειδωτικό αυτό χρησιμοποιείται σε μικρές δόσεις. Επίσης, συμβαίνει μετά την κατανάλωση ολόκληρου του HOCl με τη βοήθεια των πρωτεϊνικών χλωραμινών που σχηματίζονται στα πρώτα στάδια της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών [276, 283].

Όσον αφορά την οξειδωτική τροποποίηση της HDL από το HOCl προκύπτουν τα εξής στοιχεία: (1) Με ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμίδιου (PAGE) κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS) και την επακόλουθη χρώση των απολιποπρωτεϊνών δείχθηκε ότι η αυξημένη μοριακή αναλογία HOCl:HDL οδήγησε στην σταδιακή εξαφάνιση της apoA-I και τη συνακόλουθη δημιουργία υψηλού μοριακού βάρους συσσωρευμάτων ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις του HOCl. Όσον αφορά το ποια αμινοξέα είναι στόχοι του οξειδωτικού, έχειδειχθεί ότι η Cys και η Met καταναλώνονται ολοκληρωτικά σε χαμηλές μοριακές αναλογίες, ενώ η His, η Arg και η Lys καταναλώνονται κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο από 20-50% στην μέγιστη συγκέντρωση του οξειδωτικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η σχετική ηλεκτροφορητική ικανότητα της τροποποιημένης HDL σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης να αυξηθεί. (2) Λιπιδιακός χαρακτηρισμός της HDL έδειξε ότι αυτή αποτελείται κατά 90% από φωσφατιδυλοχολίνη (PC), ενώ το υπόλοιπο 10% συνίσταται από φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI), φωσφατιδικό οξύ (PA), PS και PE. Τροποποίηση της HDL από αυξανόμενες δόσεις του HOCl, οδήγησε σε μια μικρή μείωση της PC, ενώ σχηματίστηκαν μόνο ίχνη από την λυσο-PC. Τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια δεν άλλαξαν σημαντικά κατά την κατεργασία με το

οξειδωτικό. (3) Η ποσότητα των ακόρεστων λιπαρών οξέων ($C_{18:1}$ και $C_{18:2}$) στα υποκλάσματα της HDL μειώνεται ελαφρώς, ενώ η ποσότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων παραμένει η ίδια σε υψηλές δόσεις του οξειδωτικού. (4) Επίσης, σε υψηλές δόσεις του οξειδωτικού παρατηρείται μία οριακή αύξηση του περιεχομένου της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης, ενώ δεν παρατηρείται ο σχηματισμός προϊόντων λιπιδιακής υπεροξείδωσης όπως TBARS [284].

Πρόσδεση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών σε υποδοχείς εκκαθαριστές

Η εμφάνιση αφρωδών κυττάρων πλούσιων σε λιπίδια αποτελεί χαρακτηριστικό των πρώτων σταδίων στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Τέτοια αφρώδη κύτταρα σχηματίζονται *in vitro* όταν μακροφάγα επωάζονται με τροποποιημένες μορφές λιποπρωτεϊνών, υποδηλώνοντας ότι συγκεκριμένες τροποποιήσεις στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο επάγουν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων *in vivo*. Η πρόσληψη της τροποποιημένης λιποπρωτεϊνών γίνεται διαμέσου των υποδοχέων εκκαθαριστών, οι οποίοι είναι διαφορετικοί από τους κλασικούς υποδοχείς.

Στην κυτταρική επιφάνεια των μακροφάγων εκφράζονται τουλάχιστον έξι δομικά διαφορετικοί υποδοχείς στους οποίους προσδένονται τα τροποποιημένα LDL σωματίδια: οι υποδοχείς εκκαθαριστές A (SR-A) και B (SR-BI), ο CD36, ο CD68, ο lectin like oxLDL υποδοχέας (LOX-1) και ο υποδοχέας-εκκαθαριστής που προσδέεται με τις φωσφατιδυλοσερίνες (SR-PSOX). Οι SR-A και CD36 έχουν καταγραφεί ως οι κύριοι υποδοχείς υπεύθυνοι για την πρόσληψη τροποποιημένης LDL που οδηγεί στην λιπιδιακή φόρτωση των μακροφάγων [285, 286].

Ο υποδοχέας εκκαθαριστής SR-A είναι μια τριμερής γλυκοπρωτεΐνη 200 kDa στην οποία προσδέεται η ακετυλιωμένη LDL, η oxLDL, το πολυινοσινικό οξύ, η θειική δεξτράνη και τα υψηλής γλυκοζυλίωσης προϊόντα τερματισμού. Ο CD36 είχε αρχικά ταυτοποιηθεί ως ο μεμβρανικός γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας της θρομοσπονδίνης-1 των αιμοπεταλίων στον οποίο προσδένονται και τα oxLDL σωματίδια. Ο CD36 είναι μια υψηλού βαθμού γλυκοζυλίωσης γλυκοπρωτεΐνη των 53 kDa με N και C τελικές διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες τον χαρακτηρίζουν ως υποδοχέα-εκκαθαριστή τάξης B.

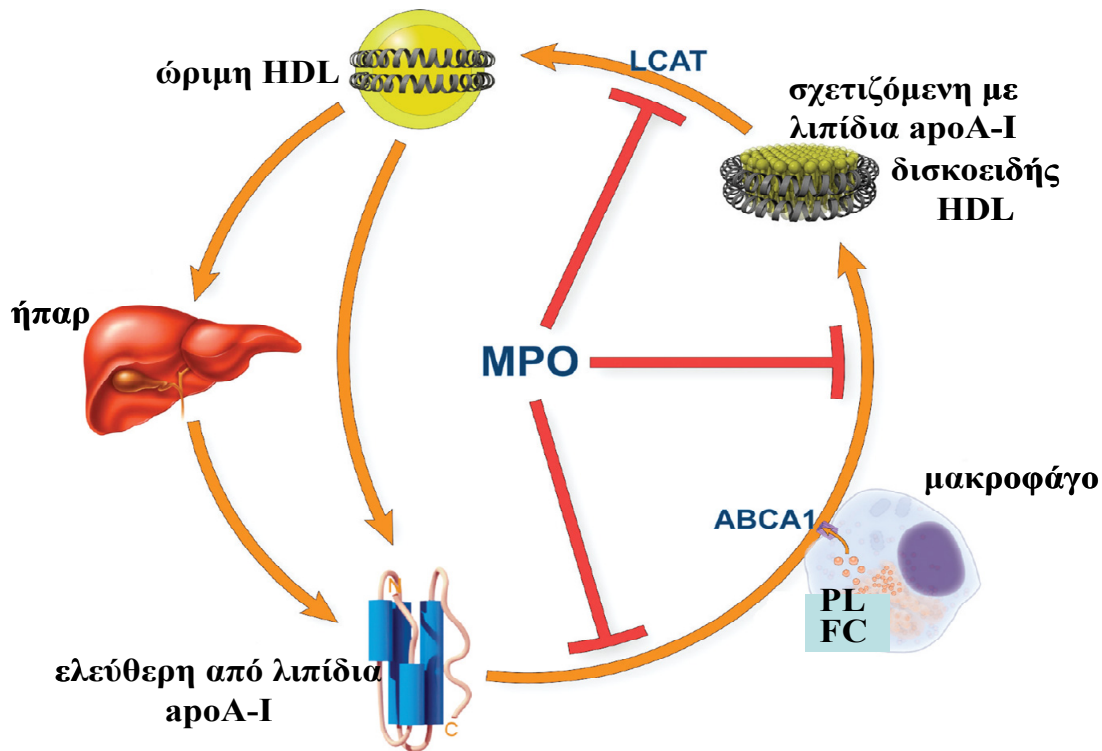
Ο CD36 προάγει την ενσωμάτωση-ένταξη της ελάχιστα τροποποιημένης LDL. Ο SR-BI είναι ένα ακόμη μέλος της οικογένειας των υποδοχέων εκκαθαριστών τάξης B και όμοια με τον CD36 αποτελεί μια πρωτεΐνη υψηλού βαθμού γλυκοζυλίωσης. Ο SR-BI μπορεί να προσδένεται με τυπικούς προσδέτες ενός υποδοχέα εκκαθαριστή συμπεριλαμβάνοντας την ακετυλιωμένη LDL και oxLDL, τα AGE, τα αποπτωτικά κύτταρα και τα ανιονικά φωσφολιπίδια. Επιπλέον ο SR-BI μπορεί επίσης να προσδένεται με την φυσική HDL [287] ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης.

Ο ρόλος των οξειδωμένων μορφών των LDL και HDL στην αθηρωμάτωση

Επιπλοκές στην αθηρωμάτωση είναι η πιο κοινή αιτία θανάτου στο δυτικό κόσμο. Η αθηροσκλήρωση αποτελεί ασθένεια του έσω χιτώνα των αρτηριών, η οποία είναι το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών, των προερχόμενων από τα μονοκύτταρα μακροφάγων, των T-κυττάρων και των φυσικών κυτταρικών στοιχείων του αρτηριακού τοιχώματος. Αυτή η φλεγμονώδης διαδικασία μπορεί τελικά να οδηγήσει στην ανάπτυξη πολύπλοκων βλαβών ή πλακών οι οποίες διεισδύουν στον αρτηριακό αυλό.

Τα υψηλά επίπεδα της LDL από μόνα τους δεν είναι ικανά να διεγείρουν την αθηροσκλήρωση. Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωρισθεί ότι στη δυναμική της αθηρωματικής πλάκας και σε όλα τα στάδια ανάπτυξής της συμμετέχουν έντονες φλεγμονώδεις διεργασίες. Βασικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αυτές διεργασίες διαδραματίζει το οξειδωτικό στρες [288]. Από την ολική LDL που εντοπίζεται στο πλάσμα, μια ποσότητα διασχίζει τον υπενδοθηλιακό χώρο και μπορεί να αποκοπεί από την γενική κυκλοφορία [289]. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η οξείδωση της LDL δεν πραγματοποιείται στην κυκλοφορία εξαιτίας της ταυτόχρονης παρουσίας αντιοξειδωτικών μορίων [290]. Από πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι η oxLDL είναι παρούσα στις αθηρωματικές πλάκες πειραματόζωων και ανθρώπων [291].

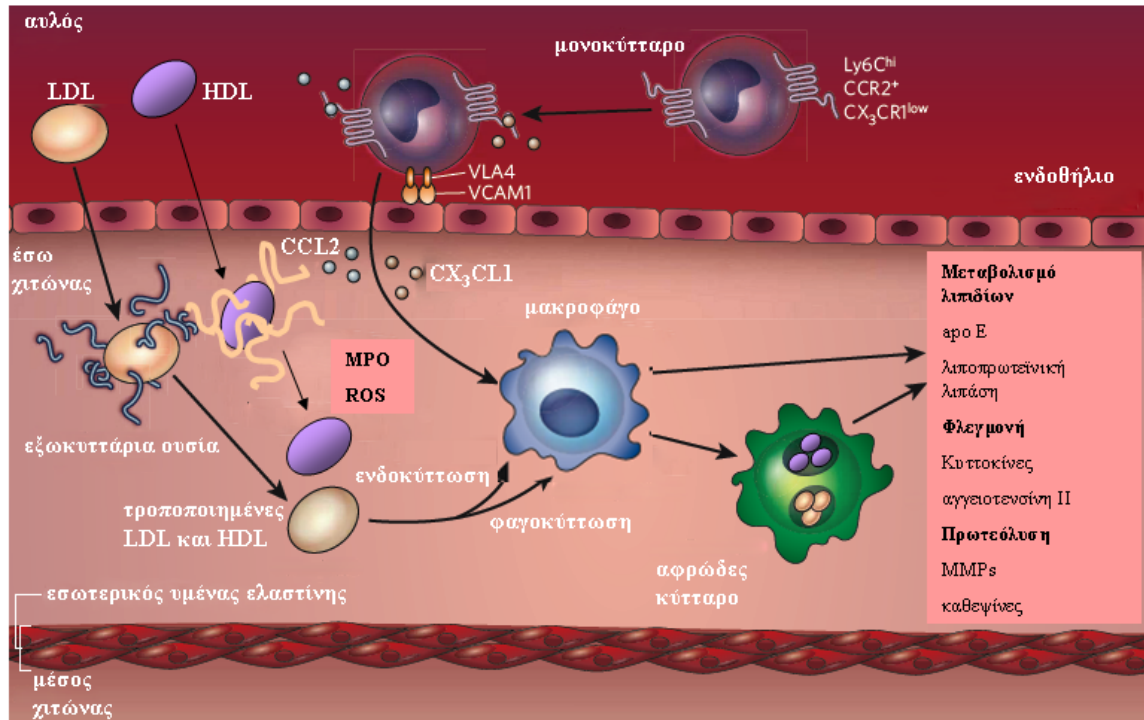
Όπως είναι γνωστό, τα επίπεδα της HDL στο πλάσμα έχουν αντίστροφη σχέση με την εμφάνιση αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής νόσου. Η κύρια υπόθεση για την εξήγηση των αντιαθηρογόνων ιδιοτήτων της HDL είναι ότι αυτή η λιποπρωτεΐνη προάγει τη διαδικασία της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης από τις αρτηρίες προς το ήπαρ [292]. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ουσιαστική πρόοδος στην κατανόηση της βιολογικής δράσης και της αλληλεπίδρασης της HDL με τα κύτταρα. Είναι γνωστό λοιπόν, πως η HDL εμφανίζει πλήθος από βιολογικές δράσεις, οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις εξής ομάδες: (α) αντιοξειδωτικές, (β) αντιφλεγμονώδεις (γ) αντιθρομβωτικές και (δ) δράση στο ενδοθήλιο. Παρόλα αυτά, αρκετά στοιχεία δείχνουν ότι η HDL μπορεί κάτω από συγκεκριμένες περιπτώσεις να τροποποιηθεί και να χάσει τον προστατευτικό της ρόλο ή ακόμη και να αποκτήσει προαθηρογόνο δράση. Ο ακριβής μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή αυτής της δυσλειτουργικής HDL και των χημικών και δομικών αλλαγών της παραμένουν ως επί το πλείστον άγνωστοι. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν την ύπαρξη οξειδωτικά τροποποιημένης HDL, *in vivo*, από την MPO. Η MPO τροποποιεί την HDL οξειδώνοντας συγκεκριμένα κατάλοιπα της apoA-I αλλάζοντας τη διάταξη της από μία ελεύθερη από λιπίδια σε μία σχετιζόμενη με λιπίδια apoA-I. Αποτέλεσμα της δομικής αλλαγής είναι να εξασθενίσει η εκροή χοληστερόλης μέσω της μεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφοράς ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1). Επιπλέον, η οξειδωμένη apoA-I χάνει την ικανότητά της να ενεργοποιεί την λεκιθινοχολεστερο-ακυλο-τρανσφεράση (LCAT), που ρόλος της είναι η μετατροπή της FC σε CE [288, 293] (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Η οξείδωση της apoA-I από την MPO αναστέλλει δύο βήματα στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Η οξείδωση της ελεύθερης από λιπίδια apoA-I από την MPO βλάπτει την ικανότητα της πρωτεΐνης να μεταφέρει χοληστερόλη μέσω του μηχανισμού με την ABCA1. Η οξείδωση της σχετιζόμενης με λιπίδια apoA-I από την MPO βλάπτει την ικανότητά της να ενεργοποιήσει την LCAT (τροποποιημένο από τους Shao et al. [293]).

Αποτέλεσμα της οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών είναι η συμμετοχή τους στην αθηρογένεση. Η LDL και η HDL της κυκλοφορίας εισέρχονται στον έσω χιτώνα όπου και συγκρατούνται μέσω της πρόσδεσής τους με την εξωκυττάρια ουσία. Οι λιποπρωτεΐνες τροποποιούνται από δραστικά μόρια οξυγόνου ή την MPO το οποίο οδηγεί στην παραγωγή βιολογικά δραστικών προφλεγμονωδών λιπιδίων που συμβάλουν στην έναρξη αλλά και τη διατήρηση μιας φλεγμονώδους διαδικασίας εντός του έσω χιτώνα. Αυτή η φλεγμονή οδηγεί στην παραγωγή χημειοκινών όπως της CX₃CL1, της CCL2 και της MCP-1 που στρατολογούν τα μονοκύτταρα εντός του υπενδοθηλιακού χώρου. Αυτά τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία μέσω της έκφρασης υποδοχέων-εκκαθαριστών αφομοιώνουν τα τροποποιημένα LDL και HDL σωματίδια μέσω ενδοκύττωσης ή φαγοκύττωσης και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα μακροφάγα όπως και τα αφρώδη κύτταρα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες από εστέρες χοληστερόλης, εκκρίνουν διάφορους παράγοντες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των αθηροσκληρωτικών πλακών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται παράγοντες που

συμμετέχουν στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στη φλεγμονή και την πρωτεόλυση (Εικόνα 3.6) [260].



Εικόνα 3.6: Ο ρόλος των οξειδωτικά τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών LDL και HDL στη δημιουργία αφρώδων κυττάρων (τροποποιημένο από τους Rader DJ [260]).

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση

Αιμοπεταλιακοί παράγοντες που συμβάλουν στην αθηροθρόμβωση

Τα αιμοπετάλια δεν αποτελούν μόνο μία αποθήκη φυσιολογικών ενεργών ουσιών, αλλά κατόπιν ενεργοποίησής τους, παράγουν και φλεγμονώδεις παράγοντες από ενδογενή πρόδρομα. Τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων αποτελούν τις κύριες αποθήκες φλεγμονοδών μεσολαβητών: κατιοντικών πρωτεϊνών, χημειοκινών της C-X-C και της C-C οικογένειας, ιντερλευκινών και προσκολλητικών πρωτεϊνών. Οι κατιονικές πρωτεΐνες των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα και την αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων [294]. Η χημειοκίνη επιθηλιακή ουδετερόφιλη-ενεργοποιητική πρωτεΐνη-78 (ENA-78, epithelial neutrophil-activating protein-78) επάγει την έξω-μέσα σηματοδότηση των β_2 ιντεγκρινών, αυξάνοντας την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στην ενδοθηλιακή επιφάνεια. Η ρυθμιζόμενη κατόπιν ενεργοποίησης κανονικών T κυττάρων που εκφράζεται και εκκρίνεται (RANTES, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) αποτελεί γέφυρα μεταξύ του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου και των μονοπύρηνων κυττάρων. Επίσης επάγει ραγδαία ενδοκυττάρια σηματοδότηση στα λευκοκύτταρα και τα μονοκύτταρα επιδρώντας στη γονιδιακή έκφραση που ελέγχει τη φλεγμονή [295]. Η χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) συμβάλει στο χημειοτακτισμό μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων και στη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Η φλεγμονώδης πρωτεΐνη-1a των μακροφάγων (MIP-1, macrophage inflammatory protein-1a) είναι πιθανός μεσολαβητής της φλεγμονής μέσω ιού *in vivo*. Ο αιμοπεταλιακός παράγοντας-4 (PF-4, platelet factor-4) είναι χημειοτακτικός για τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα ιωσινόφιλα και τους ινωβλάστες και μπορεί να διεγείρει τα βασεόφιλα ώστε να απελευθερώσουν ισταμίνη. Κατόπιν ενεργοποίησης τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην κυτταρική μεμβράνη το προσκολλητικό μόριο P-σελεκτίνη, το οποίο διαδραματίζει

σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων-ενδοθηλίου και αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων και στην εναπόθεση RANTES στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο. Επίσης η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) που απελευθερώνονται από αιμοπετάλια κατόπιν ενεργοποίησής τους με θρομβίνη, προάγουν τον χημειοτακτισμό και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων διευκολύνοντας την αποδόμηση του υπενδοθηλιακού χώρου [296, 297].

Από τα πιο μιτογόνα που απελευθερώνονται από τα α-κοκκία είναι ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF, platelet derived growth factor) που είναι σημαντικός όχι μόνο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του αρτηριακού τοιχώματος, αλλά επάγει τον χημειοτακτισμό και την ενεργοποίηση τόσο των ουδετερόφιλων όσο και των μονοκυττάρων [298]. Επίσης, παράλληλα με τον PDGF, ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β, transformer growth factor-β) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, epidermal growth factor) που εκκρίνονται, διεγείρουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών του αρτηριακού τοιχώματος, συνεισφέροντας έτσι στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας ή στη δημιουργία της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική [28].

Όσον αφορά τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων, αυτά περιέχουν σεροτονίνη, ισταμίνη και τα νουκλεοτίδια ADP και ATP. Η σεροτονίνη συμπεριφέρεται ως φλεγμονώδης παράγοντας αυξάνοντας τη διαπερατότητα του αρτηριακού τοιχώματος και οδηγώντας στην παραγωγή υπεροξειδίων από τα μακροφάγα. Τόσο το ADP όσο και το ATP αυξάνουν τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου στα ουδετερόφιλα και προκαλούν οξειδωτική έκρηξη, ενώ το ADP επάγει ανάδρομη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Επιπρόσθετα, το πυκνό σωληνοειδές σύστημα, είναι το κύριο οργανίδιο που συμμετέχει στον μεταβολισμό του AA, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή TxA_2 , λευκοτριενίων, προσταγλανδινών και PAF, τα οποία συμμετέχουν με τη σειρά τους σε μια μεγάλη ποικιλία από φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Τα αιμοπετάλια σε αυτό το οργανίδιο συνθέτουν μια πληθώρα από κυκλικά ενδοϋπεροξειδία και την προσταγλανδίνη της σειράς E που συμμετέχουν στην επαγωγή του οιδήματος και του πόνου.

Επίσης τα αιμοπετάλια παράγουν προφλεγμονώδη ένζυμα ή λιπίδια όπως την COX-1, την COX-2 ή τα εικοσανοειδή και τον PAF. Ο PAF επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και των μακροφάγων και προκαλεί αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Επίσης η IL-1β που παράγεται αυξάνει την ικανότητα

προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια παράγουν θρομβίνη, έναν ισχυρό αγωνιστή που επάγει την έκφραση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης για τη σύνδεση με τα λευκοκύτταρα [28, 294].

Εν κατακλείδι, θα προσθέταμε ότι ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη φλεγμονή οφείλεται σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό και στα PMPs. Τα PMPs φέρουν αρκετούς προφλεγμονώδεις παράγοντες στην κυτταρική τους μεμβράνη και διαδραματίζουν πολυποίκιλο και πολυσήμαντο ρόλο στη φλεγμονή, στον οποίο θα αναφερθούμε εκτενέστερα στο Κεφάλαιο 6 [159, 199]. Επίσης, η έκφραση του CD40L στην κυτταρική μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων είναι προφλεγμονώδης, ενεργοποιώντας το ενδοθήλιο, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μονοκύτταρα και επάγοντας την έκφραση χημειοκινών, μορίων προσκόλλησης και του TF [299]. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια εκφράζουν τους τύπου Toll υποδοχείς (TLR, Toll-like receptors) που ειδικεύονται στην αναγνώριση μορίων των παθογόνων μικροοργανισμών, συγκεκριμένα τον TLR-2 και τον TLR-4, οι οποίοι μελέτες δείχνουν ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση, προάγοντας το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και ενεργοποιώντας τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [300, 301]. Οι TLR-2 και TLR-4 στα αιμοπετάλια διεγείρουν την απελευθέρωση του PAF και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), αυξάνοντας την επαγόμενη από τους αγωνιστές συσσώρευση και την ετεροτυπική συσσώρευση των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα [302].

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα

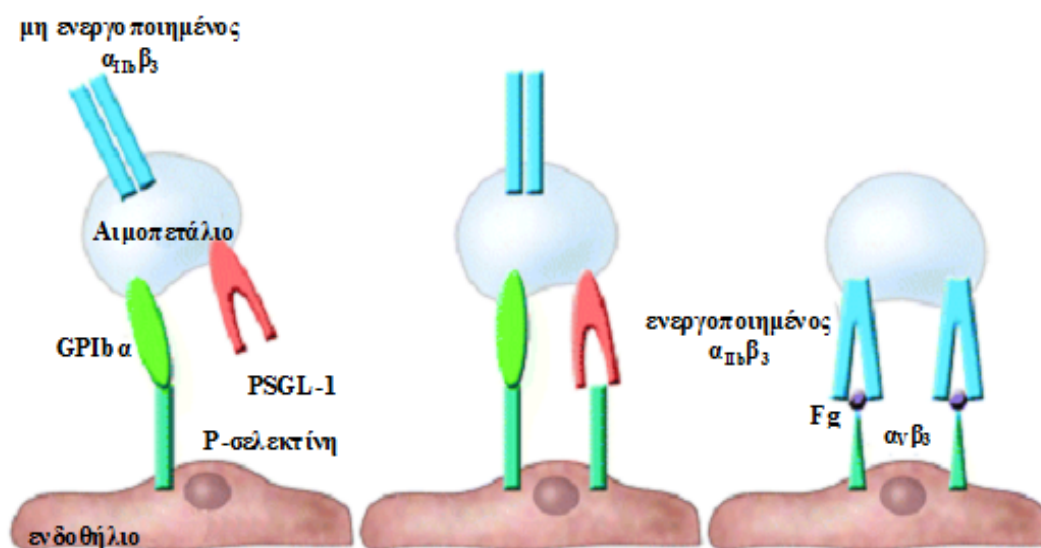
Όταν ο Bizzozzero περιέγραψε το 1882 τα αιμοπετάλια, παρατήρησε επίσης ότι κατά την ύπαρξη βλάβης στο ενδοθήλιο και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αρτηριακό τοίχωμα, τα λευκά κύτταρα του αίματος ενσωματώνονταν μέσα στην «αποθήκη» των αιμοπεταλίων. Χρειάστηκαν περισσότερα από 100 χρόνια στους επιστήμονες να ερευνήσουν τη συνεργατική δράση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων σε περιοχές όπου υπάρχει φλεγμονή. Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων είναι αναμενόμενη, όχι μόνο γιατί η απομόνωση των λευκοκυττάρων συχνά συνοδεύεται από επιμόλυνση αιμοπεταλίων, αλλά και γιατί τα δύο

αυτά είδη κυττάρων μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, έχουν ενεργό λιπιδιακό μεταβολισμό, επιδεικνύουν μερικές ομολογίες μεταξύ των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων τους και εκφράζουν αρκετά κοινά προσκολλητικά μόρια κατόπιν ενεργοποίησής τους [298].

Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια σε περίπτωση βλάβης ή καταστροφής του ενδοθηλίου, μπορούν να προσκολληθούν στον υπενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος. Εκτός από αυτού του είδους την προσκόλληση, τα αιμοπετάλια μπορούν να προσκολληθούν και στο ακέραιο μη κατεστραμμένο ενδοθήλιο, όταν αυτό έχει απλώς ενεργοποιηθεί [28]. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε διαμέσου των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιεί το ενδοθήλιο με αποτέλεσμα την έκφραση της P-σελεκτίνης από τα ενδοκυττάρια κοκκία τους στην επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης, γνωστά και ως σωματίδια Weibel-Palade, όταν αυτά ενεργοποιηθούν από διάφορους αγωνιστές, όπως η θρομβίνη, η ισταμίνη και οι ελεύθερες ρίζες O₂ [303]. Η απευθείας σύνδεση των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα γίνεται με τη βοήθεια της P-σελεκτίνης και του vWF. Αρχικά τα αιμοπετάλια διαμέσου της GPIIb και του γλυκοπρωτεϊνικού προσδέτη της P-σελεκτίνης (PSGL-1) αλληλεπιδρούν με την ενδοθηλιακή P-σελεκτίνη με αποτέλεσμα την κύλιση και τη χαλαρή προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο σταθεροποιείται τελικά διαμέσου των β₃ ιντεγκρινών, του ενεργοποιημένου αιμοπεταλιακού υποδοχέα α_{IIb}β₃ και του υποδοχέα των ενδοθηλιακών κυττάρων α_vβ₃ (Εικόνα 4.1) [304].

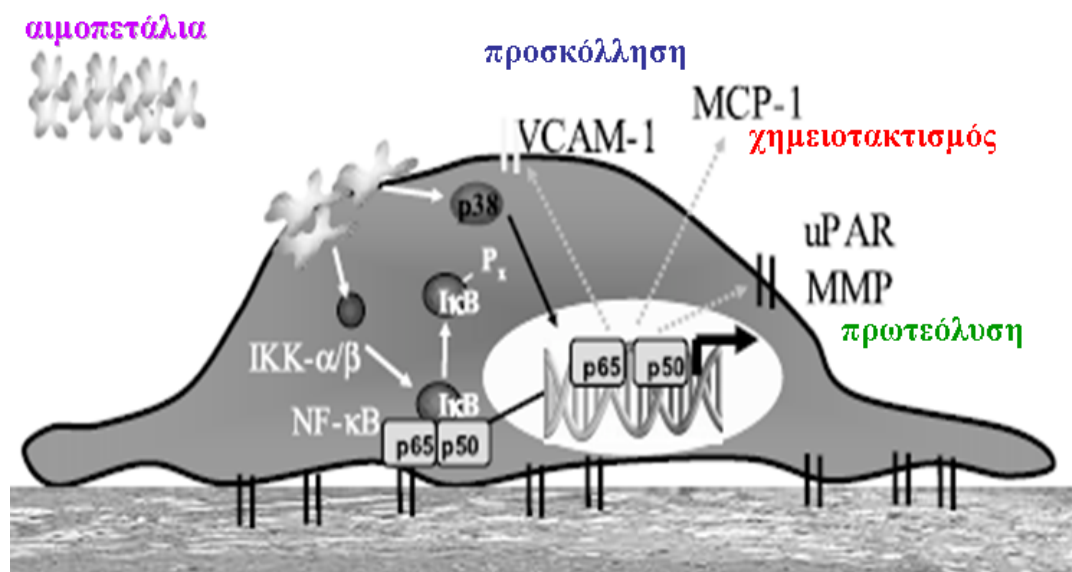
Χαλαρή προσκόλληση

Σταθερή προσκόλληση



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο [305].

Η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων διαμέσου του ενεργοποιημένου $\alpha_{IIb}\beta_3$ οδηγεί στην έκφραση της P-σελεκτίνης αλλά και στην απελευθέρωση του CD40L και της IL-1 β . Η IL-1 β ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγει την έκφραση διαφόρων φλεγμονωδών μορίων όπως του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης-1 (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1), του προσκολλητικού μορίου του αγγειακού τοιχώματος-1 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) και της MCP-1. Επιπρόσθετα η IL-1 β επάγει την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα- κ B (NF- κ B, nuclear factor- κ B) διαμέσου των MAP κινασών [306, 307]. Συνεπώς, η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο προκαλεί φλεγμονώδη διέγερση όμοια με αυτή που παρατηρείται στα κύτταρα αυτά κατά την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Συνεπώς η άμεση προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη της αθηροθρόμβωσης (Εικόνα 4.2) [308].

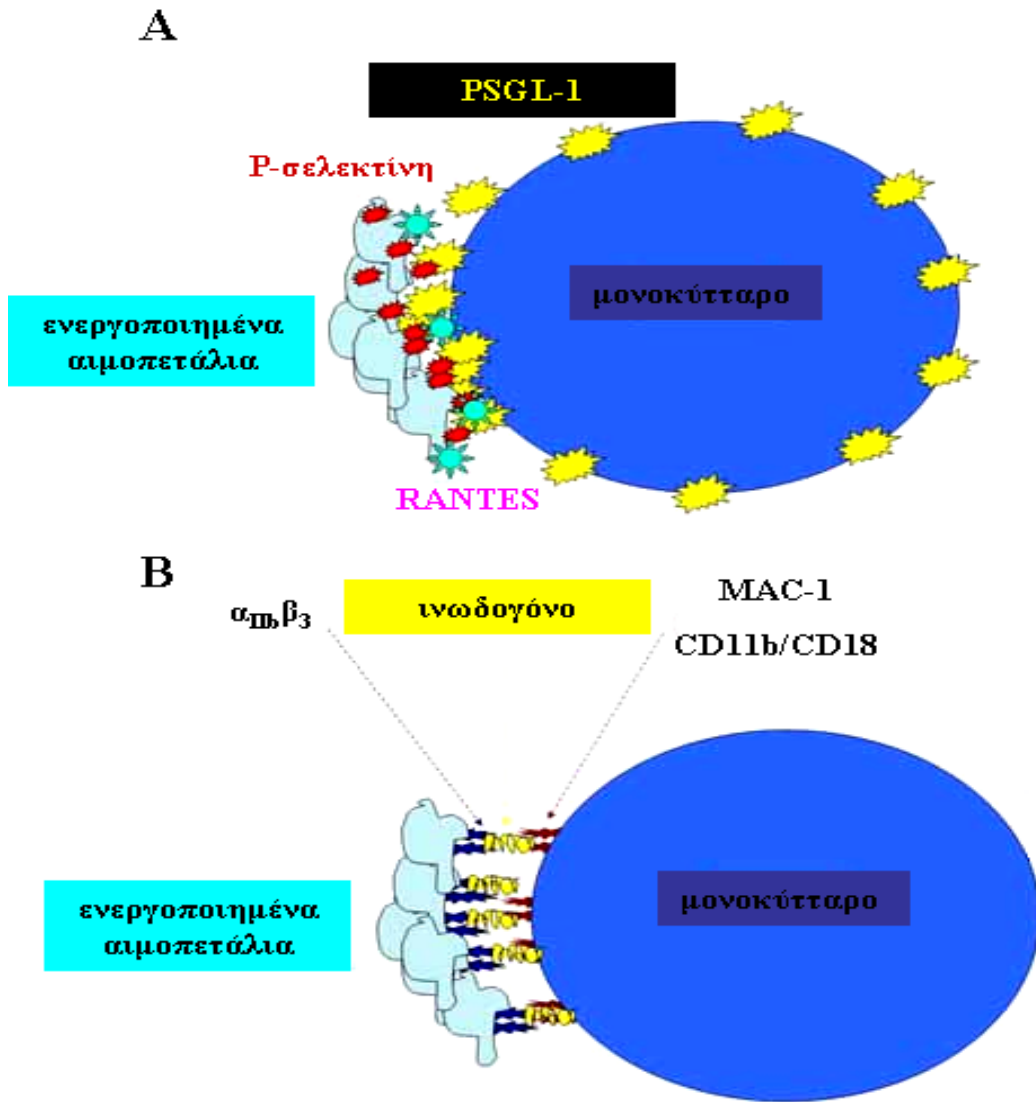


Εικόνα 4.2: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, που επάγει την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων, την αυξορύθμιση ενδοθηλιακών προσκολλητικών μορίων και την έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών [308].

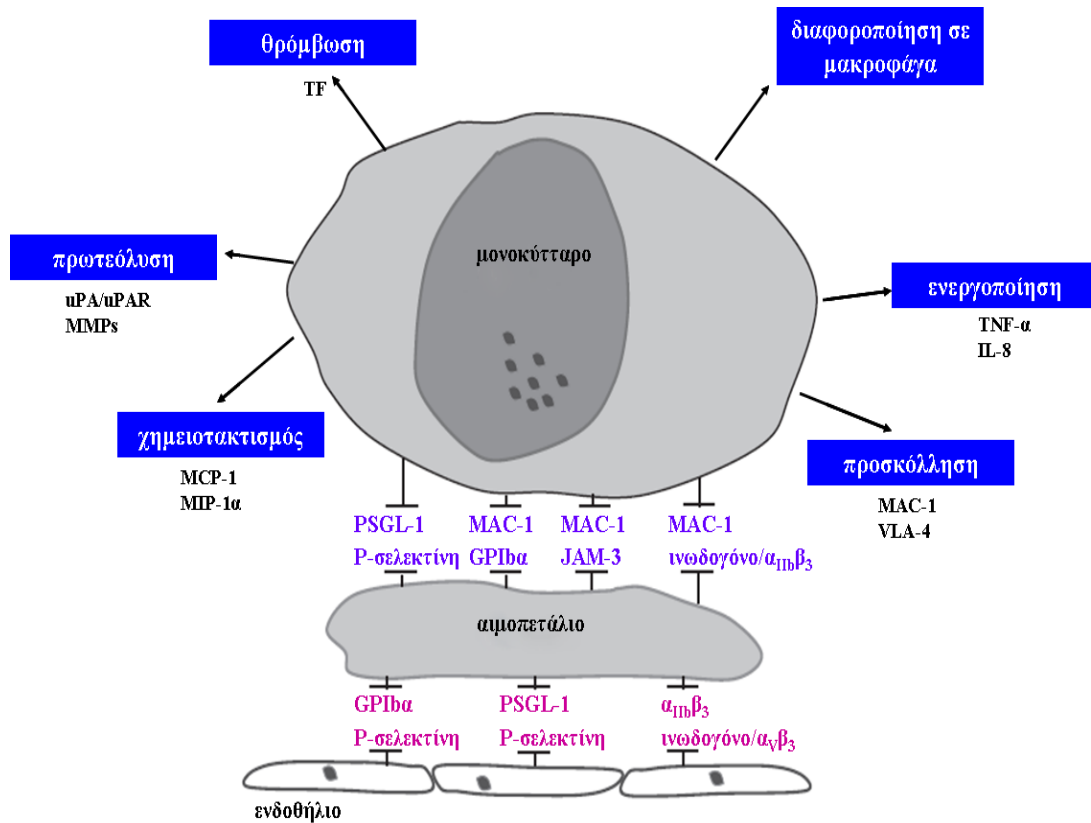
Εκτός της απευθείας σύνδεσης των αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αυτά μπορούν να προσκολληθούν και διαμέσου των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Αρχικά τα ουδετερόφιλα κυλούν πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο αφού η προσκόλληση διαμέσου της ενδοθηλιακής P-σελεκτίνης είναι χαλαρή. Σ' αυτή την προσκόλληση συμβάλουν εκτός της P-σελεκτίνης και η L-σελεκτίνη που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετερόφιλων και η E-σελεκτίνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, όταν αυτά ενεργοποιηθούν από κυτταροκίνες, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α) [309]. Η προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση αυτών σε ισχυρούς ενεργοποιητές τους, όπως είναι ο PAF και οι χημειοκίνες της οικογένειας C-X-C (IL-8), οι οποίοι παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Όσον αφορά τον PAF, αυτός μετά την παραγωγή του δεν εκκρίνεται, αλλά παραμένει συνδεδεμένος στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, ασκώντας συνδετοκρινή δράση στα προσκολλημένα ουδετερόφιλα. Με αυτόν τον τρόπο ασκεί συνδετοκρινή δράση στα προσκολλημένα ουδετερόφιλα [310]. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην έκφραση της β₂ ιντεγκρίνης (CD11b/CD18 ή MAC-1) στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετερόφιλων. Στη συνέχεια η CD11b/CD18 συνδέεται με τον ενδοθηλιακό υποδοχέα του ICAM-1, με

αποτέλεσμα τη σταθερή προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατόπιν πάνω στα ουδετερόφιλα μπορούν να προσκολληθούν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διαμέσου της P-σελεκτίνης, σχηματίζοντας έτσι συσσωρεύματα αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Η δημιουργία των παραπάνω συσσωρευμάτων μπορεί να συμβεί και ανεξάρτητα από την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να συνδεθούν με τα ουδετερόφιλα διαμέσου γεφυρών ινωδογόνου, το οποίο αναγνωρίζεται τόσο από τον $\alpha_{IIb}\beta_3$ των αιμοπεταλίων, όσο και από τον υποδοχέα CD11b/CD18 των ουδετερόφιλων [311]. Έτσι τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προσκολλούμενα και ενεργοποιώντας το ένα το άλλο διαμέσου της παραγωγής φλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα, ένδειξη ότι η προσκόλληση αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων-ενδοθηλιακών κυττάρων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης όσο και στη ρήξη αθηρωματικής πλάκας [312], [313].

Τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να προσκολληθούν στα μονοκύτταρα διαμέσου της αλληλεπίδρασης της P-σελεκτίνης και του PSGL-1. Στη συνέχεια η παραπάνω προσκόλληση σταθεροποιείται με την σύνδεση διαφόρων προσδετών των αιμοπεταλίων με το CD11b/CD18 (MAC-1) ή το GPIIb ή/και με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων (JAM-3, ICAM-2) [314, 315] και με το ινωδογόνο δεσμευμένο στον $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Εικόνα 4.3). Με αυτόν τον τρόπο, τα αιμοπετάλια διεγείρουν την έκκριση χημειοκινών, κυτταροκινών και του TF από τα μονοκύτταρα, ενεργοποιούν υποδοχείς προσκόλλησης και πρωτεασών, ενώ επάγουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα (Εικόνα 4.4) [305]. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και μονοκυττάρων και η φλεγμονώδης διέγερση που επακολουθεί, συμβάλει επίσης σημαντικά στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας.



Εικόνα 4.3: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στα μονοκύτταρα. (A) Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με τα μονοκύτταρα μέσω της Ρ-σελεκτίνης και του PSGL-1 αντίστοιχα. Ο RANTES που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και στη δημιουργία συσσωρευμάτων αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων. (B) Τα συσσωρεύματα αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων σταθεροποιούνται, μέσω του $\alpha_{IIb}\beta_3$ των αιμοπεταλίων με το CD11b-CD18 των μονοκυττάρων διαμέσου του ινωδογόνου (τροποποιημένο από τους McGregor et al [316]).



Εικόνα 4.4: Σχηματική απεικόνιση της στρατολόγησης και της διέγερσης των μονοκυττάρων από τα προσκολλημένα στο ενδοθήλιο αιμοπετάλια [317].

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας διαδραματίζει επίσης η αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνεια τους θέσεις με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης (υποδοχείς) τόσο για τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες VLDL και LDL, όσο και για την αντιαθηρογόνο HDL. Η πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων μεταβάλλει την ανταπόκριση τους στη δράση διάφορων αγωνιστών διαμέσου ενεργοποίησης ενδοκυττάρων μηχανισμών επαγωγής σήματος. Το μόριο στο σωματίδιο της LDL το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση του σωματιδίου με τα αιμοπετάλια είναι

η apoB-100, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά των λιπιδίων στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν πολλές και αντικρουόμενες απόψεις για το που συνδέεται επάνω στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη [318]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με την LDL πραγματοποιείται διάμεσου των υποδοχέων των απολιποπρωτεϊνών E-2 (apolipoprotein E receptor-2, apoER2). Η apoER2, γνωστή και ως σχετιζόμενη με τον LDL-υποδοχέα πρωτεΐνη-8, ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων της LDL, όπου η δομή της συσχετίζεται άμεσα με τον υποδοχέα της LDL (LDL-R) και του υποδοχέα της VLDL (VLDL-R) [319]. Ακόμη, έχειδειχθεί ότι η HDL διαμέσου της apoE είναι δυνατόν να αλληλεπιδρά με τον apoER2 των αιμοπεταλίων [320].

Επίσης, έχει προταθεί ότι η πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων γίνεται και διάμεσου των γλυκοπρωτεϊνών. Ειδικότερα, κύρια υπεύθυνες για την πρόσδεση αυτή είναι οι υπομονάδες του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [321], [322]. Αντίθετα, οι Pedreno et al. [323] έδειξαν ότι αιμοπετάλια σε κατάσταση ηρεμίας δε δεσμεύουν την LDL διάμεσου του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ή μέσω των υπομονάδων α_{IIb} και β_3 ξεχωριστά. Όσον αφορά την αλληλεπίδραση της HDL με τα αιμοπετάλια υπάρχουν λίγα δεδομένα. Μελέτες δείχνουν ότι τα σωματίδια της HDL, μέσω της apoA-I, συνδέονται με τα αιμοπετάλια διαμέσου του $\alpha_{IIb}\beta_3$ υποδοχέα τους [324], ενώ άλλες έδειξαν ότι η πρόσδεση της HDL στα αιμοπετάλια δεν σχετίζεται με τον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [325].

Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και λιποπρωτεϊνών φαίνεται ότι διαδραματίζουν και οι υποδοχείς εκκαθαριστές που έχουν ανιχνευτεί στην επιφάνεια των ήρεμων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Αυτοί είναι ο CD36, ο SR-BI, ο CD68, ο LOX-1 και ο SR-A [287]. Ο CD36 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως στην αθηρογένεση, το λιπιδιακό μεταβολισμό και την αγγειογένη [326] και αναγνωρίζει ένα μεγάλο αριθμό προσδετών: την θρομβοσπονδίνη-1, την oxLDL, λιπαρά οξέα κ.ά. [326-328]. Ο SR-BI συνδέεται τόσο με φυσικές όσο και με οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες, κυρίως την oxHDL μέσω της apoA-I [329]. Ο LOX-1 συνδέεται με την oxLDL, με αποπτωτικά κύτταρα, με άλλα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, με βακτήρια και συμμετέχει στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Η έκφραση του LOX-1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων έχειδειχθεί ότι εξαρτάται από την ενεργοποίηση [330]. Ο SR-A συνδέεται με την oxLDL [331], ενώ ο CD68 εκφράζεται στη μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και συνδέεται με την oxLDL [332].

Η δράση τόσο των φυσικών όσο και των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στα αιμοπετάλια φαίνεται περιληπτικά στον Πίνακα 4.1 [320, 333].

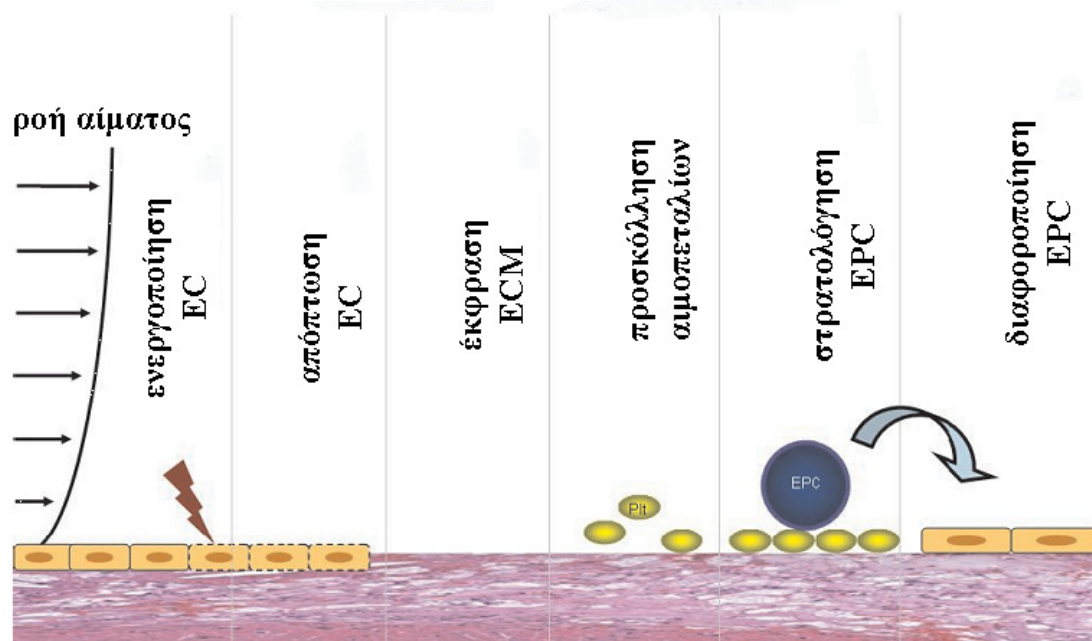
Πίνακας 4.1: Η πρόσδεση και η δράση της φυσικής ή της οξειδωμένης LDL ή HDL στα αιμοπετάλια.

<i>Πιθανοί υποδοχείς των</i>		
<i>Λιποπρωτεΐνη</i>	<i>αιμοπεταλίων που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις</i>	<i>Δράση</i>
Φυσική LDL	$\alpha_{IIb}\beta_3$, apoER2	Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων Αύξηση της ευαισθησίας των αιμοπεταλίων σε ενεργοποιητικούς παράγοντες Αλλαγή της σύστασης των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων Ανταλλαγή λιπιδίων, μεταφορά λιπιδίων σε άλλα κύτταρα Μετατροπή της σε oxLDL από τα ROS των αιμοπεταλίων, λιπιδιακή υπεροξείδωση
Οξειδωμένη LDL	SR-BI, CD36, LOX-1, SR-A, CD68, $\alpha_{IIb}\beta_3$	Επάγεται η υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων Γρήγορη αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και συσσώρευση. Δημιουργία θρόμβου Απελευθέρωση χοληστερόλης από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στα μακροφάγα Δημιουργία αφρωδών κυττάρων μετά τη φαγοκυττάρωση των αιμοπεταλίων από τα μακροφάγα Επάγεται η δημιουργία αφρωδών κυττάρων σε καλλιέργειες αιμοπεταλίων/προγονικών κυττάρων
Φυσική HDL	SR-BI, $\alpha_{IIb}\beta_3$, apoER2	Αποευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων Αντι-αθηροσκληρωτικές δράσεις
Οξειδωμένη HDL	SR-BI, apoER2, $\alpha_{IIb}\beta_3$	Επάγεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή τουλάχιστον ενισχύεται η επαγόμενη από αγωνιστές συσσώρευσή τους Αυξημένη έκκριση των κοκκίων και αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου Αναστολή της επαγόμενης από τη θρομβίνη, το κολλαγόνο και το ADP συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, της ενεργοποίησης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, της έκφρασης της P-σελεκτίνης και της έκκρισης ADP

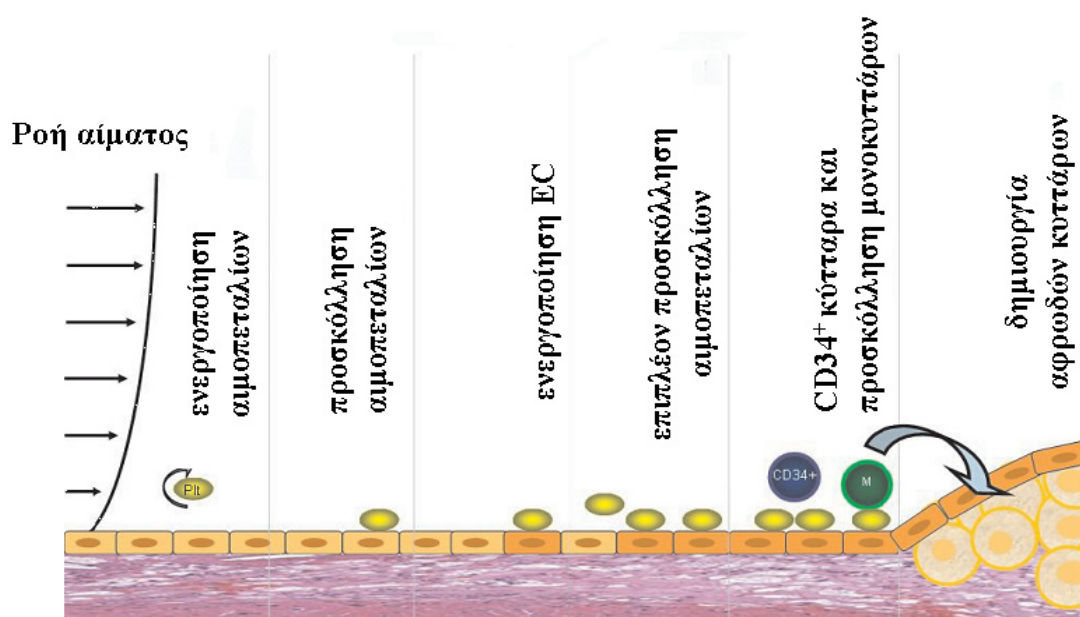
Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα πρόδρομα κύτταρα

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στη φλεγμονή είναι μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλα κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα (EPCs). Τα EPCs είναι μονοπύρρηνα κύτταρα τα οποία εκφράζουν τρία χαρακτηριστικά μόρια προσκόλλησης: το CD133, το CD34 και το KDR (VEGFR-2) και μπορούν να ανιχνευθούν στο περιφερικό αίμα. Τα EPCs έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας περισσότερο από οποιαδήποτε άλλα προγονικά κύτταρα, εξαιτίας της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλοντας στην αναγέννηση και την αγγειογένεση [334]. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα EPCs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και την αθηρογένεση και συμμετέχουν στους μηχανισμούς αποκατάστασης της αγγειακής βλάβης [333]. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα EPCs στρατολογούνται σε περιοχές όπου το ενδοθήλιο έχει τραυματιστεί δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Έχει δειχθεί ότι τα κυκλοφορούντα EPCs προσκολλώνται στα αιμοπετάλια τα οποία λειτουργούν ως γέφυρα για τη μεταφορά τους στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των EPCs προκαλώντας έτσι είτε επανενδοθηλιοποίηση και αποκατάσταση της βλάβης του ενδοθηλίου είτε τη μετατροπή αυτών σε αφρώδη κύτταρα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα αιμοπετάλια επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των EPCs παραμένουν μέχρι σήμερα αδιευκρίνιστοι. Πράγματι, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια διαμεσολαβούν στην στρατολόγηση των EPCs σε περιοχές βλάβης του ενδοθηλίου και είναι πιθανόν να οδηγούν στην επαναγένεση των ενδοθηλιακών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος. Αναλυτικότερα, ένα πλήθος από καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία οδηγούνται στην απόπτωση. Τα αποπτωτικά ενδοθηλιακά κύτταρα (EC) απελευθερώνονται στην περιφερική κυκλοφορία, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αποκάλυψη του υπενδοθηλιακού χώρου και της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) η οποία αποτελείται κυρίως από το κολλαγόνο [335]. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν μια ποικιλία από υποδοχείς που τους επιτρέπουν την προσκόλλησή τους στην ECM, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα του κολλαγόνου, GPVI [336]. Μετά την προσκόλλησή τους, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και εκφράζουν μια πληθώρα από προσκολλητικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους, όπως την P-σελεκτίνη, τον SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) και την

ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, οι οποίοι διευκολύνουν την στρατολόγηση των EPCs στην περιοχή της αγγειακής βλάβης [337-340]. Τα EPCs δεν προσκολλούνται άμεσα στον υπενδοθηλιακό χώρο, αφού δεν εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς για το κολλαγόνο, τη φιβρονεκτίνη, το ινωδογόνο και τη βιτρονεκτίνη (π.χ. τον GPIb-V-IX ή τον GPVI). Στον ανθρώπινο οργανισμό η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα EPCs, οδηγεί σε μειωμένο αριθμό αποπτωτικών EPCs, άρα τα αιμοπετάλια συμβάλουν στην επιβίωση των EPCs [338]. Αποτέλεσμα αυτών είναι η διαφοροποίηση των EPCs σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (*Εικόνα 4.5*) [337, 338]. Παρόλα αυτά κάτω από παθοφυσιολογικές καταστάσεις, είναι δυνατόν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να επάγουν τη διαφοροποίηση των κυκλοφορούντων EPCs σε μακροφάγα. Αναλυτικότερα, κατόπιν ενεργοποίησης, τα αιμοπετάλια αρχικά κυλούν και μετά προσκολλώνται σταθερά πάνω στα άνω στα EC. Ακολουθεί η έκκριση προφλεγμονωδών μορίων όπως του CD40L και της IL-1 β που ενεργοποιεί τα EC. Η ενεργοποίηση των EC, προκαλεί την περαιτέρω προσκόλληση, έκκριση και έκφραση στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων προσκολλητικών μορίων και τελικά την στρατολόγηση μονοκυττάρων και EPCs. Η ενδοκύττωση των αιμοπεταλίων από τα μονοκύτταρα και τα EPCs, οδηγεί τα τελευταία στη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα σε αρχική φάση και σε αφρώδη κύτταρα μετά, οδηγώντας στην ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας (*Εικόνα 4.6*) [335, 337]. Η πλήρης κατανόηση των παραπάνω μηχανισμών θα δημιουργήσει τη βάση για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων για ασθενείς που εμφανίζουν υψηλό βαθμό κινδύνου για αθηροσκληρωτικές νόσους.



Εικόνα 4.5: Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα EPCs στην επαναγένεση των ενδοθηλιακών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος [335].



Εικόνα 4.6: Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα EPCs στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων [335].

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τις λοιμώξεις

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι διάφορες βακτηριακές ή ιογενείς λοιμώξεις μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [341]. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, οι λοιμώξεις αυξάνουν τον κίνδυνο για οξεία στεφανιαία επεισόδια, και αποτελούν φλεγμονώδη ερεθίσματα τα οποία πυροδοτούν την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους οι λοιμώξεις συμβάλουν στην αθηρογένεση είναι διαμέσου της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στην περιοχή της βλάβης. Οι αλληλεπιδράσεις των βακτηριακών παθογόνων και των αιμοπεταλίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κλινικές καταστάσεις, όπως την ενδοκαρδίτιδα και την καρδιαγγειακή νόσο, οι οποίες είναι και οι πιο καλά μελετημένες [342, 343]. Τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με Gram (+) ή Gram (-) βακτήρια και με σπειροχαίτες, συσσωρεύονται μέσω διαφόρων ανοσοστοιχείων και πρωτεϊνών του πλάσματος και μπορούν και αναγνωρίζουν παθογόνα μέσω των TLRs [344, 345]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις έχουν ένα κοινό μηχανισμό: τα βακτήρια στοχεύουν στη φιβρονεκτίνη, το κολλαγόνο ή το ινωδογόνο μέσω πρωτεϊνών, που βρίσκονται προσδεμένες στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, όπως είναι οι (FnBPs) (fibronectin-binding proteins, πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την φιβρονεκτίνη) [346], θρομβωτικών παραγόντων [347], η PAAP (platelet aggregation-associated protein, πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την αιμοπεταλιακή συσσώρευση) [348], που δημιουργούν μία γέφυρα με τον αιμοπεταλιακό υποδοχέα GPIIb/IIIa ή τον GPIb. Αυτή η αλληλεπίδραση δεν οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και απαιτεί ένα αντίσωμα κατάλληλο για την πρόσδεση των βακτηρίων, τον αιμοπεταλιακό υποδοχέα των ανοσοσφαιρινών G (IgG), FC γ RIIA [349, 350] που επάγει την ενεργοποίηση, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη δημιουργία του θρόμβου.

Τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης και εσωτερικεύουν τον HIV-1 (immunodeficiency virus type I, ανοσοανεπάρκεια ιού τύπου I) [351, 352] μέσω του CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2, όμοιος με τη λεκτίνη υποδοχέας 2 τύπου C) και του LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, σχετιζόμενο με τη λειτουργία αντιγόνο-1 των λεμφοκυττάρων) που εκφράζονται στα αιμοπετάλια [353]. Η εσωτερίκευση του HIV-1 από τα αιμοπετάλια αποτελεί ένα μεγάλο κίνδυνο για το ανοσοποιητικό σύστημα, αφού τα αιμοπετάλια παραμένουν μολυσμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα, διευκολύνοντας τη διασπορά του HIV-1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

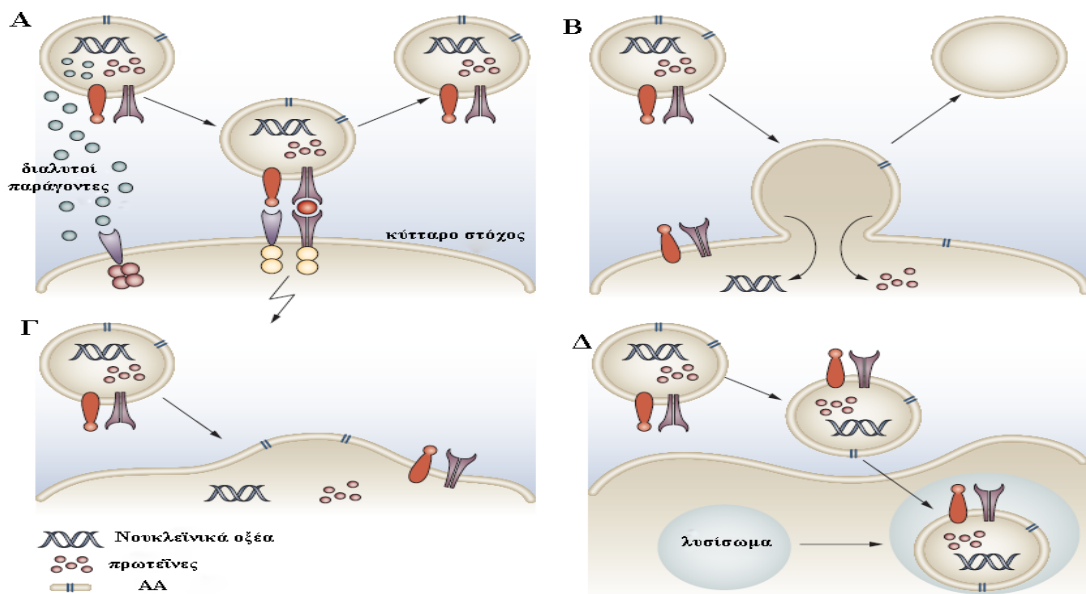
Ο ρόλος των PMPs στην αθηροθρόμβωση

Διαφορές στους λειτουργικούς ρόλους μεταξύ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs

Τόσο τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όσο και τα PMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική αιμοστατική απόκριση στον αγγειακό τραυματισμό αφού επιδεικνύουν δραστηριότητα προθρομβινάσης [354]. Παρόλα αυτά οι διαφορές στους λειτουργούς ρόλους μεταξύ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι τα PMPs που παράγονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι προθρομβωτικά [201, 354, 355]. Τα PMPs σχετίζονται επίσης και με την αυξημένη παραγωγή θρομβίνης [356]. Ακόμη, είναι πιθανόν τα PMPs να συμβάλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και να συμμετέχουν στις αγγειακές βλάβες που παρατηρούνται σε διάφορες φλεγμονώδεις διαταραχές [357, 358]. Σε πρόσφατη μελέτη οι Sinauridze et al. [359] έδειξαν ότι τα PMPs έχουν 50 έως 100 φορές παραπάνω προθρομβωτική δραστηριότητα από ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και μπορούν να μεταφερθούν εύκολα με τη ροή του αίματος μακριά από το αρχικό σημείο της πήξης, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μια επικίνδυνη θρομβωτική κατάσταση. Χρησιμοποιώντας μικροσκοπία συνεστιασμού οι Nomura et al. μελέτησαν τη σχέση ανάμεσα στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, τα λευκοκύτταρα και τα PMPs ως μία προσπάθεια για να ξεκαθαρίσουν τις διαφορές στους λειτουργικούς ρόλους μεταξύ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs. Τα αποτελέσματα τους ήταν σε συμφωνία με αυτά των Sinauridze et al. αφού έδειξαν ότι τα PMPs είναι πιο ευκίνητα από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και η πρόσβασή τους στα λευκοκύτταρα πιο εύκολη από αυτή των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [360].

Ο μηχανισμός δράσης των MPs

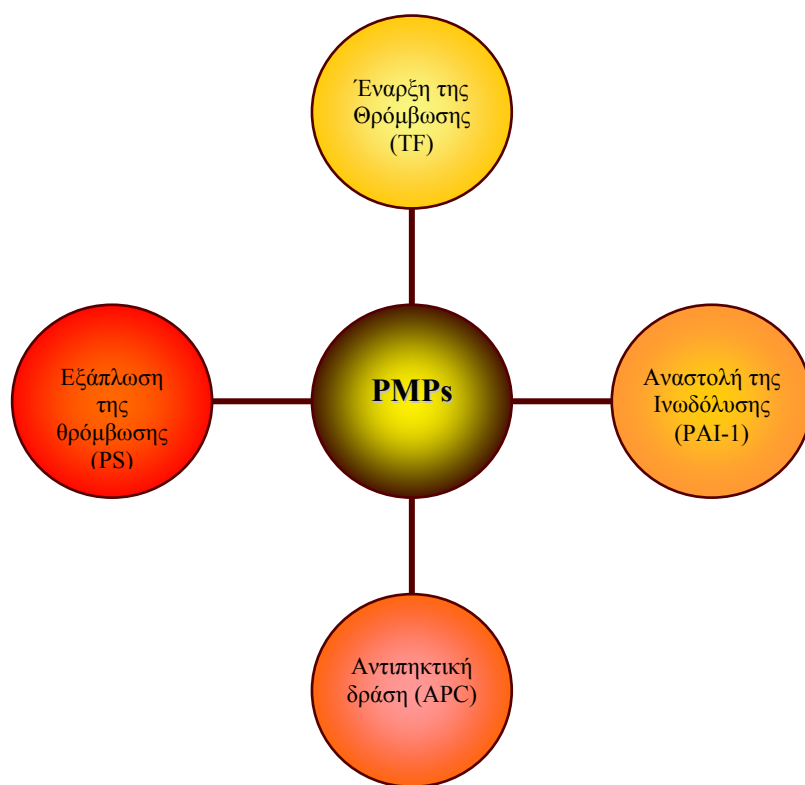
Ο μηχανισμός δράσης των MPs παραμένει αδιευκρίνιστος. Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστό εάν δρουν κατά ένα παρακρινικό τρόπο ή αν είναι απαραίτητη η επαφή τους με τα κύτταρα. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 5.1*, υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους τα MPs αλληλεπιδρούν με κύτταρα στόχους. (Α) Διαλυτοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα MPs μπορούν να προσδεθούν πάνω σε υποδοχείς των κυττάρων και να ενεργοποιήσουν ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Παράγοντες που είναι συνδεδεμένοι πάνω στα MPs μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με κυτταρικούς υποδοχείς και επομένως να μεταφέρουν προφλεγμονώδη ή αντιφλεγμονώδη σήματα. (Β) Τα MPs είναι δυνατόν να έρθουν σε στενή επαφή με τα διάφορα κύτταρα στόχους και να μεταφέρουν με ειδικό τρόπο μεμβρανικά συστατικά τους (π.χ AA), ή κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ή ακόμη και νουκλεϊνικά οξέα (mRNA) τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν τις λειτουργίες του κυττάρου και να οδηγήσουν στη δημιουργία ενός φλεγμονώδους φαινότυπου. (Γ) Σύντηξη των MPs με τα κύτταρα οδηγεί στη μη ειδική μεταφορά μεμβρανικών, κυτοσολικών και νουκλεϊνικών συστατικών και στην αλλαγή της εμφάνισης και των ιδιοτήτων των κυττάρων. (Δ) Τα MPs μπορούν να προσληφθούν από τα κύτταρα στόχους με το μηχανισμό της ενδοκύτωσης και ανάλογα με την περιοχή του κυττάρου που βρίσκονται να διεγείρουν συγκεκριμένες λειτουργίες των κυττάρων [361, 362].



Εικόνα 5.1: Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των MPs με ένα κύτταρο στόχο [361].

Ο ρόλος των PMPs στην πήξη

Τα PMPs συμμετέχουν στον μηχανισμό της πήξης με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους. MPs που εκφράζουν τον TF εκκινούν το μηχανισμό της πήξης. Επίσης, έχουν ένα ρόλο στη στρατολόγηση κυττάρων για το σχηματισμό θρόμβου. Η ύπαρξη ανιοντικών PL στην επιφάνεια των PMPs, κυρίως της PS, τους επιτρέπουν να δεσμεύουν τους παράγοντες πήξης με αποτέλεσμα την εξάπλωση της θρόμβωσης. Επίσης, αναστέλλουν την ινωδόλυση και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μπορούν να παρουσιάσουν και αντιπηκτικές ιδιότητες (Εικόνα 5.2).



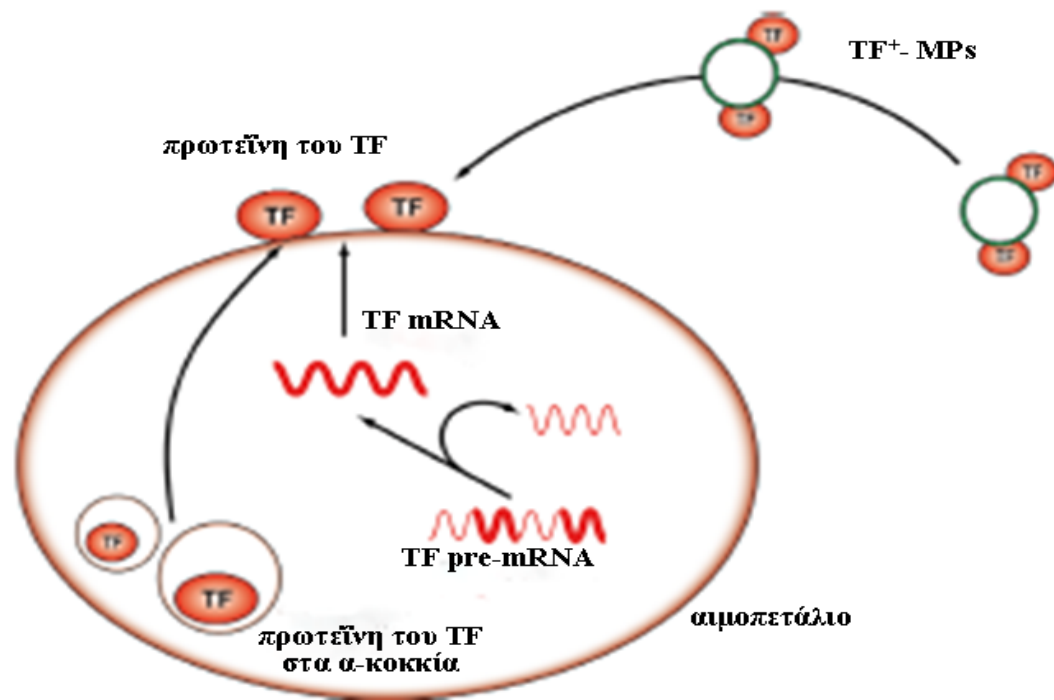
Εικόνα 5.2: Ο ρόλος των PMPs στον μηχανισμό της πήξης.

Οι προθρομβωτικές ιδιότητες των PMPs έγκεινται στην παρουσία της PS που υπάρχει στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης και στην παρουσία του TF [130]. Η έκφραση του TF από τα αγγειακά κύτταρα θεωρείται σημαντικό βήμα στην αρτηριακή θρόμβωση [363]. Πρόσφατα έχει περιγραφεί ο TF της κυκλοφορίας που είναι

γνωστός με τον όρο «ο γεννημένος στο αίμα» ('blood-borne') TF και είναι ουσιαστικά ο TF που είναι συνδεδεμένος με τα κύτταρα του αίματος και τα MPs [364].

Η κυτταρική προέλευση του TF της κυκλοφορίας φαίνεται ότι ποικίλει ανάλογα με το παθολογικό υπόβαθρο. Σε συνθήκες ηρεμίας, η συμβολή των ενδοθηλιακών MPs (EMPs) στον TF της κυκλοφορίας θεωρείται οριακή. Κάτω όμως από καταστάσεις δραστικής ενδοθηλιακής ενεργοποίησης με διάφορες κυτοκίνες ή άλλους μεσολαβητές, η συμβολή τους θεωρείται σημαντική [365-367]. Παρουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS), τα μονοκυτταρικά MPs (MMPs) αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή του TF της κυκλοφορίας [363]. Το αν τα ουδετερόφιλα εκφράζουν TF κατόπιν ενεργοποίησης ή όχι παραμένει αδιευκρίνιστο [368-370]. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα ουδετερόφιλα είναι δυνατό να εκφράσουν TF μετά από φλεγμονώδη διέγερση [371-373]. Εκτός από τη *de novo* σύνθεση του TF είναι πολύ πιθανό τα ουδετερόφιλα να παίρνουν τον TF από MPs που φέρουν τον TF [374]. Παρομοίως, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως εάν τα αιμοπετάλια εκφράζουν τον TF. Ενώ μερικοί ερευνητές δεν έχουν ανιχνεύσει ούτε την πρωτεΐνη του TF ούτε τη συνεπαγόμενη δραστηριότητά του τόσο σε ήρεμα όσο και σε ενεργοποιημένα με ιονοφόρο ή κολλαγόνο αιμοπετάλια [375], άλλοι έχουν περιγράψει λειτουργικό TF στα αιμοπετάλια [375-379]. Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί όσον αφορά την έκφραση του TF στα αιμοπετάλια. Ένας από αυτούς αφορά τη μετατόπιση και την ενεργοποίηση μιας προϋπάρχουσας πρωτεΐνης του TF από τα ενδοκυττάρια διαμερίσματα στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη. Ένας άλλος μηχανισμός προτείνει την πρόσληψη του TF από άλλες πηγές, κυρίως από MPs, ενώ τέλος άλλοι δείχνουν τη *de novo* βιοσύνθεση του TF (Εικόνα 5.3). Οι Muller et al. έχουν βρει TF σε πολλές περιοχές των ήρεμων αιμοπεταλίων: στη μεμβράνη, εντός των α-κοκκίων και στο ανοιχτό πολυκάναλο σύστημα. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με διαφορετικούς αγωνιστές οδηγεί στην έκφραση του TF στη μεμβράνη. Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα ανθρώπινα μεγακαρυοκύτταρα δεν εκφράζουν TF mRNA ούτε την πρωτεΐνη του, είναι πολύ πιθανόν ότι κατά την ανάπτυξη τους τα αιμοπετάλια προσλαμβάνουν TF από άλλα κύτταρα. Πράγματι MPs που φέρουν τον TF και που απελευθερώνονται από τα μονοκύτταρα ή τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, προσλαμβάνονται από τα αιμοπετάλια μέσω αλληλεπίδρασης που εξαρτάται από το CD15 και την Ρ-σελεκτίνη [378, 380]. Επιπλέον, είναι πολύ πιθανό EMPs που φέρουν τον TF να μεταφέρονται και αυτά στα αιμοπετάλια [125, 381]. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν την πιθανότητα για υπαρκτή *de novo* πρωτεϊνική έκφραση του TF στα αιμοπετάλια κατόπιν ενεργοποίησης [376]. Επιπλέον το ADP, ένας

ισχυρός επαγωγέας της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, ενισχύει την δραστηριότητα του TF στα αιμοπετάλια [382]. Οι Scwertz et al. δεν ανίχνευσαν TF mRNA στα ήρεμα αιμοπετάλια, αλλά αποκάλυψαν την παρουσία TF pre-mRNA το οποίο ματίζεται σε TF mRNA κατόπιν ενεργοποίησης με διαφορετικούς αγωνιστές [383], το οποίο οδηγεί σε αυξημένη TF πρωτεϊνική έκφραση και δραστηριότητα.



Εικόνα 5.3: Πιθανοί μηχανισμοί έκφρασης και προέλευσης του TF στα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια είτε εκφράζουν TF de novo μέσω ματίσματος ενός TF pre-mRNA είτε προσλαμβάνουν TF από MPs που προέρχονται από άλλες πηγές όπως τα λευκοκύτταρα. Επίσης, είναι δυνατόν η πρωτεΐνη του TF που είναι αποθηκευμένη στα α-κοκκία να μεταφέρεται στη μεμβράνη και να ενεργοποιείται [368].

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο TF που εκφράζεται στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων είναι ανενεργός, ενώ παρόλο που συνδέεται με τον παράγοντα FVIIa δεν διεγείρει την πήξη του αίματος [363]. Η ενεργοποίηση του TF οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων, των μονοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των MPs διαμέσου της P-σελεκτίνης και του PSGL-1 των λευκοκυττάρων κάτω από υψηλές διατμητικές δυνάμεις και δραστικά μόρια οξυγόνου (ROS) [363, 375]. Επίσης, είναι πιθανόν ο TF να ενεργοποιείται κατά την προσκόλληση και σύντηξη των

MPs στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια [384]. Το αν ο TF είναι συνεχώς ενεργός στην μεμβράνη των MPs ή χρειάζεται να ενεργοποιηθεί για να γίνει διαθέσιμος για τον FVIIa είναι ακόμη υπό διερεύνηση.

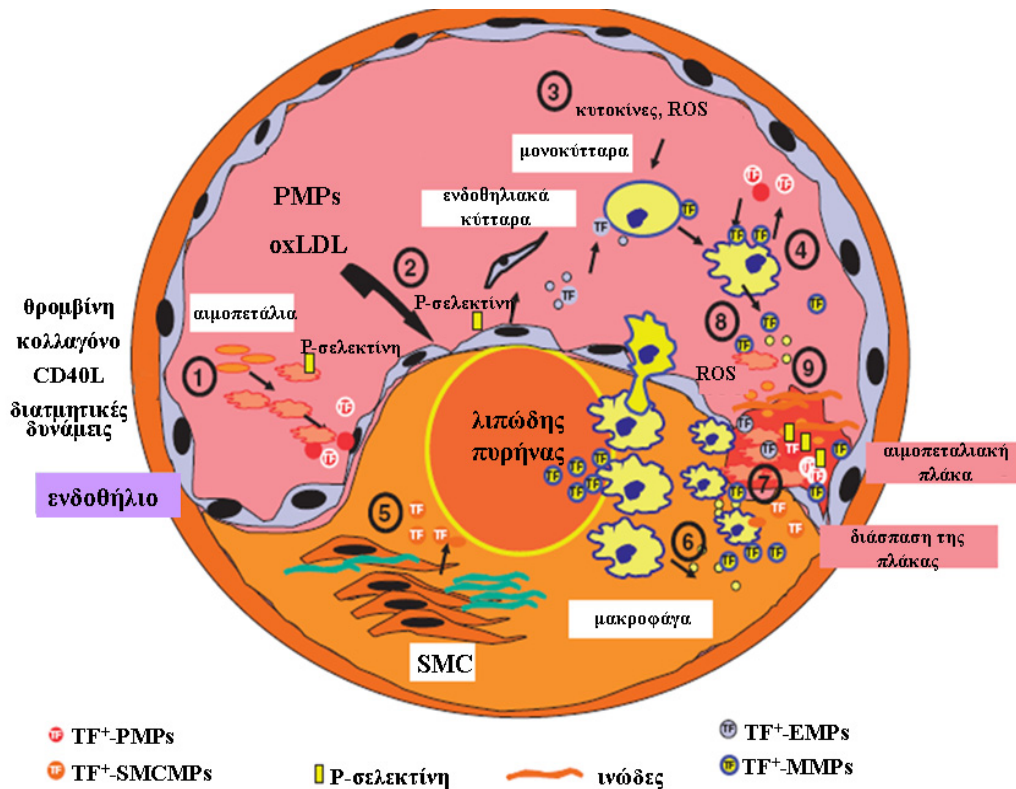
Επειδή η αποτελεσματικότητα του TF να διεγείρει την πήξη σχετίζεται με το φωσφολιπιδιακό περιβάλλον, φαίνεται ότι η αυξημένη έκφραση της PS στην μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και στη μεμβράνη των PMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση του μηχανισμού. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό αυτό φαίνεται ότι διαδραματίζουν και διάφορες μεμβρανικές ή διαλυτές κυτταροκίνες και χημειοκίνες των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs, που δρουν ως συμπαράγοντες στην διαδικασία της πήξης αυξάνοντας την διαθεσιμότητα της PS, προάγοντας τη δραστηριότητα του TF και ενεργοποιώντας άλλα κύτταρα με αποτέλεσμα την παραγωγή των MPs τους. Οι André et al. έδειξαν σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, ότι υψηλές συγκεντρώσεις της διαλυτής P-σελεκτίνης επάγουν την παραγωγή MPs, μερικά από τα οποία φέρουν τον TF και σχετίζονται με έναν προθρομβωτικό φαινότυπο [385]. Επιπλέον, η μεμβρανική P-σελεκτίνη επάγει την έκθεση της PS στα αιμοπετάλια και τη δραστηριότητα του TF στα μονοκύτταρα [386]. Το μεμβρανικό CD40L θεωρείται πολύ σημαντικό στην παθογένεια θρομβωτικών, φλεγμονωδών και αθηροσκληρωτικών διαδικασιών. Ρόλος του είναι η αυξο-ρύθμιση προσκολλητικών μορίων, χημεικινών και του TF στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μονοκύτταρα. Το διαλυτό CD40L που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια θεωρείται ως δείκτης θρομβωτικών ασθενειών [387, 388]. Το CD40L μαζί με την P-σελεκτίνη επάγουν την ενεργότητα του TF των μονοκυττάρων, πιθανώς συμβάλλοντας στην έκφραση του TF mRNA σε συσσωρεύματα μονοκυττάρων-αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων [389]. Η χημειοκίνη RANTES που απελευθερώνεται από τα κοκκία των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, μεταφέρεται με την κύλιση και την προσκόλληση των PMPs στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο μέσω του GPIb και της P-σελεκτίνης και προωθεί τη στρατολόγηση και τη διείσδυση των μονοκυττάρων εντός του αγγειακού τοιχώματος κάτω από υψηλές διατμητικές δυνάμεις [390].

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και των MPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα αγγειακά συμβάματα που σχετίζονται με τη φλεγμονή και τη θρόμβωση. Ένα πρώτο στοιχείο είναι ότι η δημιουργία των συσσωρευμάτων τους αποτελεί έναν επιπλέον μηχανισμό με τον οποίο προωθείται η δραστηριότητα του TF. Τα PMPs διαδραματίζουν ρόλο κλειδί σε τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις. Τα PMPs συσσωρεύονται μέσω γεφυρών

ινωδογόνου και του $\alpha_{IIb}\beta_3$ υποδοχέα με τα αιμοπετάλια και αλληλεπιδρούν με τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα διαμέσου της P-σελεκτίνης και των υποδοχέων των ουδετερόφιλων (PSGL-1, και CD18) [391, 392], ενώ τα ROS που εκκρίνονται από τα ουδετερόφιλα ενισχύουν την δραστηριότητα του TF [375]. Είναι ενδιαφέρον ότι τα PMPs από μόνα τους είναι δυνατόν να παράγουν ROS μέσω της NADPH οξειδάσης [393].

Τα PMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην εξάπλωση της θρόμβωσης. Η μετατόπιση των αρνητικών φωσφολιπιδίων PS και PE στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της θρομβογόνου δράσης των PMPs. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η δυσλειτουργία μιας μετατοπάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά αυτή, οδηγεί στο σύνδρομο του Scott [358, 394]. Η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται από την έλλειψη PMPs στο αίμα. Η υπόθεση ότι τα PMPs παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, ενισχύεται και από τις μελέτες των Castaman et al. [395], οι οποίοι παρουσίασαν ένα περιστατικό που χαρακτηριζόταν τόσο από μειωμένα επίπεδα PMPs όσο και από μειωμένη θρομβογόνο δράση χωρίς όμως να παρατηρείται μεταβολή στην ενεργότητα της θρομβοπλαστίνης. Η έκφραση της PS δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον για την πρόσδεση διάφορων παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί προσδένονται διαμέσου των αρνητικών φορτισμένων φωσφολιπιδίων και της περιοχής-GIa, παρουσία ιόντων Ca^{2+} σχηματίζοντας σύμπλοκα θρομβοπλαστίνης και τενάσης. Τα PMPs εκφράζουν περισσότερες περιοχές δέσμευσης με τους παράγοντες Va, VIIIa, and IXa σε σχέση με την ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων [127]. Κατά συνέπεια, η θρομβωτική δράση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και/ή των PMPs οδηγεί στην παραγωγή της θρομβίνης διάμεσου της θρομβοπλαστίνης και στο σχηματισμό ινώδους, σταθεροποιώντας με αυτό τον τρόπο τον αιμοπεταλιακό θρόμβο.

Πέραν της δημιουργίας του ινώδους, αρκετοί μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχουν τα MPs ή συσσωρεύματα κυττάρων-MPs, είναι δυνατόν να συμβάλουν στη σταθεροποίηση του θρόμβου. (1) Ο υποδοχέας Mac-1, μία $\alpha_m\beta_2$ ιντεγκρίνη στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων ή των MPs που προέρχονται από λευκοκύτταρα έχει δείχθει ότι ενισχύει τη σταθεροποίηση του θρόμβου. (2) Τα EMPs εκθέτουν ασυνήθιστα μεγάλες ποσότητες vWF και προωθούν τη δημιουργία αιμοπεταλιακών συσσωρευμάτων [155]. (3) Η απουσία του PECAM-1, ενός αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ενδοθηλιακή επιφάνεια, από τα PMPs που απελευθερώνονται κάτω από διαμητικές δυνάμεις είναι ακόμη ένα στοιχείο που οδηγεί στη ρύθμιση της δημιουργίας του θρόμβου [396, 397] (Εικόνα 5.4).



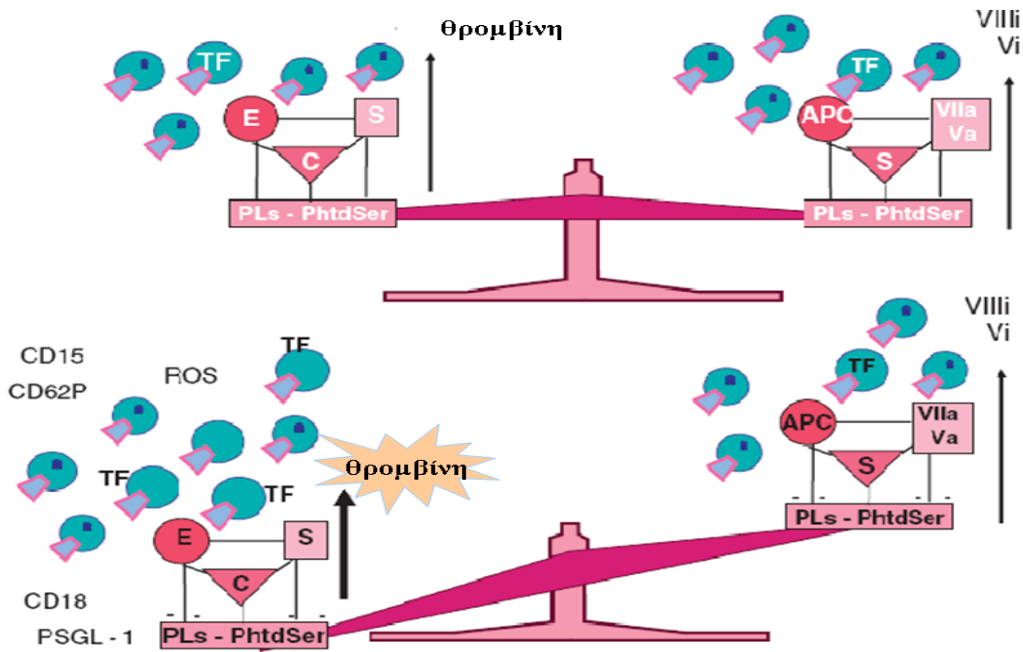
Εικόνα 5.4: Ο ρόλος του TF της κυκλοφορίας στην ανάπτυξη του θρόμβου.

- (1) Στο αγγειακό σύστημα πολλοί παράγοντες όπως οι διατμητικές δυνάμεις, το CD40L, η θρομβίνη, το κολλαγόνο και η καταστροφή του ενδοθηλίου επάγουν την απελευθέρωση PMPs από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.
- (2,3) Τα PMPs, η oxLDL και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τον αγγειακό τραυματισμό προωθούν τη μεμβρανική επαναδιαμόρφωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μονοκυττάρων και την παραγωγή MPs.
- (4) Συμβάματα αλληλεπίδρασης και σύντηξης μεταξύ αγγειακών κυττάρων, κυττάρων του αίματος και MPs, μέσω της P-σελεκτίνης και του PSGL-1, οδηγούν στην έκφραση του TF στα MPs, του λεγόμενου TF της κυκλοφορίας.
- (5,6) Εντός της αθηροσκληρωτικής πλάκας, τα MPs των ενεργοποιημένων λείων μυϊκών κυττάρων (SMC) και των μακροφάγων είναι οι κύριοι φορείς του TF.
- (7) Αυτά τα MPs αποτελούν ένα ρεζερβουάρ υψηλής θρομβογονού δράσης τα οποία εισέρχονται στη ροή του αίματος κατά τη ρήξη της πλάκας.
- (8) TF⁺-MPs που απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα συνδέονται και συντήκονται με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αυξάνοντας την προτεολυτική δραστηριότητα του TF-VIIa συμπλέγματος.
- (9) Ο TF της κυκλοφορίας που μεταφέρεται κυρίως με τα MPs στρατολογείται σε τραυματισμένες περιοχές του ενδοθηλίου, μέσω της P-σελεκτίνης και του PSGL-1, και οδηγεί τη συγκέντρωση του TF πάνω από ένα όριο, επιτρέποντας την έναρξη του μηχανισμού της πήξης [130].

Πέραν του ρόλου τους στην εξάπλωση της θρόμβωσης, τα PMPs είναι πιθανόν να παρεμποδίζουν την ινωδολύση [398], διότι φέρνουν τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) [399]. Είναι γνωστό ότι ο PAI-1 βρίσκεται στα α-κοκκία των μη

ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [400]. Ένα ποσοστό του PAI-1 βρίσκεται συνδεδεμένο με τη βιτρονεκτίνη, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του PAI-1 σε ενεργοποιημένη κατάσταση [401]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στην αποκοκκίωση των ακοκκίων και του περιεχομένου τους, ενώ επιπρόσθετα εκφράζεται και η βιμεντίνη που αποτελεί συστατικό του κυτταροσκελετού. Κατά την εξέλιξη αυτής της διεργασίας ακολουθεί η δέσμευση του PAI-1 με τη βιμεντίνη διαμέσου της βιτρονεκτίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παρουσία του PAI-1 στα PMPs. Με αυτό τον τρόπο τα PMPs ενισχύουν την προθρομβωτική δράση τους.

Τα PMPs εμφανίζουν επίσης αντιπηκτική δράση, αφού τα αμινοφωσφολιπίδια συνδέονται με την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) και αναστέλλουν τον παράγοντα Va *in vitro*. Είναι πιθανόν αυτή η αντιπηκτική δραστηριότητα των PMPs να λειτουργεί ως ένας αρνητικός μηχανισμός ανάδρασης, αποτρέποντας την μη ελεγχόμενη εξάπλωση του μηχανισμού της πήξης. Παρόλα αυτά, δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί ο θρομβωτικός ρόλος των PMPs *in vivo*. Είναι πιθανόν τα PMPs να δεσμεύονται στο πλασμινογόνο με τρόπο ανάλογο της δέσμευσης των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, υπόθεση η οποία δεν έχει μέχρι σήμερα επιβεβαιωθεί με πειραματικά ευρήματα [402]. Επίσης, στην επιφάνεια των PMPs έχει ανιχνευθεί μία πρωτεάση, ο αναστολέας του μονοπατιού του TF (TFPI), ο οποίος συνδέεται με τον FXa, αναστέλλοντας το σύμπλεγμα του TF-FVIIa [130, 368, 403]. Αν και οι αντιπηκτικές ιδιότητες των PMPs είναι σημαντικές στην ισορροπία της αιμοστατικής λειτουργίας, είναι πιθανόν ότι όταν η δραστηριότητα του TF ενισχυθεί στην επιφάνεια των PMPs, η επαγόμενη από τον TF πήξη να επικρατήσει έναντι της αντιπηκτικής τους δραστηριότητας (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5: Τα PMPs στη διατήρηση και τη διατάραξη της αιμοστατικής ισορροπίας. Τα PMPs που κυκλοφορούν σε φυσιολογικά άτομα υποστηρίζουν την πήξη, γεγονός που αντισταθμίζεται από την ικανότητα των PMPs να προάγουν την αντιπηκτική δραστηριότητα μέσω της APC. Αν και οι αντιπηκτικές ιδιότητες των PMPs είναι σημαντικές, είναι πιθανόν ότι όταν η δραστηριότητα του TF ενισχυθεί στην επιφάνεια των MPs, η επαγόμενη από τον TF πήξη να επικρατήσει έναντι της αντιπηκτικής δραστηριότητας. Τα PMPs κινούνται παλινδρομικά στην ανταλλαγή TF μεταξύ λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων. Οι αλληλεπιδράσεις των MPs με κύτταρα ή μεταξύ τους οδηγούν στην ανάπτυξη της δραστηριότητας του TF του οποίου η στρατολόγηση στον αναπτυσσόμενο θρόμβο περιλαμβάνει μια πληθώρα από υποδοχείς (CD15, CD62P, PSGL-1, CD18) και ROS [130].

Ο ρόλος των PMPs στη φλεγμονή

Πέραν του ρόλου τους στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, τα PMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη φλεγμονή. Έχει δειχθεί ότι τα PMPs προκαλούν ένα πλήθος από κυτταρικές αποκρίσεις στο μικροπεριβάλλον όπου παράγονται. Οι Barry et al. έδειξαν ότι τα PMPs ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και επειδή ο αριθμός τους αυξάνει στη φλεγμονή, είναι δυνατόν να διευκολύνουν τις προσκολλητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων [132, 404, 405]. PMPs που παράγονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη ή με ιονοφόρο A23187 παρουσία αναστολέα της COX, αυξάνουν κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την ενδοκυττάρια μετακίνηση των Ca^{2+} στα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα και τη

δημιουργία IP [132]. Επομένως, τα PMPs εκκινούν βιολογικές αποκρίσεις ανεξάρτητα από την δραστηριότητα της COX. Επίσης, μέσω της μεταφοράς του AA επάγουν την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των U-937 κυττάρων επάγοντας τη de novo έκφραση της COX-2 όχι όμως και της COX-1 [132, 406]. Μελέτες με φαρμακευτικούς αναστολείς προτείνουν ότι η επαγόμενη από τα PMPs ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν γίνεται μέσω ενεργοποίησης της θρομβοξάνης, του PAF ή των α -αδρενεργικών υποδοχέων [132]. Η μεταφορά των βιοδραστικών λιπιδίων των PMPs μπορούν να ρυθμίσουν τις πολλαπλές κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται στα πρώτα στάδια της αθηρογένεσης.

Τα PMPs προσκολλώνται στον υπενδοθηλιακό χώρο και τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα διαμέσου του γλυκοπρωτεϊνικού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [407, 408]. Αυτή η προσκόλληση των PMPs στο αγγειακό τοίχωμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση αφού έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στην περιοχή της ενδοθηλιακής βλάβης, διαμέσου ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το ινδογόνο και τον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [401].

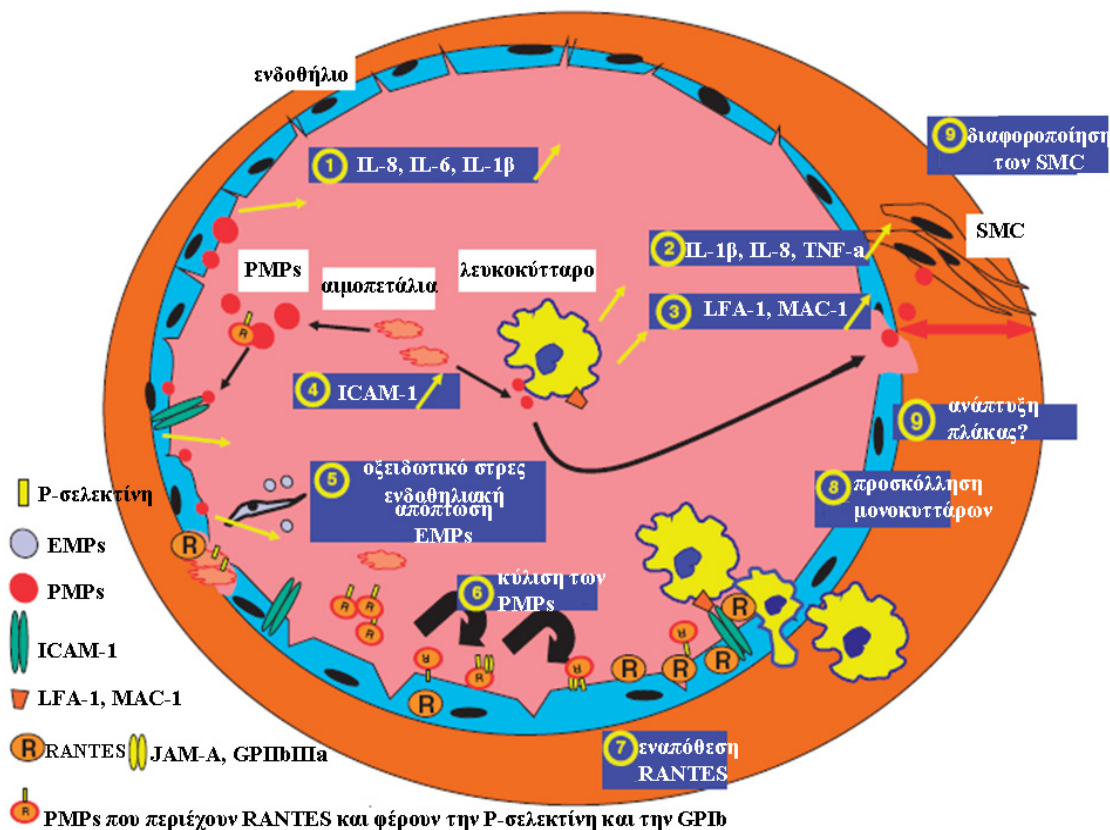
Τα PMPs αυξάνουν την έκφραση του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης-1 (ICAM-1) και του προσκολλητικού μορίου του αγγειακού τοιχώματος-1 (VCAM-1) των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα και την παραγωγή των EMPs. Ακολουθεί η μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον υπενδοθηλιακό χώρο, με αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1, η IL-8 και η IL-6 [357, 405, 409]. Επιπρόσθετα με τα παραπάνω, τα PMPs πιθανώς να παίζουν ρόλο στην αθηρωμάτωση, καθώς προκαλούν τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων [410]. Ακόμη πρόσφατη μελέτη των Baj-Kryworzeka et al. [136] έδειξε ότι τα PMPs εκφράζουν το CD40L στην επιφάνεια τους όταν απομονώνονται από αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου, δίνοντας έτσι μια νέα διάσταση στο ρόλο του CD40L αλλά και των PMPs στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας.

Ο ρόλος της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση είναι σημαντικός, αφού μέσω αυτής διευκολύνεται η στρατολόγηση των λευκοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα [411, 412]. Τα PMPs που εκφράζουν την P-σελεκτίνη οδηγούν στη δημιουργία γεφυρών μεταξύ των PMPs και των λευκοκυττάρων διαμέσου του PSGL-1, με αποτέλεσμα να κατευθύνονται προς την επιφάνεια του

ενδοθηλίου και να εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις [413]. Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων επάγει την μεμβρανική έκφραση του TF και του CD11b όπως και την παραγωγή των MMPs [404]. Επίσης, διαμέσου της P-σελεκτίνης τα PMPs αλληλεπιδρούν με τα ουδετερόφιλα, το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και στην αύξηση της έκφρασης του CD11b [413].

Νεότερα δεδομένα πάνω στον προφλεγμονώδη ρόλο των PMPs, έδειξαν ότι αυτά αποτελούν φορείς της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A_2 (Lp-PLA₂) του πλάσματος [414] και συμβάλουν στην παραγωγή του λυσοφωσφατιδικού οξέος. Η ύπαρξη της Lp-PLA₂ στα PMPs μπορεί να έχει παθοφυσιολογική σημασία σε συνδυασμό με τους υποδοχείς και τα άλλα βιοδραστικά μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των σωματιδίων αυτών αλλά και ως προς το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά λιπίδια όπως ο PAF, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και στην αθηρογένεση. Επιπρόσθετα, ο PAF φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία όπως έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα με οξύ ή χρόνια φλεγμονή [415]. Δηλαδή η δράση του δεν περιορίζεται μόνο στο κύτταρο από το οποίο εκκρίθηκε, ή σε παρακείμενα κύτταρα, αλλά εμφανίζει και συνδετοκρινή δράση. Συνεπώς, η Lp-PLA₂ που συνδέεται στα PMPs μπορεί να ελέγχει την δράση του PAF στην σηματοδότηση που προκαλεί στα κύτταρα στόχους.

Επίσης τα PMPs αλληλεπιδρούν απευθείας με τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εναποθέτοντας τη χημειοκίνη RANTES και αυξάνοντας τη στρατολόγηση των μονοκυττάρων στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο [390] (Εικόνα 5.6). Τέλος, οι Ray et al. [416] έδειξαν ότι τα PMPs είναι φορείς των μεταγραφικών παραγόντων του ενεργοποιημένου υποδοχέα του πολλαπλασιαστή του υπεροξεισώματος γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) και του υποδοχέα του ρετινοειδούς X (RXR) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο σε μεταγραφικές λειτουργίες αλλά και στο μεταβολισμό των λιπιδίων, το διαβήτη και τη φλεγμονή. Επιπλέον, έδειξαν ότι τα PMPs μεταφέρουν τις πρωτεΐνες των PPAR γ /RXR στην μονοκυτταρική σειρά THP-1 όπου επιδεικνύουν και βιολογική δραστηριότητα. Αυτή η ανακάλυψη μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό μηχανισμό ενδοκυττάριας ρύθμισης.



Εικόνα 5.6: Η αλληλεπίδραση των PMPs με άλλα κύτταρα και ο ρόλος της στη φλεγμονή. Τα PMPs παράγονται κατόπιν ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και συμμετέχουν σε μια σειρά από φλεγμονώδεις αντιδράσεις:

- (1,2) Αυξάνουν την έκφραση του ICAM-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγουν την απελευθέρωση διαφόρων κυτοκινών (IL-1β, IL-6, IL-8).
- (3) Επάγουν την αυξορύθμιση του MAC-1/LFA-1 των λευκοκυττάρων,
- (4) που είναι ο προσδέτης του ICAM-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- (5) Προωθούν την ενδοθηλιακή απόπτωση μέσω οξειδωτικού στρες, το οποίο οδηγεί στην απελευθέρωση EMPs.
- (6) Κάτω από υψηλές διατμητικές δυνάμεις, τα PMPs αρχικά κυλούν πάνω στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο μέσω της P-σελεκτίνης και/ή της GPIb και μετά προσκολλώνται σταθερά μέσω του JAM-A και της GPIIb/IIIa και μεταφέρουν τη χημειοκίνη RANTES.
- (7) Η εναπόθεση του RANTES διεγείρει την προσκόλληση και την διείσδυση των μονοκυττάρων
- (8) στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο.
- (9) Διεγείρουν τη διαφοροποίηση των SMC και τη στρατολόγηση των μακροφάγων το οποίο οδηγεί στην ανάπτυξη της πλάκας [130].

Ο ρόλος των PMPs στην αγγειογένεση

Τα PMPs είναι πιθανόν να προάγουν την αγγειογένεση, μια παθοφυσιολογική κατάσταση που σχετίζεται άμεσα με την αθηροσκλήρωση. Είναι γνωστό ότι στην

επιφάνεια των αιμοπεταλίων βρίσκονται διάφορα βιοδραστικά λιπίδια όπως η φωσφορική σφιγγοσίνη-1 (SPP, sphingosine-1-phosphate). Πράγματι, το SPP είναι προσδέτης για το συζευγμένο με G_i-πρωτεΐνη γονίδιο διαφοροποίησης-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Differentiation Gene-1, EDG-1), γνωστό επίσης και ως SPP₁. Η επαφή του SPP με τα ενδοθηλιακά κύτταρα διάμεσου του SPP₁, οδηγεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τελικά το σχηματισμό ενός αυλού, γεγονός απαραίτητο για την αγγειογένεση. Επιπρόσθετα, το EDG-1 οδηγεί στην ωρίμανση του αγγειακού τοιχώματος, η οποία επιτυγχάνεται διάμεσου της αλληλεπίδρασης των λείων μυϊκών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι Kim et al. έδειξαν ότι η απομάκρυνση των βιοδραστικών λιπιδίων με ενεργό άνθρακα, μειώνει σημαντικά την δυνατότητα των PMPs να προκαλέσουν αγγειογένεση. Παράλληλα η κατεργασία των PMPs υπό θερμότητα ώστε να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες δεν επηρέασε την διαδικασία της αγγειογένεσης, γεγονός που αποδεικνύει ότι αυτή δεν οφείλεται στην παρουσία αγγειογενετικών πρωτεϊνών, όπως είναι ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF). Έτσι φαίνεται ότι τα PMPs μπορούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας διάμεσου της συμμετοχής τους στη διαδικασία της αγγειογένεσης [358].

Αθηροσκληρωτική πλάκα και PMPs

Η αθηροσκλήρωση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος του αρτηριακού τοιχώματος, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών, των μονοκυττάρων-μακροφάγων, των λεμφοκυττάρων και άλλων κυττάρων [417]. Όπως συμβαίνει και στη φύση, έτσι και σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής των MPs και της κάθαρσής τους από τα φαγοκύτταρα. Όταν ο αριθμός των MPs στην κυκλοφορία αυξηθεί όπως συμβαίνει σε πολλές ασθένειες π.χ. μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, κάποιος μπορεί να υποθέσει ότι αυτά τα επιπλέον MPs προέρχονται από τις πλάκες που έχουν υποστεί ρήξη [418]. Παρόλο αυτά, αυτό είναι μάλλον απίθανο, αφού τα MPs που προέρχονται από τις πλάκες έχουν διαφορετική κυτταρική προέλευση σε σχέση με αυτά του πλάσματος [419]. Η πλειοψηφία των MPs που υπάρχουν στην αθηροσκληρωτική πλάκα προέρχονται από μακροφάγα,

ερυθροκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και καθόλου αιμοπετάλια, ενώ τα MPs που υπάρχουν στην κυκλοφορία προέρχονται κατά ένα ποσοστό που φτάνει μέχρι το 90% από τα αιμοπετάλια [127]. Επιπλέον, αν και τα MPs που υπάρχουν στις πλάκες βρίσκονται σε αφθονία και εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη προθρομβωτική δραστηριότητα στον λιπώδη πυρήνα σε σχέση με αυτά του πλάσματος, δηλ. τα PMPs, θα έπρεπε ένας πολύ μεγάλος αριθμός αθηρωματικών πλακών (όπως αυτές που βλέπουμε στις καρωτιδικές αρτηρίες) να υποστούν ρήξη ταυτόχρονα για να προσεγγίσουν τα επίπεδα των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [419]. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι τα PMPs εμφανίζουν ασθενή προθρομβωτική δραστηριότητα, το οποίο εξηγεί την απουσία μιας αυθόρμητης πήξης παρά τα υψηλά επίπεδά τους ακόμη και σε υγιείς ανθρώπους. Αυτό διαφέρει με το τι γίνεται όταν η πλάκα υποστεί ρήξη και ένας μεγάλος αριθμός από ιδιαίτερος προθρομβωτικά MPs (προερχόμενα κυρίως από λευκοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα) εκτίθενται στους παράγοντες πήξης στην κυκλοφορία του αίματος [129]. Γι' αυτό το λόγο πιστεύεται ότι τα MPs που βρίσκονται στο πλάσμα πιθανώς να οφείλονται σε τοπική βλάβη είτε αγγειακών είτε άλλων κυττάρων της κυκλοφορίας.

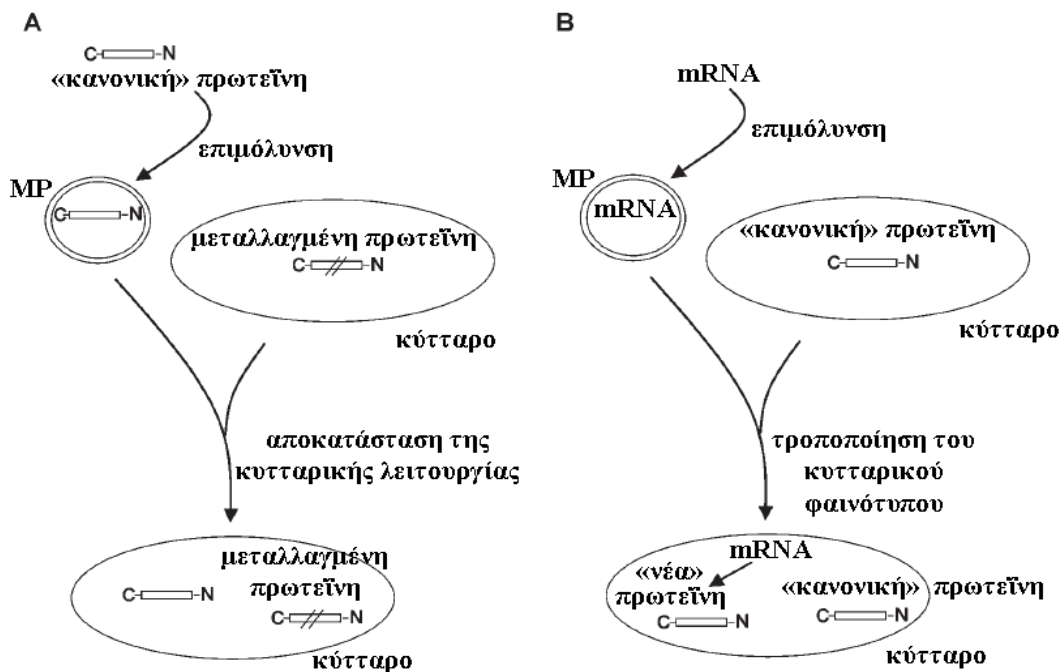
Ο ρόλος των MPs ως πιθανά θεραπευτικά εργαλεία

Μέχρι σήμερα, η ανίχνευση και η μέτρηση των επιπέδων των MPs σε διαφορετικές παθολογίες δεν έχουν συνδεθεί με θεραπευτικές ή διαγνωστικές στρατηγικές για τη ρύθμιση σχετικών ασθενειών. Παρόλα αυτά έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που αφορούν πολλές ασθένειες. Όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, τα MPs εξαιτίας της προπηκτικής τους δραστηριότητας, μπορούν να βελτιώσουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων όταν διαταράσσεται, σε ασθένειες όπως η θρομβοκυτοπενία, αποκαθιστώντας την αιμόσταση [134].

Σύμφωνα με τους Benameur et al [420], η πλέον υποσχόμενη χρήση των MPs ως θεραπευτικά εργαλεία, είναι η ικανότητα να παραχθούν, *in vitro*, γενετικά τροποποιημένα MPs (Εικόνα 5.7). Πράγματι, έχει δειχθεί ότι τέτοιου είδους MPs μπορούν να υπερεκφράσουν πολλές πρωτεΐνες αναγκάζοντας τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται να τις συνθέσουν. Επιπλέον, τα MPs μπορούν να μεταφέρουν και να ενσωματώσουν mRNA σε κύτταρα στόχους και επομένως να τροποποιήσουν το φαινότυπό τους. Υποστηρίζοντας

την πρώτη προσέγγιση, έχειδειχθεί ότι γενετικά τροποποιημένα MP^{Shh+} επιδεικνύουν προ-αγγειογενετικές ικανότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα εργαλείο σε ασθένειες που σχετίζονται με ελαττωματική αγγειογένεση. Μία παρόμοια προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε κύτταρα στόχους, των οποίων η λειτουργία είναι διαταραγμένη εξαιτίας, π.χ. μιας μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Αν και δεν υπάρχουν μελέτες μέχρι σήμερα που να έχουν ασχοληθεί με αυτή τη πιθανότητα, μελλοντικές έρευνες είναι πολύ πιθανό να δώσουν κάποια αποτελέσματα.

Όσον αφορά την ικανότητα των MPs να μεταφέρουν mRNA, έχειδειχθεί ότι MPs από πνευμονικά κύτταρα περιέχουν mRNA το οποίο μπορούν να μεταφέρουν σε κύτταρα του μυελού των οστών, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο τον φαινότυπό τους [421]. Επίσης, οι Deregibus et al. [422] έδειξαν ότι MPs από ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα είναι ικανά να διεγείρουν προ-αγγειογενετικές δραστηριότητες σε ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της οριζόντιας μεταφοράς του σχετιζόμενου με την PI3-κινάσης/Akt mRNA. Όπως περιγράφηκε παραπάνω η επιμόλυνση των MPs με mRNA και η επακόλουθη μεταφορά του μπορεί να είναι ένας νέος μηχανισμός με τον οποίο ένα «επιθυμητό» βιολογικό μήνυμα μπορεί να μεταφερθεί σε κύτταρα στόχους και να τροποποιηθεί ο φαινότυπός τους.



Εικόνα 5.7: Σχηματική αναπαράσταση της χρήσης των MPs ως πιθανά θεραπευτικά εργαλεία. (A) Τα γενετικά τροποποιημένα MPs είναι δυνατόν να υπερεκφράσουν πολλές «κανονικές» πρωτεΐνες που μπορούν να μεταφερθούν σε κύτταρα στόχους αποκαθιστώντας τη λειτουργία μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. (B) Τα MPs μπορούν να τροποποιήσουν κυτταρικούς φαινότυπους μεταφέροντας mRNA σε κύτταρα στόχους, το οποίο μεταφράζεται σε «νέες» πρωτεΐνες [420].

Μεθοδολογίες

Απομόνωση των πλυμένων αιμοπεταλίων

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Απυράση (EC 3.6.1.5, Sigma)
- PGE₁ (Προσταγλανδίνη E₁, Sigma)
- Απόλυτη Αιθανόλη (Riedel de Haën)
- HEPES (C₁₈H₁₈N₂O₄S, M.B. 238.31 g/mol, Sigma)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- KCl (M.B. 74.56 g/mol, Sigma)
- NaHCO₃ (M.B. 84.01 g/mol, Fluka-Garanite)
- MgCl₂•6H₂O (M.B. 203.31 g/mol, Sigma)
- NaH₂PO₄•H₂O (M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- Γλυκόζη (D (+) C₆H₁₂O₆, MB : 180.16 g/mol, Fluka)
- Ένυδρο Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇•H₂O, MB : 210 g/mol)
- Ένυδρο Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂•2H₂O, MB : 147 g/mol, Sigma)
- Ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂•6H₂O, MB : 203.3 g/mol, Sigma)
- CaCl₂ (M.B. 110.99 g/mol, Merck)
- Οξαλικό αμμώνιο ((NH₄)₂C₂O₄•H₂O, MB : 142.11 g/mol, Mallinckrodt)

Διαλύματα Εργασίας

- *Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD)*. Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα απυράσης*. Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 500 U απυράσης σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 ml φυσιολογικό ορό δίνοντας

διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 100 U/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 500 μl .

- **Διάλυμα προσταγλανδίνης E_1 (PGE_1).** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 50 mg PGE_1 σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 ml αιθανόλης δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 20 μl .
- **Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου 1 % βάρους κατ' όγκο (w/v).** 1 g οξαλικού αμμωνίου διαλυτοποιείται σε 100 ml dH_2O . Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .
- **Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων (pH 6.5) 10X.** Το διάλυμα αυτό περιέχει : 6 % w/v χλωριούχο νάτριο (NaCl), 0.373 % w/v χλωριούχο κάλιο (KCl), 0.9 % w/v γλυκόζη ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 7.56 % w/v ένυδρο κιτρικό οξύ ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.294 % w/v ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) και 0.203 % w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Οι ουσίες διαλύονται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C .

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούμε κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό πριν από αυτήν γίνεται αραιώση του παραπάνω διαλύματος με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.5 με διάλυμα NaOH (αρχικό pH 1.16). Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C .

- **Διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων (pH 7.35) 10X.** Το διάλυμα αυτό περιέχει : 8.18 % w/v χλωριούχο νάτριο (NaCl), 0.22 % w/v χλωριούχο κάλιο (KCl), 1.8 % w/v γλυκόζη ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 0.1 % w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2.38 % w/v HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), και 0.42 % w/v όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3). Οι ουσίες διαλύονται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C .

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούμε κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό πριν από αυτήν γίνεται αραιώση του παραπάνω διαλύματος με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7.35 με διάλυμα NaOH (αρχικό pH 6.98). Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C .

- **Διάλυμα λύσης των κυττάρων.** Το διάλυμα αυτό περιέχει 156 mM NH_4Cl , 97 μM K_2EDTA και 10 mM KHCO_3 σε νερό και συμπληρώνω την ογκομετρική φιάλη μέχρι

τα 50 ml, στην συνεχεία ρυθμίζω το pH του διαλύματος στο 7.4. Κατά τη διάρκεια του πειράματος φυλάσσεται σε πάγο. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται λίγο πριν την χρήση του.

- **Διάλυμα 1 M CaCl₂.** 11.099 g CaCl₂ διαλυτοποιούνται σε 100 ml dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

Εισαγωγή

Τα αιμοπετάλια κατά την πλύση τους χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην ενεργοποιηθούν. Η αναδιασπορά του ιζήματος των αιμοπεταλίων μετά από κάθε πλύση πρέπει να γίνεται γρήγορα ώστε το ίζημα να μη μένει χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας έκπλυσης και πριν την έναρξη των πειραμάτων συσσώρευσης ή απομόνωσης των PMPs μπορούμε να αφήσουμε το τελικό εναιώρημα για 10–15 min προκειμένου να «ηρεμήσουν» τα αιμοπετάλια. Μία ένδειξη της σωστής έκπλυσης είναι, όταν με ελαφριά ανακίνηση του δοκιμαστικού σωλήνα διαπιστώσουμε ένα λευκό συννεφάκι στο τελικό εναιώρημα που αποτελεί ένδειξη της παρουσίας των αιμοπεταλίων.

Στην περίπτωση που θέλουμε να λύσουμε τα ερυθροκύτταρα για να προσδιορίσουμε π.χ. την ενεργότητα της Lp-PLA₂ στα PMPs, μετά την πρώτη πλύση, το ίζημα των αιμοπεταλίων αναδιασπείρεται σε 1 ml από το διάλυμα λύσης και αφήνεται για 15 min στους 4°C.

Η απυράση είναι μία φωσφατάση (adenosine 5' – triphosphatase και adenosine 5' – diphosphatase) η οποία μετατρέπει το απελευθερωμένο από τα αιμοπετάλια ADP σε ανενεργό AMP [423-425]. Η PGE₁ ενεργοποιεί την AC οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων του cAMP και στην αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Πειραματική διαδικασία

Η απομόνωση των πλυμένων αιμοπεταλίων από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με προηγούμενη εργασία μας [426] και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

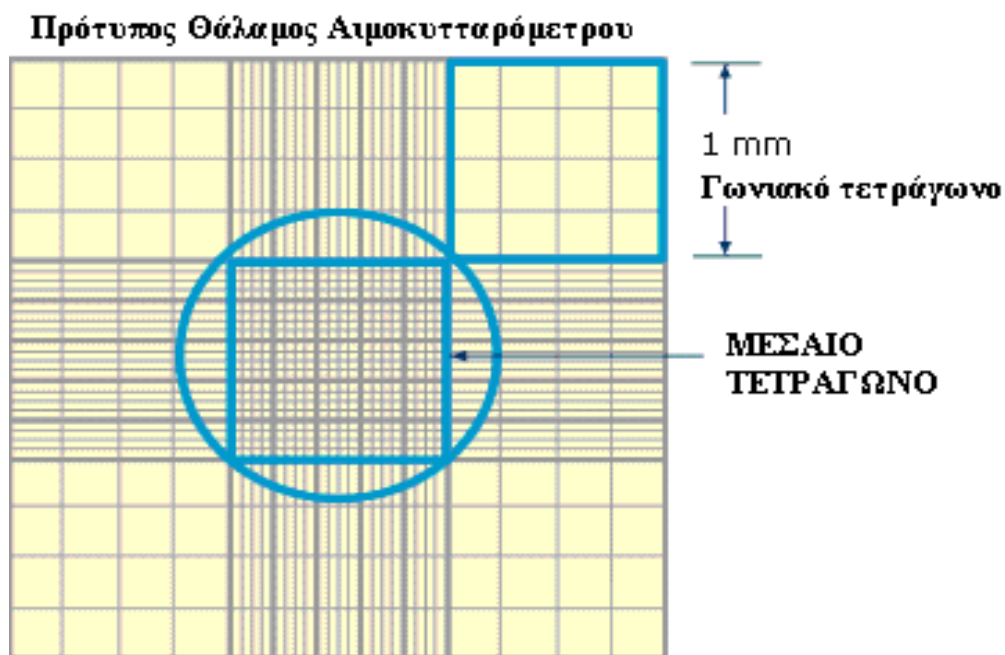
1. Σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v), συλλέγονται 10.8 ml περιφερικού φλεβικού αίματος. Επιπλέον, στο αντιπηκτικό έχουμε προσθέσει απυράση, ώστε η τελική της συγκέντρωση στο δείγμα να ισούται με 1 Unit/ml. Στο ίδιο αντιπηκτικό προσθέτουμε και 1 μl PGE₁.
2. Ζυγοσταθμίζουμε το προς φυγοκέντρωση δείγμα.
3. Φυγοκεντρούμε το δείγμα σε φυγόκεντρο πάγκου στις 900 στροφές το λεπτό (rpm) (126xg) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο PRP σε άλλο σωλήνα πολυπροπυλενίου. Κατά την μεταφορά προσέχουμε να μην γίνει ανάμιξη του PRP με το υποκείμενο στρώμα λευκών ή ερυθρών αιμοσφαιρίων.
5. Μετρούμε τον όγκο του PRP που έχουμε απομονώσει και τον συμπληρώνουμε ως τα 10 ml με διάλυμα έκπλυσης (1X, pH 6.5). Επίσης, προσθέτουμε στο διάλυμα 1.5 μl απυράσης (τελική συγκέντρωση 0.015 U/ml) και 3.5 μl PGE₁ (τελική συγκέντρωση 0.1 μM). Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
6. Ζυγοσταθμίζουμε το προς φυγοκέντρωση σωλήνα.
7. Το φυγοκεντρούμε σε φυγόκεντρο πάγκου στις 2500 στροφές το λεπτό (rpm) (975xg) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ετοιμάζουμε σωληνάκι πολυπροπυλενίου με 10 ml διαλύματος έκπλυσης (1X, pH 6.5) (έχουμε ξεπαγώσει και ρυθμίσει το pH του διαλύματος), στο οποίο έχουμε προσθέσει 1.5 μl απυράσης (τελική συγκέντρωση 0.015 U/ml) και 3.5 μl PGE₁ (τελική συγκέντρωση 0.1 μM). Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
9. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αποχύνουμε απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα.
10. Το ίζημα των αιμοπεταλίων αναδιασπείρεται σε 1 ml από το διάλυμα λύσης των κυττάρων. Αφήνεται για 15 min στους 4°C για να πραγματοποιηθεί η λύση των ερυθροκυττάρων (Το βήμα αυτό προστίθεται μόνο στην περίπτωση που θέλουμε να προσδιορίσουμε την Lp-PLA₂, όπως περιγράφεται στις παρακάτω σελίδες). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 mL με το διάλυμα του βήματος 8. Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
11. Ζυγοσταθμίζουμε το προς φυγοκέντρωση σωλήνα.
12. Το φυγοκεντρούμε σε φυγόκεντρο πάγκου στις 2500 στροφές το λεπτό (rpm) (975xg) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

13. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αποχύνουμε απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα.

14. Αναδιασπείρουμε αμέσως και προσεχτικά το ίζημά μας με το διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων pH 7.35 (έχουμε ξεπαγώσει και ρυθμίσει το pH του διαλύματος). Προσθέτουμε όγκο διαλύματος εναιώρησης περίπου ίσο με το 1/3 του όγκου του PRP του σωλήνα του βήματος 5. Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.

15. Υπολογίζουμε τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο εναιώρημα. Αυτό γίνεται με μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων με την πλάκα Neubauer. Ισχύει:

$$\text{Συγκέντρωση αιμοπεταλίων} = [\text{άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα}/5] \times 1000 \text{ (αιμοπετάλια/}\mu\text{l)}.$$



16. Προσθέτουμε στο διάλυμα εναιώρησης 1X pH 7.35 των αιμοπεταλίων τόσο όγκο, ώστε η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στην κυψελίδα συσσωρευομετρίας να ισούται με 250.000/μl. Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.

17. Λίγο πριν αρχίσουν τα πειράματα συσσωρευομετρίας ή απομόνωσης των PMPs αφήνουμε το τελικό εναιώρημα των αιμοπεταλίων σε ηρεμία για 10 με 15 λεπτά

προσθέτοντας τον απαιτούμενο όγκο διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου, ώστε η τελική συγκέντρωση του να ισούται με 1 mM.

Απομόνωση των PMPs

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Auto densi-flow
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)
- Σουκρόζη (M.B. 342.30 g/mol, Merck)
- EDTANa₂•2H₂O (Titriplex III, M.B. 368.4 g/mol, Sigma)
- Θρομβίνη (CHRONO-LOG)
- Κολλαγόνο (CHRONO-LOG)
- Ιονοφόρο Ca²⁺-A23187 (Sigma)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- NaH₂PO₄•H₂O (M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- Na₂HPO₄•2H₂O (M.B. 177.99 g/mol, Merck)

Διαλύματα Εργασίας

- **Διάλυμα 1.9 mM ιονοφόρο Ca²⁺-A23187.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 1 mg ιονοφόρο Ca²⁺-A23187 σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 1 ml DMSO δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 1.9 mM. Στην συνέχεια το διάλυμα αραιώνεται 1:1 με DMSO δίνοντας ένα διάλυμα με συγκέντρωση 0,9 mM. Τα διαλύματα διατηρούνται στους -80°C σε κλάσματα των 100 μl.
- **Διάλυμα 20 U/ml θρομβίνη.** Η εμπορική συσκευασία περιέχει λυοφιλοποιημένη θρομβίνη από ανθρώπινο πλάσμα το οποίο διαλυτοποιείται σε 2 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 25 μl.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄•H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄•2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml dH₂O και αφού ρυθμιστεί

το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.** 12.8247 g Titriplex III διαλυτοποιούνται σε 90 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 20% σουκρόζη.** 2.0 g σουκρόζης διαλυτοποιούνται σε 10 ml Tampon de resuspension 1X pH 7.35. Παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, υπό την επίδραση διαφόρων αγωνιστών, έχει σαν αποτέλεσμα την διέγερση των κυττάρων με συνέπεια την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και την παραγωγή των PMPs.

Πειραματική διαδικασία

Τα πλυμένα αιμοπετάλια παρασκευαστήκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο **Απομόνωση των πλυμένων αιμοπεταλίων**. Τα PMPs παρασκευάστηκαν όπως έχει είδη περιγραφθεί με μερικές τροποποιήσεις [406, 427]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται παρουσία θρομβίνης σε συγκέντρωση 0.2 U/ml υπό συνεχή ανάδευση ή από το ιονοφόρο Ca²⁺-A23187 σε συγκέντρωση 10 μM χωρίς ανάδευση ή από το συνδυασμό 0.1 U/ml θρομβίνης + 4 μg/ml κολλαγόνο υπό συνεχή ανάδευση για 30 min στους 37°C. Η ποσότητα του DMSO δεν ξεπερνά το 1% (v/v) στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τερματίζεται με τη προσθήκη 0.01% EDTA (w/v) και άμεση τοποθέτηση στους 4°C. Το εναιώρημα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων φυγοκεντρείται στις 2600 στροφές το λεπτό (rpm) (1,000×g) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου για την καθίζηση των υπολειμμάτων των αιμοπεταλίων. Το πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο απομακρύνεται από το ίζημα. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αυτό επιστοιβάζεται σε διάλυμα 20% σουκρόζη και φυγοκεντρείται στις 3500 στροφές το λεπτό (rpm) (2,000×g) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου [428]. Η επιστοιβάση και η φυγοκέντρηση διαχωρίζει τα PMPs από το υπολείμματα των αιμοπεταλίων. Με την

βοήθεια αυτόματης πιπέτας συλλέγεται η πάνω στοιβάδα, (πλούσια σε PMPs), και υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρωση στις 33000 στροφές το λεπτό (rpm) ($100,000\times g$) στους 4°C για 2 h. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα αναδιασπείρεται σε μικρό όγκο διαλύματος PBS 10 mM, pH 7.4 (600 μl). Στην συνέχεια γίνεται η ταυτοποίηση των PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής και προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.

Ανάλυση των PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- KCl (M.B. 74.56 g/mol, Sigma)
- $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M.B. 203.31 g/mol, Sigma)
- HEPES ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, M.B. 238.31 g/mol, Sigma)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- Γλυκόζη (D (+) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, MB : 180.16 g/mol, Fluka)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA, Sigma)
- CD41a-FITC (BD Biosciences)
- CD31-PE (BD Biosciences)
- CD-62P-PE (BD Biosciences)
- CD154-FITC (CD40L) (Pharmingen, Becton Dickinson)
- Annexin-V-FITC (Pharmingen, Becton Dickinson)
- CD36-FITC (Pharmingen, Becton Dickinson)
- PAC-1 (BD Biosciences)
- Σωληνάκια πολυστηρενίου των 5 ml (12×75 mm, Becton Dickinson)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)

Διαλύματα Εργασίας

- **Ροθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS (pH 7.4).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 98.
- **Διάλυμα 130 mM CaCl_2 –1 M $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.** 2.88 g CaCl_2 και 40.6 g $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ διαλυτοποιούνται σε 200 mL d H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .

- **Διάλυμα 20 mM HEPES.** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂•6H₂O, 20 mM HEPES, 3.3 mM NaH₂PO₄•H₂O, 5.6 mM D(+)-γλυκόζης, και 0.1% αλβουμίνης διαλυτοποιούνται σε 90 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- **Διάλυμα 20 mM HEPES + 2 mM CaCl₂ (Binding Buffer).** Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παραπάνω. Επιπλέον περιέχει μια ποσότητα από το διάλυμα 1M CaCl₂ τέτοια ώστε η τελική συγκέντρωση του CaCl₂ να είναι 2 mM.

Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λ.π.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει ακτίνα laser. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και μικρά δείγματα, ταυτόχρονα πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Οι κυτταρομετρητές ροής λειτουργούν με ακτίνα φωτός από πηγή laser, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Η σκεδαζόμενη από κάθε κύτταρο ακτινοβολία συλλέγεται από κατάλληλους ανιχνευτές και αξιολογείται μέσω λογισμικού, προσφέροντας πληροφορίες για το σχετικό μέγεθος, την κοκκίωση, την πολυπλοκότητα δομής, την παρουσία επιφανειακών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων, το περιεχόμενο DNA και την ένταση φθορισμού ταυτόχρονα. Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται και εκπέμπουν σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (FITC= 530nm/30, PE= 585nm/42, και PerCP= 650 nm). Στη συνέχεια ένα-ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διαταταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδους) μετρούν την ένταση του σκεδαζομένου φωτός που προκύπτει από

τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απ' ευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές σχρότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/sec). Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής έχει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών όπως στην κλινική και μοριακή βιολογία, στην ανοσολογία, στη φυτολογία, στη θαλάσσια βιολογία. Στην ιατρική οι εφαρμογές της τεχνολογίας είναι πολλές και συνεχίζουν να προστίθενται νέες τόσο στο πεδίο της κλινικής πράξης όσο και στην βασική έρευνα [429, 430].

Χρησιμοποιούμε αντισώματα όπως το anti-CD41a-FITC (αναγνωρίζει την α_{IIb} υπομονάδα του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$), το anti-CD62P-PE (αναγνωρίζει την έκφραση της P-σελεκτίνη), το anti-CD154-FITC (αναγνωρίζει την έκφραση του CD40L), το anti-CD31-PE (αναγνωρίζει την έκφραση του PECAM-1), το PAC-1-FITC (αναγνωρίζει τον ενεργοποιημένο υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$), το CD36-FITC (αναγνωρίζει τον υποδοχέα εκκαθαριστή CD36) αλλά και το CD61-PerCP (που αναγνωρίζει την β_3 υπομονάδα του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$) μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των PMPs μετά από την παραγωγή τους, για των χαρακτηρισμό αυτών. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται η Αννεξίνη-V η οποία αναγνωρίζει τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, δηλαδή η PS που εκφράζονται στην επιφάνεια των PMPs. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται ότι τα μικροσωματίδια που παρασκευάστηκαν προέρχονται από τα αιμοπετάλια, διότι εκφράζουν τόσο αντιγόνα των αιμοπεταλίων όσο και τον χαρακτηριστικό δείκτη των μικροσωματιδίων Αννεξίνη-V [431-433].

Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική πορεία έχει ως εξής: προετοιμάζουμε ειδικά σωληνάκια της Becton Dickinson με 5 μl από τα κατάλληλα αντισώματα (anti-CD61, anti-CD41a Αννεξίνη-V κτλ.). Στην συνέχεια προσθέτουμε 5 μl από τα PMPs και συμπληρώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES μέχρι τα 50 μl. Τα δείγματα επωάζονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά ακολουθεί αραίωση αυτών 1:10 με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES, pH 7.4. Στην περίπτωση της Αννεξίνης-V, το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES περιέχει και 2 mM Ca^{2+} (binding buffer). Η πρόσδεση της Αννεξίνης-V με τα αρνητικά φωσφολιπίδια, όπως τη PS των PMPs, απαιτεί ιόντα Ca^{2+} διότι και η Αννεξίνη-V είναι αρνητικά φορτισμένη, οπότε με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται γέφυρες μεταξύ της Αννεξίνης-V και της PS διαμέσου ιόντων Ca^{2+} . Ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρίας ροής, η απορρόφηση του δείγματος γίνεται με χαμηλή ροή (12 μl ± 3 μl/min) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση από τον υπολογιστή. Η καλύτερη ανάλυση των PMPs γίνεται την επόμενη μέρα μετά από την παραγωγή τους.

Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BSA

Αντιδραστήρια-Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με την χρήση εμπορικής συσκευασίας Kit που περιλαμβάνει τα παρακάτω:

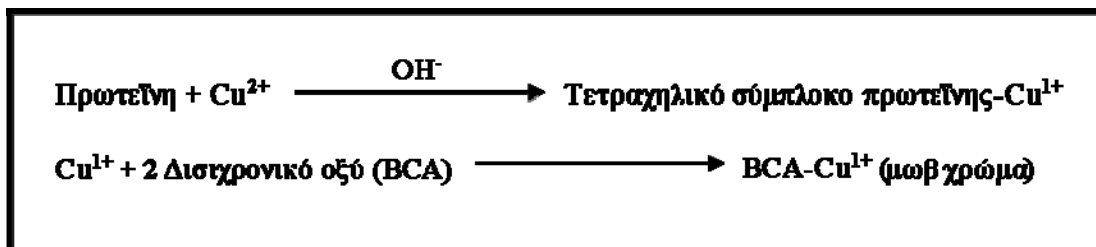
- **Αντιδραστήριο A.** Το αντιδραστήριο A είναι μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0.2N NaOH.
- **Αντιδραστήριο B.** Διάλυμα 4% CuSO_4 .
- Πρότυπο διάλυμα 2 mg/mL BSA σε 0.9% NaCl και 0.05% NaN_3 .
- Πλακίδιο microELISA 96 θέσεων (Starrstedt).
- Πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μL (Costar)
- Μετρητής microELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices)

Διαλύματα Εργασίας

- **Διάλυμα εργασίας.** Το διάλυμα εργασίας προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β σε κατ' όγκο αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Πρότυπα διαλύματα BSA.** Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος BSA 2 mg/mL, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα 0.25-1.5 mg/mL BSA. Τα πρότυπα διαλύματα BSA διατηρούνται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Τα ιόντα Cu^{2+} ανάγονται αρχικά από τις πρωτεΐνες, σε αλκαλικό περιβάλλον, προς ιόντα Cu^+ , κάθε ένα από τα οποία σχηματίζει στη συνέχεια έγχρωμο, υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με 2 μόρια δισιχρονικού οξέος, που απορροφά στα 560 nm [434].



Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο microELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl προτύπων καθώς και 20 μl δείγματος. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα καλύπτεται με αυτοκόλλητη μεμβράνη, ανακινείται ήπια, και επωάζεται στους 37°C για 30 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microELISA όπου φωτομετρείται στα 562 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία:

$Απορρόφηση = a \times συγκέντρωση + b$ (όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής).

Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα mg/ml πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

Απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Optiseal, Beckman)
- Αντιβιοτικό Garamycin (Gentamicin sulfate, Schering-Plough)
- Titriplex III (Merck)
- KBr (Merck)
- Μembrάνη διαπίδυσης (Sigma)
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)
- Σύριγγες (5-10 ml)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 99.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml.** 14.92 g KBr διαλυτοποιούνται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5 μ l/ml 10% EDTA και 1.25 μ l/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml.** 45.99 g KBr διαλυτοποιούνται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210 g/ml.** 159.03 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 mL. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μL/ml 10% EDTA και 1.25 μL/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS + 0.05%EDTA, pH 7.4.** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH σε 7.4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l με dH₂O. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5 ml διαλύματος 10% EDTA. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Μεμβράνη διαπίδυσης.** Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.
- **Το KBr.** Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 24 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- **Αντιβιοτικό Garamycin.** Το διάλυμα περιέχει 40 mg θειικής γενταμυκίνης/ml και υπάρχει σε φιαλίδια των 2 ml.

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκέντρωση βασίζεται στην παρατήρηση ότι διαφορές στο λιπιδιακό περιεχόμενο των λιποπρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα την επιπλευσή τους σε διαφορετικές πυκνότητες [435]. Απομονώνονται οι εξής λιποπρωτεΐνες στις αντίστοιχες πυκνότητες.

Λιποπρωτεΐνες	Πυκνότητα (d=density)
VLDL + IDL	0.096-1,019 g/ml
LDL	1.019-1.063 g/mL
HDL	1.063-1.210 g/mL
Lp(a)	1.060-1.107 g/mL

Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση του πλάσματος

Η συλλογή του αίματος γίνεται σε πλαστικό σωληνάκι το οποίο περιέχει 10% EDTA σε αναλογία 100 μl για κάθε 10 ml αίματος. Το αίμα φυγοκεντρείται στις 3100 rpm (1500 xg) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε φυγόκεντρο πάγκου ώστε να καταβυθιστούν τα κύτταρα του αίματος και το πλάσμα συλλέγεται με πιπέτα.

Απομόνωση των VLDL και IDL

Αρχικά μετριέται με ακρίβεια ο όγκος του πλάσματος σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.0212. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr του στερεού KBr που πρέπει να προστεθούν στο πλάσμα ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.019g/ml. Το πλάσμα στη συνέχεια μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Quickseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10 ώρες, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης οι VLDL και IDL έχουν συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του σωλήνα διαχωρισμένες από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Οι VLDL και IDL συλλέγονται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml). Στη συνέχεια συλλέγεται και το υπόλοιπο του πλάσματος το οποίο περιέχει τις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL καθώς και άλλα συστατικά του πλάσματος.

Απομόνωση της LDL

Μετριέται με ακρίβεια ο όγκος του υπολοίπου του πλάσματος της πρώτης υπερφυγοκέντρωσης σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.060. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr του στερεού KBr που θα πρέπει να προστεθούν στο υπόλοιπο του πλάσματος, ώστε η πυκνότητά του να αυξηθεί από 1.019 σε 1.063g/ml. Το υπόλοιπο του πλάσματος μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal, ο όγκος των οποίων

συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρώνονται στις 40000 rpm, για 10 ώρες, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η LDL η οποία έχει συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml).

Έκπλυση της LDL

Η απομονωμένη LDL υποβάλλεται ακόμα μία φορά σε υπερφυγοκέντρωση ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατό περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Η LDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγόκεντρου Optiseal ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν και σφραγιστούν, τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρώνονται στις 40000 rpm, για 10 ώρες, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η LDL έχει συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του σωλήνα απ' όπου συλλέγεται με σύριγγα (2-2.5 ml).

Διαπίδυση της LDL

Η απομονωμένη LDL μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και στη συνέχεια τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο διαλύματος 10mM PBS pH=7.4 σε σχέση με τον όγκο της. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 5 ώρες το PBS αντικαθίσταται με καινούριο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης η LDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και ακολουθεί μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA.

Απομόνωση της HDL

Μετά την απομόνωση της LDL μετριέται με ακρίβεια ο όγκος του υπολοίπου του πλάσματος σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.2199. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr του στερεού KBr που προστιθέμενα στο υπόλειμμα η

πυκνότητά του αυξάνεται από 1.063 σε 1.210g/ml. Το υπόλοιπο του πλάσματος μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν και σφραγιστούν, τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm, για 10 ώρες, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η HDL έχει συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος και συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml).

Έκπλυση της HDL

Η απομονωμένη HDL υποβάλλεται ακόμα μία φορά σε υπερφυγοκέντρωση ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατό περισσότερο από τα άλλα συστατικά (αλβουμίνη) του πλάσματος. Η HDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10 ώρες, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η HDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα απ' όπου συλλέγεται με σύριγγα (2-2.5 ml).

Διαπίδυση της HDL

Η απομονωμένη HDL μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο διαλύματος 10 mM PBS pH=7.4 σε σχέση με τον όγκο της. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 5 ώρες το PBS αντικαθίσταται με καινούριο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης η HDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και ακολουθεί μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA.

Οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών LDL και HDL με μεταλλικά ιόντα χαλκού

Αντιδραστήρια- Όργανα

- Απομονωμένη LDL και HDL
- CuSO_4 (M.B. 159.61 g/mol, Riedel-deHaën)
- Μembrάνη διαπίδυσης (Sigma)
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)
- Πλακίδιο microELISA 96 θέσεων (Costar, Maxisorp)
- Μετρητής microELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices)

Διαλύματα Εργασίας

- **Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 99.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 98.
- **Διάλυμα 20 mM CuSO_4 .** 0.0319 g CuSO_4 διαλυτοποιούνται σε 100 ml dH_2O δίνοντας διάλυμα 20 mM CuSO_4 . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 0.2 mM CuSO_4 .** 0.1 ml του διαλύματος 20mM CuSO_4 προστίθενται σε 10ml dH_2O δίνοντας διάλυμα 0,2mM CuSO_4 . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Απομονωμένη LDL.** Η LDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C, παρουσία EDTA 0.05%.
- **Απομονωμένη HDL.** Η HDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C, παρουσία EDTA 0.05%.
- **Μembrάνη διαπίδυσης.** Η membrάνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 h και κατακρατά οτιδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL ή της HDL επιτυγχάνεται με την επώασή της, σε κατάλληλες συνθήκες, με ιόντα Cu^{2+} στους 37°C. Η παρακολούθηση της οξείδωσης

γίνεται στα 234 nm, περιοχή όπου απορροφούν τα συζυγή διένια που σχηματίζονται στις λιποπρωτεΐνες κατά την υπεροξείδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων [230].

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία της LDL και της HDL για την οξείδωση

Η LDL και η HDL διατηρούνται στους 4°C παρουσία 0,05% EDTA, οπότε πριν την οξείδωση υφίστανται εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση του EDTA. Οι λιποπρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετούνται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο διαλύματος 10 mM PBS pH 7.4 σε σχέση με τον όγκο τους. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 5 ώρες το PBS αντικαθίσταται με καινούργιο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης η LDL και η HDL συλλέγονται προσεκτικά με σύριγγα και ακολουθεί προσδιορισμός της πρωτεΐνης τους με τη μέθοδο BCA.

Οξείδωση της LDL ή της HDL

Η LDL ή η HDL αραιώνονται στα 100 μg πρωτεΐνης/ml με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 10 mM PBS, pH=7.4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0.2 mM CuSO₄, τέτοιου όγκου ώστε η τελική συγκέντρωση μέσα στο πηγαδάκι να είναι 5 μM. Η LDL ή η HDL τοποθετούνται σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων και στη συνέχεια το πλακίδιο τοποθετείται σε μετρητή *microELISA* στους 37°C για όση ώρα διαρκεί η οξείδωση (3 ή 6 ώρες). Η οξείδωση παρακολουθείται στα 234 nm με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων. Η οξείδωση της LDL γίνεται με τον ίδιο τρόπο και παρουσία των διαφόρων ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις, για τον έλεγχο της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης αυτών.

Τερματισμός της οξείδωσης

Η οξείδωση της LDL ή της HDL σταματά με την προσθήκη, 5 μl/ml λιποπρωτεΐνης διαλύματος 10% EDTA pH 7.0, δίνοντας τελική συγκέντρωση EDTA 0.05%. Η οξειδωμένη LDL ή HDL (oxLDL, oxHDL) είτε χρησιμοποιούνται αμέσως είτε διατηρούνται στους 4°C για διάστημα δύο εβδομάδων.

Προσδιορισμός του βαθμού οξείδωσης της LDL ή της HDL

Ο βαθμός της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL ή της HDL υπολογίζεται με τη μέτρηση της σχετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (REM), με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Sebia -K20
- Τροφοδοτικό
- Εμπορική συσκευασία Kit ηλεκτροφόρησης Hydragel Lipo+Lp(a) (Sebia) που περιλαμβάνει:
 1. 10 πλάκες με πήκτωμα αγαρόζης, έτοιμες για χρήση
 2. Φιαλίδια συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού
 3. Φιαλίδια συμπυκνωμένης χρωστικής 3% Sudan black
 4. Διάλυμα χρώσης
 5. Ειδική μεμβράνη με θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων
 6. Διηθητικά χαρτιά
- Διάλυμα αιθανόλης (45%) σε dH₂O (v/v)

Διαλύματα Εργασίας

- *Φιαλίδια συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού.* Το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου αραιώνεται στα 1000 ml με dH₂O.

- **Διάλυμα χρώσης.** Η παρασκευή του διαλύματος χρώσης γίνεται ως εξής: Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 160 ml απόλυτης αιθανόλης με 2 ml 3% Sudan black. Υπό συνεχή ισχυρή ανάδευση ακολουθεί προσθήκη 140 ml dH₂O.

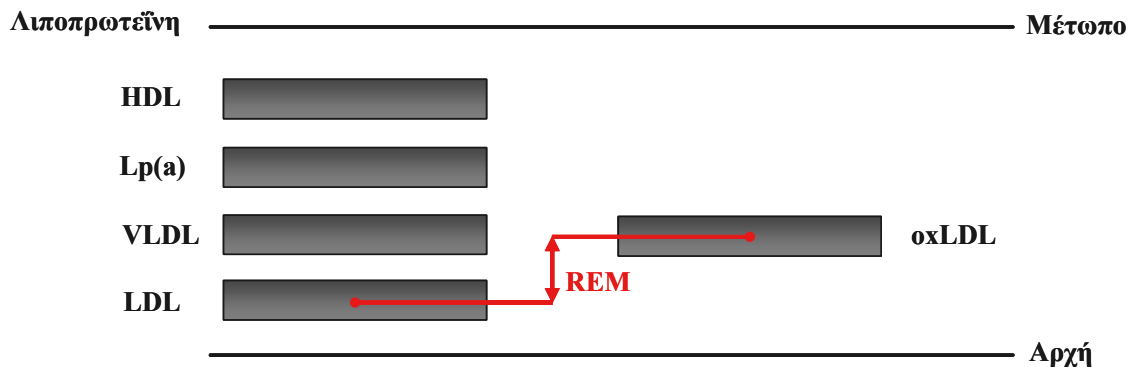
Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι ποιοτική κυρίως μέθοδος διαχωρισμού των λιποπρωτεϊνών με βάση το ηλεκτρικό φορτίο και το μέγεθος τους. Κατά την ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών μεταναστεύουν και οι πρωτεΐνες του πλάσματος όμως η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι μόνο για λιπίδια.

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα με EDTA καθώς και απομονωμένες λιποπρωτεΐνες Lp(a), HDL, έλεγχο της καθαροτητάς τους, αλλά και για την οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών. Η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται στους 4⁰C το πολύ για 3 μέρες.

Η ηλεκτροφόρηση ενός νορμολιπιδαιμικού ατόμου με Lp(a) θα είναι ως εξής (σε αυτό το πήκτωμα φαίνονται όλες οι λιποπρωτεΐνες αλλά και η oxLDL).



Εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης

Η πλάκα με το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε επιφάνεια καθαρισμένη εκ των προτέρων με αιθανόλη (45%). Το πήκτωμα έχει χαραγμένα δύο βέλη τα οποία καθορίζουν την θέση τοποθέτησης της μεμβράνης των δειγμάτων. Η πλάκα με το πήκτωμα αγαρόζης, εφόσον έχει απομακρυνθεί η υγρασία της από την περιοχή φόρτωσης των δειγμάτων με κομμάτι διηθητικού χαρτιού, τοποθετείται στην ειδική συσκευή τοποθέτησης των δειγμάτων. Στην συνέχεια εφαρμόζεται η μεμβράνη τοποθέτησης των δειγμάτων πάνω στο πήκτωμα της αγαρόζης ώστε τα βέλη της μεμβράνης να συμπίπτουν με τα βέλη της επιφάνειας της πηκτής. Κατά την εφαρμογή της μεμβράνης στην αγαρόζη πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα γιατί παρεμποδίζουν την μετανάστευση των δειγμάτων. Έπειτα προστίθενται τα δείγματα στις κατάλληλες θέσεις με αυτόματη πιπέτα χωρίς να τραυματιστεί η αγαρόζη. Τα δείγματα (περίπου 15 με 20 μl) προστίθενται στις κατάλληλες θέσεις του φορέα τοποθέτησης αυτών και αφήνονται για 4-5 λεπτά ώστε να απορροφηθεί η ποσότητα από τις ειδικές εσοχές. Στη συνέχεια τοποθετείται ο φορέας δειγμάτων στην συσκευή που φέρει το πήκτωμα αγαρόζης και βυθίζεται σε αυτό. Αφήνεται για 5-7 λεπτά ώστε να προσροφηθούν τα δείγματα πλήρως από την αγαρόζη και κατόπιν απομακρύνεται ο φορέας από το πήκτωμα. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε κάθε διαμέρισμα της οποίας έχουν τοποθετηθεί 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού, ανεστραμμένο πάνω στη γέφυρα της ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα προς την καθοδική πλευρά. Η συσκευή σκεπάζεται με το καπάκι της, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με το τροφοδοτικό και ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

- Διάρκεια της ηλεκτροφόρησης: 90 min
- Τάση τροφοδοτικού: σταθερή τάση 50V
- Ένταση ρεύματος: 3 mA για κάθε δείγμα

Χρώση των λιποπρωτεϊνών

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα ($\leq 80^{\circ}\text{C}$) για 15 με 20 min. Η πλάκα υπό μορφή πλέον ζελατίνης τοποθετείται στο ειδικό δοχείο χρώσης που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής και αφήνεται για 15 min με παρακολούθηση για την εμφάνιση των ζωνών. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με νερό βρύσης. Στη συνέχεια η ζελατίνη τοποθετείται σε λεκάνη που περιέχει 45% αιθανόλης για 5 min. Η περίσσεια της αιθανόλης στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα.

Έλεγχος της καθαρότητας των απομονωμένων λιποπρωτεϊνών

Μία υπερφυγοκεντρικά απομονωμένη λιποπρωτεΐνη για να θεωρηθεί καθαρή πρέπει να δίνει μία και μόνο ζώνη στην πηκτή της αγαρόζης, με μετατόπιση που είναι χαρακτηριστική για το συγκεκριμένο είδος λιποπρωτεΐνης. Η εμφάνιση και άλλων ζωνών έστω και αχνών σημαίνει ότι το δείγμα έχει προσμίξεις και από άλλες λιποπρωτεΐνες.

Έλεγχος της οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών LDL

Οι τιμές REM (Relative electrophoretic mobility) υπολογίζονται μετρώντας την απόσταση του σημείου φόρτωσης των δειγμάτων από το σημείο στο οποίο μετακινήθηκε το κάθε δείγμα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Ο λόγος αυτής της απόστασης προς την απόσταση που αντιστοιχεί στη μη οξειδωμένη LDL δίνει την τιμή REM κάθε δείγματος.

Μελέτη της πρόσδεσης (Binding) της επισημασμένης με FITC LDL ή HDL στα PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής

Αντιδραστήρια-Όργανα

- CD61-PerCP (BD Biosciences)
- Απομονωμένες LDL και HDL
- FITC, isomer on celite 10% (Calbiochem)
- Σωληνάκια πολυστηρενίου των 5 ml (12×75 mm, Becton Dickinson)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Μικροφυγόκεντρος eppendorf
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)

Διαλύματα εργασίας

- ***Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS (pH 7.4).*** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 98
- ***Διάλυμα 5% Na₂CO₃.*** 5 g Na₂CO₃ διαλυτοποιείται σε 100 mL H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Η επισημάνση των φυσικών ή των οξειδωμένων μορφών της LDL ή της HDL με τη φθορίζουσα ουσία (FITC) μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε την πρόσδεση τους τόσο στα αιμοπετάλια όσο και στα PMPs.

Πειραματική διαδικασία

Επισημάνση των φυσικών ή οξειδωμένων μορφών των λιποπρωτεϊνών με FITC

Η επισημάνση της LDL ή της HDL με FITC έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφουν οι Smythe et al. [436]. Οι απομονωμένες LDL και HDL υποβλήθηκαν σε

διαπίδυση για 24 h στους 4°C στο σκοτάδι έναντι ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10 mM, pH 8.6 (το pH ρυθμίστηκε με 5% Na₂CO₃), με δυο αλλαγές.

Η επισήμανση της LDL ή της HDL γίνεται ως εξής: αρχικά ρυθμίζεται το pH του ρυθμιστικού διαλύματος PBS με διάλυμα 5% Na₂CO₃ στο 8.6 (Ρυθμιστικό PBS-Na₂CO₃). Επίσης προστίθεται ορισμένη ποσότητα celite-FITC στο διάλυμα PBS-Na₂CO₃ υπό ισχυρή ανάδευση. Η συγκέντρωση του celite-FITC δεν πρέπει να ξεπερνά τα 2 mg/ml. Σε erppendorfs που περιέχουν LDL ή HDL (σε τελική συγκέντρωση 1.4 mg/ml αντίστοιχα) προσθέτουμε στάγδην, τέτοια ποσότητα celite-FITC ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 0.2 mg/ml. Τα erppendorfs επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min υπό περιοδική ανάδευση στο σκοτάδι. Ακολουθεί μια φυγοκέντρωση στα 10,000×g (σε μικροφυγόκεντρο erppendorf) για 5 min, και στη συνέχεια το υπερκείμενο υποβάλλεται σε διαπίδυση. Η διαπίδυση γίνεται έναντι 2 l PBS 10 mM, pH 8,6 με δυο αλλαγής για 24 h στους 4°C υπό σκοτάδι. Μετά από την διαπίδυση γίνεται μια φυγοκέντρωση στα 10,000×g (σε μικροφυγόκεντρο erppendorf) για 1 min και φυλάσσεται στους 4°C. Η LDL- ή HDL-FITC χρησιμοποιείται μέσα σε δυο ημέρες μετά από την επισήμανση.

Σε μερικά πειράματα οξειδώσαμε τις επισημασμένες με FITC λιποπρωτεΐνες με CuSO₄ προκειμένου να μελετήσουμε την πρόσδεση των οξειδωμένων μορφών των λιποπρωτεϊνών στα PMPs ή τα αιμοπετάλια. Η LDL- ή η HDL-FITC αραιώνεται στα 300μg πρωτεΐνης/ml με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 10 mM PBS, pH=7.4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0.2 mM CuSO₄, τέτοιου όγκου ώστε η τελική συγκέντρωση μέσα στο πηγαδάκι να είναι 5μM. Η LDL τοποθετείται σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων και στη συνέχεια το πλακίδιο τοποθετείται σε μετρητή *microELISA* στους 37°C για όση ώρα διαρκεί η οξείδωση (3 ή 6 ώρες). Η οξείδωση παρακολουθείται στα 234nm με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων.

Μελέτη της πρόσδεσης

Τα PMPs (100 μg πρωτεΐνης/ml) επωάζονται με LDL ή HDL-FITC ή με τις οξειδωμένες μορφές τους σε διαφορές συγκεντρώσεις (50-400 μg πρωτεΐνης/ml) σε erppendorfs για 1 h στους 37°C. Μεταφέρονται 50 μl σε σωληνάκια της Becton Dickinson,

που περιέχει 5 μl του anti-CD61 και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια ακολουθεί αραίωση 1:10 με PBS 10 mM, pH 7.4 και ανάλυση στο κυτταρόμετρο. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκαν τα πλυμένα αιμοπετάλια, ενώ η πρόσδεση μελετήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Ως αρνητικό δείγμα έλεγχου χρησιμοποιήθηκε το IgG και το ίδιο το FITC των οποίων η πρόσδεση ήταν αμελητέα.

Οξειδωτική τροποποίηση των PMPs

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Απομονωμένα PMPs
- CuSO_4 (M.B. 159.61 g/mol, Riedel-deHaën)
- Μυελούπεροξειδάση (MPO, M.B. 150000, Calbiochem)
- DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid, M.B. 393.35 g/mol, Sigma)
- H_2O_2 (M.B. 34.01 g/mol, Sigma)
- NaOCl (M.B. 74.44 g/mol, Sigma)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M.B. 177.99 g/mol, Merck)
- CH_3COONa (M.B. 82.03 g/mol, Fluka)

Διαλύματα Εργασίας

- **Απομονωμένα PMPs.** Τα PMPs απομονώνονται από τα ενεργοποιημένα με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C υπό άζωτο.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 98.
- **Διάλυμα 20 mM CuSO_4 .** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 110.
- **Διάλυμα 0.2 mM CuSO_4 .** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 110.
- **Διάλυμα 10 mM DTPA.** 0.0393 g DTPA διαλυτοποιούνται σε 10 ml 10 mM PBS pH 7.4. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα της MPO.** 1.4610 g NaCl (100 mM), 1.0254 g (50 mM) διαλυτοποιούνται σε 200 ml dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 6.0, συμπληρώνεται ο όγκος στα 250 ml με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 999 µg/ml MPO.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 100 µg MPO σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 100 µl dH₂O δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 999 µg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα 100 µg/ml MPO.** 0.20 ml του διαλύματος 999 µg/ml MPO αραιώνονται μέχρι τα 200 ml με το ρυθμιστικό διάλυμα της MPO δίνοντας διάλυμα 100 µg/ml MPO. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα 10 µg/ml MPO.** 0.20 ml του διαλύματος 100 µg/ml MPO αραιώνονται μέχρι τα 200 ml με το ρυθμιστικό διάλυμα της MPO δίνοντας διάλυμα 10 µg/ml MPO. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα 50 mM NaH₂PO₄•H₂O.** 6.8995 g NaH₂PO₄•H₂O διαλυτοποιούνται σε 1000 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 50 mM Na₂HPO₄•2H₂O.** 8.8995 g Na₂HPO₄•2H₂O διαλυτοποιούνται σε 1000 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM PBS, pH 7.4.** 19 ml του διαλύματος 50 mM NaH₂PO₄•H₂O αναμιγνύονται με 81 ml του διαλύματος 50 mM Na₂HPO₄•2H₂O και αραιώνονται μέχρι τα 200 ml με dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4, και κατόπιν διαλυτοποιούμε σε αυτό 1.7532 g NaCl (150 mM). Το διάλυμα διατηρείται στους σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 1 M H₂O₂.** 2 µl του διαλύματος 30% H₂O₂ αραιώνονται μέχρι τα 20 µl με 10 mM PBS pH 7.4. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C στο σκοτάδι.
- **Διάλυμα 1 mM H₂O₂.** 2 µl του διαλύματος 1M H₂O₂ αραιώνονται μέχρι τα 2 ml με 10 mM PBS pH 7.4 δίνοντας διάλυμα 1 mM H₂O₂. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C στο σκοτάδι.
- **Διάλυμα 3720 mM NaOCl.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει διάλυμα 250 ml 3720 mM NaOCl. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα 80 mM NaOCl.** 215 µl του 3720 mM NaOCl αραιώνονται μέχρι τα 10 ml με 10 mM PBS pH 7.4 δίνοντας διάλυμα 80 mM NaOCl. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα 8 mM NaOCl.** 5 ml του 80 mM NaOCl αραιώνονται μέχρι τα 40 ml με 10 mM PBS pH 7.4 και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στα 50 ml δίνοντας διάλυμα 8 mM NaOCl. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs επιτυγχάνεται με την επώασή τους, είτε με ιόντα Cu^{2+} είτε με το σύστημα της MPO, που προσεγγίζει τις συνθήκες οξείδωσης *in vivo*, στους 37°C αντίστοιχα ή με απευθείας επίδραση σε NaOCl στους 4°C. Ο έλεγχος της οξείδωσης των PMPs πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής, με τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου Lp-PLA₂, με τη μέτρηση των καταλοίπων των λυσινών, με υψηλή ανάλυση χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (HPTLC) καθώς και με ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS-PAGE) 5-19 %.

Πειραματική διαδικασία

- Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs με τον CuSO_4 πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση 100 μg πρωτεΐνης PMPs/ml με 5 μM CuSO_4 για 3h, 6h ή 24h.
- Η οξείδωση με το σύστημα της MPO πραγματοποιήθηκε επίσης στους 37°C με επώαση 100 μg πρωτεΐνης/ml PMPs με 0.5 μg/ml MPO, 50 μM DTPA, 50 mM PBS (pH 7.4) και 50 μM H_2O_2 για 1h ή 3h. Το μίγμα της αντίδρασης προ-επωάστηκε στους 37°C για 10 min πριν την προσθήκη του H_2O_2 . Το DTPA χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μειώσει την background οξείδωση από μεταλλικά ιόντα που τυχόν έχουν επιμλύνει την ανάλυσή μας [437].

- Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs με το αντιδραστήριο του NaOCl πραγματοποιήθηκε στους 4°C με επώαση 100 µg πρωτεΐνης/ml PMPs με 0.2-1.6 mM NaOCl για 1h.

Η οξείδωση πραγματοποιείται σε eppendorfs μέχρι τελικού όγκου 200 µl, αφού πρώτα έχουμε ανοίξει τρύπες στο πώμα των eppendorf για την καλή οξυγόνωση των PMPs.

Τερματισμός της οξείδωσης

Η οξείδωση των PMPs σταματά με την τοποθέτηση των δειγμάτων στους 4°C.

Προσδιορισμός της ενεργότητας της $Lp-PLA_2$

Αντιδραστήρια- Όργανα

- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)
- Μικροφυγόκεντρος για eppendorf
- Υδατόλουτρο 37°C
- Φιαλίδια σπινθηρισμού των 4 ml
- PAF (1-O-δεκαεξάκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)
- Πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF (1-O-δεκαεξέκυλο-2-[³Hακετυλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 0.25 mCi/0.5 mL, 10 Ci/mmol, DuPont New England Nuclear Boston MA)
- Υγρό σπινθηρισμού, Scintillation liquid Optiphase Hisafe 3
- Τριχλωροξεϊκό οξύ (TCA, Merck)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- HEPES (C₁₈H₁₈N₂O₄S, M.B. 238.31 g/mol, Sigma)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- KCl (M.B. 74.56 g/mol, Sigma)
- Titriplex III (Merck)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 20 mM PAF.** 25 mg σκόνης PAF διαλύονται σε 2.387 ml 80% αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .
- **Διάλυμα 20% TCA.** 20 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .
- **Διάλυμα 2.5 mg/ml BSA.** 25mg BSA διαλύονται σε 10 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .
- **Διάλυμα 100 mg/ml BSA.** 1 g BSA διαλυτοποιείται σε 10 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4.** Διαλύονται 1.0009 g Hepes, 8.0063 g NaCl, 0.1939 g KCl και 0.7445 g Titriplex III σε 1 l dH_2O . Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .
- **Διάλυμα 1000 μM [^3H]-PAF (Ενισχυμένο).** Για τη μέτρηση της ενεργότητας Lp-PLA₂ σε δείγματα PMPs αναμιγνύονται, σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου, 50 μl από το διάλυμα 20 mM PAF με 40 μl από το πρότυπο διάλυμα [^3H]-PAF. Εξατμίζεται η αιθανόλη μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου υπό ήπιες συνθήκες και το μίγμα PAF-[^3H]-PAF αναδιασπείρεται σε 1 ml του διαλύματος 2.5 mg/ml BSA. Το μίγμα επώαζεται στους 37°C για 30 min ώστε ο PAF και ο [^3H]-PAF να δεσμευτούν ποσοτικά στην BSA. Μετά το πέρας των 30 λεπτών το διάλυμα αναδεύεται σε κυκλοαναδευτήρα και διατηρείται στους -20°C .

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της Lp-PLA₂ προσδιορίζεται με την μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξικό οξύ (TCA). Η μέτρηση της ενεργότητας της Lp-PLA₂ πραγματοποιείται έμμεσα με την μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [^3H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στο υπερκείμενο κατά την καταβύθιση με TCA του παραγόμενου lyso-PAF καθώς και του [^3H]-PAF που δεν διασπάστηκε, οι οποίοι βρίσκονται δεσμευμένοι σε BSA που μετουσιώνεται και καταβυθίζεται από το TCA [438]. Η β ακτινοβολία που εκπέμπουν

αυτές οι ομάδες μετριέται σε ειδικό μετρητή σπινθηρισμού και τέλος, με τη βοήθεια ειδικών μαθηματικών τύπων οι μετρούμενες κρούσεις μετατρέπονται σε ενζυμική ενεργότητα, η οποία εκφράζεται ως ο αριθμός των pmol του ραδιενεργού PAF που διασπάστηκαν από το ένζυμο στη μονάδα του χρόνου από μια συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία δειγμάτων

Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιούνται 8 μg πρωτεΐνης PMPs ή 8 μg πρωτεΐνης οξειδωμένων PMPs τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 μl.

Παράλληλα ετοιμάζεται και δείγμα ελέγχου (τυφλό) όπου περιέχει 90 μl Hepes pH 7.4. Τα eppendorfs τοποθετούνται σε υδατόλουτρο. Η ενζυμική αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10 μl [³H]-PAF σε δείγμα και τυφλό ενώ ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10 min ακριβώς για τα δείγματα με την LDL και για 1 h ακριβώς για τα δείγματα με την HDL, τα PMPs και κυττάρων. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης, η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη 20 μl διαλύματος 100 mg/ml BSA. Στη συνέχεια τα eppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C (παγόλουτρο) για 15 min τουλάχιστον. Έπειτα προστίθενται 80 μl διαλύματος 20% TCA, τα eppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C για άλλα 30 min τουλάχιστον. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκεντρο eppendorf, σε 10,000 rpm (7,200xg) για 3.5 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. Στην συνέχεια 100 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Η μέτρηση γίνεται για 3 min και τα αποτελέσματα δίνονται σε κρούσεις (counts/min, cpm).

Υπολογισμός ειδικής ενεργότητας (E.E.)

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις που δίνουν τα 10 μl των διαλυμάτων [³H]-PAF 1000 μM για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας (E.E.). Έτσι, π.χ. τα 10 μl [³H]-PAF 100 μM περιέχουν 10 nmol [³H]-PAF, άρα:

$$\mathbf{E.E. (cpm/nmol) = \frac{cpm_{st}}{10}}$$

Υπολογισμός ενζυμικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις των 100 μl του δείγματος (cpm_{δ}) και του δείγματος ελέγχου (cpm_{τ}). Πριν από την μέτρηση υπήρχε συνολικά όγκος 200 μl, ο οποίος δίνει 2 x cpm_{δ} κρούσεις από τις οποίες αφαιρούνται οι κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα ελέγχου (τυφλό) 2 x cpm_{τ} . Άρα, οι καθαρές κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα είναι 2 x (cpm_{δ} - cpm_{τ}). Έτσι η ενεργότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\mathbf{Ενεργότητα PAF-AH = 2 \frac{(cpm_{\delta} - cpm_{\tau}) \times 1000}{E.E. \times \alpha \times \beta}}$$

όπου: cpm_{δ} : είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μl κάθε δείγματος

cpm_{τ} : είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μl τυφλού

$E.E.$: είναι η ειδική ενεργότητα του διαλύματος του [³H]-PAF 100μM

1000: είναι ο συντελεστής για την μετατροπή των μg πρωτεΐνης σε mg, ή των μl διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ενζύμου σε ml

α : είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε λεπτά

β : είναι τα μg πρωτεΐνης ή τα ml των PMPs

Έτσι, η ενεργότητα της PAF-AH εκφράζεται ως nmol του $[^3\text{H}]\text{-PAF}$ που αποικοδομούνται ανά mg πρωτεΐνης ή ανά ml εναιωρήματος ή ανά mg λιποπρωτεϊνικής μάζας, ανά min .

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19%

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, Bio-Rad)
- Συσκευή βαθμίδωσης πυκνοτήτων (Gradient Former)
- Περισταλτική αντλία (Gilson, Minipuls 3)
- Τροφοδοτικό
- Σύριγγα φόρτωσης
- Tris-base (121.14g/mol)
- SDS (288.4g/mol)
- Γλυκίνη (Merck, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$, M.B. 75.07g/mol)
- DTT ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, $154,253\text{ g/mol}$)
- Υπερθειικό αμμώνιο APS (Ammonium Persulfate, 228.2 g/mol)
- TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, $116,24\text{ g/mol}$)
- Σουκρόζη (M.B. $342,3\text{g/mol}$, Merck)
- Αιθανόλη (Merck)
- Μεθανόλη (LAB-SCAN)
- CH_3COOH (17.5M , Riedel-deHaën)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα A (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% δις ακρυλαμίδιο).** 58.4 gr ακρυλαμιδίου και 1.6 gr δις ακρυλαμιδίου διαλύονται σε dH_2O μέχρι τελικού όγκου 200 ml . Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4°C για ένα μήνα. Υπάρχει έτοιμο και στο εμπόριο.
- **Διάλυμα B (ρυθμιστικό διάλυμα διαδρομής pH 8.8 (running)).** 36.34 gr Tris-base και 0.8 gr SDS διαλύονται σε 100 ml dH_2O . Ρυθμίζεται το pH στο 8.8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 200 ml . Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διάλυμα Γ (ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβασης 3%, pH 6.8 (stacking)).** 6.6 gr Tris-base διαλύονται σε 50 ml dH₂O, ρυθμίζεται το pH στο 6.8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml με dH₂O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα δειγμάτων.** 6.61 gr SDS και 0.32 gr Tris-base διαλύονται σε 120 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 200 ml με dH₂O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.** 14.5gr γλυκίνης 1.5gr SDS και 5 gr Tris-base διαλύονται σε 1 l dH₂O. Το pH επιβεβαιώνεται ότι είναι 8.2 χωρίς όμως να ρυθμίζεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα 1 M DTT.** 0.3086gr διαλύονται σε 2 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους – 20°C.
- **Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων.** Σε 2 ml διαλύματος δειγμάτων προστίθενται 20 μl από το διάλυμα 1M DTT, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της DTT να είναι 10 mM. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων.** 50% γλυκόζη σε dH₂O και προσθήκη μικρής ποσότητας μπλε βρωμοφαινόλης.
- **Διάλυμα 10% SDS.** 10 gr SDS διαλύονται σε 100 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 10% APS.** 0,1gr υπερθειικού αμμωνίου διαλύεται σε 1ml dH₂O . Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του
- **Πρότυπα προχρωματισμένα μοριακά βάρη.**

Μυοσίνη	199 kDa
Β-γαλακτοζαμίνη	116 kDa
Αλβουμίνη βοδιού	97 kDa
Αλβουμίνη αυγού	54 kDa
Καρβονική ανυδράση	37 kDa
Αναστολέας της τρυψίνης	29 kDa
Λυσοζύμη	20 kDa
Αποπροτονίνη	7 kDa

BIO-RAD Prestained SDS-PAGE Standards
Broad Range
Catalog 161-0318, Control 310005521

Protein	Calibrated MW (daltons) on Tris-HCl gel	Calibrated MW (daltons) on Bis-Tris gel	Calibrated MW (daltons) on Tris-Acetate gel
Myosin	198,844	195,785	197,603
β-galactosidase	115,700	104,020	110,271
Bovine serum albumin	96,743	59,840	72,274
Ovalbumin	53,541	41,675	44,495
Carbonic anhydrase	37,134	27,855	31,600
Soybean trypsin inhibitor	29,134	21,168	
Lysozyme	19,540	15,223	
Aprotinin	6,905	6,501	

CL1610318 Rev B
Bio-Rad Laboratories • 2000 Alfred Nobel Drive • Hercules, CA 94547

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου, (PAGE), κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS), συνδιάζει την ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος με την υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Η παρουσία του ιοντικού απορρυπαντικού SDS έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων τους ώστε να προκύψουν πολύ ανιονικές αλυσίδες πεπτιδίων λόγω της συμπλοκοποίησης με SDS. Το SDS που ενώνεται με τις πρωτεΐνες δίνει ένα σταθερό λόγο ανιοντικού φορτίου προς μάζα για όλες τις πρωτεΐνες και τις αλυσίδες τους οι οποίες μεταναστεύουν προς την άνοδο με βάση το μοριακό τους βάρος. Η συγκέντρωση του PAGE δρα ως μοριακό κόσκινο και είναι τέτοια ώστε τα μόρια να εισέρχονται πρώτα σε μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης PAGE και μεγάλων πόρων και στη συνέχεια καθώς προχωρούν στην πηκτή η συγκέντρωση του PAGE αυξάνει και μειώνεται το μέγεθος των πόρων. Τα μόρια ανάλογα με το μέγεθός τους παγιδεύονται όταν φτάνουν σε περιοχές πηκτής όπου το μέγεθος των πόρων είναι τέτοιο ώστε δεν μπορούν να εισέλθουν [439].

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία του πηκτώματος διαδρομής (running gel)

Προετοιμασία συσκευής

Χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων 7×10 cm οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά με dH₂O και στη συνέχεια με απόλυτη αιθανόλη. Οι πλάκες τοποθετούνται η μια πάνω στην άλλη και στις 2 πλάγιες άκρες τους τοποθετούνται διαχωριστές πάχους 1.5 mm. Στη βάση στήριξης των πλακών της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται ελάσματα καουτσούκ που εξασφαλίζουν στεγανότητα. Οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη βάση στήριξης και σταθεροποιούνται με σφιγκτήρες. Με τη χρήση αλφαδιού εξασφαλίζεται η ευθύγραμμη τοποθέτησή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων πηκτώματος 5% και 19%

Αντιδραστήρια	5%	19%
Διάλυμα Α	0.63 ml	2.38 ml
Διάλυμα Β	0.93 ml	0.94 ml
dH ₂ O	2.19 ml	0.43 ml
APS	16 μl	16 μl
TEMED	2 μl	2 μl

Το APS και το TEMED προστίθενται λίγο πριν την επιστοίβαση των πυκνοτήτων, αφού και τα δύο δρουν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου. Μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα τοποθετούνται στα διαμερίσματα της συσκευής που θα δημιουργήσει τη βαθμίδωση πυκνοτήτων. Στο διαμέρισμα ανάμειξης των διαλυμάτων τοποθετείται το διάλυμα 19% που είναι και η τελευταία πυκνότητα της βαθμίδωσης. Το διάλυμα 5% διατηρείται στο άλλο διαμέρισμα, από όπου σε μικρές ποσότητες διοχετεύεται αυτόματα στο διαμέρισμα ανάμειξης, ώστε να δημιουργηθούν όλες οι πυκνότητες της βαθμίδωσης. Αρχικά τα δύο διαμερίσματα δεν επικοινωνούν μεταξύ τους και αυτό διασφαλίζεται με την προσθήκη ίχνους χρωστικής, βρωμοφαινόλης μπλέ, στο διάλυμα 19%. Αν δεν υπάρχει στεγανότητα η χρωστική βάφει και το 5%. Η συσκευή που δημιουργεί τη βαθμίδωση πυκνοτήτων συνδέεται με περισταλτική αντλία η οποία μεταφέρει και επιστοιβάζει τα διαλύματα στο χώρο σχηματισμού της πηκτής. Κατά την επιστοίβαση πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα οι οποίες καθιστούν ασυνεχή την πηκτή και παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό. Μόλις ολοκληρωθεί η επιστοίβαση των διαλυμάτων, η επιφάνεια της πηκτής καλύπτεται με νερό, το οποίο τοποθετείται προσεκτικά ώστε να μη διαταραχθεί η επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου. Έτσι η πηκτή δεν έρχεται σε επαφή με τον αέρα και ο πολυμερισμός γίνεται πιο γρήγορα. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε μια περίπου ώρα και το νερό αφαιρείται ποσοτικά με διηθητικό χαρτί. Στον χρόνο αυτό γίνεται η προετοιμασία του 3% διαλύματος επιστοίβασης των δειγμάτων (stacking gel).

Αντιδραστήρια	3% stacking gel
Διάλυμα Α	0.75 ml
Διάλυμα Γ	1.87 ml
dH ₂ O	4.87 ml
Ακολουθεί απαέρωση	
10% SDS	75 μl
APS	50 μl
TEMED	7.5 μl

Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται και επιστοιβάζεται με τη χρήση σύριγγας πάνω από την πηκτή 5-19%. Μεταξύ των γυάλινων πλακών έχει ήδη τοποθετηθεί χτένι πάχους 1.5 mm ώστε μόλις πήξει το stacking gel να έχουν δημιουργηθεί οι θέσεις στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Ο πολυμερισμός του stacking gel ολοκληρώνεται σε διάστημα 30-60 min. Σε αυτό το χρονικό διάστημα ετοιμάζονται τα δείγματα.

Προετοιμασία δειγμάτων

Ποσότητα δείγματος που περιέχει 5 μg πρωτεΐνης PMPs ή oxPMPs τοποθετείται σε κωνικό σωλήνα erpendorf και λυοφιλοποιείται μέχρι ξηρού. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 20 μl από το διάλυμα κατεργασίας των δειγμάτων, και ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά, αφού τρυπηθούν τα καπάκια των erpendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl από το διάλυμα φόρτωσης. Τα δείγματα αναδεύονται και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση. Τα πρότυπα μοριακών βαρών, από τα οποία χρησιμοποιούνται 10 μl δεν υποβάλλονται σε καμία κατεργασία.

Τοποθέτηση δειγμάτων

Αφαιρείται το χτένι από την πηκτική και το σύστημα των πλακών αποσυνδέεται από την βάση στήριξής του και τοποθετείται στην θέση του μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου σταθεροποιείται πάλι με σφιγκτήρες. Το διαμέρισμα της ηλεκτροφόρησης γεμίζει με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης όπως και το εσωτερικό διαμέρισμα μεταξύ των πλακών μέχρι να καλυφθεί η εσωτερική διαχωριστική γέφυρα. Στη συνέχεια στα φρεάτια που έχουν δημιουργηθεί από το χτένι τοποθετούνται τα δείγματα με σύριγγα Hamilton.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 1 h (ο απαραίτητος χρόνος ώστε να εξέλθει η χρωστική από το πήκτωμα) και γίνεται υπό σταθερή τάση 200 V (η ένταση ρεύματος είναι περίου 78 mA ανά πήκτωμα).

Χρώση της πηκτής

Μόλις τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, αποσυνδέονται οι πλάκες από τη θέση στήριξής τους και αφαιρώντας τα μεταξύ τους διαχωριστικά οι πλάκες ανοίγουν. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο και συνεχίζεται η κατεργασία του με χρώση με νιτρικό άργυρο.

Χρώση με νιτρικό άργυρο

Όργανα-Αντιδραστήρια

- Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad): Περιέχει το συμπυκνωμένο διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Enhancer), το αντιδραστήριο της ανάπτυξης (Development Accelerator

Reagent) και τα διαλύματα ανάπτυξης και χρώσης (Silver Complex Solution, Reduction Moderator και Image Development Reagent)

- CH₃COOH (17.5M, Riedel-deHaën)
- HNO₃ (Sigma)
- Σαρωτής ειδώλου (Πρόγραμμα Image Master 1D Prime, Pharmacia)

Διαλύματα εργασίας

Όλα τα διαλύματα τοποθετούνται σε γυαλικά τα οποία έχουν πριν καθαριστεί με νιτρικό οξύ 50%. Επίσης με νιτρικό οξύ έχει καθαριστεί και η λεκάνη που τοποθετείται το πήκτωμα για την χρώση.

- **Διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Solution) (200 ml/πήκτωμα).** Αποτελείται από 100 ml μεθανόλης, 20 ml οξικού οξέος, 20 ml συμπυκνωμένου διαλύματος σταθεροποίησης και 60 ml dH₂O.
- **Διάλυμα επιτάχυνσης ανάπτυξης (Development Accelerator Solution).** 5 g από το αντιδραστήριο της ανάπτυξης (Development Accelerator Reagent) προσθέτονται σιγά σιγά και διαλύονται σε 80 ml dH₂O. Κατόπιν συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml και το διάλυμα διατηρείται μέχρι 3 μήνες στους 4°C. Χρησιμοποιείται πάντα σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης (Staining and Developing) (50 ml/πήκτωμα).** 5 min πριν την χρώση, σε καλά προστατευμένο από το φως γυάλινο ποτήρι των 50 ml, αναμιγνύονται 2.5 ml από το κάθε διάλυμα ανάπτυξης και χρώσης (Silver Complex Solution, Reduction Moderator και Image Development Reagent) με 17.5 ml dH₂O. Μόλις 3 min πριν από την χρώση προσθέτονται 25 ml από διάλυμα επιτάχυνσης ανάπτυξης και αναδεύονται.
- **Διάλυμα οξικού οξέος 5% (Τερματισμού της αντίδρασης).** 10 ml οξικού οξέος αναμιγνύονται με 190 ml dH₂O.

Αρχή της Μεθόδου

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι γρήγορη, υψηλής ευαισθησίας και απλή μέθοδος για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης ή

πολυακρυλαμιδίου μετά από ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα εμφανίζονται μέσα σε 1 h. Είναι 30-50 φορές περισσότερο ευαίσθητη από τη χρώση με Coomassie Blue και μπορεί ανιχνεύει έως και ng πρωτεϊνών και DNA.

Η χρώση με νιτρικό άργυρο γίνεται με την αναγωγή του νιτρικού αργύρου σε μεταλλικό άργυρο από τον πεπτιδικό δεσμό των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την εναπόθεση του σε αυτές.

Πειραματική διαδικασία

Μετά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολουθούνται τα εξής στάδια :

Σταθεροποίηση

Το πήκτωμα τοποθετείται σε λεκάνη παρουσία του διαλύματος σταθεροποίησης για 30 min υπό ανάδευση. Κατόπιν απομακρύνεται το διάλυμα σταθεροποίησης και το πήκτωμα εκπλύνεται δυο φορές με νερό για 40 min (2x20 min).

Χρώση και ανάπτυξη χρώματος

Μετά τις εκπλύσεις προσθέεται το διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης χρώματος υπό ανάδευση. Η επώαση γίνεται έως ότου να εμφανιστούν καλά οι μπάντες των πρωτεϊνών (για τουλάχιστον 20 min).

Τερματισμός της ανάπτυξης χρώματος

Κατόπιν το πήκτωμα τοποθετείται σε 200 ml διαλύματος 5% οξικού οξέος, για τουλάχιστον 15 min, με σκοπό να τερματιστεί η περαιτέρω ανάπτυξη του χρώματος.

Συντήρηση και επεξεργασία του πηκτώματος

Το πήκτωμα τοποθετείται για τουλάχιστον 5 min σε νερό πριν την επεξεργασία του και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με την βοήθεια του προγράμματος Image Master 1D Prime σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, μετά από φωτογραφία του πηκτώματος στον σαρωτή ειδώλου.

Εκχύλιση των λιπιδίων των PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών τους με τη μέθοδο Bligh-Dyer

Αντιδραστηρια-Όργανα

- Γυάλινοι βιδωτοί σωλήνες χωρητικότητας 20 ml
- Εκχύλισμα λιπιδίων των PMPs και των oxPMPs
- Γυάλινοι βιδωτοί σωλήνες χωρητικότητας 10 ml
- Μεθανόλη (M.B.32 g/mol, Merck)
- Χλωροφόρμιο (M.B.119.5 g/mol, Merck)

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων επιτυγχάνεται με τη διαφορετική μετατόπιση κάθε λιπιδίου στην πλάκα TLC ανάλογα με την πολικότητά τους καθώς και την πολικότητα του μίγματος των διαλυτών που χρησιμοποιείται.

Πειραματική διαδικασία

Τα ολικά λιπίδια από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs εκχυλίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Bligh and Dyer [440]. Συγκεκριμένα, 1 ml εναιωρήματος 200 μg πρωτεΐνης

των PMPs ή των oxPMPs μεταφέρεται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα χωρητικότητας 10 ml. Στο σωλήνα προστίθεται τριπλάσιος όγκος μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε αναλογία 1:2 v/v. Ακολουθεί περιοδική ισχυρή ανάδευση σε Vortex για 1 min και στη συνέχεια προστίθεται αρχικά 1 ml CHCl_3 και μετά από ισχυρή ανάδευση προστίθεται 1 ml 0.5% CH_3COOH σε dH_2O οπότε και σχηματίζονται οι δύο φάσεις. Το dH_2O αντικαθίσταται από το υδατικό διάλυμα 0.5% CH_3COOH προκειμένου να ενισχύσουμε την ανάκτηση της PS [441], αφού απουσία της ανακτάται μόνο το ~50% της PS [442]. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε vortex για 1 min και στη συνέχεια ο σωλήνας φυγοκεντρείται στις 3000 rpm (1500xg) για 10 min για να διαχωριστούν καλά οι φάσεις. Η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση) που περιέχει τα φωσφολιπίδια συλλέγεται με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται ποσοτικά σε άλλο γυάλινο σωλήνα. Η υδατική φάση εκπλένεται με 2 ml CHCl_3 , το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε vortex για 1 min και στη συνέχεια ο σωλήνας φυγοκεντρείται στις 3000 rpm (1500xg) για 10 min για να διαχωριστούν καλά οι φάσεις. Συλλέγουμε τη χλωροφορμική φάση και την ενώνουμε με την άλλη χλωροφορμική φάση στο ίδιο σωληνάκι και το χλωροφόρμιο εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού. Κατόπιν, το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 1 ml $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:2 v/v). Το χλωροφορμικό εκχύλισμα περιέχει το σύνολο των λιπιδίων και υποβάλλεται σε υψηλής πίεσης χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Διαχωρισμός των λιπιδίων των PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών τους με υψηλή ανάλυση χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2 , M.B.84.93 g/mol, Sigma)
- Αιθυλικό οξικό οξύ ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, M.B.88.11 g/mol, Sigma)
- Ακετόνη (CH_3COCH_3 , Sigma)
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M.B.119.5 g/mol, Merck)
- Ισοπροπανόλη ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$, Merck)
- Αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Merck)
- Μεθανόλη (CH_3OH , M.B.32 g/mol, Merck)
- Οξικό οξύ (17.5M CH_3COOH , Riedel-deHaën)

- Πρότυπα φωσφολιπιδίων. Χρησιμοποιούνται διαλύματα φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, σφιγγομυελίνη, lyso-PC) (Sigma) σε $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1 v/v)
- Θάλαμος TLC
- Πλάκες HPTLC (Merck)
- Ειδικά ξυστηράκια πλακών TLC (Alltech)
- Σαρωτής ειδώλου (Πρόγραμμα Image Master 1D Prime, Pharmacia)

Πειραματική διαδικασία

Οι εσωτερικές πλευρές του θαλάμου καλύπτονται με διηθητικό χαρτί. Ετοιμάζονται δύο μίγματα διαλυτών: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5:\text{CH}_3\text{COCH}_3$ (80:16:7 v/v) το οποίο αποχύνεται μέσα στο θάλαμο, διαβρέχοντας ταυτόχρονα το διηθητικό χαρτί. Ετοιμάζουμε και το σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5:\text{CH}_3\text{COCH}_3:\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{dH}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (30:6:6:6:16:28:6:2 v/v) [441]. Οι θάλαμοι σκεπάζονται με τα καπάκια τους και αφήνονται να κορεστούν για τουλάχιστον 1h. Η πλάκα TLC χωρίζεται σε παράλληλες κάθετες λωρίδες, το πλάτος των οποίων εξαρτάται από την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε λιπίδια καθώς και από τον αριθμό των δειγμάτων. Στις δύο ακραίες λωρίδες τοποθετούνται οι πρότυπες ουσίες PC, PE, SM και PS. Σε απόσταση 2 cm από την κάτω πλευρά της πλάκας σημειώνεται με μολύβι παράλληλη ευθεία γραμμή, η οποία αποτελεί το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων. Τα δείγματα και τα πρότυπα τοποθετούνται με πιπέτα Pasteur στο κατάλληλο σημείο της πλάκας. Αφού εξατμιστούν οι διαλύτες, η πλάκα τοποθετείται μέσα στον πρώτο θάλαμο, που έχει πλέον κορεστεί με το μίγμα των διαλυτών, αφήνεται να αναπτυχθεί για 1h και στη συνέχεια αφήνεται να στεγνώσει, στρέφεται κατά 90° και φέρεται στον θάλαμο χρωματογραφίας με το δεύτερο σύστημα διαλυτών για 45 λεπτά. Μετά το τέλος της χρωματογραφίας σημειώνεται με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη και η πλάκα στεγνώνεται στον απαγωγό με ρεύμα ζεστού αέρα. Η εμφάνιση της πλάκας γίνεται σε θάλαμο που περιέχει υδατικό διάλυμα το οποίο αποτελείται από 7.5% w/v Cu-acetate, 2.5% w/v CuSO_4 and 8.5% v/v H_3PO_4) [441]. Οι κηλίδες των λιπιδίων και των προτύπων σημειώνονται πάνω στην πλάκα με μολύβι και στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα με θερμό αέρα στον απαγωγό. Ξύνεται προσεκτικά η περιοχή του κάθε λιπιδίου και το πυρίτιο μεταφέρεται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα για τον προσδιορισμό του φωσφόρου.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Επίσης, με τη βοήθεια μετρητή πυκνότητας εικόνων (Image Master ID programme) κατά τη σάρωση των φωσφολιπιδιακών μπαντών των PMPs ή των oxPMPs με 5 μM CuSO_4 στους 37°C προσδιορίστηκαν οι τιμές των λιπιδίων τους. Οι μπάντες που αντιπροσωπεύουν την SM, την PC, την PS και την PE προσδιορίστηκαν ποσοτικά ως ύψος κορυφής.

Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφόρου στα φωσφολιπίδια

Αντιδραστήρια- Όργανα

- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Γυάλινα σκεύη
- Θερμαινόμενη πλάκα με ρυθμιστή θερμοκρασίας
- 72% HClO_4

Διαλύματα εργασίας

- **Πρότυπο διάλυμα φωσφορικών.** 1.7575 mg KH_2PO_4 , το οποίο πριν τη χρήση του ξηραίνεται στους 105°C για 60 min, διαλύονται σε 100 ml dH_2O . Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει ακριβώς 4 μg P/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **0.4% μολυβδαινικό αμμώνιο.** 0.425 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 100 ml dH_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Αντιδραστήριο ANSA.** 4 ml διαλύματος ANSA αναμιγνύονται με 6 ml dH_2O . Το αντιδραστήριο ANSA παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα αμινοναφθολο-σουλφονικού οξέος (ANSA).** 30g NaHSO_3 (ή 28.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) και 6 g Na_2SO_3 διαλύονται σε 250 ml dH_2O . Σε αυτό το διάλυμα θειωδών αλάτων προστίθενται 0.5 g ANSA. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 3h και αν σχηματιστεί ίζημα διηθείται. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα, μετά από καύση με HClO_4 . Στη συνέχεια σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου το οποίο ανάγεται προς κυανό του φωσφομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Ως αναγωγικό χρησιμοποιείται το ANSA. (Φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου των Bartlett, Marinetti) [443, 444].

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός φωσφόρου γίνεται σε φωσφολιπίδια που βρίσκονται πάνω σε πλάκα TLC, μετά το διαχωρισμό τους. Ξύνονται από την πλάκα TLC οι κηλίδες που αντιστοιχούν στα R_f των προτύπων PC, PE, Lyso-PC και σφιγγοσίνης και το πυρίτιο μεταφέρεται ποσοτικά σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Σε κάθε σωλήνα προστίθεται 0.5 ml 72% HClO_4 και τα δείγματα καίγονται σε αμμόλουτρο 170-180°C για 5h. Μετά το τέλος της καύσης τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml dH_2O . Κατά τη διάρκεια της καύσης των δειγμάτων ετοιμάζονται τα πρότυπα δείγματα. Ετοιμάζονται 6 γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες στους οποίους προστίθενται 0.5 ml 72% HClO_4 και στη συνέχεια προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml (0, 1, 2, 3, 4, 5, μg φωσφόρου) από το πρότυπο των φωσφορικών. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1.5 ml με την προσθήκη dH_2O . Από το σημείο αυτό και έπειτα τα δείγματα και τα πρότυπα κατεργάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου και 0.5 ml αντιδραστήριου ANSA. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε Vortex και θέρμανση σε υδρόλουτρο 100°C για 10 min ακριβώς. Μετά την ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, το κυανό του φωσφορομολυβδαινίου που έχει σχηματιστεί φωτομετρείται στα 820 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης

και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φώσφορο.

Προσδιορισμός των καταλοίπων των λυσινών

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Απομονωμένα PMPs
- Βορικό οξύ (M.B. 61.83, Sigma)
- 5% TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, Sigma)
- SDS (Biorad)
- 12N HCl (M.B. 36.46, Sigma)
- Πλακίδιο microELISA 96 θέσεων (Costar, Maxisorp)
- Μετρητής microELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- NaH₂PO₄•H₂O (M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- Na₂HPO₄•2H₂O (M.B. 177.99 g/mol, Merck)

Διαλύματα εργασίας

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS (pH 7.4).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 98
- **Βορικό οξύ 0.2 M, pH 9.5.** 1.236 g διαλυτοποιούνται σε 85 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 9.5 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **0.1% TNBS.** 1 ml του 5% TNBS αραιώνεται μέχρι τα 50 ml με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C στο σκοτάδι.
- **10% SDS.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 126.
- **1N HCl.** 4.16 ml πυκνού (12N) HCl προστίθενται σε 45.84 ml dH₂O σε γυάλινο δοχείο. Πάντα προσθέτουμε το οξύ στο νερό και όχι το αντίθετο. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Απομονωμένα PMPs ή οξειδωμένα PMPs:** Τα PMPs όσο και τα οξειδωμένα PMPs χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 100 µg/ml.

Αρχή της μεθόδου

Το TNBS αντιδρά με τις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων προς σχηματισμό τρινιτροφαινυλικών παραγώγων (TNP) τα οποία ποσοτικοποιούνται με μέτρηση της απορρόφησής τους στα 335 nm.

Πειραματική διαδικασία

Σε eppendorfs προσθέτουμε 0.25 ml 100 µg/ml PMPs ή oxPMPs σε PBS, 0.25 ml 0.2 M βορικού οξέος και 0.25 ml 0.1% TNBS και επωάζουμε για δύο ώρες στους 37°C. Ως τυφλό χρησιμοποιούμε 0.25 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS. Μετά τις δύο ώρες προσθέτουμε 0.25 ml 10% SDS και κατόπιν 0.125 ml 1N HCl. Από το συνολικό μίγμα όγκου (1.125 ml) μεταφέρουμε 200 µl των παραπάνω δειγμάτων και τυφλού σε πλακίδιο microELISA 96 θέσεων. Η πλάκα καλύπτεται με αυτοκόλλητη μεμβράνη, ανακινείται ήπια, και εισάγεται στον μετρητή microELISA όπου φωτομετρείται στα 335 nm σε θερμοκρασία δωματίου.

Υπολογισμοί

1 µmole TNBS ανά ml δίνει ως απορρόφηση στα 335 nm 9.78. Τα µmole των λυσινών προκύπτουν από την εξίσωση:

$$\text{(OD}_{335}\text{) (1.125 ml)/9.87}$$

Έλεγχος της βιολογικής δράσης των PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών τους ή των συμπλεγμάτων των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Θρομβίνη (CHRONO-LOG)
- AA (M.B. 304.5 g/mol, Sigma)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Aggregometer, CHRONO-LOG, model 560)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης
- Απομονωμένα PMPs
- Απομονωμένες λιποπρωτεΐνες LDL, ή HDL
- Οξειδωτικά τροποποιημένα PMPs
- Συμπλέγματα των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες LDL, ή HDL
- Ασπιρίνη (Ακετυλοσαλικυλική λυσίνη, Egicalm)
- CV-3988 ((±)-[3-(N-octadecylcarbamoyloxy)-2-methoxy]propyl 2-thiazolioethyl phosphate, C₂₆H₅₄NO₇P, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)

Διαλύματα Εργασίας

- *Διάλυμα PBS 10 mM, pH 7.4.* Όπως περιγράφεται στη σελίδα 98.
- *Διάλυμα 20 U/ml θρομβίνη.* Όπως περιγράφεται στη σελίδα 98.
- *50 mM AA.* 10 mg AA διαλυτοποιούνται σε 656 μl απόλυτης αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 20 μl στο σκοτάδι κλεισμένα με parafilm.

Πειραματική διαδικασία

Για τη διαπίστωση της βιολογικής δράσης των PMPs ή των οξειδωμένων PMPs (στην περιοχή συγκεντρώσεων από 1.25-5 μg/ml) ή των συμπλεγμάτων των PMPs (5 μg/ml) με τις λιποπρωτεΐνες (περιοχή συγκεντρώσεων από 5-25 μg/ml) με συσσωρευομετρία σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Ανοίγουμε το συσσωρευόμετρο μισή ώρα πριν τη δοκιμή των παραπάνω δειγμάτων για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C.
2. Ετοιμάζουμε μια σειρά από γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματά μας. Καθεμιά φέρει από ένα μαγνητάκι.
3. Ετοιμάζουμε ένα δείγμα από 500 μl τελικού διαλύματος εναιώρησης των αιμοπεταλίων 1X pH 7.35 και το τοποθετούμε στη θέση 'reference' του οργάνου. Το δείγμα αυτό δε φέρει μαγνητάκι και παραμένει στη θέση αυτή μέχρι να τελειώσει το πείραμα.
4. Ετοιμάζουμε ένα δείγμα αναφοράς (τυφλό) το οποίο περιέχει το τελικό αιώρημα αιμοπεταλίων. Τοποθετούμε το δείγμα στη διπλανή θέση του οργάνου. Η προσθήκη του αγωνιστή γίνεται ένα λεπτό μετά την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο. Ο τελικός όγκος στην κυψελίδα ισούται με 500 μl. Ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0.2 U/ml θρομβίνης ή 500 μM AA. Σε όλα τα δείγματα η προσθήκη του αγωνιστή γίνεται σε συνεχώς αναδεδυμένο αιώρημα αιμοπεταλίων στις 1200 στροφές το λεπτό (rpm).
5. Παρατηρούμε τη συσσώρευση του δείγματος για 4 λεπτά.
6. Καταγράφουμε και τυπώνουμε την % συσσώρευση του δείγματος αναφοράς (τυφλού).
7. Ετοιμάζουμε τις τυχόν συγκεντρώσεις των δειγμάτων που τα έχουμε ήδη φέρει σε θερμοκρασία δωματίου. Ομογενοποιούμε με την πιπέτα.
8. Εισάγουμε το τελικό αιώρημα των αιμοπεταλίων στην κυψελίδα συσσώρευσης.
9. Μετά από ένα λεπτό εισάγουμε το εκάστοτε από τα παραπάνω δείγματα που θέλουμε να μελετήσουμε τη βιολογική δράση.
10. Παρατηρούμε τη συσσώρευση του δείγματος για 4 λεπτά.
11. Καταγράφουμε και τυπώνουμε την % συσσώρευση του δείγματος.
12. Κατόπιν, προχωρήσαμε στη διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο τα PMPs ή τα oxPMPs συσσωρεύουν τα αιμοπετάλια. Η κατεργασία των πλυμένων αιμοπεταλίων με 10 μl 0.1 M ασπιρίνη 15 min πριν την προσθήκη των PMPs ή των oxPMPs έγινε προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο του μεταβολίτη του AA (π.χ. του TxA₂). Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια προεπωάστηκαν και με τον ειδικό αναστολέα του PAF, το CV3988 (30 μM) για 1 min, πριν την προσθήκη των παραπάνω δειγμάτων. Όλα τα πειράματα συσσωρευομετρίας ολοκληρώνονται μέσα σε τρεις ώρες από τη στιγμή της αιμοληψίας.
13. Ξεπλένουμε τις κυψελίδες αρχικά με νερό και απορρυπαντικό και κατόπιν με αραιό νιτρικό οξύ και απεσταγμένο νερό.
14. Ξεπλένουμε τα μαγνητάκια με απεσταγμένο νερό και μεθανόλη.

Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώρο (HUVECs)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Αποστειρωμένες καθετήρες τριών δρόμων (3 way stopcock)
- Αποστειρωμένο νυστέρι #11
- Αποστειρωμένα γάντια
- Σύριγγες
- Γυάλινα ποτήρια των 250 και 600 ml
- Αποστειρωμένες γάζες
- Dulbecco's PBS (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Medium 199 (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Hank's balanced salt solution (HBSS, Biowhittaker, Walkersville, MD)
- L-γλουταμίνη (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (25,000U/mL και 25,000mg/mL, αντίστοιχα; Biowhittaker, Walkersville, MD)
- 5g/φιαλίδιο Κολλαγονάση Τύπου I (Worthington Biochemical Corp. Freehold, NJ)
- Ορός από έμβryo βοδιού (FCS, Gibco-BRL)
- Ηπαρίνη
- ECGS (φιαλίδια των 15 mg, Sigma)
- Ορός από έμβryo βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (foetal bovine serum, FBS heat inactivated, Gibco-BRL)
- Trypsin+EDTA (Gibco-BRL)
- MgCl₂.6H₂O (MB= 203,31 g/mol, Sigma)
- CaCl₂ (MB= 110,99 g/mol, Merck)
- CH₃COOH (17.5M, Riedel-deHaën)
- Ανθρώπινο όρο (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- VEGF (Immunotools)
- Ζελατίνη (Sigma)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- Φίλτρα διήθησης 0,20 μ (Corning)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 15 και 50ml (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 250 U/mg κολλαγόνωσης σε PBS:** 0,1 gr κολλαγόνωσης διαλύονται σε 10 ml PBS που έχει θερμανθεί στους 37°C δίνοντας το stock διάλυμα. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο διήθησης 0.20 μ και διατηρείται στους -20°C. Η κολλαγόνωση πριν χρησιμοποιηθεί θερμαίνεται στους 37°C για 1 ώρα.
- **Διάλυμα 25 U/mg κολλαγόνωσης σε PBS (διάλυμα εργασίας):** Το διάλυμα αυτό προέρχεται από αραιώση 1:100 σε PBS του αρχικού διαλύματος 250 U/mg. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα κολλαγόνου 50 μg/ml:** Το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα συγκέντρωσης 3.31mg/ml, αραιώνεται με διάλυμα CH₃COOH (0.02 N) μέχρι την συγκέντρωση των 50 μg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Θρεπτικό μέσο M199:** Από το εμπορικά διαθέσιμο μέσο αφαιρούμε 26 ml και στη συνέχεια προσθέτουμε 120 ml FCS θερμικά απενεργοποιημένο, 300 μl ηπαρίνη, 6 ml διαλύματος Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (25.000 U/ml και 25.000 mg/ml) και 30 mg ECGS. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για 1 μήνα.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία ομφαλίου λώρου

Όλη η διαδικασία απομόνωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων γίνεται υπό στείρες συνθήκες στο χώρο ιστοκαλλιέργειών, στο θάλαμο νηματοειδούς ροής. Ο χώρος καθαρίζεται με αιθανόλη (70%) πριν από τη χρήση του και ο λώρος παραλαμβάνεται με καθαρά αποστειρωμένα γάντια. Από τη στιγμή που παραλαμβάνεται ο ομφάλιος λώρος μπορεί να παραμείνει μέσα σε PBS (1X), το οποίο έχει αποστειρωθεί την προηγούμενη ημέρα σε βάζο, έως και 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Απομόνωση HUVECs

Στον ομφάλιο λώρο υπάρχουν δυο αρτηρίες και μια μεγαλύτερη φλέβα από την οποία γίνεται η απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο λώρος φέρει σημάδια από τους αιμοστάτες, τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν με κόψιμο 1-2 cm της περιοχής από κάθε πλευρά, με αποστειρωμένο νυστέρι. Μετά την απομάκρυνση αυτών των σημείων, τοποθετούνται και στα δυο ανοίγματα της φλέβας οι αιμοστατικές λαβίδες (καθετήρες τριών δρόμων) οι οποίες σταθεροποιούνται με χειρουργικό νήμα. Η φλέβα ξεπλένεται με PBS (1X) με τη βοήθεια σύριγγας και η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι το διάλυμα να βγει καθαρό από τον λώρο. Κατά την έκλυσή της η φλέβα πρέπει να διογκώνεται. Στη συνέχεια με τη βοήθεια σύριγγας εισέρχεται διάλυμα κολλαγόνωσης τόσο ώστε να γεμίσει η φλέβα και κλείνονται οι στρόφιγγες των καθετήρων τριών δρόμων. Ο ομφάλιος λώρος τοποθετείται σε προθερμασμένο PBS, στους 37°C για 12 λεπτά ακριβώς. Μετά το τέλος της επώασης, ανοίγεται η μια στρόφιγγα και παραλαμβάνεται το διάλυμα κολλαγόνωσης με το εναιώρημα των κυττάρων που βρίσκεται μέσα στο λώρο σε αποστειρωμένο κωνικό βαθμονομημένο σωλήνα των 50 ml. Από την άλλη πλευρά του καθετήρα εφαρμόζεται μια σύριγγα και ο λώρος εκπλένεται με PBS (1X) και με θρεπτικό μέσο M199 έτσι ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της κολλαγόνωσης. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1000 rpm για 10 λεπτά σε 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό M199, ο όγκος του οποίου καθορίζεται από το μήκος του ομφάλιου λώρου, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Μήκος ομφάλιου λώρου	Όγκος θρεπτικού μέσου	Φλάσκες καλλιέργειας
20 cm	5 ml	T25
80 cm	10 ml	T75

Τα κύτταρα είναι πλέον έτοιμα για καλλιέργεια.

Γενικά περί καλλιέργειών των ΗΥΝΕCs

(A) Ψύξη κυττάρων (stock)

Για τη ψύξη των κυττάρων, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- αφαίρεση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων (από φλάσκα ή τρυβλίο).
- πλύσεις των κυττάρων με προθερμασμένο PBS 1X (2 φορές).
- προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης και επώαση για ~1 λεπτό στους 37°C ή για ~2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (τα ελέγχουμε μέχρι να ξεκολλήσουν και προσέχουμε να μην αφήσουμε τη θρυψίνη παραπάνω από όσο χρειάζεται για να μην πεθάνουν τα κύτταρα).
- προσθήκη του ανάλογου όγκου θρεπτικού μέσου (δεκαπλάσια ποσότητα από τον όγκο της τρυψίνης).
- ανάμιξη και μεταφορά των κυττάρων σε ένα 15 ml σωληνάριο τύπου falcon όπου και αναδεύονται.
- φυγοκέντρηση κυττάρων στα 2000 rpm για 5 λεπτά.
- ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη στο ίζημα των κυττάρων 1ml ορού FBS/10% DMSO και μεταφορά αυτών σε κατάλληλα σωληνάρια ψύξεως (cryovials). Τα σωληνάρια τοποθετούνται αρχικά στους 4°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια στους -80°C, ώστε η ψύξη των κυττάρων να είναι σταδιακή. Για την αποθήκευση των κυττάρων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε υγρό άζωτο.

(B) Αραιώση κυττάρων (split)

Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας των πλακιδίων, τότε πραγματοποιείται αραιώση των κυττάρων με τον εξής τρόπο:

- αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και πλύσεις με PBS 1X (2 φορές).
- προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης και επώαση για ~1 λεπτό στους 37°C ή για ~2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (τα ελέγχουμε μέχρι να ξεκολλήσουν και

προσέχουμε να μην αφήσουμε τη θρυψίνη παραπάνω από όσο χρειάζεται για να μην πεθάνουν τα κύτταρα).

- προσθήκη του ανάλογου όγκου θρεπτικού μέσου (δεκαπλάσια ποσότητα από τον όγκο της θρυψίνης) και καλή ανάδευση.
- ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε αναλογία 1:3-1:6 (δηλ. τα κύτταρα ενός πλακιδίου επανακαλλιεργούνται σε 3-6 πλακίδια).
- Αλλάζουμε θρεπτικό μέσο ανά δύο μέρες.

(Γ) Απόψυξη κυττάρων

Τα κρυοφιαλίδια των κυττάρων από τους -80°C ή από το υγρό άζωτο ξεπαγώνουν σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου. Λίγο πριν ξεπαγώσουν τελείως, τα κύτταρα τοποθετούνται σε αποστειρωμένο σωληνάκι που περιέχει ποσότητα θρεπτικού μέσου ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας στο οποίο θα τοποθετηθούν τα κύτταρα. Ακολουθεί καλή αναδιασπορά των κυττάρων στο σωληνάκι και τελική εναπόθεσή τους στο καλυμμένο από κολλαγόνο πλακίδιο καλλιέργειας (φλάσκα, τρυβλίο ή πλακάκι) το οποίο ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην επιφάνειά του.

Καλλιέργεια των ΗΥΝΕCs

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS απουσία ιόντων Ca^{2+} , Mg^{2+} (10X Dulbecco's, Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Medium 199 (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (100X, PAA)
- Κολλαγόνο (Collagen type I (Rat tail), 3.36 mg/ml, BD Biosciences)
- Ορός από έμβryo βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (foetal bovine serum, FBS heat inactivated, GIBCO-BRL)
- Θρυψίνη + EDTA (PAA)
- Ηπαρίνη (5.000 i.u./ml-5 ml, LEO)
- ECGS (φιαλίδια των 15 mg, Sigma)
- CH_3COOH (17.5M, Riedel-deHaën)

- Φυσιολογικός ορρός
- dH₂O αποστειρωμένο
- EtOH 70% (v/v)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide for molecular biology, M.B. 78.13, Sigma)
- Φλάσκες και τρυβλία καλλιέργειας
- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων (102 mm², Falcon, Becton Dickinson)
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 5,10 και 25 ml (Costar, Corning Incorporated)
- Φίλτρα διήθησης 0,20 μ (Corning Incorporated)
- Σύριγγες, γάντια
- Αιματοκυττόμετρο Neubauer
- Ηλεκτρική πιπέτα (Labopet 240, Fortuna)
- Μικροσκόπιο (A. Krüss, Optronik)
- Φυγόκεντρος (Rotofix 32, Hettich, Zentrifugen)
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής (NUAIRE)
- Κλίβανος επώασης με ατμόσφαιρα 5% CO₂ (NUAIRE)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Υδατόλουτρο

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα κολλαγόνου 50 mg/ml:** Ποσότητα του αρχικού διαλύματος (stock) κολλαγόνου αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο CH₃COOH 0.02 M προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 50 mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα CH₃COOH 0.02 M:** Ποσότητα διαλύματος CH₃COOH 17.5 M (stock διάλυμα) αραιώνεται σε αποστειρωμένο dH₂O προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 0.02 M. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα PBS (1X):** 100ml διαλύματος PBS (10X) διαλύονται σε 900 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Θρεπτικό μέσο M199/ 20% FBS (heat inactivated):** Από το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα αφαιρούνται 26 ml και στη συνέχεια προστίθενται 30 mg ECGS (η οποία υπόκειται ανασύσταση σε αυθαίρετη ποσότητα θρεπτικού μέσου M199 και στη συνέχεια διηθείται από φίλτρο 0.20 μ), 300 μl ηπαρίνη, 6 ml διαλύματος πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 120 ml FBS.
- **Διάλυμα παγώματος:** Σε ορό FBS προστίθεται κατάλληλος όγκος DMSO, ώστε να προκύψει διάλυμα FBS/5 ή 10% DMSO.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πριν από την έναρξη της καλλιέργειας των HUVECs τα πλακίδια καλλιέργειας (πλακάκια, τρυβλία, φλάσκες) καλύπτονται με διάλυμα κολλαγόνου 50 mg/ml. Το εκάστοτε πλακίδιο καλλιέργειας αφήνεται είτε για 20 λεπτά στον κλίβανο επώασης (5% CO₂) είτε για 1 ώρα στο θάλαμο νηματοειδούς ροής.

Οι αντίστοιχες ποσότητες για κάθε πλακίδιο καλλιέργειας καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Όγκος διαλύματος κολλαγόνου (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
4.6	φλάσκα (75 cm ²)
3.5	τρυβλίο (57 cm ²)
6*0.626	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm ²)

Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα κολλαγόνου και οι επιφάνειες των πλακιδίων καλλιέργειας ξεπλένονται 2 φορές με τον κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS (1X).

Όγκος διαλύματος PBS (1X) (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
5.0	φλάσκα (75 cm ²)
3.8	τρυβλίο (57 cm ²)
6*0.680	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm ²)

Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από μια φλάσκα ή τρυβλίο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία έχουν αναπτυχθεί ικανοποιητικά αλλά όχι σε σημείο που να κάνουν συσσωματώματα. Η μονοστιβάδα των κυττάρων ξεπλένεται δύο φορές με PBS (1X) στις ίδιες ποσότητες έτσι όπως έχουν καταγραφεί στον παραπάνω πίνακα. Μετά την απομάκρυνση της ποσότητας του PBS (1X)

της τελευταίας έκπλυσης, στη μονοστιβάδα των κυττάρων προστίθεται ποσότητα θρυψίνης+EDTA η οποία αφήνεται για 20 δευτερόλεπτα με συνεχή ανακίνηση του εκάστοτε πλακιδίου καλλιέργειας ήπια και σταυρωτά. Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων (κυττάρων που δεν έχουν κολλήσει ή έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας).

Όγκος διαλύματος θρυψίνης (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
1.3	φλάσκα (75 cm ²)
1.0	τρυβλίο (57 cm ²)
6*0.200	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm ²)

Μετά το πέρας των 20 δευτερολέπτων απομακρύνεται η θρυψίνη και προστίθεται εκ νέου ίση ποσότητα, όπως αναφέρεται στον παραπάνω πίνακα, ενώ το πλακίδιο καλλιέργειας ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό το ξεκόλλημα των κυττάρων. Τα κύτταρα μόλις ξεκολλήσουν παραλαμβάνονται και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο σωληνάκι που περιέχει ποσότητα θρεπτικού μέσου ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας στο οποίο θα τοποθετηθούν τα κύτταρα.

Όγκος διαλύματος θρεπτικού μέσου (ml)	Πλακίδιο καλλιέργειας
13.0	φλάσκα (75cm ²)
10.0	τρυβλίο (57 cm ²)
6*2.0	πλακάκι 6 θέσεων (6*10.2 cm ²)

Ακολουθεί καλή αναδιασπορά των κυττάρων στο σωληνάκι και τελική εναπόθεσή τους στο καλυμμένο από κολλαγόνο πλακίδιο καλλιέργειας το οποίο ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην επιφάνειά του.

Διαίρεση κυττάρων- απόκτηση νέας γενιάς

Τα κύτταρα μπορούν να αραιωθούν (split) και να καλλιεργηθούν σε καινούργια πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων με σκοπό την απόκτηση καινούργιας γενιάς κυττάρων. Ανάλογα με το split που θα πραγματοποιηθεί διαφέρει το χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο θα αναπτυχθούν τα κύτταρα έτσι ώστε να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια του εκάστοτε πλακιδίου καλλιέργειας (confluent). Το θρεπτικό μέσο αλλάζεται ανά δύο μέρες. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μέρες καλλιέργειας που απαιτούνται για να χαρακτηριστεί μια καλλιέργεια κυττάρων confluent ανάλογα με το split που θα πραγματοποιηθεί.

Split	Confluent καλλιέργειες κυττάρων
1:3	~ 2 μέρες
1:4	~ 2-3 μέρες
1:5	~ 4-5 μέρες
1:6	~ 5-6 μέρες

Ενεργοποίηση των ΗΥΝΕCs με TNF- α και επίδραση με τις προς μελέτη ουσίες

Αντιδραστήρια-Όργανα

- TNF- α (10 μ g, R&D Systems)
- BSA (>96%, Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS απουσία ιόντων Ca²⁺, Mg²⁺ (10x Dulbecco's, Biowhittaker, Walkersville, MD)
- CV-3988 (Sigma)
- Ασπιρίνη (Ακετυλοσαλικυλική λυσίνη, Egicalm)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 10% BSA:** 1 gr BSA διαλύονται σε 10 ml αποστειρωμένου PBS (1X).
- **Διάλυμα 0.1% BSA:** 10 μl διαλύματος 10% BSA αραιώνονται σε 990 μl αποστειρωμένου PBS (1X).
- **TNF-α (10 μg/ml):** Το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο περιέχει 10 μg σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλύονται σε 1 ml PBS που περιέχει 0.1% BSA. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα 51 mM CV-3988.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 5 mg CV-3988 σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 165 μl αιθανόλης δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 51 mM. Το διαλύματα διατηρείται στους -20 °C.
- **Διάλυμα ασπιρίνης 0.1 M.** 0,0162 g ασπιρίνης διαλυτοποιούνται σε 500 μL φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Αρχή της μεθόδου

Η κυτοκίνη TNF-α επάγει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM-1, ICAM-1 η έκφραση των οποίων εξετάζεται με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία των HUVECs

Η επίδραση των προς μελέτη ουσιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα πραγματοποιείται σε πλακίδια καλλιέργειας 6 θέσεων, οι οποίες έχουν επικαλυφθεί με διάλυμα κολλαγόνου. Τα κύτταρα μετά την παραλαβή τους από τη φλάσκα ή το τρυβλίο καλλιέργειας, αραιώνονται με θρεπτικό μέσο και μοιράζονται σε τόσες θέσεις όσες είναι απαραίτητες για την κάθε πειραματική διαδικασία. Στη συνέχεια και όταν τα κύτταρα είναι έτοιμα, ακολουθεί έκπλυση αυτών και επίδραση με τις προς μελέτη ουσίες.

Ενεργοποίηση των HUVECs και επίδραση των προς μελέτη ουσιών

Τα HUVECs επώαστηκαν με TNF- α (1 ng/ml) ή PMPs (5-50 μ g πρωτεΐνης/ml) ή oxPMPs (5 ή 25 μ g/ml) ή τις λιποπρωτεΐνες LDL ή HDL (στην περιοχή συγκεντρώσεων από 5-25 μ g/ml) ή τα συμπλέγματα των PMPs (25 μ g/ml) με τις λιποπρωτεΐνες στις παραπάνω συγκεντρώσεις για 5 ή 24 h. Τα HUVECs που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή ήταν 2^{ης} ως 5^{ης} ανακαλλιέργειας. Οι προς μελέτη ουσίες αραιώνονται με κατάλληλο όγκο από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, ώστε να βρίσκονται στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το μηχανισμό με τον οποίο τα PMPs ή τα oxPMPs ενεργοποιούν τα HUVECs. Γι' αυτό το λόγο τα HUVECs κατεργάστηκαν παρουσία ασπιρίνης 0.1 μ M για 45 min πριν την επώαση με τα PMPs, ώστε να αναστέλλεται η παραγωγή και η έκκριση του μεταβολίτη του AA (π.χ. η προστακυκλίνη) ή παρουσία του ειδικού αναστολέα του PAF CV3988 (30 μ M) ο οποίος προστέθηκε ταυτόχρονα και επώαστηκε με τα PMPs.

Ανάλυση των HUVECs με χρήση κυτταρομετρίας ροής

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)
- Λογισμικό Cell Quest (Becton Dickinson)
- Σωληνάκια πολυστηρενίου των 5ml (12x75mm, Becton Dickinson)
- BD FACScFlow, BD Biosciences
- CD31-PE (Becton Dickinson)
- CD54-PE (Becton Dickinson)
- CD106-PE (Becton Dickinson)
- Medium 199 (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Ορός από έμβryo βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (foetal bovine serum, FBS heat inactivated, GIBCO-BRL)
- Πάγος

Διαλύματα εργασίας

- **M199/10% FBS:** 10 ml του εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος FBS αναμιγνύονται με 90 ml θρεπτικού μέσου M199.
- **M199/5% FBS:** 5 ml του εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος FBS αναμιγνύονται με 95 ml θρεπτικού μέσου M199.

Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιούνται αντισώματα όπως το CD31-PE που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη PECAM-1, το CD54-PE που αναγνωρίζει το μόριο ICAM-1 και το CD106-PE που αναγνωρίζει το προσκολλητικό VCAM-1.

Πειραματική διαδικασία

Μέτρηση κυττάρων

Τα προς κυτταρομετρική εξέταση κύτταρα αποκολλώνται, χρησιμοποιώντας την ανάλογη με την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας ποσότητα διαλύματος θρυσίνης+EDTA - όπως περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω- και παραλαμβάνονται σε 1.5ml M199/10% FBS. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια αιματοκυττόμετρου Neubauer. 10 μl από το εναιώρημα των κυττάρων (1.5 ml) τοποθετούνται σε κάθε πλευρά της πλάκας και μετρώνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα του αιματοκυττόμετρου. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = \frac{\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων (4 τετράγωνα)}}{4} * 10^4 \text{ κύτταρα/ml} * 1.5 \text{ ml}$$

4

Προετοιμασία κυττάρων για κυτταρομετρία

Μετά τη μέτρηση 1.5×10^5 κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά με 15 μl από το εκάστοτε αντίσωμα και 200 μl M199/5%FBS στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1500 rpm για 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με 200 μl κρύου διαλύματος M199/ 5%FBS, το οποίο κάθε φορά απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 500 μl M199/5%FBS και τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάκια κυτταρομετρίας ροής.

Ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο

Η απορρόφηση του κάθε δείγματος πραγματοποιείται με χαμηλή ροή (12 μl±3 μl/min) ενώ η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται μέσω του λογισμικού Cell Quest του κυτταρομέτρου.

Προσδιορισμός επιπέδων της MCP-1 σε υπερκείμενο κυττάρων με την τη μέθοδο ELISA τύπου σάντουιτς

Αντιδραστήρια-Όργανα

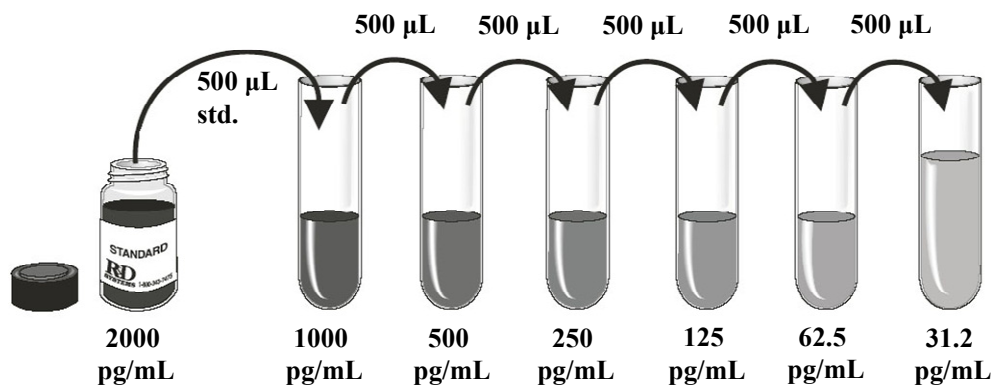
Ο προσδιορισμός της MCP-1 πραγματοποιείται με εμπορική συσκευασία kit (Quantikine Human MCP-1/CCL2 Immunoassay) το οποίο περιέχει:

- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων επικαλυμμένο με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της MCP-1
- Πρότυπο διάλυμα MCP-1: 10 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης MCP-1 λυοφιλοποιημένη
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της MCP-1 επισημασμένο με ένζυμο
- Διάλυμα RD1-83: για δείγματα ορού ή πλάσματος
- Διάλυμα RD5L (5x): για υπερκείμενα κυττάρων
- Διάλυμα RD6Q: για δείγματα ορού ή πλάσματος
- Διάλυμα έκπλυσης
- Χρωμοφόρο A

- Χρωμοφόρο B
- Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (2N H₂SO₄)
- MicroELISA φασματοφωτόμετρο (SpectraMax 190, Molecular Devices)
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200 μl (Costar)
- Σωληνάρια πολυπροπυλενίου

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα έκπλυσης:** 20 ml του αρχικού διαλύματος έκπλυσης αραιώνονται με dH₂O μέχρι τελικού όγκου 500 ml.
- **Διάλυμα αραιώσης πρότυπων διαλυμάτων MCP-1 [RD5L (1X)]:** 20 ml από το αρχικό διάλυμα αραιώσης πρότυπων διαλυμάτων MCP-1 [RD5L (5X)] αραιώνονται με dH₂O έως τον όγκο των 100 ml.
- **Διάλυμα υποστρώματος:** Παρασκευάζεται με ανάμιξη ίσων όγκων χρωμοφόρου A και χρωμοφόρου B. Χρειάζεται προστασία από το φως και χρησιμοποιείται μέσα σε 15 min από την παρασκευή του.
- **Πρότυπο διάλυμα MCP-1 (2000 pg/ml):** Η ανασύσταση του πρότυπου διαλύματος 10 ng/φιαλίδιο πραγματοποιείται με την προσθήκη 5 ml διαλύματος RD5L (1X). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και παραμονή σε ηρεμία για τουλάχιστον 15 λεπτά. Το διάλυμα χωρίζεται σε δείγματα των 500 μl και φυλάσσεται στους -20°C.
- **Πρότυπα διαλύματα MCP-1:** Τα πρότυπα διαλύματα MCP-1 παρασκευάζονται ως εξής:



Σε 6 σωληνάκια πολυαιθυλενίου τοποθετούνται από 500 μl διαλύματος RD5L (1X). Στη συνέχεια στο πρώτο από αυτά προστίθενται 500 μl από το πρότυπο διάλυμα MCP-1 (2000 pg/ml) οδηγώντας στη δημιουργία του διαλύματος συγκέντρωσης 1000 pg/ml. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση και στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζονται και τα υπόλοιπα διαλύματα.

Αρχή της μεθόδου

Η πρωτεΐνη χημειοτακτισμού των μονοκυττάρων τύπου 1 (MCP-1) ανήκει στην υπερικογένεια των χημειοκινών και είναι γνωστή για την πρόκληση χημειοτακτισμού των μονοκυττάρων και ενεργοποίηση αυτών. Για τον προσδιορισμό της, το υπερκείμενο των κυττάρων καθώς και τα πρότυπα διαλύματα επωάζονται σε πλακίδια ELISA που περιέχουν ακινητοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο προς την MCP-1. Οποιαδήποτε ποσότητα MCP-1 υπάρχει δεσμεύεται στο αντίσωμα, ενώ με διαδοχικές εκπλύσεις η MCP-1 που δεν έχει δεσμευθεί απομακρύνεται και ακολουθεί επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της MCP-1. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται και ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη χρώματος. Η ένταση του χρώματος που παρατηρείται είναι ανάλογη της ποσότητας της MCP-1 που έχει δεσμευθεί. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη οξέος και μετριέται η απορρόφηση στα 450 nm.

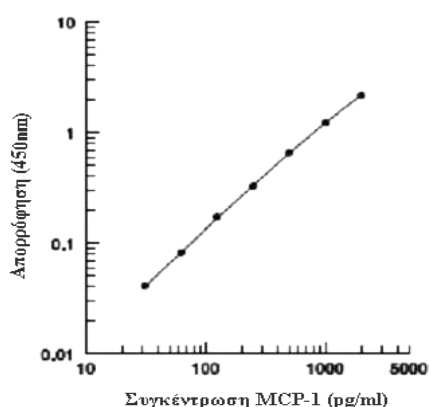
Πειραματική διαδικασία

Πριν από την έναρξη προσδιορισμού της MCP-1, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα που χρησιμοποιούνται αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αρχικά προετοιμάζεται η πρότυπη καμπύλη με την προσθήκη σε κάθε θέση από 200 μl των προτύπων διαλυμάτων, ξεκινώντας από τα 0 pg/ml (προσθήκη 200 μl διαλύματος RD5L (1x)) και φτάνοντας στα 2000 pg/ml. Στις υπόλοιπες θέσεις τοποθετούνται από 200 μl των προς μέτρηση δειγμάτων (υπερκείμενα κυττάρων) και το πλακίδιο επωάζεται για 2

ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη φάση αυτή η υπάρχουσα MCP-1 δεσμεύεται από το αντίσωμα. Ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου και τρεις εκπλύσεις με την προσθήκη 200 μl ανά θέση, του αντιδραστηρίου έκπλυσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της MCP-1 που δεν έχει δεσμευθεί. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της MCP-1 και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη 1 ώρα το πλακίδιο εκπλένεται τρεις φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πολυκλωνικού αντισώματος που δεν έχει δεσμευθεί. Ακολουθεί προσθήκη 200 μl του υποστρώματος και επώαση για 20 λεπτά απουσία φωτός. Στη φάση αυτή το χρώμα γίνεται μπλε. Τέλος, σε κάθε θέση, προστίθενται 50 μl του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης. Σε αυτή τη φάση το χρώμα μετατρέπεται σε κίτρινο και παραμένει σταθερό για 30 λεπτά, εντός των οποίων πρέπει να γίνει η μέτρηση. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 450 nm ή στα 540 nm με διορθωτικό μήκος κύματος στα 450 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, η οποία έχει και τους δυο άξονες λογαριθμικούς. Από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει υπολογίζεται η ποσότητα της MCP-1 που περιέχουν τα δείγματα και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/ml (Εικόνα 6.1).



(pg/ml)	Απορρόφηση	Μέσος όρος	Διόρθωση
0	0.052 0.055 0.110	0.054	—
31.2	0.108 0.159	0.109	0.055
62.5	0.155 0.273	0.157	0.103
125	0.260 0.476	0.266	0.212
250	0.449 0.834	0.462	0.408
500	0.806 1.429	0.820	0.766
1000	1.397 2.317	1.413	1.359
2000	2.247	2.282	2.228

Εικόνα 6.1: Πρότυπη καμπύλη MCP-1 και αναμενόμενες τιμές απορρόφησης.

Ανοσοφθορισμός

Αντιδραστήρια –Όργανα

- IgG-FITC (Becton Dickinson)
- CD31-PE (BD Pharmingen)
- CD54-PE (BD Pharmingen)
- CD41a-FITC (Becton Dickinson)
- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων (35×10 mm, Primaria Falcon)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- KCl (M.B. 74.56 g/mol, Sigma)
- KH₂PO₄
- Na₂HPO₄
- CaCl₂ (M.B. 110.99 g/mol, Merck)
- Ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂·6H₂O, MB : 203.3 g/mol, Sigma)
- NH₄Cl (M.B. 53.49, Fluka)
- Triton X-100 (Serva)
- MOWIOL (Calbiochem)
- DAPCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2] octane, C₆H₁₂N₂, M.B. 112.2 g/mol, Sigma)
- Tris-HCl (C₄H₁₁NO₃*ClH, M.B. 157.60 g/mol, Merck)
- Γλυκερόλη 87% (Carlo-Erba)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 15 και 50 ml (Corning)
- Leica TCS-SP Μικροσκόπιο συνεστιασμού (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)
- Leica TCS λογισμικό
- Ψηφιακή κάμερα Leica TCS NT (Leica Microsystems AG)
- Φακοί Leica PL APO 100x/1.40 και 63x/1.32
- Ειδικό λάδι βύθισης 59 (Zeiss 518N)

Διαλύματα εργασίας

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 5X PBS pH 7.5.** 40 g NaCl, 1g KCl, 1.2 g KH₂PO₄ και 7.2 g Na₂HPO₄ διαλυτοποιούνται σε 800 ml dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.5, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 1 M MgCl₂.** 10.2 g MgCl₂ διαλυτοποιούνται σε 50 ml dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα 1 M CaCl₂.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 95.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS pH 7.5 + 0.1 mM MgCl₂ + 0.1 mM CaCl₂.** Αραιώνουμε 200 ml του 5X PBS, pH 7.5 σε 800 ml dH₂O. Προσθέτουμε 1 ml 1 M MgCl₂ και 1 ml 1 M CaCl₂. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα 1 M NH₄Cl.** 2.67 g διαλυτοποιούνται σε 50 ml dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα 50 mM NH₄Cl.** 2.5 ml του 1 M NH₄Cl αραιώνονται μέχρι τα 50 ml στο ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS pH 7.5 + 0.1 mM MgCl₂ + 0.1 mM CaCl₂. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα 0.1% Triton X-100.** 100 μl του Triton X-100 αραιώνονται μέχρι τα 100 ml στο ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS pH 7.5 + 0.1 mM MgCl₂ + 0.1 mM CaCl₂. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C στο σκοτάδι.
- **Διάλυμα 10% FCS/PBS.** 2 ml FCS αραιώνονται μέχρι τα 20 ml στο ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS pH 7.5 + 0.1 mM MgCl₂ + 0.1 mM CaCl₂. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα 0.2 M Tris-HCl.** Διαλύονται 1.6 g Tris-HCl σε 50 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.5.
- **Διάλυμα MOWIOL.** Ζυγίζουμε 2.49 g MOWIOL και τοποθετείται σε κωνικό βαθμονομημένο σωλήνα των 50 ml στην συνέχεια προσθέτουμε 5.5 ml γλυκερόλης (87%) και 6 ml ddH₂O αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προσθέτουμε 12 ml από το διάλυμα 0.2 M Tris-HCl, pH 8.5 και αφήνεται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 53°C, μέχρι να γίνει διάλυμα το MOWIOL (περίπου 30 min). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4,000 rpm για 20 min. Το υπερκείμενο χωρίζεται σε aliquots του 1 ml και φυλάσσεται στους -80°C.
- **MOWIOL+DAPCO.** Προσθέτουμε τέτοια ποσότητα του DAPCO ώστε στο 1 ml του MOWIOL να έχουμε τελική συγκέντρωση του DAPCO 100 mg/ml.

Αρχή της μεθόδου

Ο φθορισμός καθώς και μια ειδική κατηγορία του ο ανοσοφθορισμός αποτελούν δύο από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές μελέτης τόσο ζωντανών, όσο και μονιμοποιημένων συστημάτων (καλλιιεργειών κυττάρων). Ο ανοσοφθορισμός είναι η

τεχνική φθορισμού που βασίζεται στη σήμανση αντισωμάτων ή αντιγόνων με φθορίζουσες ενώσεις. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για την παρατήρηση της υποκυττάριας κατανομής των βιομορίων που μας ενδιαφέρουν. Τα σεσημασμένα με τέτοιο τρόπο τμήματα ιστών ή κυτταροκαλλιιεργειών μελετώνται μέσω της χρήσης μικροσκοπίου φθορισμού ή μικροσκοπίου συνεστιασμού. Η χρώση των κυττάρων κατά τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα βήματα: προετοιμασία των κυττάρων, μονιμοποίηση, εφαρμογή του αντισώματος και αξιολόγηση.

Σαν πρώτο βήμα τα κύτταρα που πρόκειται να επισημανθούν, ακινητοποιούνται σε μια στερεή επιφάνεια για να είναι πιο εύκολος ο χειρισμός τους στις διαδικασίες που θα ακολουθήσουν. Τα προσκολλημένα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες ή και σε πλαστικές επιφάνειες παρόμοιας μορφολογίας. Το δεύτερο βήμα είναι η μονιμοποίηση και η διαπερατότητα των μεμβρανών τους ώστε να είναι εφικτή η πρόσβαση του αντιγόνου στο αντίσωμά του. Τέλεια μονιμοποίηση ακινητοποιεί τα αντισώματα, ενώ διατηρείται η αυθεντική κυτταρική και υποκυττάρια αρχιτεκτονική, επιτρέποντας την πρόσβαση των αντισωμάτων σε όλα τα κύτταρα και τα υποκυττάρια συστατικά. Υπάρχουν πολλά μέσα μονιμοποίησης. Η σωστή επιλογή εξαρτάται από τη φύση του αντιγόνου που μελετάται και από τις ιδιότητες του αντισώματος που χρησιμοποιείται. Η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται είτε με οργανικά διαλύματα είτε με διαλύματα διασταυρωτής σύνδεσης. Οι οργανικοί διαλύτες όπως οι αλκοόλες και η ακετόνη απομακρύνουν τα λιπίδια, αφυδατώνουν τα κύτταρα και καθιζάνουν τις πρωτεΐνες της κυτταρικής αρχιτεκτονικής. Τα διαλύματα διασταυρωτής σύνδεσης (όπως η παραφορμαλδεΰδη) δημιουργούν ομοιοπολικές ενδομοριακές γέφυρες μέσω των ελεύθερων αμινομάδων, δημιουργώντας έτσι ένα δίκτυο ομοιοπολικά προσδεδμένων αντιγόνων. Το τρίτο βήμα περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με το αντίσωμα. Το μη προσδεμένο αντίσωμα απομακρύνεται με εκπλύσεις, ενώ το δεμένο αντίσωμα προσδιορίζεται είτε άμεσα (αν είναι επισημασμένο το πρώτο αντίσωμα), είτε έμμεσα χρησιμοποιώντας επισημασμένο με φθορίζουσα ένωση δευτερεύων αντίσωμα. Στο τέταρτο βήμα, η χρώση αξιολογείται μέσω της παρατήρησης με μικροσκόπιο φθορισμού ή συνεστιακό μικροσκόπιο.

Η τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) χρησιμοποιείται για αύξηση του βαθμού διαφοράς φωτεινού-σκούρου μιας εικόνας κατά την επεξεργασία ενός βιολογικού δείγματος. Το μικροσκόπιο συνεστιασμού

παράγει έντονα φωτεινές εικόνες του εξεταζόμενου δείγματος, οι οποίες σε ένα συνηθισμένο μικροσκόπιο θα εμφανίζονταν θολές. Αυτό επιτυγχάνεται εμποδίζοντας την είσοδο του μεγαλύτερου μέρους φωτός που προέρχεται από το φθορίζον δείγμα, το οποίο δεν είναι στο εστιακό επίπεδο του μικροσκοπίου. Η εικόνα έχει καλύτερη αντίθεση (καλύτερη ποιότητα και καθαρότερο background) και λιγότερη θολερότητα, σε σύγκριση με ένα συνηθισμένο μικροσκόπιο και αντιπροσωπεύει μια λεπτή διατομή του δείγματος. Πρωτοπόρος του μικροσκοπίου συνεστιασμού ήταν ο Marvin Minsky το 1955 στο πανεπιστήμιο του Harvard.

Στην μικροσκοπία συνεστιασμού, οι φακοί του μικροσκοπίου εστιάζουν το λέιζερ στο δείγμα σημείο προς σημείο γνωστό και ως εστιακό σημείο (focal point). Το λέιζερ σαρώνει το δείγμα και έτσι συλλέγονται πληροφορίες για αυτό. Οι πληροφορίες αυτές αποτελούνται τόσο από φως της φθορίζουσας χρωστικής που χρησιμοποιείται όσο και από φως που αντανακλάται από το ίδιο το δείγμα. Στην συνέχεια το φως που εκπέμπει το εστιακό σημείο εστιάζεται σε ένα δεύτερο σημείο γνωστό ως σημείο συνεστιασμού (Confocal point). Στο σημείο αυτό υπάρχει ένα μικρό άνοιγμα (pinhole aperture) που επιτρέπει στο φως να περνά προς τον ανιχνευτή. Αντίθετα, πληροφορίες εκτός του εστιακού σημείου δεν καταγράφονται από τον ανιχνευτή [445-450].

Πειραματική διαδικασία

1. Αρχικά πριν από την έναρξη της καλλιέργειας των HUVECs τα πλακάκια καλλιέργειας των 6 θέσεων καλύπτονται με διάλυμα κολλαγόνου 50 mg/ml και αφήνεται είτε για 20 min στον κλίβανο επώασης (5% CO₂) είτε για 1 h στο θάλαμο νηματοειδούς ροής.
2. Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα κολλαγόνου και τα πλακάκια καλλιέργειας ξεπλένονται 2 φορές με τον κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS (1X).
3. Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από μια φλάσκα ή τρυβλίο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία έχουν αναπτυχθεί ικανοποιητικά αλλά όχι σε σημείο που να κάνουν συσσωματώματα. Η μονοστιβάδα των κυττάρων ξεπλένεται δύο φορές με PBS (1X) στις ίδιες ποσότητες έτσι όπως έχουν καταγραφεί σε παραπάνω πίνακα. Μετά την απομάκρυνση της ποσότητας του

PBS (1X) της τελευταίας έκπλυσης, στη μονοστιβάδα των κυττάρων προστίθεται ποσότητα θρυψίνης+EDTA η οποία αφήνεται για 20 δευτερόλεπτα με συνεχή ανακίνηση του εκάστοτε πλακιδίου καλλιέργειας ήπια και σταυρωτά. Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων (κυττάρων που δεν έχουν κολλήσει ή έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια του πλακακιού καλλιέργειας).

4. Μετά το πέρας των 20 δευτερολέπτων απομακρύνεται η θρυψίνη και προστίθεται εκ νέου ίση ποσότητα, όπως αναφέρεται σε παραπάνω πίνακα, ενώ το πλακίδιο καλλιέργειας ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό το ξεκόλλημα των κυττάρων. Τα κύτταρα μόλις ξεκολλήσουν παραλαμβάνονται και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο σωληνάκι που περιέχει ποσότητα θρεπτικού μέσου ανάλογα με το πλακίδιο καλλιέργειας στο οποίο θα τοποθετηθούν τα κύτταρα.
5. Ακολουθεί καλή αναδιασπορά των κυττάρων στο σωληνάκι και τελική εναπόθεσή τους στο καλυμμένο από κολλαγόνο πλακάκι των 6 θέσεων καλλιέργειας το οποίο ανακινείται ήπια και σταυρωτά με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην επιφάνειά του.
6. Πριν γίνουν confluent, επωάζω τα κύτταρα μερικών wells με 1 ng/ml TNF- α ή 25 μ g/ml PMPs για 5 ή 24 h προκειμένου να μελετήσουμε την εσωτερική τους στα HUVECs.
7. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν ικανοποιητικά απομακρύνω το θρεπτικό μέσο και ξεπλένω 3 φορές με 1X PBS, pH 7.5 + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂. Προσέχουμε κατά την έκπλυση να μη στεγνώσουν.
8. Η μονιμοποίηση των HUVECs έγινε με την προθήκη 3% παγωμένης παραφορμαλδεύδης (PF₄) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η PF₄ πρέπει να είναι παγωμένη και ποτέ δεν προστίθεται κατευθείαν πάνω στο coverslip γιατί τα κύτταρα μπορεί να ξεκολλήσουν. Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων δεν χρειάζεται να δουλέψουμε σε στείρες συνθήκες.
9. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 1X PBS, pH 7.5 + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂.
10. Για την εξουδετέρωση της περίσσειας της παραφορμαλδεύδης προσθέτω σε κάθε well 1 ml 50 mM NH₄Cl και επωάζουμε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 1X PBS, pH 7.5 + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂.

12. Κατόπιν επώασαμε με το απορρυπαντικό Triton X 0.1% για 4 min ακριβώς προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης.
13. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 1X PBS, pH 7.5 + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂.
14. Στη συνέχεια επώασαμε με 10% FCS (που είχε προηγουμένως φυγοκεντρηθεί) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Μετά από αυτό το στάδιο δεν ξεπλένουμε με PBS.
15. Τα wells που περιέχουν μόνο κύτταρα επώαστηκαν για 45 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD31-PE, anti-CD54-PE, anti-CD41a-FITC και με το αρνητικό IgG-FITC (1:100 αραίωση (v/v) σε 10% FCS αντίστοιχα για κάθε αντίσωμα).
16. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 1X PBS, pH 7.5 + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂.
17. Ακλουθεί η προσθήκη του anti-CD41a-FITC (1:100 αραίωση (v/v) σε 10% FCS) στο well που περιέχει τα PMPs για 45 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Μετά το πέρας της επώασης ξεπλένουμε τρεις φορές με 1X PBS, pH 7.5 + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂.
19. Ακολουθεί μία πλύση με dH₂O προκειμένου να απομακρύνουμε τα άλατα.
20. Στην συνέχεια οι γυάλινες καλυπτήρες αντιστρέφονται σε αντικειμενοφόρα πλάκα παρουσία MOWIOL+DAPCO (5 μl) και επωάζονται στους 37°C για 30 min.
21. Ακολουθεί οπτική παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488) και λογισμικό Leica TCS. Οι αντικειμενικοί φακοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία Leica PL APO 100x/1.40 και 63x/1.32 και το 59 ειδικό λάδι βύθισης ήταν Zeiss 518N. Οι αναλύσεις των εικόνων έγιναν με τη βοήθεια των προγραμμάτων Image J και Photoshop (Adobe Systems Incorporated).

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας στις καλλιέργειες των HUVECs

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)
- Λογισμικό Cell Quest (Becton Dickinson)
- Σωληνάκια πολυστηρενίου των 5ml (12x75mm, Becton Dickinson)
- BD FACSFlo^w, BD Biosciences
- TLR-4-PE (Becton Dickinson)
- Medium 199 (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Ορός από έμβρυο βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (foetal bovine serum, FBS heat inactivated, Gibco-BRL)
- Πάγος

Διαλύματα εργασίας

- **M199/10% FBS:** 10 ml του εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος FBS αναμιγνύονται με 90 ml θρεπτικού μέσου M199.
- **M199/5% FBS:** 5 ml του εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος FBS αναμιγνύονται με 95 ml θρεπτικού μέσου M199.

Αρχή της μεθόδου

Η κυτταροτοξικότητα των HUVECs παρουσία 25 µg/ml PMPs ή 1 ng/ml TNF-α ελέγχθηκε με την μέτρηση του TLR-4. Ο TLR4 θεωρείται ο κατεξοχήν υποδοχέας για τον LPS Gram αρνητικών βακτηρίων χωρίς να αποκλείεται ο ρόλος του στην αναγνώριση και άλλων μικροβιακών δομών αφού έχει διαπιστωθεί ότι αναγνωρίζει λιποτειχοϊκά οξέα Gram θετικών μικροβίων. Η αλληλεπίδραση του TLR4 με τον LPS είναι η πρώτη και η πιο καλά μελετημένη μέχρι σήμερα.

Πειραματική διαδικασία

Μέτρηση κυττάρων

Τα προς κυτταρομετρική εξέταση κύτταρα αποκολλώνται, χρησιμοποιώντας την ανάλογη με την επιφάνεια του πλακιδίου καλλιέργειας ποσότητα διαλύματος θρυσίνης+EDTA -όπως περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω- και παραλαμβάνονται σε 1.5ml M199/10% FBS. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια αιματοκυττόμετρου Neubauer. 10 μl από το εναιώρημα των κυττάρων (1.5 ml) τοποθετούνται σε κάθε πλευρά της πλάκας και μετρώνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα του αιματοκυττόμετρου. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = \frac{\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων (4 τετράγωνα)} * 10^4 \text{ κύτταρα/ml} * 1.5 \text{ ml}}{4}$$

4

Προετοιμασία κυττάρων για κυτταρομετρία

Μετά τη μέτρηση 1×10^6 κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά με 20 μl από το TLR-4-PE και προσθέτουμε 200 μl M199/5%FBS στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1500 rpm για 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με 200μl κρύου διαλύματος M199/ 5%FBS, το οποίο κάθε φορά απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 500 μl M199/5%FBS και τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάκια κυτταρομετρίας ροής.

Ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο

Η απορρόφηση του κάθε δείγματος πραγματοποιείται με χαμηλή ροή (12 $\mu\text{l} \pm 3$ $\mu\text{l}/\text{λεπτό}$) ενώ η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται μέσω του λογισμικού Cell Quest του κυτταρομέτρου.

Απομόνωση αγγελιοφόρου RNA (mRNA) από ΗΥΝΕCs

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)
- RNase-free H₂O
- Σωληνάκια eppendorf 1.5 και 2 ml
- Αιθανόλη (Merck)
- RNAase Zap (Applied Biosystems)
- Σύριγγα με μικροβελόνα διαμέτρου 23 gauge
- DEPC (Diethylpyrocarbonate, M.B. 162.14, Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (M.B. 78.13, Sigma)
- Πιπέτες Pasteur (κατεργασμένες με DEPC)
- Φυγόκεντρος πάγκου
- Μικροφυγόκεντρος ψυχόμενη (Eppendorf)
- Φασματοφωτόμετρο UV
- Θάλαμος νηματικής ροής

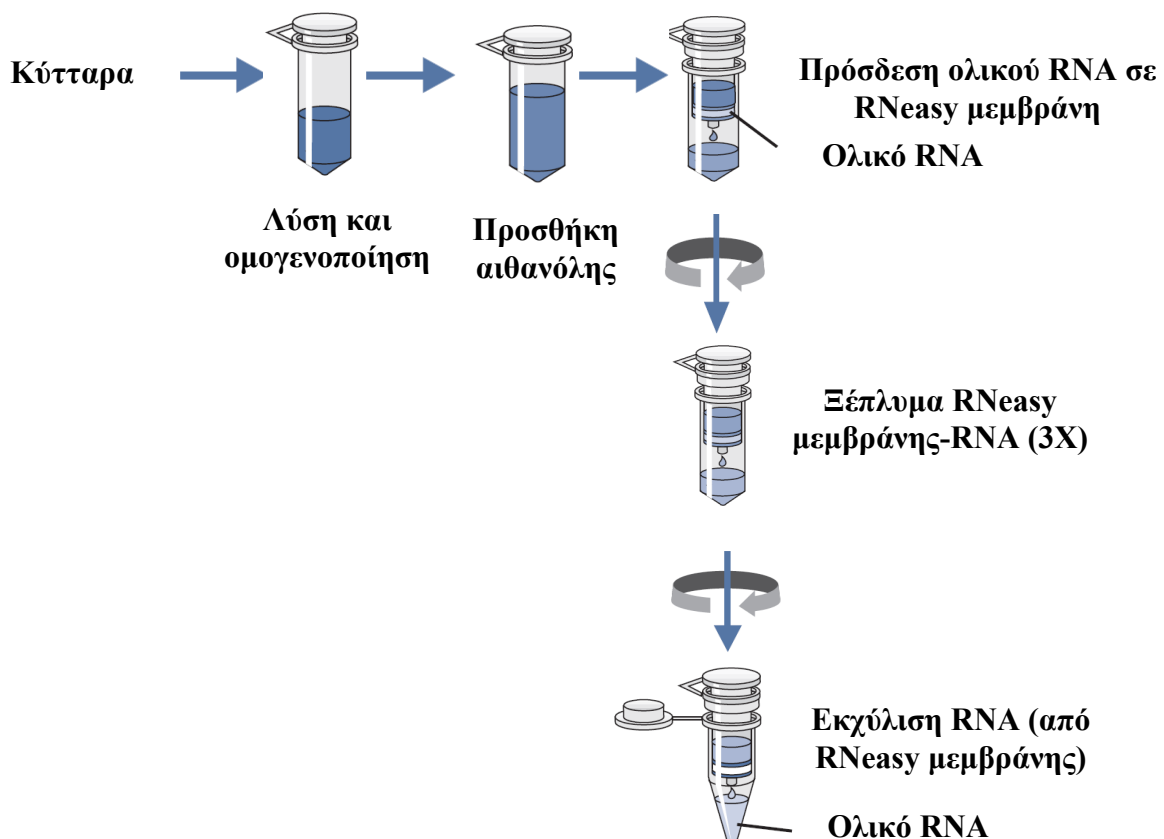
Διαλύματα εργασίας

- **70% αιθανόλη (v/v).** Από φιάλη με απόλυτη αιθανόλη, που δεν έχει ανοιχτεί, μεταφέρονται 70 ml σε αποστειρωμένη φιάλη των 100 ml και προσθέτονται 30 ml αποστειρωμένου dH₂O. Διατηρείται στους -20°C.

Αρχή της μεθόδου

Η RNeasy διαδικασία είναι μία καλά εδραιωμένη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την απομόνωση του RNA, η οποία συνδυάζει τις εκλεκτικές ιδιότητες πρόσδεσης που παρουσιάζει μια μεμβράνη από διοξείδιο του πυριτίου με την ταχύτητα της τεχνολογίας του microspin. Ένα ειδικό μεγάλης συγκέντρωσης αλατούχο διάλυμα επιτρέπει σε 100 µg RNA, που περιέχει περισσότερες από 200 βάσεις, να προσδεθεί στην RNeasy μεμβράνη. Τα βιολογικά δείγματα πρώτα λύνονται και ομογενοποιούνται παρουσία ενός διαλύματος που περιέχει guanidine-thiocyanate (RLT) το οποίο απενεργοποιεί τις RNases ώστε να διασφαλιστεί ο καθαρισμός του RNA. Η προσθήκη της αιθανόλης παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν την πρόσδεση και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στην RNeasy mini spin στήλη όπου το ολικό RNA

προσδένεται στην μεμβράνη ενώ όλα τα υπόλοιπα συστατικά απομακρύνονται με πλύσεις. Στη συνέχεια γίνεται η εκχύλιση του καθαρού RNA σε 30-100 µl RNase-free H₂O. Η διαδικασία αυτή απομονώνει το mRNA αφού τα RNAs που περιέχουν λιγότερα από 200 νουκλεοτιδία (όπως τα 5.8S rRNA, 5S rRNA και tRNAs, που αποτελούν το 15–20% του ολικού RNA) αποκλείονται εκλεκτικά.



Εικόνα 6.2: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών βημάτων της απομόνωσης RNA.

Πειραματική διαδικασία

Ολόκληρη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, φορώντας γάντια τα οποία είναι επίσης αποστειρωμένα, γιατί το mRNA είναι πολύ λίγο (1-2% του συνολικού RNA) και διασπάται ταχύτητα από τις RNAσες που υπάρχουν στο νερό, στα χέρια μας κτλ. Οι πάγκοι, οι πιπέτες και όλος ο εξοπλισμός που

χρησιμοποιείται καθαρίζονται με αποστειρωμένο dH₂O, αιθανόλη (70%) και με το RNAase Zap το οποίο απομακρύνει αποτελεσματικά τις RNAσες.

- Ολικό RNA απομονώθηκε από HUVECs ή HUVECs επωασμένα με PMPs ή TNF-α με τη βοήθεια του Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Qiagen, τα κύτταρα ομογενοποιούνται σε 600 μl RLT buffer (προμηθεύεται από την εταιρεία και περιέχει guanidine-thiocyanate και απενεργοποιεί τις RNases) στο οποίο προσθέτουμε 6 μl β-μερκαπτοαιθανόλης.
- Το ομογενοποίημα το παίρνουμε από σύριγγα απαλλαγμένη από RNase, στην οποία είναι προσαρτημένη μικροβελόνα διαμέτρου 23 gauge για καλύτερη ομογενοποίηση του υλικού. Με φυγοκέντρηση του ομογενοποιήματος για 3 min (14.000 rpm, maximum speed), απομακρύνονται οι πυρήνες και οι μεμβράνες που δεν έχουν ομογενοποιηθεί.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται με πιπέτα Pasteur σε καινούριο σωληνάκι eppendorf και προστίθενται σ' αυτό 600 μl 70% αιθανόλη (η αιθανόλη παρέχει ευνοϊκές συνθήκες για εκλεκτική πρόσδεση του RNA στη RNeasy μεμβράνη) και ανακατεύεται χωρίς καθυστέρηση γιατί η αιθανόλη προκαλεί κατακρήμνιση μορίων.
- Το παραπάνω μείγμα μεταφέρεται στην RNeasy mini στήλη, φυγοκεντρείται για 15 sec στις 10.000 rpm. Απομακρύνεται το διάλυμα που έχει περάσει μέσα από τη μεμβράνη.
- Ακολουθούν τρία ξεπλύματα της μεμβράνης, ένα με 700 μl RW1 buffer και δύο με 500 μl RPE buffer. Ανάμεσα στα ξεπλύματα γίνεται φυγοκέντρηση για 15sec στις 10.000 rpm.
- Στη συνέχεια γίνεται η εκχύλιση του καθαρού RNA με 50 μl RNase-free H₂O και φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 rpm. Για μεγαλύτερη συγκομιδή καθαρού RNA το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά με την ίδια ποσότητα RNase-free H₂O.

Έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου mRNA με φασματοφωτομετρική ανάλυση

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Αιθανόλη (Merck)
- DEPC (Diethylpyrocarbonate, M.B. 162.14, Sigma)
- Πιπέτες (κατεργασμένες με DEPC)
- Σωληνάκια erpendorf 1.5 ml (κατεργασμένες με DEPC)
- Φασματοφωτόμετρο UV
- Κυβέτες 6Q

Διαλύματα εργασίας

- **0.2% DEPC.** 0.2 ml του DEPC αραιώνονται μέχρι τα 100 ml με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάζονται τα προς φωτομέτρηση δείγματα: α) 3 μl RNA και 597 μl 0.2 % DEPC (δείγμα) και β) 600 μl 0.2% DEPC (τυφλό). Το DEPC είναι ένα οργανικό μόριο που δεσμεύει ποσοτικά τις RNAσες και αναστέλλει ισχυρά τη δράση τους. Η μέτρηση στο δείγμα αυτό καθώς και στο τυφλό (dH₂O) πραγματοποιείται στα 260 nm και στα 280 nm σε φασματοφωτόμετρο UV. Υπολογίζεται η καθαρή απορρόφηση ($A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}$) για κάθε μήκος κύματος και προσδιορίζεται ο λόγος A_{260}/A_{280} . Όσο πιο κοντά στο 2 βρίσκεται ο λόγος, τόσο πιο καθαρό RNA έχει απομονωθεί. Τιμές μικρότερες του 1.6 υποδηλώνουν μεγάλη συγκέντρωση πρωτεϊνών στο διάλυμα του RNA, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2.2 υποδηλώνουν υψηλή συγκέντρωση DNA. Τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA σε μg/ml με βάση τον τύπο:

$$C=40 \times A_{260} \times d$$

όπου C: η συγκέντρωση του mRNA σε μg/ml

A_{260} : η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και

d: η αραίωση του δείγματος ίση με 125

40: η συγκέντρωση στην οποία αντιστοιχεί 1 O.D. διαλύματος RNA (σε ng/μl)

Τα συνολικά μg RNA υπολογίζονται με βάση τον τύπο:

$$\mu\text{g RNA} = C(\mu\text{g/ml}) \times 0.100$$

Στη συνέχεια με απλή μέθοδο των τριών υπολογίζονται τα μl του διαλύματος που πρέπει να χρησιμοποιηθούν ώστε σε αυτό να περιέχονται 5 μg RNA.

Κατεργασία του mRNA με DNAση

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)
- DNAση (DNase, 1500 Kunitz units, Qiagen)
- RNase-free H₂O
- Σωληνάκια eppendorf 1.5 και 2 ml
- Αιθανόλη (Merck)
- RNAase Zap (Applied Biosystems)
- Σύριγγα με μικροβελόνα διαμέτρου 23 gauge
- DEPC (Diethylpyrocarbonate, M.B. 162.14, Sigma)
- Πιπέτες Pasteur (κατεργασμένες με DEPC)
- Φυγόκεντρος πάγκου
- Μικροφυγόκεντρος ψυχόμενη (Eppendorf)
- Φασματοφωτόμετρο UV
- Θάλαμος νηματικής ροής

Διαλύματα εργασίας

- **70% αιθανόλη (ν/ν).** Από φιάλη με απόλυτη αιθανόλη, που δεν έχει ανοιχτεί, μεταφέρονται 70 ml σε αποστειρωμένη φιάλη των 100 ml και προσθέτονται 30 ml αποστειρωμένου dH₂O. Διατηρείται στους -20°C.
- **stock διάλυμα DNA I:** Μεταφέρουμε με τη βοήθεια σύριγγας που έχει απαλλαχθεί από τις RNAασες 550 μl RNase-free H₂O στο φιαλίδιο που περιέχει την DNA I. Αναμιγνύουμε ήρεμα ανακινώντας το. Δεν κάνουμε vortex. Διατηρείται στους -20°C για 9 μήνες σε aliquots. Τα ξεπαγωμένα aliquots αποθηκεύονται στους 2-8° C μέχρι 6 βδομάδες και δεν ξανακαταψύχονται.

Αρχή της μεθόδου

Η προσθήκη DNAσης στο mRNA, καταστρέφει τις διπλές αλυσίδες του χρωμοσωμικού DNA, που ίσως να συνυπάρχουν στο παρασκεύασμα. Η DNAση δεν καταστρέφει μονές αλυσίδες.

Πειραματική διαδικασία

- Ομογενοποιούμε το κάθε δείγμα με 600 μl 70% αιθανόλης.
- Μεταφέρουμε τα δείγματα στην RNeasy στήλη σε σωληνάκια των 2 ml και φυγοκεντρούμε για 15 s στα 8000 x g και απομακρύνουμε το διάλυμα που έχει περάσει μέσα από τη μεμβράνη.
- Προσθέτουμε 350 μl του RW1 buffer στη στήλη, φυγοκεντρούμε για 15 s στα 8000 x g και απομακρύνουμε το διάλυμα που έχει περάσει μέσα από τη μεμβράνη.
- Προσθέτουμε σε eppendorf 10 μl του stock διαλύματος DNA I σε 70 μl διαλύματος RDD και αναμιγνύουμε ανακινώντας το.

- Μεταφέρουμε 80 μ l του παραπάνω διαλύματος DNA I στη μεμβράνη της RNeasy στήλης στους 20-30° C για 15 min.
- Προσθέτουμε 350 μ l του RW1 buffer στη στήλη, φυγοκεντρούμε για 15 s στα 8000 x g και απομακρύνουμε το διάλυμα που έχει περάσει μέσα από τη μεμβράνη.
- Προσθέτουμε 500 μ l του RPE buffer στη στήλη, φυγοκεντρούμε για 15 s στα 8000 x g και απομακρύνουμε το διάλυμα που έχει περάσει μέσα από τη μεμβράνη.
- Προσθέτουμε 500 μ l του RPE buffer στη στήλη, φυγοκεντρούμε για 2 min στα 8000 x g και απομακρύνουμε το διάλυμα που έχει περάσει μέσα από τη μεμβράνη.
- Στη συνέχεια γίνεται η εκχύλιση του καθαρού RNA με 30-50 μ l RNase-free H₂O και φυγοκέντρωση για 1 min στις 10.000 rpm. Για μεγαλύτερη συγκομιδή καθαρού RNA το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά με την ίδια ποσότητα RNase-free H₂O.

Τόσο το δείγμα μετά την κατεργασία με την DNAση, όσο και το δείγμα χωρίς την κατεργασία φωτομετρούνται στα 260 nm και στα 280 nm με φασματοφωτόμετρο UV (μέτρηση RNA).

Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Υδατόλουτρο 37°C
- Μικροφυγόκεντρος
- Eppendorfs (Eppendorf)
- Απόλυτη αιθανόλη (C₂H₅OH, Merck)
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής (Class II, Type A/B3, NUAIRE)
- Αντιδραστήρια αντίστροφης μεταγραφής (αντίστροφη μεταγραφάση, ολιγονουκλεοτίδια 10mM dNTP, 0.5 μ g/ μ l oligo-dT₁₂₋₁₈, 40 U/ml RNAsine, 0.1 M

DTT, διάλυμα 5X first strand και αποστειρωμένο H₂O_{RT} (Invitrogen)). Διατηρούνται στους -20°C

Διαλύματα εργασίας

- **RT αντιδραστήρια.** Αντίστροφη μεταγραφάση (Superscript RNase H reverse transcriptase, RT), 40 U/mL RNAsine, Oligo-mix, 10 mM dNTP και 0.1 M DTT. Διάλυμα first strand 5X και αποστειρωμένο H₂O_{RT} (διατηρούνται στους -20°C, GIBCO).
- **5 μg απομονωμένο RNA.**

Πειραματική διαδικασία

Ολόκληρη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες. Ως υλικό χρησιμοποιήθηκε το mRNA των HUVECs ή το mRNA των HUVECs που είχαν επωαστεί με 1 ng/ml TNF-α ή 25 μg/ml PMPs.

Για την αντίστροφη μεταγραφή χρειάζονται 5 μg RNA που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένη ποσότητα εναιωρήματος RNA (μl). Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf και προσθέτονται 10 μl από το oligo-mix, 1 μl από την RNAsine (η οποία καταστρέφει τις RNAσες) και ο όγκος συμπληρώνεται στα 30 μl με το H₂O_{RT}. Η ανάμιξη γίνεται ήπια με την βοήθεια της αυτόματης πιπέτας. Το μίγμα του RNA, για να μετουσιωθεί, τοποθετείται στους 70°C για 5-10 min. Αμέσως μετά υποβάλλεται σε μια γρήγορη φυγοκέντρηση και αφήνεται να αποκτήσει την θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κατόπιν προσθέτονται 8 μl του διαλύματος 5X, 5 μl του 0.1 M DTT και 1 μl του dNTP. Η RT απομακρύνεται από τους -20°C και πολύ γρήγορα τοποθετείται χωρίς καμία ανάμιξη, στο παγόλουτρο. Προσθέτονται στο μίγμα του RNA 2.5 μl της RT και αναμιγνύεται με ήπια αναδιασπόρα. Τοποθετείται στους 37°C για 2 h 30 min. Το τελικό προϊόν της επώασης είναι το cDNA. Η συντήρηση του γίνεται στους -20°C.

Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (QPCR) πραγματικού χρόνου

Αντιδραστήρια-Όργανα

- RNase/DNase free H₂O (ISC/BIOXPRESS)
- SYBR Green QPCR (2X) (Fermentas) το οποίο περιέχει:
dye (φθοριόχρωμα): SYBR[®] Green I Dye
JumpStart[™] Taq πολυμεράση
Μίγμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)
ROX Passive reference (Παθητική χρωστική)
- Βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα: SYBR Green QPCR Buffer
- Ζεύγος πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή (Forward & Reverse Primer)
- Low tube Strips, WHT (Bio-Rad)
- Flat Cap Strips (Bio-Rad)
- MX 4000 θερμοκυκλοποιητής

Αρχή της μεθόδου

Μία από τις πλέον αναγνωρίσιμες γραφές στο χώρο των βιολογικών και ιατρικών επιστημών είναι τα αρχικά «PCR», η συντομογραφία δηλ. της «αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης» (Polymerase Chain Reaction, PCR), η οποία ανακαλύφθηκε από τον K. Mullis. Αποτελεί μία μέθοδο επιλεκτικής ενίσχυσης αλληλουχιών DNA *in vitro*, με αποτέλεσμα την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων πιστών αντιγράφων τους.

Η PCR αντίδραση χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία και εξειδίκευση στην ενίσχυση των αλληλουχιών, καθώς και πολύ μεγάλη ταχύτητα και απλότητα κατά την πραγματοποίησή της. Οι ιδιότητες αυτές, παράλληλα με την τεράστια διαθεσιμότητα θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών, τυποποιημένων δοκιμασιών (kits) και οργάνων από τις εταιρίες που δραστηριοποιούνται στο χώρο, έχει ως αποτέλεσμα την υιοθέτηση της PCR στη ρουτίνα τόσο των ερευνητικών όσο και των κλινικών εργαστηρίων.

Η PCR απαιτεί μια θερμοάνοχη DNA πολυμεράση, δεοξυνουκλεοτίδια όλων των βάσεων (dNTPs), την αλληλουχία στόχο και ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων γνωστά ως εκκινητές (primers), συμπληρωματικά στις δύο αλυσίδες του DNA, στα άκρα της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει. Οι κύκλοι της αντίδρασης PCR συνεχίζονται μεταξύ

μιας ιδιαίτερα υψηλής θερμοκρασίας για την αποδιάταξη της αλληλουχίας στόχου, μίας χαμηλής θερμοκρασίας, η οποία επιτρέπει την ειδική υβριδοποίηση των εκκινητών στο στόχο και μιας τρίτης θερμοκρασίας κατάλληλης για τη δράση της πολυμεράσης. Οι επαναλαμβανόμενοι θερμοκρασιακοί κύκλοι, έχουν ως αποτέλεσμα την εκθετική συσσώρευση της αλληλουχίας στόχου, η οποία θα αποτελείται από τους εκκινητές στο 5' άκρο τους και όλες τις ενδιάμεσες αλληλουχίες [451-453].

Για την ερμηνεία και την εξασφάλιση της δυνατότητας σύγκρισης των αποτελεσμάτων της μελέτης έκφρασης mRNA ενός ή περισσοτέρων γονιδίων σε κλινικά δείγματα, απαιτείται η μελέτη έκφρασης ενός τουλάχιστον γονιδίου σταθερής έκφρασης (housekeeping gene), το οποίο θα αποτελέσει το γονίδιο αναφοράς (reference gene) για τη συγκεκριμένη μελέτη [452, 454-456].

Αμέσως μετά την ανάπτυξη της PCR, πολλοί επιστήμονες διαπίστωσαν πως αν κατάφερναν να μετρήσουν την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης μετά από κάθε κύκλο, τότε η μέθοδος θα μπορούσε να γίνει ποσοτική. Μερικά από τα πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα του πραγματικού χρόνου είναι η γρήγορη λήψη αποτελεσμάτων, η μεγάλη ευαισθησία, η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η μείωση του συνολικού όγκου της αντίδρασης, η αυτοματοποίηση, η χρήση κλειστών κυκλωμάτων, η αποφυγή των μολύνσεων, η δυνατότητα πολλαπλών αντιδράσεων και η έλλειψη χειρισμών έπειτα από την αντίδραση. Η PCR αντίδραση σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) βασίζεται σε φθορίζουσες χρωστικές ή σημασμένους ιχνηθέτες που εκπέμπουν σήμα φθορισμού μόνο όταν προσδεθούν στο δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης, αντανακλώντας έτσι, στην ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος. Η ποσότητα του προϊόντος PCR που σχηματίζεται κατά την QRT-PCR ανιχνεύεται με μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υπόβαθρου, είναι γνωστός ως «οριακός κύκλος» (threshold cycle, CT) [452, 457].

Στην παρούσα μελέτη ως φθορίζουσα χρωστική χρησιμοποιήθηκε η SYBR Green I. Αυτή προσδέεται στη μικρή αύλακα του DNA, με αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού της μέχρι και 100 φορές. Πρόκειται για μια πολύ σταθερή χρωστική η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των προϊόντων στην QRT-PCR, αλλά και σε πυκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμιδίου καθώς διαθέτει μεγαλύτερη ευαισθησία από το βρωμιούχο αιθίδιο. Στην QRT-PCR, κατά την διάρκεια του σταδίου αποδιάταξης κάθε κύκλου πραγματοποιείται αποδιάταξη των δύο αλυσίδων του δίκλωνου DNA και

απελευθέρωση των μορίων της χρωστικής από αυτό. Κατά το στάδιο της επέκτασης των εκκινητών και του σχηματισμού του δίκλωνου προϊόντος της PCR, μόρια του φθοριοχρώματος SYBR Green I προσδένονται στο νεοσυντιθέμενο dsDNA, με αποτέλεσμα να αυξάνει και πάλι ο φθορισμός, το μέγεθος σήματος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης σε κάθε κύκλο [452].

Πειραματική διαδικασία

Συνθήκες ποσοτικής PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA των γονιδίων YWHA, ICAM-1, VCAM-1, GPR-78, DDIT-3, MCP-1, IL-8, COX-2, CHOP, CD14 και TF

Η προετοιμασία της αντίδρασης Real Time PCR έγινε σε ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής για αποφυγή μολύνσεων. Η αντίδραση της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή MX 4000 (Stratagene, La Jolla, CA). Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η JumpStart™ Taq πολυμεράση και ως σύστημα ανίχνευσης επιλέχθηκε αυτό της SYBR Green-I φθορίζουσας χρωστικής. Στους Πίνακες 6.1 και 6.2, 6.3 φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών των παραπάνω γονιδίων, όπως επίσης οι αναλογίες και οι συνθήκες της αντίδρασης QRT-PCR έπειτα από πειράματα βελτιστοποίησης της απόδοσης και της ειδικότητας της αντίδρασης. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από 10 μl SYBR Green-I (2X), 0.5 μl πρόσθιου εκκινητή 125 nM, 0.5 μl ανάστροφου εκκινητή 125 nM, 0.2 μl δείγματος cDNA και συμπληρώνεται με RNase/DNase free H₂O μέχρις όγκου 20 μl.

Πίνακας 6.1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα γονίδια YWHA, ICAM-1, VCAM-1, GPR-78, DDIT-3, MCP-1, IL-8, COX-2, CHOP, CD14 και TF.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία
YWHA		GCATGAAGTCTGTAACCTGAGCA TCAATACTTGAGACGACCCTCC
ICAM-1		GTCTACTGACCCCAACCCTTGA TGTACCTGGTGACCTTGAATGTG
VCAM-1		TGAGTTTTGAGAACGAACACTCTTATCT GCTTACAGTGACAGAGCTCCCATT
GPR-78		CGGGCAAAGATGTCAGGAAAG TTCTGGACGGGCTTCATAGTAG
DDIT-3		GAGCATCAGTCCCCCACTTG TATGTGGGATTGAGGGTCACATC
MCP-1	Πρόσθιος F Ανάστροφος R	TCTCGCCTCCAGCATGAAAGT GCATTGATTGCATCTGGTGA
IL-8		CCACACTGCGCCAACACA TCACTGATTCTTGGATACCACAGAGA
COX-2		CCAAGCTGTGCTTGAATAACGATAT TGGCTTCAAGACTGAGATAAAAATTAATG
CHOP		GAGCATCAGTCCCCCACTTG TATGTGGGATTGAGGGTCACATC
TF		TGGCCTCCCAAAGTGCTAGTATT ATGCACCCAATTCCTTCCAT
CD14		AACACTCGCCTGCCTTTTCCT GTTGCCAGCGCTAGATTCT

Πίνακας 6.2: Μίγμα της αντίδρασης QRT-PCR.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος (μl)</i>	<i>Συγκεντρώσεις στο μίγμα</i>
SYBR Green-I (2X)	10	1X
RNase/DNase free H₂O	7	
Πρόσθιος εκκινητής	0.5	3.1 Nm
Ανάστροφος εκκινητής	0.5	3.1 nM
Δείγμα cDNA	0.2	1 ng/μl
Σύνολο	20	

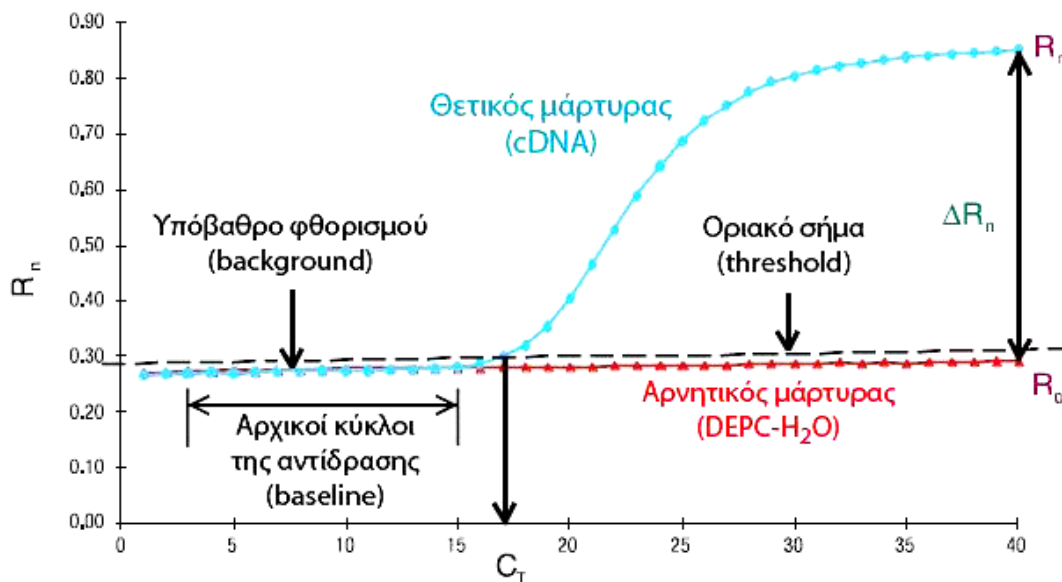
Πίνακας 6.3: Συνθήκες της αντίδρασης QRT-PCR.

<i>Στάδιο</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>Χρόνος (min)</i>
(1) Ενεργοποίηση της JumpStart™ Taq πολυμεράση	95	3
(2) Αποδιάταξη	60-95	0.5
(3) Υβριδοποίηση	95	0.5
(4) Επέκταση εκκινητών	60	1
(5) Τελικό/Επώαση	95	1

Το στάδιο (1) πραγματοποιείται για έναν κύκλο. Το στάδιο (2) για 36 κύκλους. Το στάδιο (3), (4) πραγματοποιείται για 40 κύκλους, ενώ το στάδιο (5) σε 1 κύκλο. Τα δείγματα, τα πολυμερισμένα cDNA, διατηρούνται στους 4°C.

Η ανίχνευση και η ανάλυση των προϊόντων της QRT-PCR πραγματοποιήθηκε με το σύστημα της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green-I. Μετά τα πρώτα 30 sec του σταδίου υβριδοποίησης των εκκινητών και πολυμερισμού από την DNA πολυμεράση,

κατάλληλος λαμπτήρας του οργάνου εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, διεγείροντας έτσι τις χρωστικές SYBR Green-I και ROX που περιέχονται στο μίγμα των αντιδράσεων και προκαλώντας το φθορισμό τους και μάλιστα σε διαφορετικά μήκη κύματος. Το σήμα φθορισμού ανιχνεύεται στο κατάλληλο για κάθε χρωστική φίλτρο από ειδικό ανιχνευτή. Η SYBR Green-I χρησιμοποιείται ως χρωστική ανίχνευσης και ο φθορισμός της αυξάνεται καθώς συσσωρεύεται όλο και περισσότερο προϊόν PCR (δίκλωνο DNA) με την πάροδο των θερμικών κύκλων της αντίδρασης, ενώ η ROX χρησιμοποιείται ως χρωστική παθητικής αναφοράς, για την κανονικοποίηση του σήματος της χρωστικής ανίχνευσης, έχοντας αμετάβλητο σήμα φθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια της PCR. Μετά το τέλος της PCR, ακολουθεί η ανάλυση των προϊόντων της PCR με χρήση καμπύλης τήξης, η οποία αναπαριστά το φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και δημιουργείται με συνεχή μέτρηση του φθορισμού καθώς η θερμοκρασία ανυψώνεται προοδευτικά, τα προϊόντα PCR αποδιατάσσονται και ο φθορισμός ελαττώνεται. Η αρνητική παράγωγος αυτής της καμπύλης παρουσιάζει κορυφές που αντιστοιχούν στα προϊόντα της αντίδρασης (ειδικά και μη) και η παρουσία συγκεκριμένων κορυφών φανερώνει ότι έχει προηγηθεί μια απόλυτα ειδική ή όχι αντίδραση ενίσχυσης.



Εικόνα 6.3: Σχηματική αναπαράσταση μιας τυπικής καμπύλης QTR-PCR [458].

Τέλος, η διαδικασία ολοκληρώνεται με τον προσδιορισμό του CT για κάθε δείγμα. Αυτό πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή του οργάνου της RT-PCR και προσφέρει τη δυνατότητα επιλογής του επιπέδου «Threshold», τόσο αυτόματα με τη βοήθεια ειδικών αλγορίθμων του λογισμικού, όσο και από τον ίδιο τον ερευνητή. Αφού προσδιοριστούν με βάση τις καμπύλες τήξης, οι θέσεις εκείνες όπου παρατηρείται σχηματισμός διμερών εκκινητών και/ή μη ειδικών προϊόντων, αποκλείονται από την περαιτέρω ανάλυση. Η ανάλυση παρέχει για κάθε δείγμα τις τιμές CT, τη μέση τιμή και τα τυπικά σφάλματά τους καθώς και τη σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου-στόχου ως προς το γονίδιο αναφοράς.

Για του στόχους της συγκεκριμένης διατριβής χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το YWHA και μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων-στόχων ICAM-1, VCAM-1, GPR-78, DDIT-3, MCP-1, IL-8, COX-2, CHOP, TF και CD14. Το σχετικό επίπεδο έκφρασης μεταξύ του δείγματος 1 (control) και του δείγματος 2 (αυτό που μελετάμε) υπολογίζεται με βάση τη φόρμουλα:

$$2^{-(CT1-CTYWHA1)-(CT2-CTYWHA2)}$$

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS 16.0. Οι τιμές εκφράστηκαν ως η μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (SD). Η σύγκριση των τιμών έγινε χρησιμοποιώντας το student's t-test. Σε κάθε περίπτωση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε ως $P < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

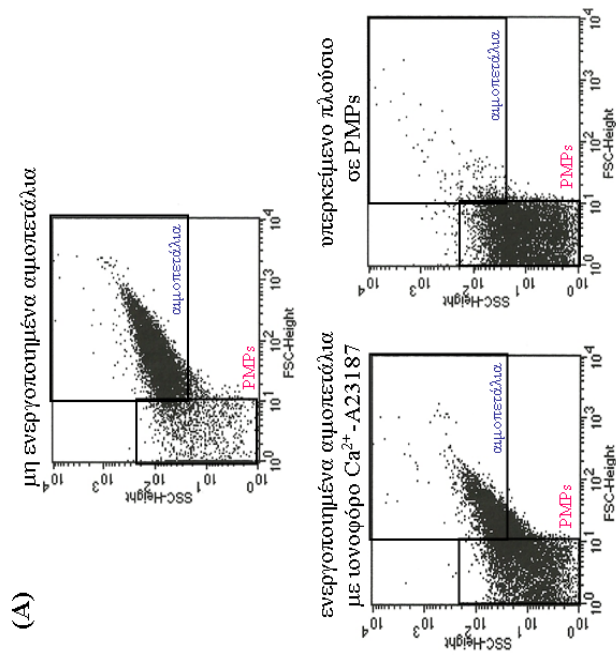
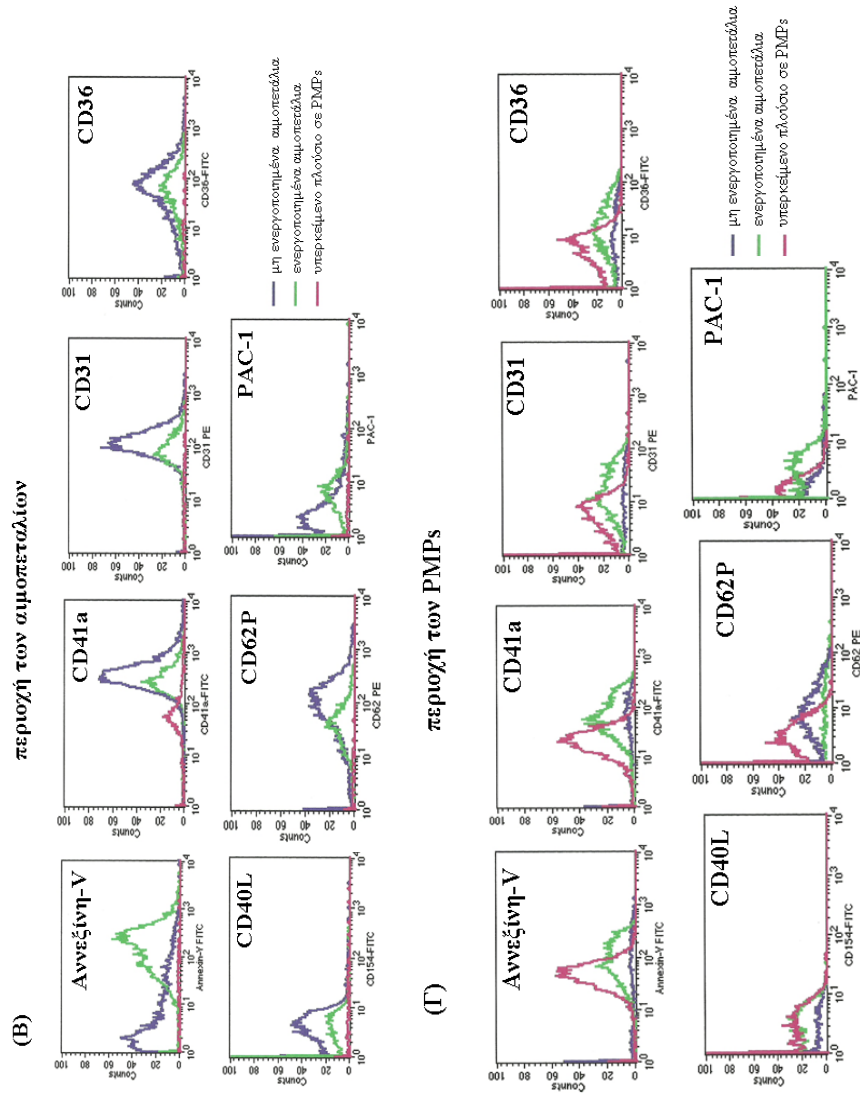
Αποτελέσματα

Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των PMPs που παράγονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

Αρχικά παρασκευάστηκαν πλυμένα αιμοπετάλια, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία, από δείγματα αίματος νορμολιπιδαιμικών ατόμων που δεν είχαν πάρει αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο για τουλάχιστον 14 ημέρες. Στη συνέχεια έγινε η ενεργοποίησή τους με διάφορους αγωνιστές και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των υπερκειμένων πλούσιων σε PMPs. Η χρήση των διαφόρων αγωνιστών έγινε προκειμένου να μελετήσουμε τις διάφορες πορείες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την παραγωγή των PMPs, αφού κάθε αγωνιστής είναι πιθανόν να προκαλεί και διαφορετική έκφραση των διαφόρων μεμβρανικών υποδοχέων αλλά και προσκολλητικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs. Με βάση μελέτες *in vitro*, η ισχύς των αγωνιστών όσον αφορά την ικανότητά τους να επάγουν το σχηματισμό PMPs ακολουθεί την εξής σειρά: ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 > C5b9-του συστήματος του συμπληρώματος > συνδυασμός θρομβίνης και κολλαγόνου > θρομβίνη ή κολλαγόνο > επινεφρίνη ή ADP [116].

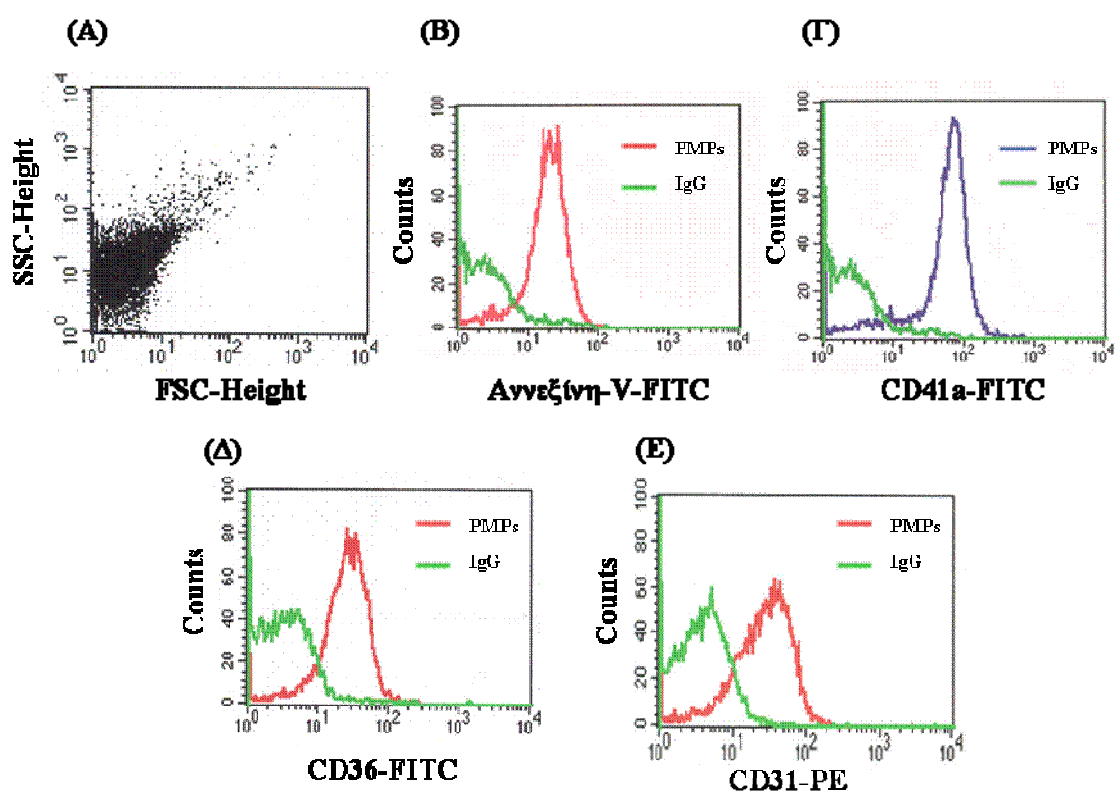
Στα αρχικά μας πειράματα, χρησιμοποιήσαμε ως αγωνιστές 10 μM ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, ή 0.2 U/ml θρομβίνη ή το συνδυασμό 0.1 U/ml θρομβίνης + 4 $\mu\text{g/ml}$ κολλαγόνου προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό παράγωγης των PMPs κάτω από διαφορετικές συνθήκες ενεργοποίησης. Ως χρόνο ενεργοποίησης επιλέχθηκαν τα 30 min για την μέγιστη παραγωγή των PMPs. Αρχικά παρασκευάστηκαν PMPs κατόπιν ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με 10 μM ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, που σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία αποτελεί τον καλύτερο αγωνιστή για την παραγωγή μικροσωματιδίων. Η λειτουργικότητα

των αιμοπεταλίων δεν επηρεάστηκε από τον οργανικό διαλύτη διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO), στον οποίο γίνεται η ανασύσταση του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187. Στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε η συγκέντρωση του DMSO δεν ξεπέρασε το 1% (v/v) στο διάλυμα των αιμοπεταλίων. Παρατηρήθηκε με βάση τα ιστογράμματα FSC vs SSC, ότι σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, υπήρχε χρονο-εξαρτώμενη αύξηση των συμβάντων (events) στην περιοχή των PMPs (*Εικόνα 7.1A*). Έπειτα, απομακρύνοντας με φυγοκέντρηση τα υπολείμματα των αιμοπεταλίων, παραλαμβάνεται ένα υπερκείμενο πλούσιο σε PMPs, όπως αυτό επιβεβαιώνεται από την *Εικόνα 7.1A* της κυτταρομετρίας ροής. Η περιοχή των PMPs χαρακτηρίζεται από μικρά σε μέγεθος σωματίδια και θετική έκφραση ως προς την Αννεξίνη-V. Η πρόσδεση της Αννεξίνης-V, που αναγνωρίζει στην εξωτερική επιφάνεια τα αρνητικά φωσφολιπίδια (όπως είναι η PS) των PMPs, επιβεβαιώνει ότι ο πληθυσμός που βρίσκεται στην περιοχή των PMPs είναι μικροσωματίδια [148, 459]. Επίσης, τα PMPs χαρακτηρίστηκαν και ως προς την έκφραση διαφόρων χαρακτηριστικών πρωτεϊνών που εκφράζουν τα αιμοπετάλια. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 7.1B και Γ*, τα PMPs εκφράζουν το CD41a που αναγνωρίζει την α_{IIb} υπομονάδα του υποδοχέα $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Επιπρόσθετα, τα PMPs είναι εμπλουτισμένα στον υποδοχέα εκκαθαριστή (scavenger receptor) CD36 που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την πρόσληψη της oxLDL και στο προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων CD31 (PECAM-1). Η μέση ένταση φθορισμού ως προς την έκφραση του CD62P (αντίσωμα που αναγνωρίζει την P-σελεκτίνη), του CD40L και του PAC-1 (αναγνωρίζει τον ενεργοποιημένο υποδοχέα) που αποτελούν χαρακτηριστικά αντιγόνα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και θα περιμέναμε να εκφράζονται στα ενεργοποιημένα με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 αιμοπετάλια και στην μεμβράνη των PMPs ήταν αμελητέα γεγονός που εξηγείται από το ότι το ιονοφόρο ασβεστίου A23187 προκαλεί αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και όχι έκκριση των περιεχομένων των α - και πυκνών κοκκίων τους και συσσώρευση.



Εικόνα 7.1: (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρικής ροής όπου φαίνονται τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων για 30 min με 10 μ M ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 και το υπερκείμενο πλόσσο σε PMPs. (B) Χαρακτηρισμός της περιοχής των αιμοπεταλίων παρουσία των φορτισμένων αντισωμάτων της Annexin-V, του CD41a, του CD31, του CD36, του CD62P, του CD40L και του PAC-1. (Γ) Χαρακτηρισμός της περιοχής των PMPs παρουσία των παραπάνω φορτισμένων αντισωμάτων.

Στη συνέχεια το πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο επιστοιβάζεται σε διάλυμα 20% σουκρόζης και μετά υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση. Μετά την φυγοκέντρηση συλλέγεται η πάνω στοιβάδα που είναι πλούσια σε PMPs και υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρηση. Το ίζημα που προκύπτει μετά από την υπερφυγοκέντρηση αναδιασπείρεται σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM PBS pH 7.4. Ακολουθεί ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και φύλαξη στους 4°C, υπό N₂, μέχρι μια βδομάδα. Στην *Εικόνα 7.2* φαίνεται το κυτταρομετρικό προφίλ των απομονωμένων PMPs.



Εικόνα 7.2: Χαρακτηριστικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται (Α) ο πληθυσμός των PMPs μετά από υπερφυγοκέντρηση, (Β) η έκφραση της Αννεξίνης-V, (Γ) του CD41a, (Δ) του CD36 και (Ε) του CD31 σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (IgG).

Κατόπιν μελετήθηκε η έκφραση της Αννεξίνης-V και των παραπάνω αντιγόνων στα PMPs που παρήχθησαν κατόπιν ενεργοποίησης με 0.2 U/ml θρομβίνη ή το συνδυασμό 0.1 U/ml θρομβίνης + 4 μg/ml κολλαγόνου που προκαλούν την έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων και τη συσσώρευσή τους. Όσον αφορά την έκφραση των παραπάνω αντιγόνων και την πρόσδεση της Αννεξίνης-V στα PMPs, βρέθηκε ότι είναι παρόμοια σε σχέση με αυτή των PMPs που παράγονται με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του CD62P, του CD40L και του PAC-1 στο εναιώρημα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων ήταν σημαντική, σε αντίθεση με αυτή των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187. Επιπρόσθετα, στο πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο η έκφραση τους ήταν μικρή, ενώ πάνω στην μεμβράνη των PMPs κατόπιν υπερφυγοκέντρωσης του εναιωρήματος ήταν αμελητέα, γεγονός που φανερώνει ότι τόσο το CD62P όσο και CD40L που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με θρομβίνη ή το συνδυασμό θρομβίνης + κολλαγόνου είναι διαλυτό και όχι συνδεδεμένο με τα PMPs. Στον Πίνακα 7.1 φαίνονται οι διαφορές στα διάφορα αντιγόνα και στην Αννεξίνη-V που εκφράζονται σε PMPs που παράγονται σύμφωνα με τις τρεις παραπάνω συνθήκες ενεργοποίησης.

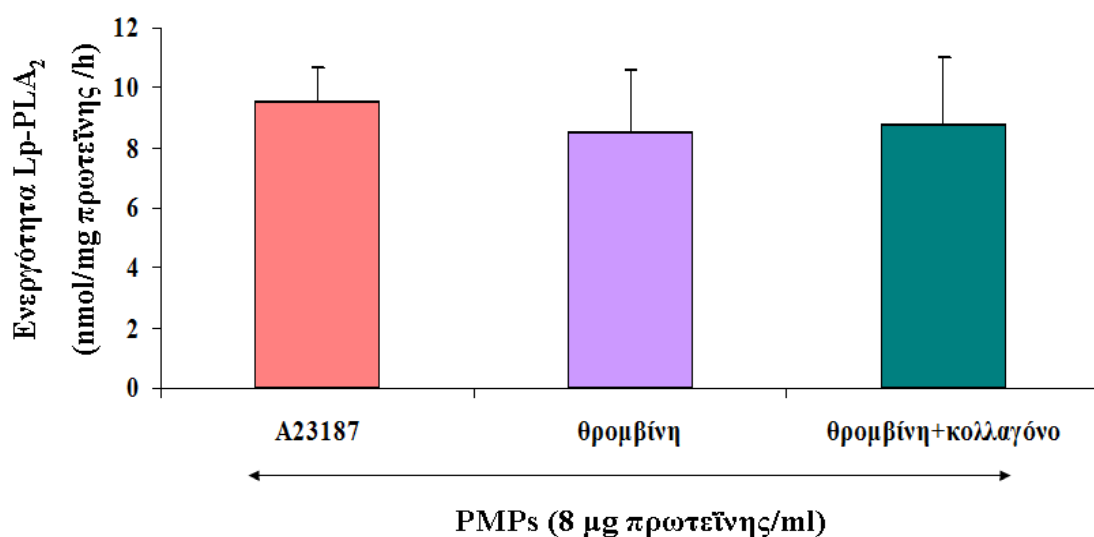
Σύμφωνα με εργασία του εργαστηρίου μας, τα PMPs της κυκλοφορίας είναι φορείς της Lp-PLA₂ του πλάσματος [414]. Η ύπαρξη της Lp-PLA₂ στα PMPs μπορεί να έχει παθοφυσιολογική σημασία σε συνδυασμό με τους υποδοχείς και τα άλλα βιοδραστικά μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των σωματιδίων αυτών άλλα και ως προς το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά λιπίδια όπως ο PAF, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και στην αθηρογένεση [415]. Γι' αυτό το λόγο, προσδιορίστηκε η ενεργότητα της Lp-PLA₂ στα PMPs που παρήχθησαν και με τους τρεις παραπάνω ενεργοποιητές, προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στην έκφρασή της. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 100 μM ³H-PAF και η πηγή του ενζύμου είναι 8 μg πρωτεΐνης PMPs/ml. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ενεργότητα της LP-PLA₂ στα PMPs που παρήχθησαν και με τους τρεις ενεργοποιητές ήταν παρόμοια (Εικόνα 7.3).

Ο τρόπος παραγωγής των PMPs ο οποίος τελικά επιλέχθηκε για τα περαιτέρω πειράματα, ήταν διαμέσου του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187 που σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία αποτελεί τον καλύτερο αγωνιστή για την παραγωγή MPs [116].

Πίνακας 7.1: Οι διαφορές στην Ανεξίνη-V και σε διάφορα αντιγόνα (ως προς την μέση ένταση φθορισμού, MFI) που εκφράζονται σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, σε υπερκείμενα πλούσια σε RMPs και σε RMPs μετά από υπερφυοκέντρηση. Ως αγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν 10 μM ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, ή 0.2 U/ml θρομβίνη ή ο συνδυασμός 0.1 U/ml θρομβίνης + 4 μg/ml κολλαγόνου.

Μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια	ενεργοποιημένα αιμοπετάλια		υπερκείμενο πλούσιο σε RMPs		RMPs μετά από υπερφυοκέντρηση	
	A23187	θρομβίνη + κολλαγόνο	A23187	θρομβίνη + κολλαγόνο	A23187	θρομβίνη + κολλαγόνο
Ανεξίνη-V	23.8±11.9	57.1±21.2	40.2±10.8	34.0±11.3	36.0±8.2	38.0±4.8
CD41a	189.7±37.7	176.0±46.8	57.7±14.7	37.8±11.4	76.4±9.5	63.3±12.7
CD36	116.4±42.4	81.4±27.6	76.4±30.4	26.2±3.7	23.6±6.1	20.9±3.5
CD31	123.9±2.7	76.8±11.0	23.1±5.3	21.9±3.8	30.3±10.3	29.9±6.8
CD40L	3.7±0.7	43.4±9.0	2.3±0.5	3.3±1.8	2.6±0.4	2.9±0.5
CD62P	23.4±3.4	39.8±9.8	5.0±1.8	4.4±1.2	5.4±1.4	5.4±0.8
PAC-1	5.5±1.2	45.5±12.7	1.9±0.4	2.3±0.8	3.2±1.1	2.4±0.5

Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από 3 πειράματα

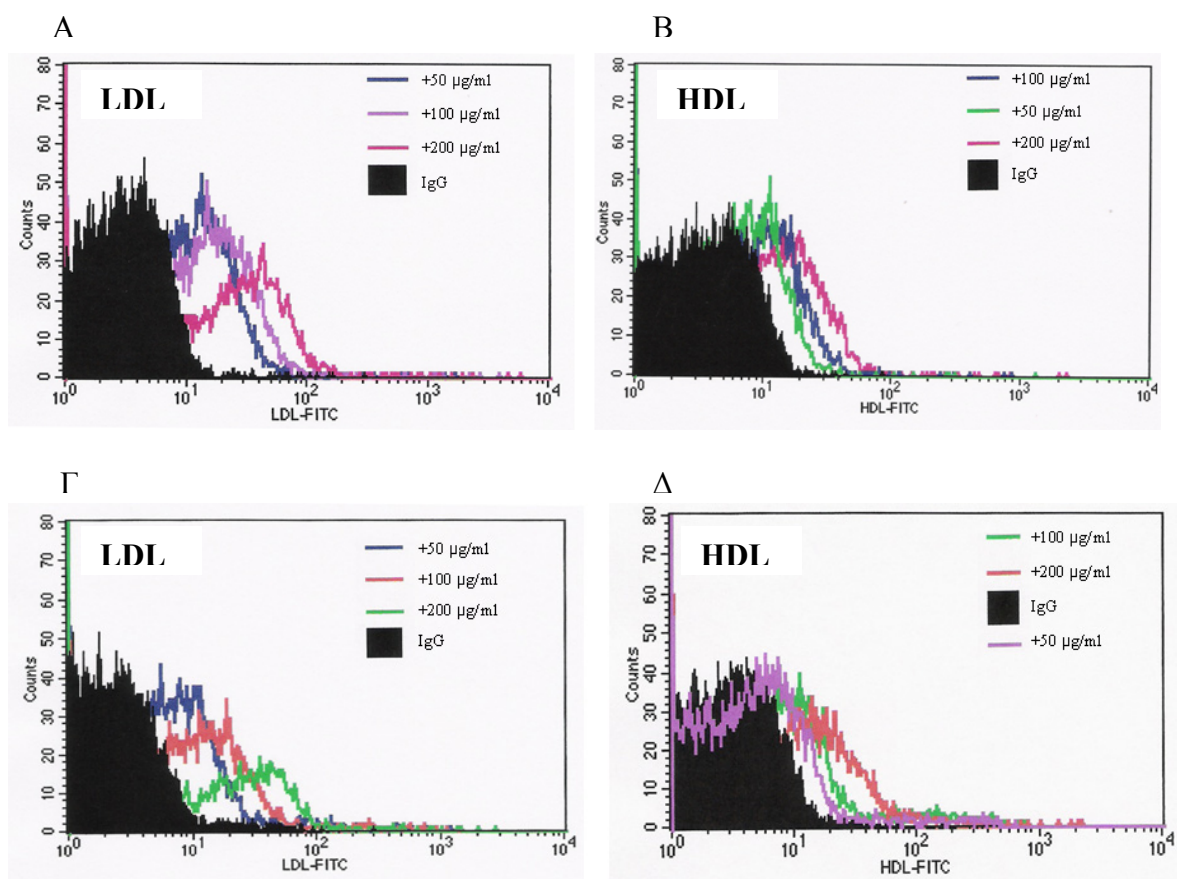


Εικόνα 7.3: Η ενεργότητα της Lp-PLA₂ σε PMPs που παράγονται είτε με 10 µM ιονοφόρο Ca²⁺-A23187, είτε με 0.2 U/ml θρομβίνη είτε με το συνδυασμό 0.1 U/ml θρομβίνης + 4 µg/ml κολλαγόνου. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από 3 πειράματα. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 100 µM ³H-PAF και η πηγή του ενζύμου είναι 8 µg πρωτεΐνης PMPs/ml.

Η σύνδεση των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τις οξειδωμένες μορφές τους in vitro

Αρχικά μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής η πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος σε αιμοπετάλια χρησιμοποιώντας LDL και HDL επισημασμένες με FITC. Η επισήμανση των λιποπρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφουν οι Smythe et al. [436]. Κατόπιν τα αιμοπετάλια (250.000 αιμοπετάλια/µl) επώαστηκαν με LDL-FITC ή HDL-FITC σε διάφορες δόσεις από 5-300 µg/ml για 1h στους 37° C. Παρατηρήθηκε με βάση τα ιστογράμματα η αύξηση της MFI προς τα δεξιά όπως απεικονίζεται στην *Εικόνα 7.4 A και B* και μάλιστα κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο αποδεικνύοντας έτσι την πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στα αιμοπετάλια. Σε δόσεις άνω των 200 µg πρωτεΐνης/ml παρατηρήθηκε υψηλό background με αποτέλεσμα να υπάρχει πρόβλημα στην ανάλυση αυτών των δειγμάτων με την κυτταρομετρία ροής. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το IgG-FITC καθώς και μόνο του το FITC των οποίων η πρόσδεση ήταν αμελητέα.

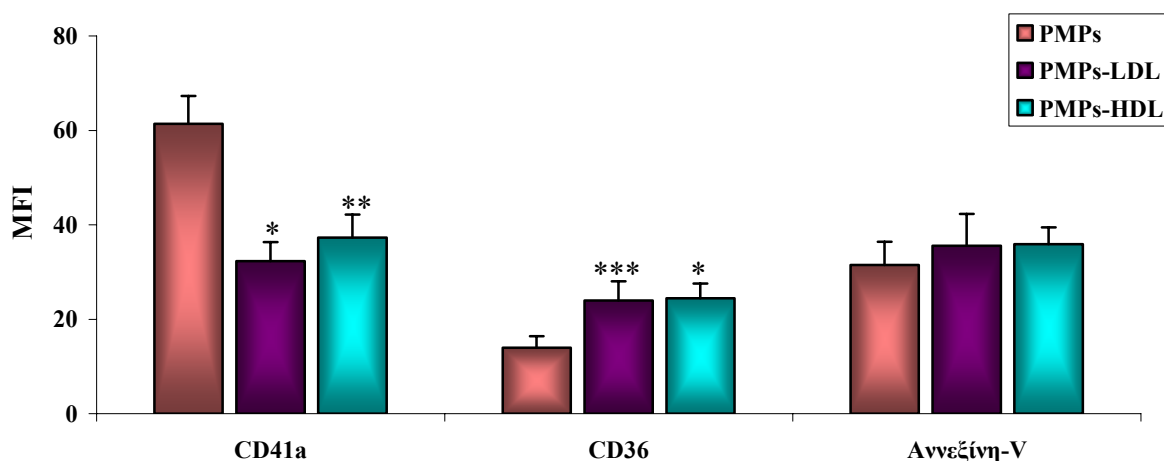
Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε όταν τα PMPs (100μg/ml) επώαστηκαν με την LDL-FITC ή την HDL-FITC στις ίδιες δόσεις υπό τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες (Εικόνα 7.4 Γ και Δ).



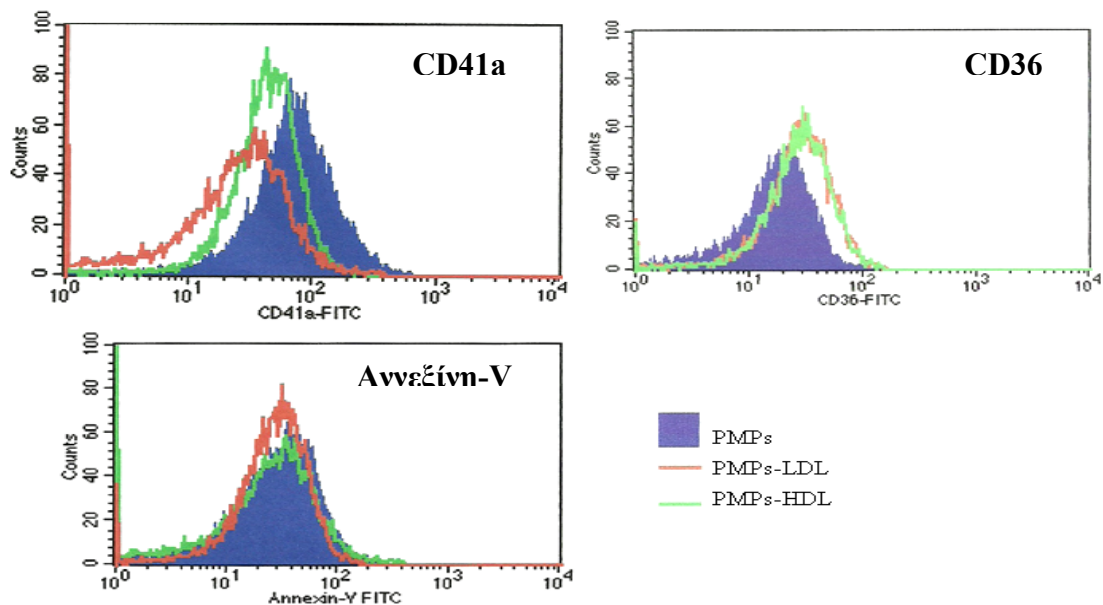
Εικόνα 7.4: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν την δόσο-εξαρτώμενη πρόσδεση της LDL-FITC ή HDL-FITC στα πλυμένα αιμοπετάλια (250.000 αιμοπετάλια/μl) (A, B) και στα PMPs (100 μg πρωτεΐνης/ml) αντίστοιχα (Γ, Δ).

Σε μερικά πειράματα, τα PMPs (100 μg/ml) επώαστηκαν με τις μη φθορισμένες λιποπρωτεΐνες, LDL και HDL, σε συγκέντρωση 100 μg/ml κάτω από τις ίδιες συνθήκες και μελετήθηκε η έκφραση του CD41a, του CD36 και της δέσμευσης της αννεξίνης-V με κυτταρομετρία ροής. Αυτό έγινε για να διασαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα PMPs αλληλεπιδρούν με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.5, η παρουσία τόσο της LDL όσο και της HDL επηρεάζει την έκφραση του CD41a και του CD36, ενώ η πρόσδεση της αννεξίνης-V στα PMPs παραμένει η ίδια. Συγκεκριμένα, η

πρόσδεση τόσο της LDL όσο και της HDL, μείωσε σημαντικά την έκφραση του CD41a των PMPs κατά 47.4% και 39.3% αντίστοιχα ($P=0.02$ και $P=0.01$ αντίστοιχα), ενώ η έκφραση του CD36 των PMPs αυξήθηκε κατά 72% και 75.4% αντίστοιχα ($P=0.04$ και $P=0.02$ αντίστοιχα). Στην *Εικόνα 7.6* φαίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής της έκφρασης του CD41a και του CD36 και της πρόσδεσης της Αννεξίνης-V κατά την αλληλεπίδραση των PMPs με τις παραπάνω λιποπρωτεΐνες.



Εικόνα 7.5: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση των PMPs (100 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα) με την LDL ή την HDL (100 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα) επηρεάζει την έκφραση του CD41a και του CD36, ενώ η έκφραση της Αννεξίνης-V-FITC παραμένει η ίδια. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση από 5 πειράματα (* $P=0.02$, ** $P=0.01$ και *** $P=0.04$).

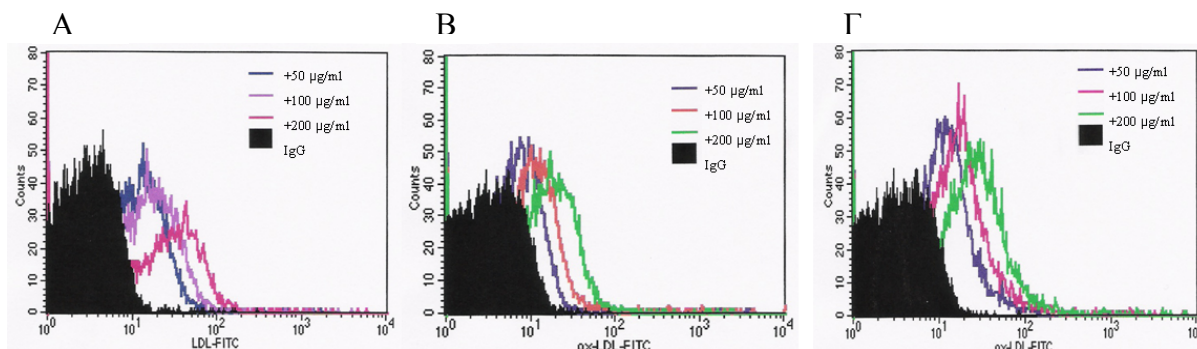


Εικόνα 7.6: Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση των PMPs (100 µg/ml αντίστοιχα) με την LDL ή την HDL (100 µg/ml αντίστοιχα) επηρεάζει την έκφραση του CD41a και του CD36, ενώ η έκφραση της Annexίνης-V-FITC παραμένει η ίδια.

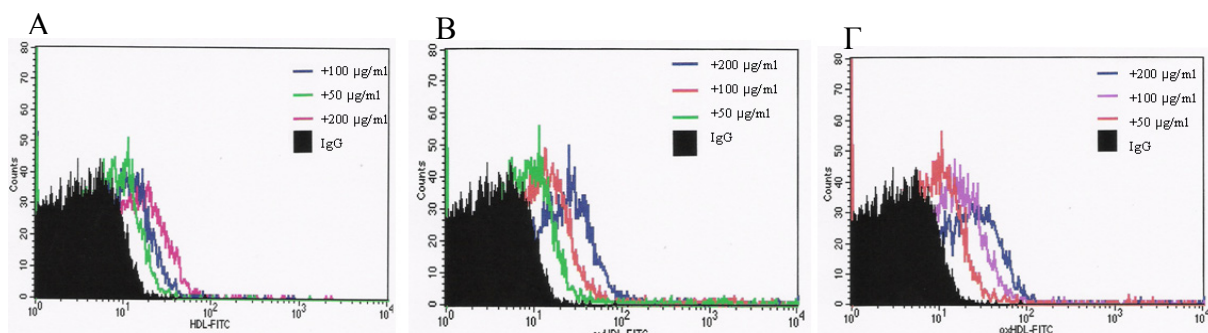
Κατόπιν προχωρήσαμε στη μελέτη της σύνδεσης των οξειδωμένων μορφών των λιποπρωτεϊνών στα PMPs χρησιμοποιώντας ως θετικό control τα αιμοπετάλια (Εικόνες 7.7-7.10). Αρχικά, επισημίναμε τις λιποπρωτεΐνες με το FITC, όπως προηγουμένως, και μετά προχωρήσαμε στην οξείδωσή τους με 5µM CuSO₄ για 3h και 24h προκειμένου να μελετήσουμε τις διαφορές μεταξύ των μετρίως ή εκτενώς οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών. Ο έλεγχος της οξειδωτικής τροποποίησης των επισημασμένων με FITC λιποπρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα αγαρόζης όπου προσδιορίστηκε η σχετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα (REM). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τη σύνδεση των λιποπρωτεϊνών με τα PMPs όταν χρησιμοποιήθηκαν οι οξειδωμένες μορφές τους. Αντίθετα, η πρόσδεση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στα πλυμένα αιμοπετάλια ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε με τις φυσικές μορφές των λιποπρωτεϊνών (Πίνακας 7.2). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των 3h και των 24h οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών κατά τη σύνδεσή τους τόσο με τα PMPs όσο και με τα πλυμένα αιμοπετάλια.

Πίνακας 7.2: Η σύνδεση των φυσικών και των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στα πλυμένα αιμοπετάλια και τα PMPs εκφρασμένη ως MFI.

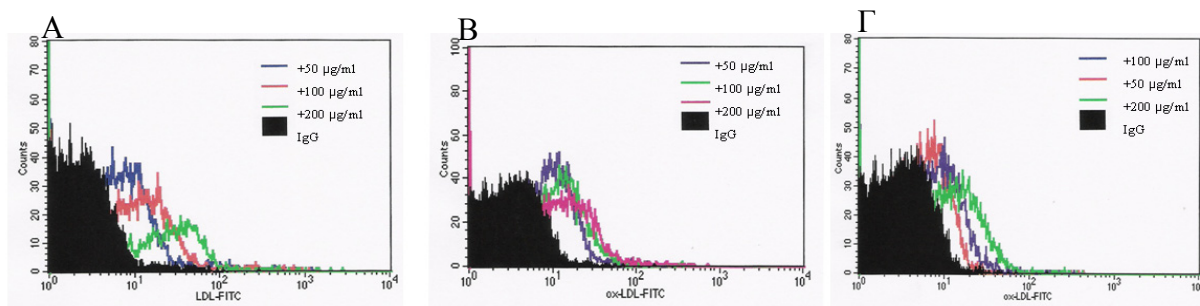
	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$)	Πλυμένα αιμοπετάλια (250.000 αιμ./ μl) (MFI)	PMPs (100 $\mu\text{g/ml}$) (MFI)
LDL	50	3.42	4.93
	100	10.4	11.37
	200	21.46	18.80
oxLDL-FITC (3h)	50	11.40	4.03
	100	26.42	10.52
	200	49.73	22.52
oxLDL-FITC (24h)	50	13.31	3.45
	100	30.50	15.13
	200	50.64	23.05
HDL	50	4.97	4.58
	100	11.7	11.73
	200	22.34	21.2
oxHDL-FITC (3h)	50	12.9	2.79
	100	27.78	10.27
	200	41.62	20.3
oxLDL-FITC (24h)	50	14.98	3.00
	100	32.61	17.18
	200	40.21	23.24



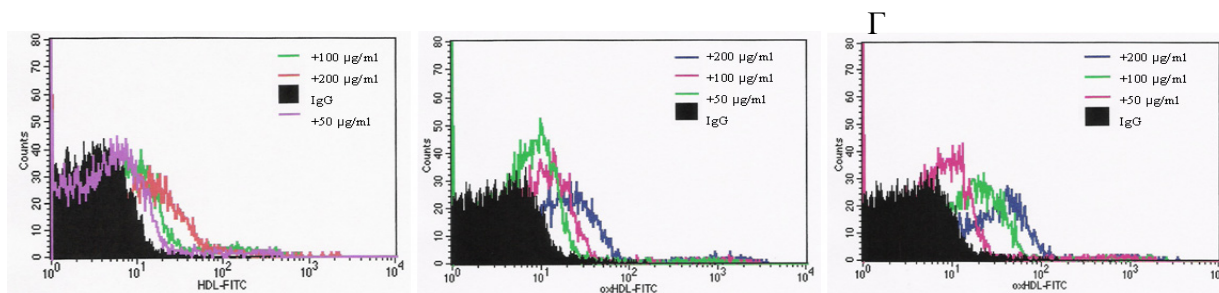
Εικόνα 7.7: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν την δοσοεξαρτώμενη πρόσδεση της LDL-FITC (A) και της οξειδωμένης LDL-FITC για 3 h και 24 h (B, Γ αντίστοιχα) στα αιμοπετάλια.



Εικόνα 7.8: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν την δοσοεξαρτώμενη πρόσδεση της HDL-FITC (A) και της οξειδωμένης HDL-FITC για 3 h και 24 h (B, Γ αντίστοιχα) στα αιμοπετάλια.



Εικόνα 7.9: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν την δοσοεξαρτώμενη πρόσδεση της LDL-FITC (A) και της οξειδωμένης LDL-FITC για 3 h και 24 h (B, Γ αντίστοιχα) στα PMPs.



Εικόνα 7.10: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν την δοσοεξαρτώμενη πρόσδεση της HDL-FITC (A) και της οξειδωμένης HDL-FITC για 3 h και 24 h (B, Γ αντίστοιχα) στα PMPs.

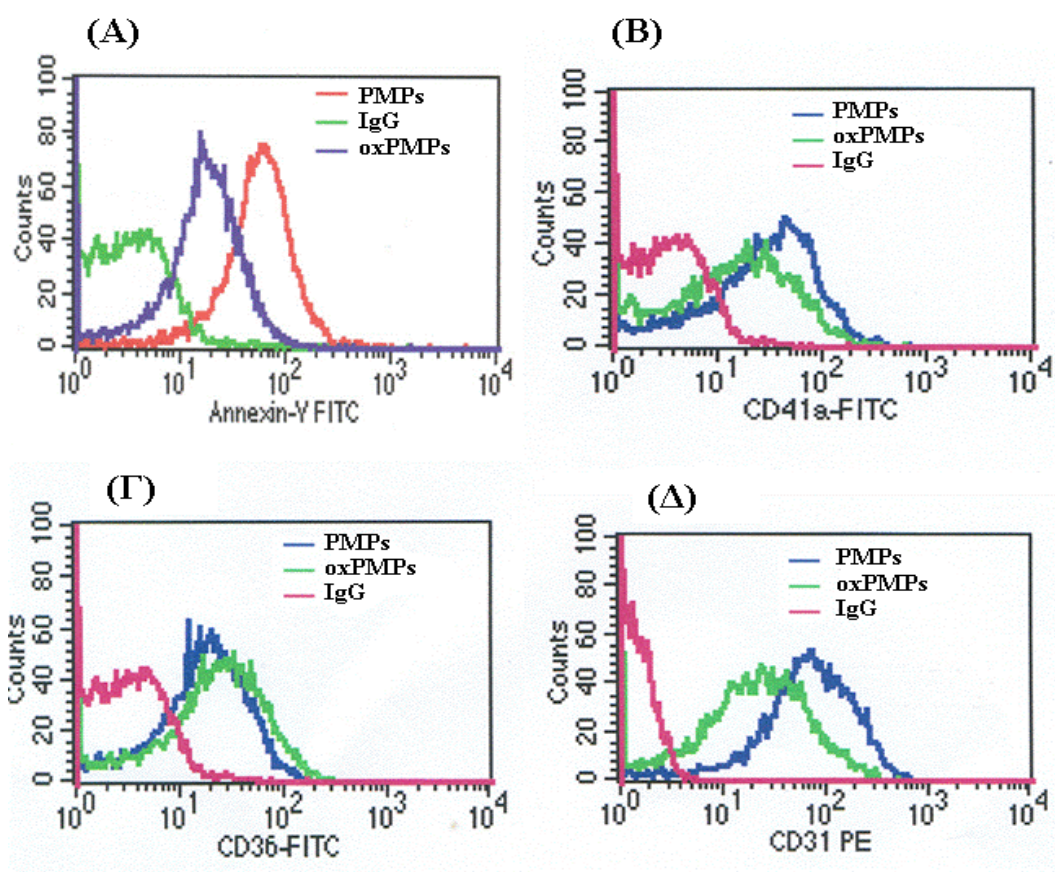
Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα PMPs in vitro

Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs *in vitro*, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 3 συστήματα οξείδωσης, ένα με μεταλλικά ιόντα και συγκεκριμένα με τον χαλκό, ένα με την MPO που προσεγγίζει τις συνθήκες οξείδωσης *in vivo* και ένα με απευθείας επίδραση σε NaOCl. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα Cu^{2+} μπορούν να οξειδώσουν ταχύτατα πολλά σωματίδια και έχει δειχθεί η ύπαρξη ελεύθερου χαλκού σε περιοχές προχωρημένης αθηρωμάτωσης, ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της αθηρωμάτωσης. Η MPO είναι ένα ένζυμο το οποίο απελευθερώνεται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα ύστερα από φλεγμονώδη διέγερση, καταλύοντας το σχηματισμό ενός ισχυρού οξειδωτικού, του HOCl χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα H_2O_2 και ιόντα Cl^- . Η απευθείας επίδραση σε NaOCl έγινε προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στην οξειδωτική τροποποίηση των PMPs, σε σχέση με το σύστημα της MPO, εξαιτίας περιορισμένης διαθεσιμότητας του ενζύμου ή της περιορισμένης δράσης του να καταλύσει το σχηματισμό του HOCl [276, 460].

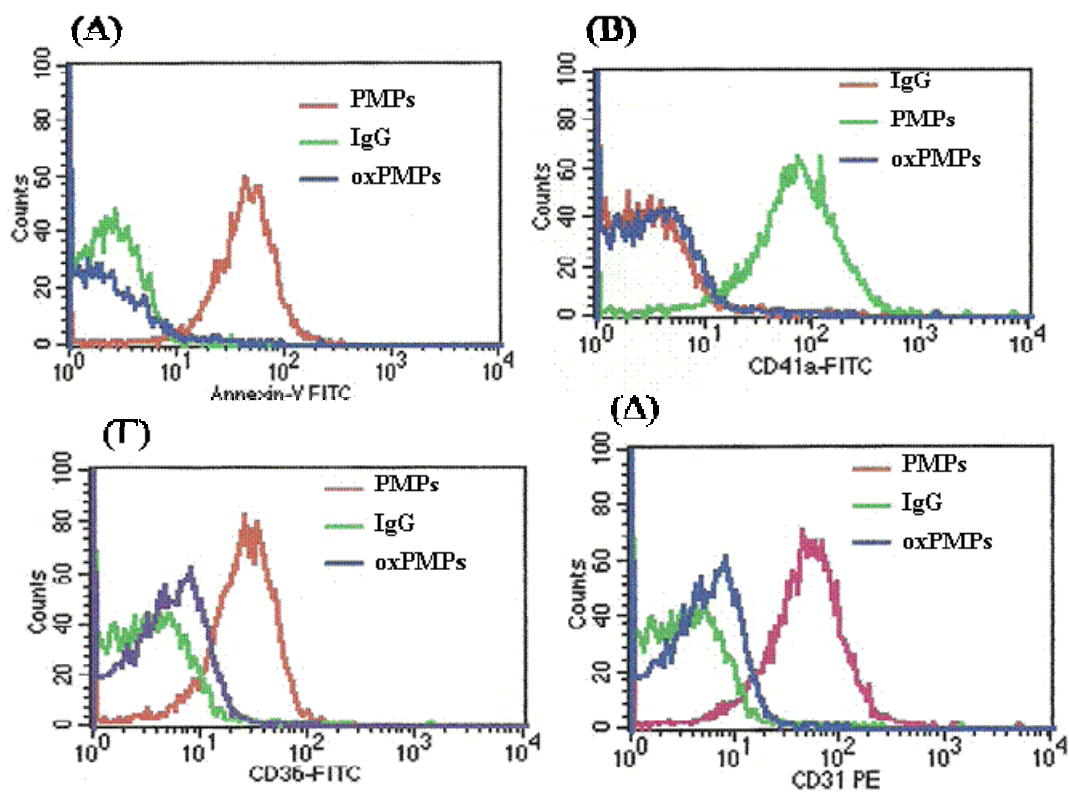
Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs με τον χαλκό πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση 100 μg πρωτεΐνης/ml PMPs με 5 μM CuSO_4 για 3h, 6h ή 24h. Η οξείδωση με το σύστημα της MPO πραγματοποιήθηκε επίσης στους 37°C με επώαση 100 μg πρωτεΐνης/ml PMPs με 0.5 $\mu\text{g/ml}$ MPO, 50 μM DTPA, 50 mM PBS (pH 7.4) και 50 μM H_2O_2 για 1h ή 3h. Το μίγμα της αντίδρασης προ-επωάστηκε στους 37°C για 10 min πριν την προσθήκη του H_2O_2 . Το DTPA χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μειώσει την background οξείδωση από μεταλλικά ιόντα που τυχόν έχουν επιμολύνει την ανάλυσή μας [437]. Τέλος, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs με το αντιδραστήριο του NaOCl πραγματοποιήθηκε στους 4°C με επώαση 100 μg πρωτεΐνης/ml PMPs με 0.2-1.6 mM NaOCl για 1h. Ο έλεγχος της οξείδωσης των PMPs πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής, με τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου LP-PLA₂, τη μέτρηση των καταλοίπων των λυσινών, με HPTLC καθώς και με SDS-PAGE 5-19 %.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής, κατά την οξείδωση με χαλκό στις 3h, παρατηρείται μια μείωση της πρόσδεσης της Αννεξίνης-V (που αναγνωρίζει την PS) κατά 50% στα οξειδωμένα PMPs. Πιθανώς αυτή η μείωση να αποτελεί ένα δείκτη οξείδωσης των PMPs. Επίσης, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs

δεν επηρέασε την έκφραση του CD41a, του CD36 και του CD31 στην επιφάνεια των PMPs (Εικόνα 7.11). Στις 6h οξείδωσης δεν παρατηρήθηκαν περαιτέρω διαφορές. Αντίθετα, στις 24h επώαση μειώνεται δραστικά τόσο η έκφραση των παραπάνω αντιγόνων όσο και η πρόσδεση της Αννεξίνης-V (Εικόνα 7.12).

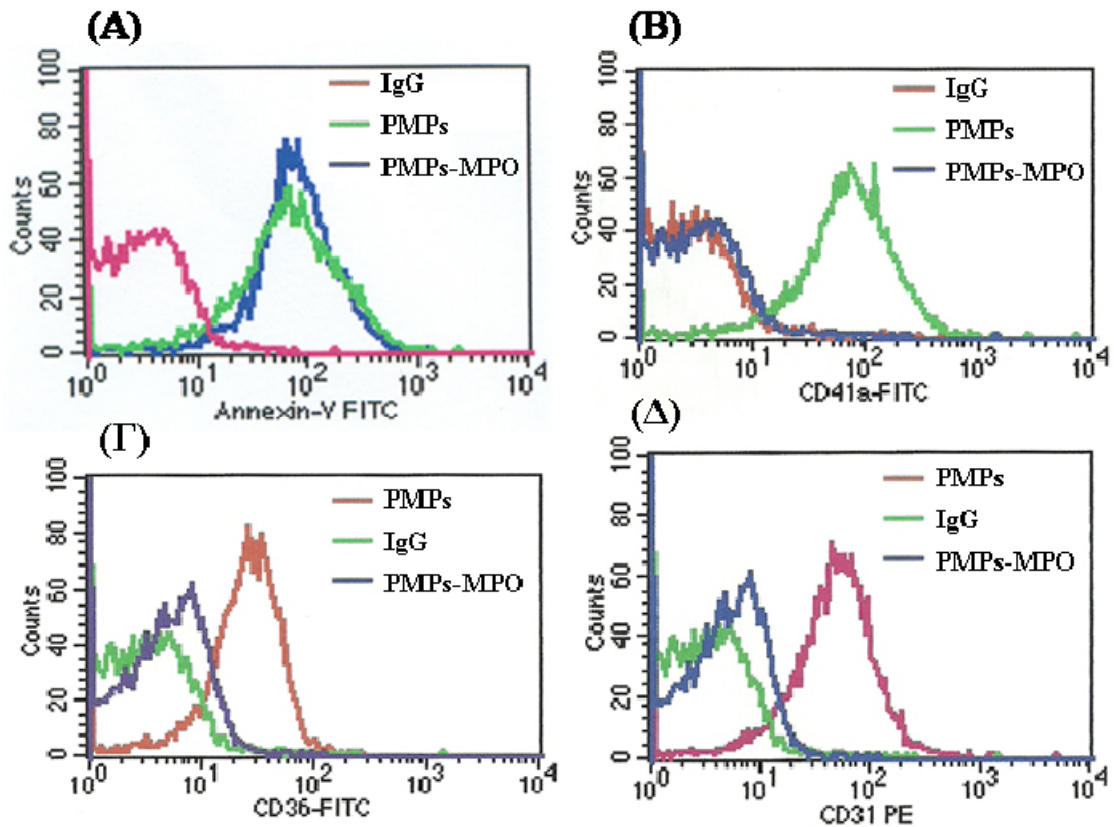


Εικόνα 7.11: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν την επίδραση της οξειδωτικής τροποποίησης των PMPs με CuSO_4 για 3h στην πρόσδεση της Αννεξίνης-V (Α) και της έκφρασης του CD41a (Β), του CD36 (Γ) και του CD31 (Δ) σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (IgG).



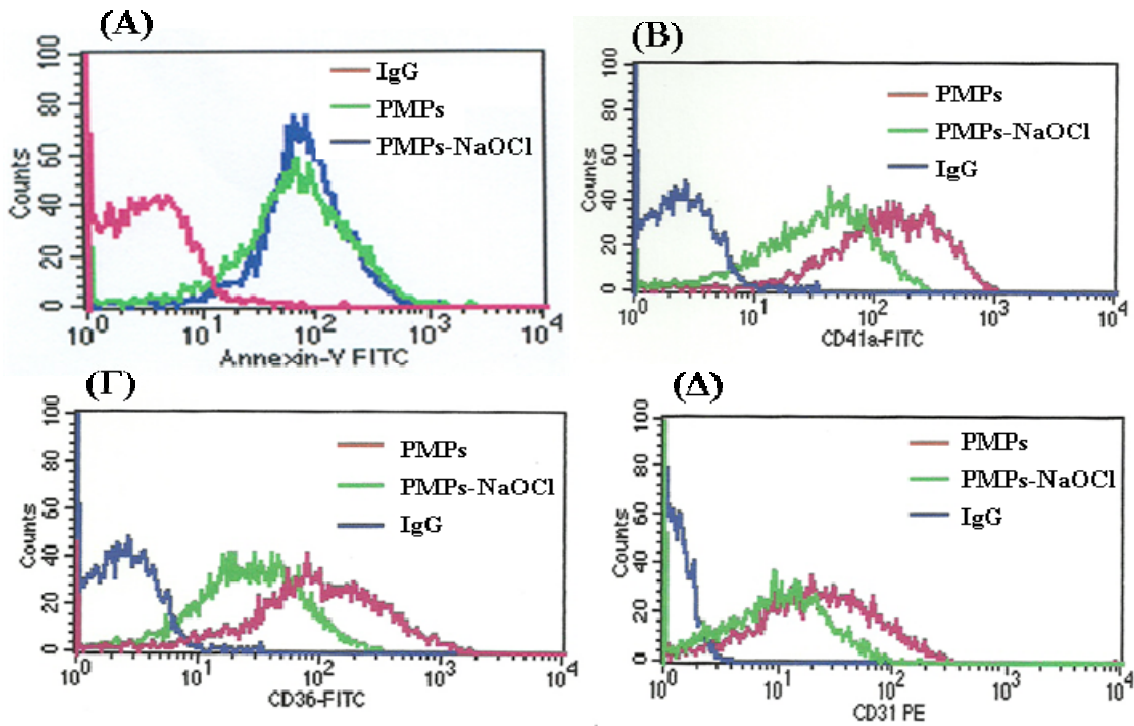
Εικόνα 7.12: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν την επίδραση της οξειδωτικής τροποποίησης των PMPs με CuSO_4 για 24h στην πρόσδεση της Αννεξίνης-V (A) και της έκφρασης του CD41a (B), του CD36 (Γ) και του CD31 (Δ) σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (IgG).

Αντίθετα, η οξείδωση των PMPs παρουσία της MPO οδήγησε στη δραστική μείωση της μεμβρανικής έκφρασης των CD41a, CD36 και CD31, ενώ η έκφραση της Αννεξίνης-V δεν άλλαξε σημαντικά (Εικόνα 7.13). Ακόμη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ της 1h και των 3h οξείδωσης.

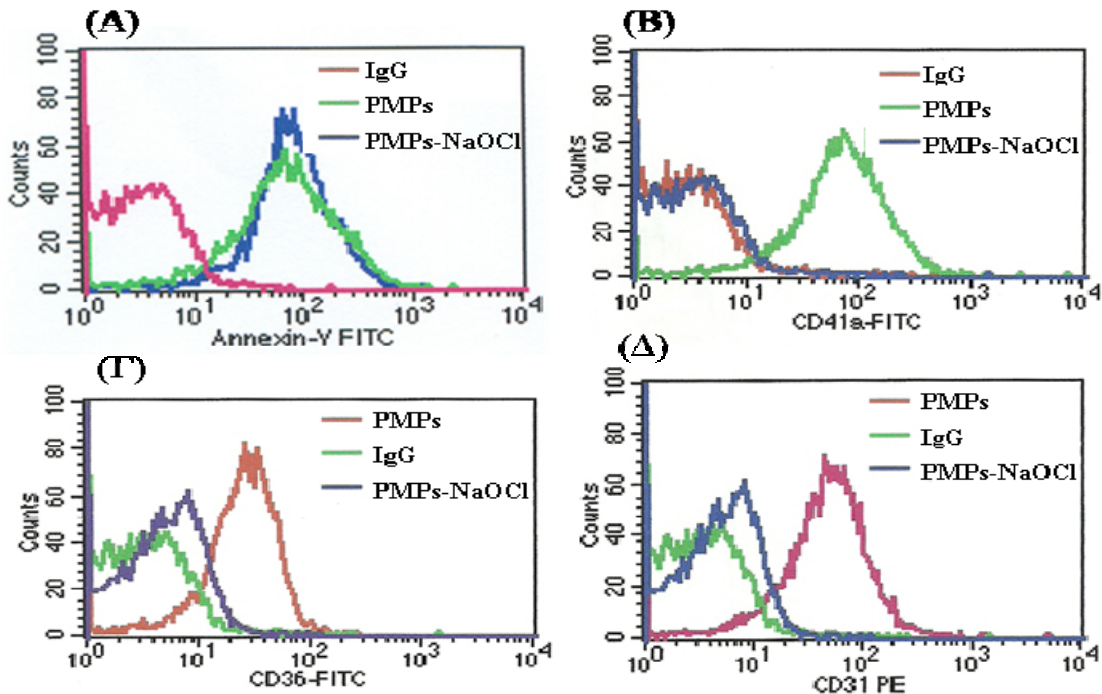


Εικόνα 7.13: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν την επίδραση της οξειδωτικής τροποποίησης των PMPs με το σύστημα της MPO για 3h στην πρόσδεση της Αννεξίνης-V (A) και της έκφρασης του CD41a (B), του CD36 (Γ) και του CD31 (Δ) σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (IgG).

Τα ίδια αποτελέσματα πήραμε και όταν επιδράσαμε κατευθείαν NaOCl στα PMPs. Παρατηρήσαμε τη δραστική μείωση της μεμβρανικής έκφρασης των CD41a, CD36 και CD31 καθώς αυξήσαμε τη συγκέντρωση του NaOCl από 0.2 mM στα 1.6 mM, ενώ η πρόσδεση της Αννεξίνης-V παρέμεινε ίδια (Εικόνα 7.14 και 7.15).

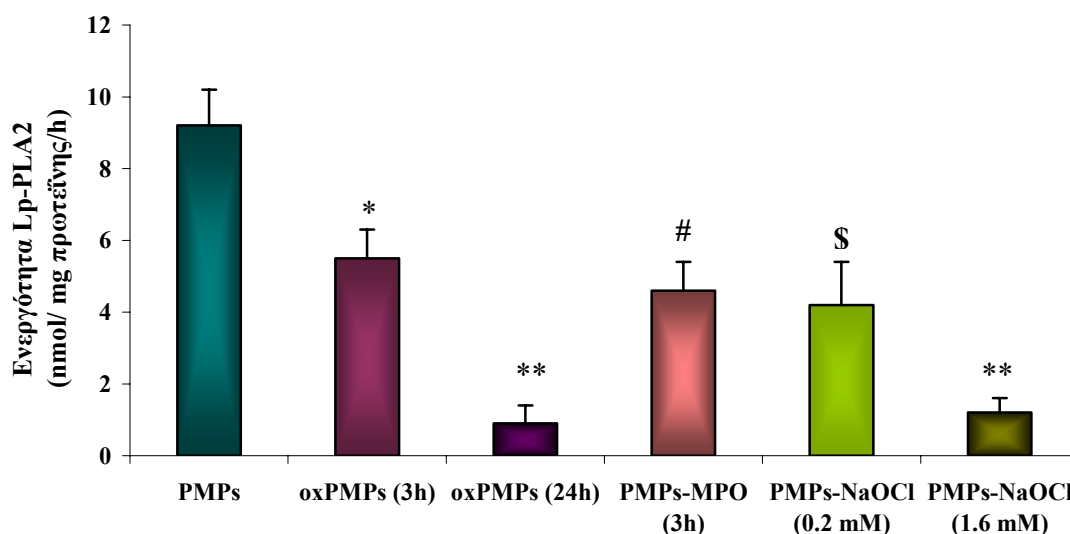


Εικόνα 7.14: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν την επίδραση της οξειδωτικής τροποποίησης των PMPs με 0.2 mM NaOCl για 1h στην πρόσδεση της Αννεξίνης-V (Α) και της έκφρασης του CD41a (Β), του CD36 (Γ) και του CD31 (Δ) σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (IgG).



Εικόνα 7.15: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν την επίδραση της οξειδωτικής τροποποίησης των PMPs με 1.6 mM NaOCl για 1h στην πρόσδεση της Αννεξίνης-V (Α) και της έκφρασης του CD41a (Β), του CD36 (Γ) και του CD31 (Δ) σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (IgG).

Επίσης, προσδιορίστηκε η ενεργότητα της Lp-PLA₂ των PMPs μετά την οξείδωση και βρέθηκε ότι η ενεργότητα της Lp-PLA₂ των PMPs μειώνεται σημαντικά μετά από την οξείδωση και με τα τρία συστήματα οξείδωσης (Εικόνα 7.16). Συγκεκριμένα μετά από 3h οξείδωση με τον χαλκό, η ενεργότητα των PMPs μειώνεται κατά 40.2% (9.4±1.1 nmol/mg πρωτεΐνης/h και 5.5±0.8 nmol/mg πρωτεΐνης/h αντίστοιχα, P=0.02). Μετά από 24h οξείδωση με τον χαλκό κατά 90% (9.4±1.1 nmol/mg πρωτεΐνης/h και 0.9±0.5 nmol/mg πρωτεΐνης/h, αντίστοιχα, P=0.0001). Μετά από 3h οξείδωση με την MPO (9.4±1.1 nmol/mg πρωτεΐνης/h και 4.6±0.8 nmol/mg πρωτεΐνης/h, αντίστοιχα, P=0.002) κατά 50%. Μετά από 0.2 mM NaOCl (9.4±1.1 nmol/mg πρωτεΐνης/h και 4.2±1.2 nmol/mg πρωτεΐνης/h, αντίστοιχα, P=0.03) κατά 54.3%, ενώ μετά από 1.6 mM NaOCl κατά 87% (9.4±1.1 nmol/mg πρωτεΐνης/h και 1.2±0.4 nmol/mg πρωτεΐνης/h, αντίστοιχα, P=0.0001).



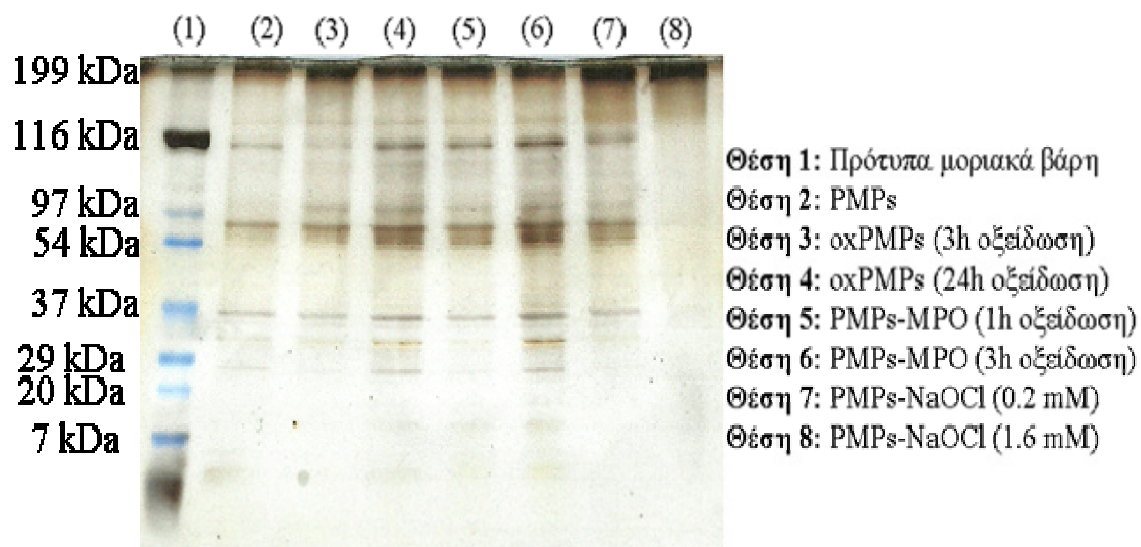
Εικόνα 7.16: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η ενεργότητα της Lp-PLA₂ πριν και μετά την οξείδωση των PMPs με CuSO₄ ή με την MPO ή με NaOCl. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 100 μM ³H-PAF και η πηγή του ενζύμου είναι 8 μg πρωτεΐνης PMPs/ml. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 5 πειράματα. (*P=0.02, **P=0.0001, #P=0.002, \$P=0.03 σε σύγκριση με πριν την οξείδωση).

Ακόμη, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs προκάλεσε σημαντική μείωση των καταλοίπων των λυσινών τους και με τα τρία συστήματα οξείδωσης. Κατά την οξείδωση με το σύστημα της MPO τα κατάλοιπα των λυσινών των PMPs μειώθηκαν κατά 39.3% σε σχέση με τα μη τροποποιημένα. Κατά την οξείδωση με 0.2 mM ή 1.6 mM NaOCl παρατηρήθηκε μια μείωση κατά 46.4% ή 57.1% αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, κατά την οξείδωση με χαλκό παρατηρήθηκε μια χρονο-εξαρτώμενη μείωση αυτών (21.4% στις 3h οξείδωση, ενώ στις 24h κατά 36%), το οποίο είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής (Πίνακας 7.3).

Πίνακας 7.3: Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στα κατάλοιπα των λυσινών των PMPs.

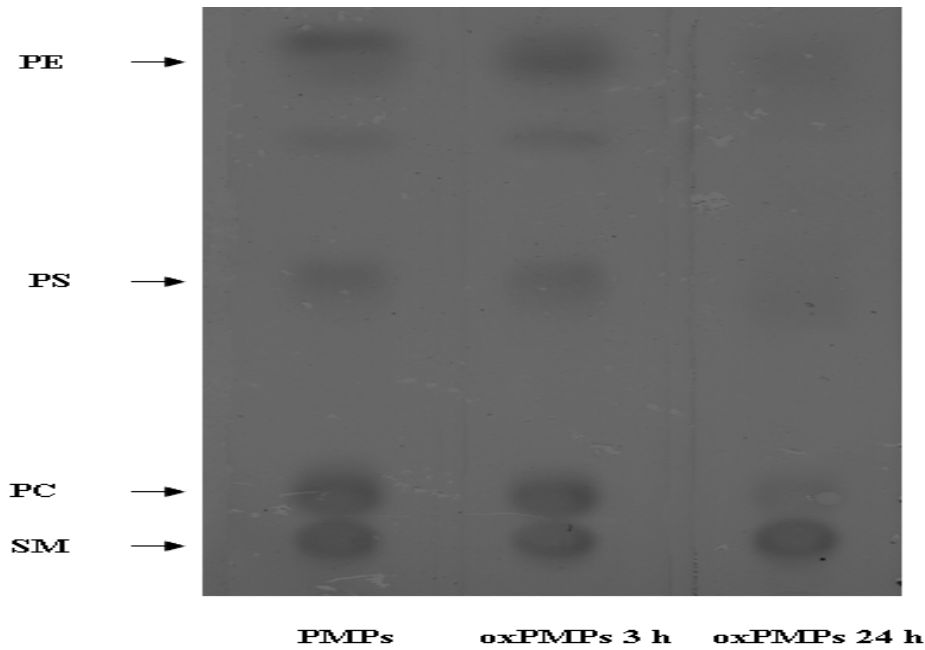
	<i>μmole καταλοίπων λυσινών</i>	<i>% μείωση των λυσινών</i>
PMPs	0.028	
oxPMPs (3h)	0.022	21.4
oxPMPs (24h)	0.018	35.7
PMPs-MPO	0.017	39.3
PMPs-NaOCl (0.2 mM)	0.015	46.4
PMPs-NaOCl (1.6 mM)	0.012	57.1

Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της οξείδωσης των PMPs στο πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο και με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19% (Εικόνα 7.17). Τα αποτελέσματα που πήραμε δείχνουν ότι κατά την οξείδωση των PMPs με τον CuSO₄ ή με την MPO ή με το NaOCl σε συγκέντρωση 0.2 mM, έχουμε σημαντική τροποποίηση των πρωτεϊνών, ενώ κατά την οξείδωση με 1.6 mM NaOCl οι ζώνες των πρωτεϊνών εξαφανίζονται. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά της κυτταρομετρίας ροής.

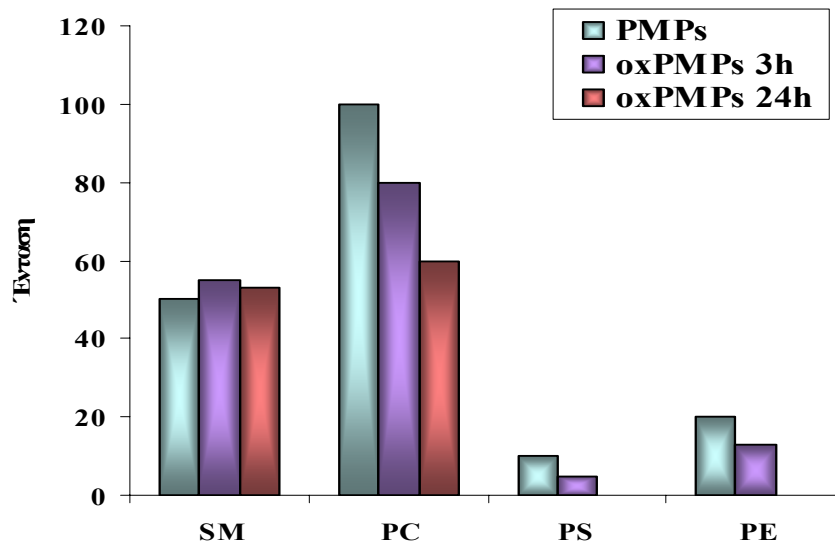


Εικόνα 7.17: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19% όπου φαίνεται η τροποποίηση των πρωτεϊνών μετά την οξείδωση των PMPs με CuSO_4 ή με την MPO ή με απευθείας επίδραση NaOCl παρουσία των πρότυπων μοριακών βαρών και των PMPs.

Κατόπιν, μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της οξείδωσης των PMPs στο φωσφολιπιδιακό τους περιεχόμενο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής, η οξείδωση των PMPs με τον CuSO_4 επηρεάζει το λιπιδικό τους περιεχόμενο, ενώ η MPO ή το NaOCl το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο. Χρησιμοποιώντας HPTLC βρήκαμε ότι το φωσφολιπιδιακό προφίλ των PMPs που παράγονται κατόπιν ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με Ca^{2+} -ιονοφόρο A23187 είναι παρόμοιο με αυτό άλλων εργασιών [461]. Στο HPTLC φαίνονται 4 κύριες μπάντες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν την SM, την PC, την PS και την PE (Εικόνα 7.18). Είναι ενδιαφέρον, ότι μετά από 3h οξείδωσης των PMPs υπήρχε μια σημαντική μείωση στις μπάντες που αντιπροσωπεύουν την PS και την PE, ενώ η PC ήταν ελαφρώς αλλά όχι σημαντικά μειωμένη. Επιπρόσθετα, μετά από 24h οξείδωση οι μπάντες της PE και της PS εξαφανίστηκαν, ενώ της PC ήταν σημαντικά μειωμένη (Εικόνες 7.18 και 7.19).



Εικόνα 7.18: Αντιπροσωπευτικό HPTLC που δείχνει το φωσφολιπιδιακό προφίλ των PMPs πριν και μετά από 3h ή 24h οξείδωσης με 5 μM CuSO_4 στους 37°C.



Εικόνα 7.19: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών του οποίου οι τιμές προέρχονται από μετρητή πυκνότητας εικόνων κατά τη σάρωση των φωσφολιπιδιακών μαντών των PMPs που διαχωρίζονται με HPTLC, πριν και μετά από 3h ή 24h οξείδωσης των PMPs με 5 μM CuSO_4 στους 37°C. Οι μπάντες που αντιπροσωπεύουν την SM, την PC, την PS και την PE προσδιορίστηκαν ποσοτικά ως ύψος κορυφής.

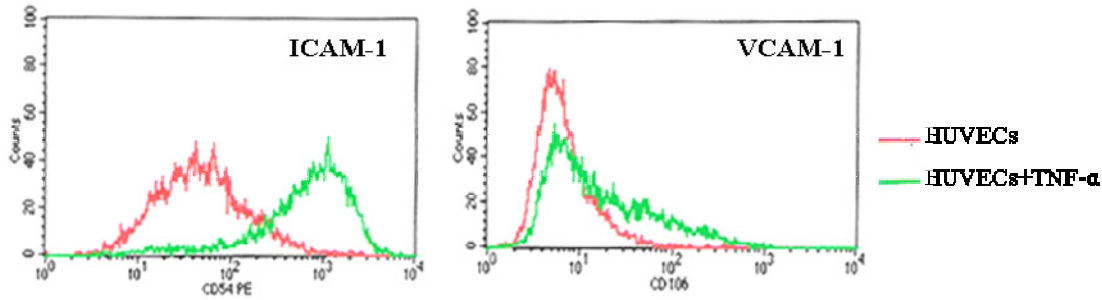
Μελέτη της επίδρασης των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs στην ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων

Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του ICAM-1 (CD54), του VCAM-1 (CD106), της E-σελεκτίνης αλλά και την έκκριση του MCP-1 [305]. Επιπρόσθετα, μελέτες των Barry et al. έδειξαν ότι τα PMPs επάγουν την έκφραση του ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο [132, 405]. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι διάφοροι αγωνιστές επάγουν την έκφραση των μορίων αυτών όπως η θρομβίνη [462, 463], ο VEGF [464] και ο TNF-α [465]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν σε σταθερή βάση μια μικρή ποσότητα του ICAM-1 στην επιφάνεια τους, ενώ ο VCAM-1 εκφράζεται μονό κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών.

Στη συνέχεια της μελέτης μας θέλαμε να δούμε τη δράση των απομονωμένων PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs, είτε με CuSO₄ είτε με το σύστημα της MPO, στην ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου (HUVECs). Τα οξειδωμένα PMPs με το NaOCl δεν μελετήθηκαν περαιτέρω, αφού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενό τους σε σχέση με αυτά που τροποποιήθηκαν με την MPO. Αρχικά απομονώσαμε HUVECs, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία, και στην συνέχεια επιδράσαμε στα κύτταρα αυτά TNF-α (1 ng/ml) ή PMPs (5-50 μg πρωτεΐνης/ml) ή οξειδωτικά τροποποιημένα PMPs (5 ή 25 μg/ml) για 5 ή 24h. Τα HUVECs που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή ήταν 2^{ης} ως 5^{ης} ανακαλλιέργειας.

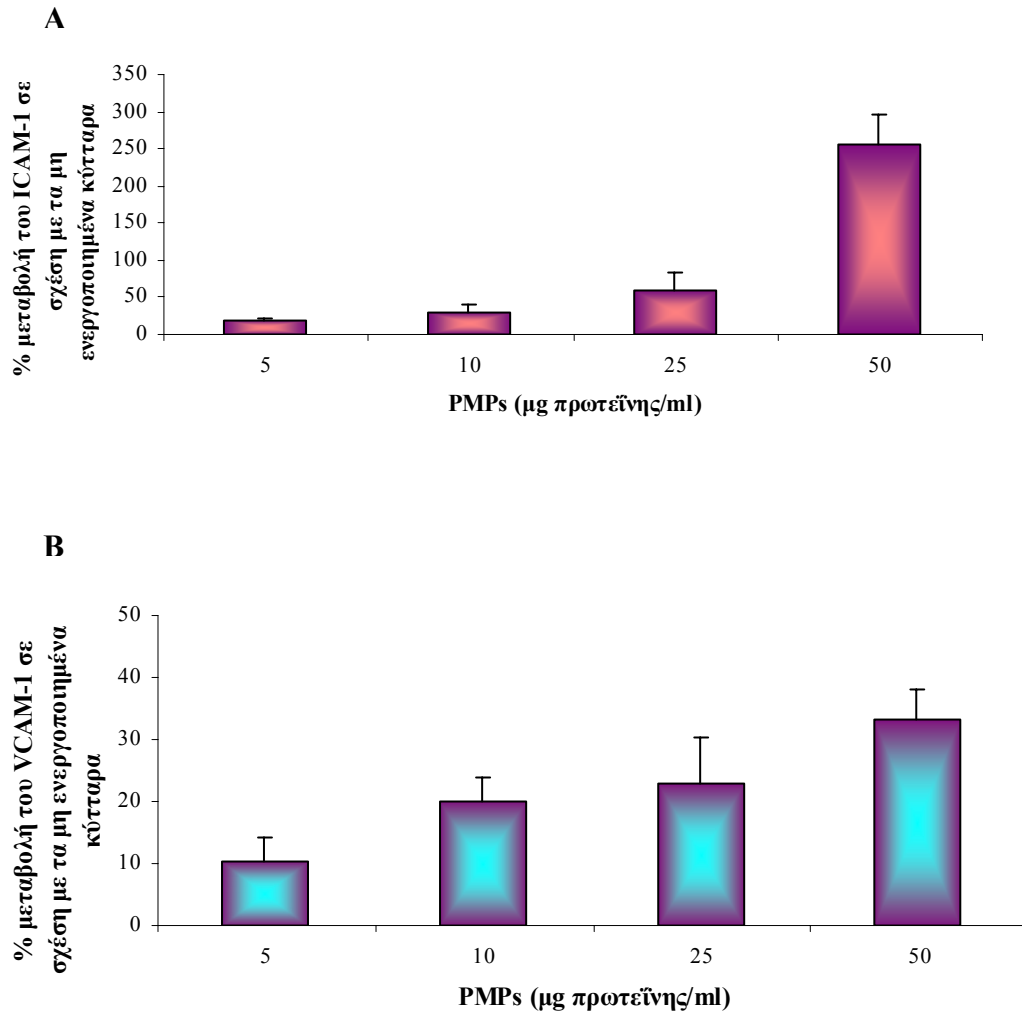
Αρχικά, μελετήσαμε τη δράση του TNF-α (1 ng/ml) στα HUVECs για 5h ή 24h και προσδιορίσαμε τη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 και του VCAM-1 με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Ο TNF-α προκάλεσε μια σημαντική αύξηση στην έκφραση του ICAM-1 και του VCAM-1 μετά από 5 h ενεργοποίησης με MFI 2532.60 και 516.64 αντίστοιχα (Εικόνα 7.20). Στις 24h επώαση, η παραπάνω δράση σχεδόν διπλασιάστηκε (MFI 4307.29 και 913.87 αντίστοιχα). Η επιφανειακή έκφραση του ICAM-1 στα HUVECs βασίζεται στην μεταγραφή και μετάφραση του mRNA μετά από την επίδραση του αγωνιστή. Η έκφραση του ICAM-1 είναι ανιχνεύσιμη μετά από 4 h ενεργοποίησης, ενώ η μέγιστη εκφρασή του γίνεται μετά από 16-24h [466]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι

συμβατά με τα ευρήματα αυτής της μελέτης. Συνεπώς ο TNF- α επάγει τόσο την έκφραση του ICAM-1 όσο και την έκφραση του VCAM-1 στα HUVECs.

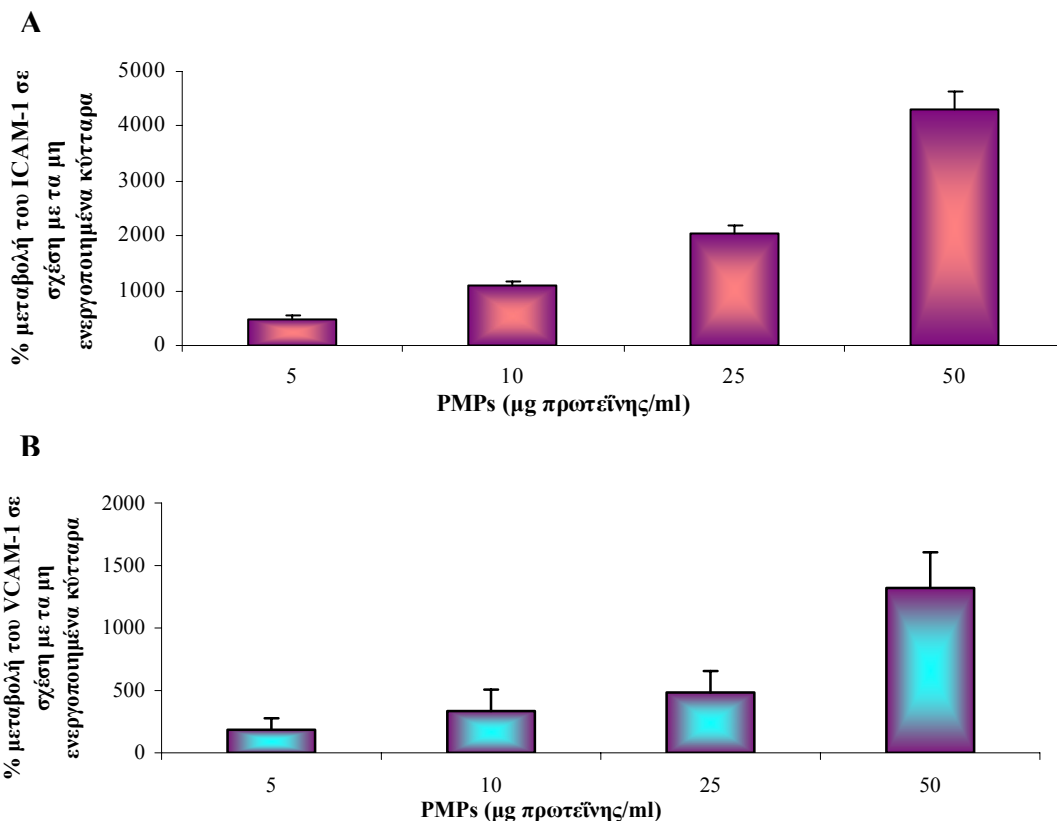


Εικόνα 7.20: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής κατά την ανάλυση ενεργοποιημένων με TNF- α HUVECs για 5h ως προς το ICAM-1 και το VCAM-1.

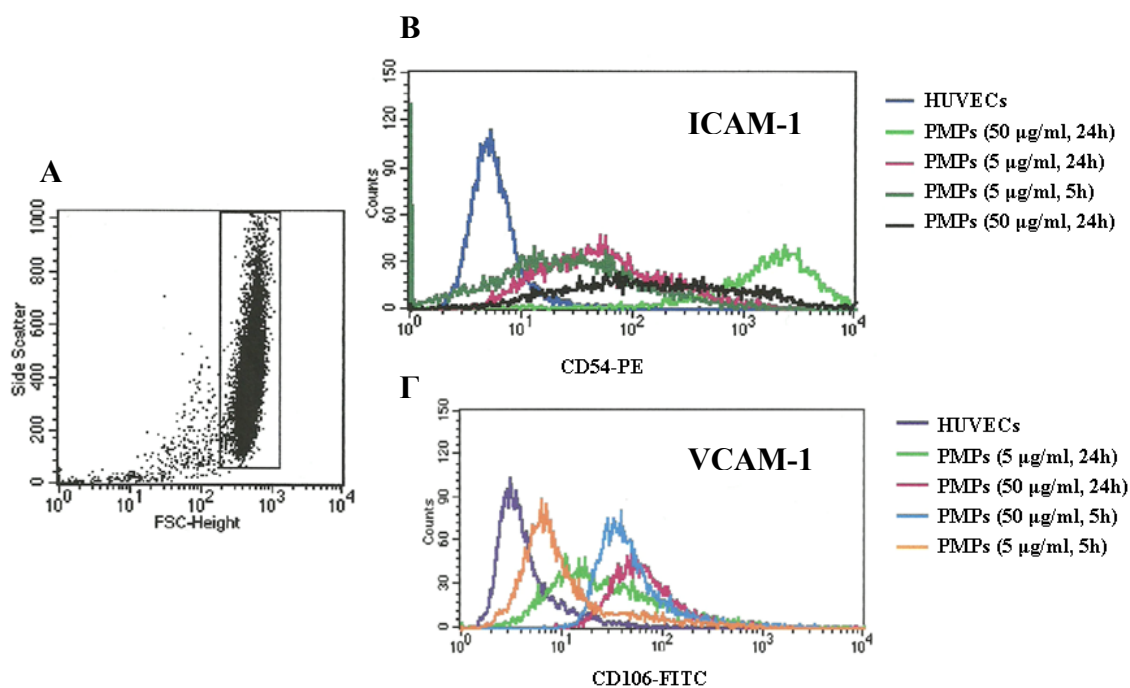
Κατόπιν, μελετήσαμε τη δράση των PMPs στα HUVECs σε διάφορες δόσεις από 5-50 μ g πρωτεΐνη/ml στις 5h ή στις 24h, στη μεμβρανική έκφραση των παραπάνω προσκολλητικών μορίων. Τα PMPs εμφάνισαν μια δοδο- και χρονο-εξαρτώμενη ενεργοποιητική δράση στα HUVECs όπως αυτή φαίνεται με την αύξηση της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1 και του VCAM-1 (Εικόνες 7.21 και 7.22 και 7.23).



Εικόνα 7.21: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η % μεταβολή της έκφρασης του ICAM-1 και του VCAM-1 σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση των μη ενεργοποιημένων κυττάρων μετά από την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων PMPs στις 5h επώαση.

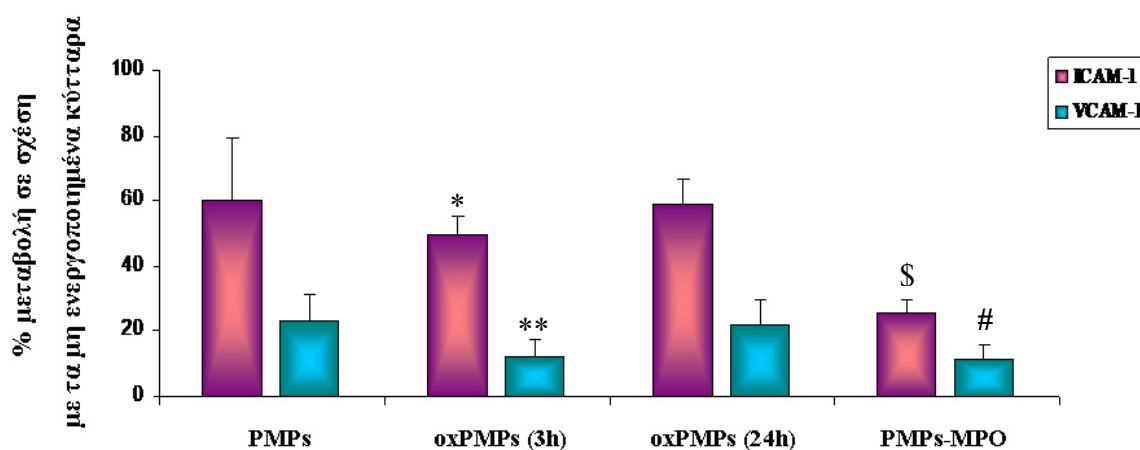


Εικόνα 7.22: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η % μεταβολή της έκφρασης του ICAM-1 και του VCAM-1 σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση των κυττάρων μετά από την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων PMPs στις 24h επώαση.

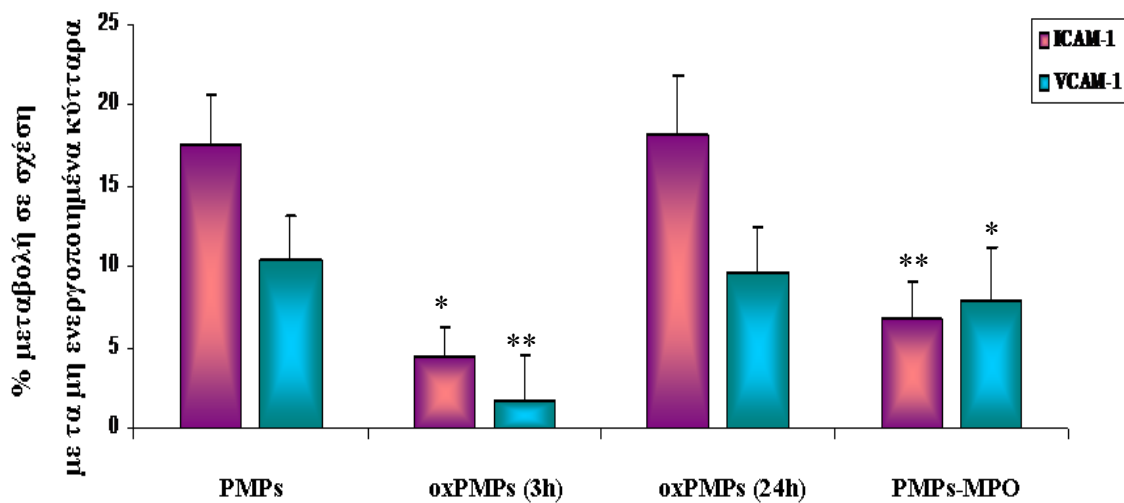


Εικόνα 7.23: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται ο πληθυσμός των HUVECs (A) και αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τη δόσο- και χρονο- εξαρτώμενη δράση των PMPs στα HUVECs μετά από 5h ή 24h επώαση στην έκφραση του ICAM-1 (B) και του VCAM-1 (Γ).

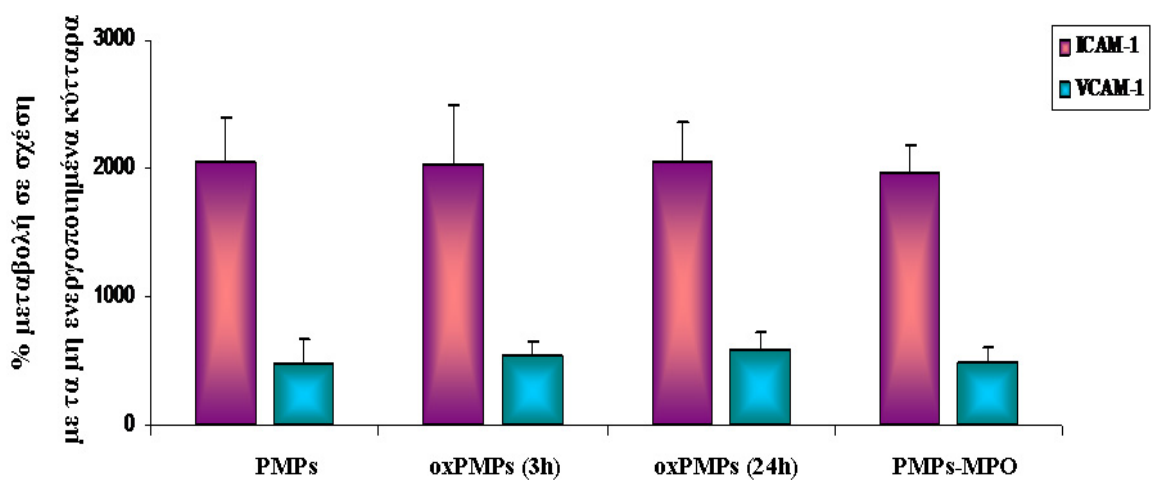
Στη συνέχεια της μελέτης μας εξετάσαμε την επίδραση των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs, είτε με CuSO₄ είτε με το σύστημα της MPO, στην ενεργοποίηση των HUVECs. Είναι πιθανόν, οι διαφορές στο πρωτεϊνικό και λιπιδιακό περιεχόμενο των οξειδωμένων PMPs να επηρεάζουν τη μεμβρανική έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 των HUVECs με διαφορετικό τρόπο σε σχέση με τα PMPs. Αρχικά, διερευνήσαμε την πιθανότητα τα οξειδωμένα PMPs να δρουν τοξικά στις καλλιέργειες των HUVECs. Γι' αυτό το λόγο επιδράσαμε διάφορες συγκεντρώσεις τους, από 5-50 μg πρωτεΐνη/ml, και καταλήξαμε ότι σε συγκεντρώσεις πάνω από 25 μg/ml ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων πεθαίνουν, σύμφωνα με μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Αντίθετα, σε δόσεις μικρότερες από 25 μg πρωτεΐνης οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs/ml, κάτι τέτοιο δεν ισχύει, αφού περισσότερο από το 90% των κυττάρων είναι ζωντανά, όπως φαίνεται από το % Total στην κυτταρομετρία ροής. Γι' αυτό το λόγο αποφασίσαμε να μελετήσουμε τη δράση των οξειδωμένων PMPs στην ενεργοποίηση των HUVECs στις δόσεις των 25 μg/ml ή των 5 μg/ml. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν, ότι η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs μείωσε την ενεργοποιητική δράση των PMPs όσον αφορά την έκφραση των ICAM-1 και VCAM-1 μετά από 5h επώασή τους με τα HUVECs (Εικόνα 7.24 και 7.25), ενώ μετά από 24h επώαση, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs οδήγησε στην αύξηση της ενεργοποιητικής δράσης των PMPs (Εικόνα 7.26 και 7.27).



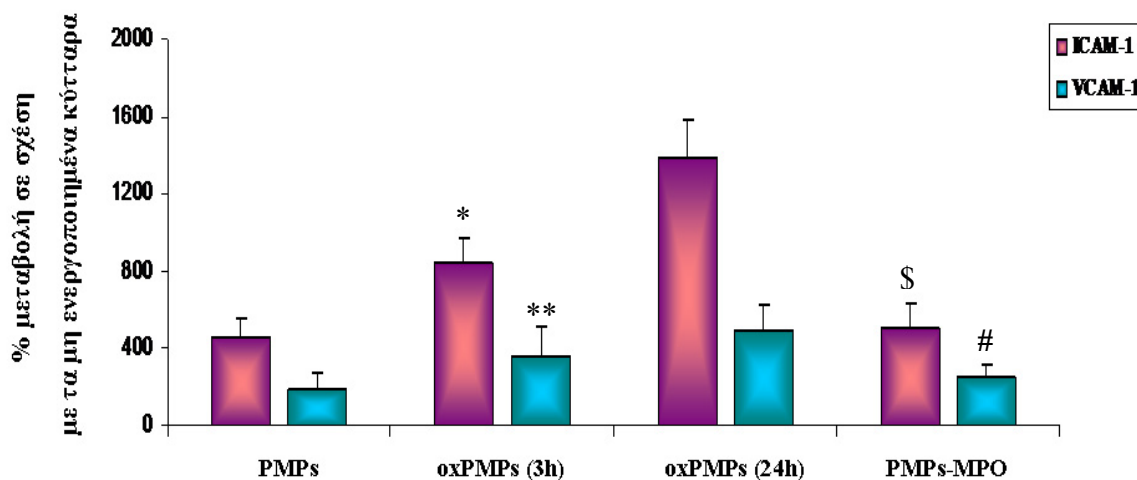
Εικόνα 7.24: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs σε συγκέντρωση 25 μg/ml αντίστοιχα, στην έκφραση του ICAM-1 και του VCAM-1 όταν αυτά επωαστούν για 5h με τα κύτταρα (*P=0.04, **P=0.02, \$P=0.03 και #P=0.002 σε σύγκριση με τα PMPs).



Εικόνα 7.25: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs σε συγκέντρωση 5 µg/ml αντίστοιχα, στην έκφραση του ICAM-1 και του VCAM-1 όταν αυτά επωαστούν για 5h με τα κύτταρα (*P=0.002 και **P=0.04 σε σύγκριση με τα PMPs).

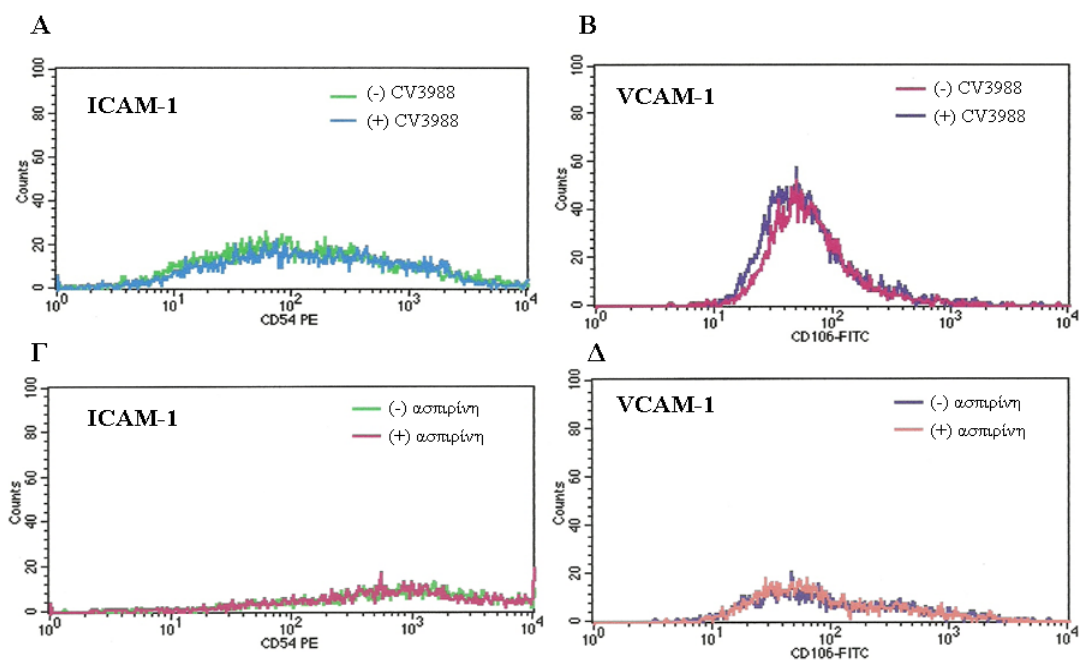


Εικόνα 7.26: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs σε συγκέντρωση 25 µg/ml αντίστοιχα, στην έκφραση του ICAM-1 και του VCAM-1 όταν αυτά επωαστούν για 24h με τα κύτταρα.



Εικόνα 7.27: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs σε συγκέντρωση 5 µg/ml αντίστοιχα, στην έκφραση του ICAM-1 και του VCAM-1 όταν αυτά επωαστούν για 24h με τα κύτταρα (*P=0.02, **P=0.01, \$P=0.04 και #P=0.0008 σε σύγκριση με τα PMPs).

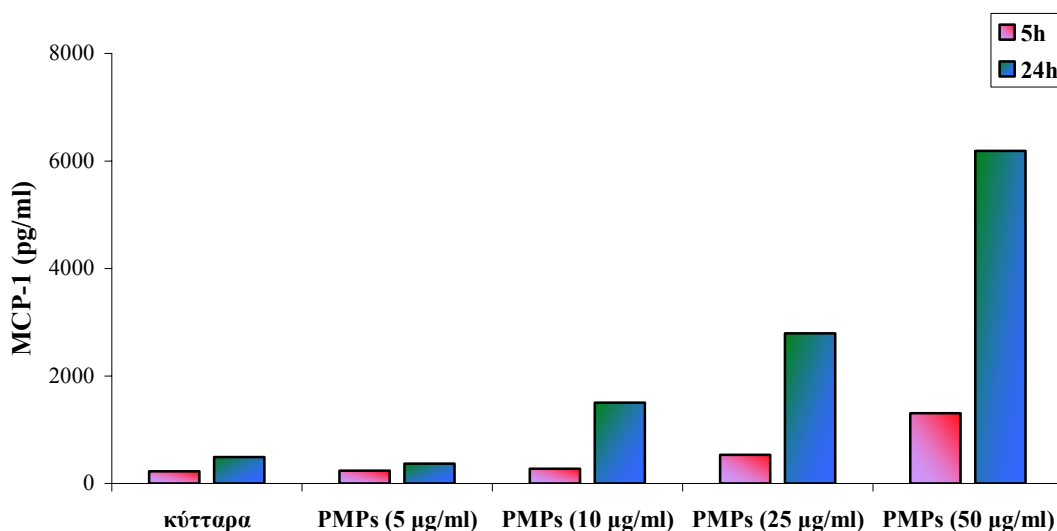
Κατόπιν θέλαμε να διερευνήσουμε το μηχανισμό με τον οποίο τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs ενεργοποιούν τα HUVECs. Γι' αυτό το λόγο τα HUVECs κατεργάστηκαν παρουσία ασπιρίνης 0.1 µM για 45 min πριν την επώαση με τα PMPs, ώστε να αναστέλλεται η παραγωγή και η έκκριση των μεταβολιτών του AA που παράγονται από τη δράση της COX-1 (π.χ. της προστακυκλίνης) ή παρουσία του ειδικού αναστολέα του PAF CV3988 (30 µM) ο οποίος επώαστηκε παράλληλα με τα PMPs. Τόσο η ασπιρίνη όσο και ο αναστολέας του PAF CV3988, απέτυχαν να αποτρέψουν την επαγόμενη από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs ενεργοποίηση των HUVECs όπως αυτή φαίνεται από τη μεμβρανική έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 (Εικόνα 7.28).



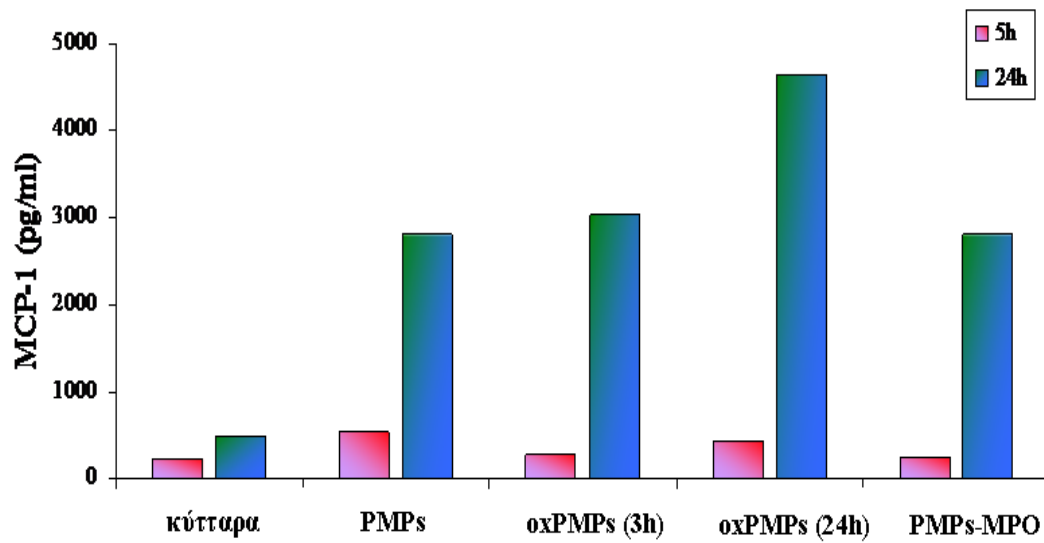
Εικόνα 7.28: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν τη δράση 25 $\mu\text{g/ml}$ PMPs μετά από 24h επώαση με τα HUVECs παρουσία ή απουσία ασπιρίνης ή του CV3988 στην έκφραση του ICAM-1 (A, Γ) και του VCAM-1 (B, Δ) αντίστοιχα.

Τέλος, προσδιορίσαμε την έκκριση της MCP-1 με ELISA. Από τα πειράματα καλλιέργειας των HUVECs και πριν από την παραλαβή τους για την κυτταρομετρική ανάλυση για τον προσδιορισμό της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1 και του VCAM-1, συλλέγαμε τα υπερκείμενα από κάθε θέση καλλιέργειας. Στα υπερκείμενα αυτά των κυττάρων προσδιορίσαμε την έκκριση της MCP-1 με kit Elisa, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο μεθόδων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, τα HUVECs εκκρίνουν αυθόρμητα μια ποσότητα MCP-1, ανεξάρτητα από την ενεργοποίησή τους και από την παρουσία των PMPs ή των οξειδωμένων PMPs. Επίσης, παρουσία του TNF- α (1 ng/ml) παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της αυθόρμητης έκκρισης της MCP-1 σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα HUVECs. Επιπρόσθετα, τα PMPs (5-50 μg πρωτεΐνης/ml) επάγουν την έκκριση της MCP-1 σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται από τα ίδια τα HUVECs (Εικόνα 7.29). Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs μετά από 5h επώαση με τα HUVECs, οδήγησε στη μείωση της δράσης των PMPs όσον αφορά την έκκριση της MCP-1. Αντίθετα στις 24h, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs, οδήγησε στην αύξηση της δράσης των PMPs (Εικόνα 7.30 και 7.31).

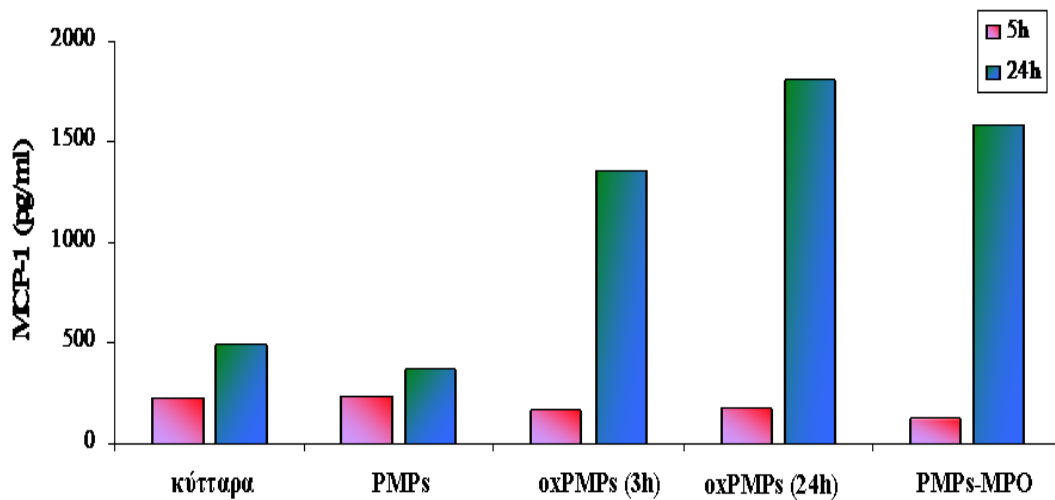
Παράλληλα μελετήσαμε τη δράση της ασπιρίνης και του αναστολέα του PAF CV3988 στην έκκριση της MCP-1. Ο αναστολέας CV3988 απέτυχε να αποτρέψει την επαγόμενη από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs έκκριση της MCP-1 (Εικόνα 7.32), άρα αυτή γίνεται ανεξάρτητα από τη δράση του PAF των PMPs. Όσον αφορά την ασπιρίνη, αυτή μείωσε την επαγόμενη από τα PMPs έκκριση της MCP-1 κατά 44.5%. Τα οξειδωμένα PMPs τόσο με τον χαλκό για 3h ή 24h όσο και με την MPO προκάλεσαν μία μείωση της έκκρισης της MCP-1 της τάξεως του 11.6%, ή 13.6% ή 28.7% αντίστοιχα (Εικόνα 7.33), ένδειξη ότι αυτή οφείλεται κατά ένα ποσοστό σε μεταβολίτες του AA το οποίο μεταφέρεται από τα PMPs.



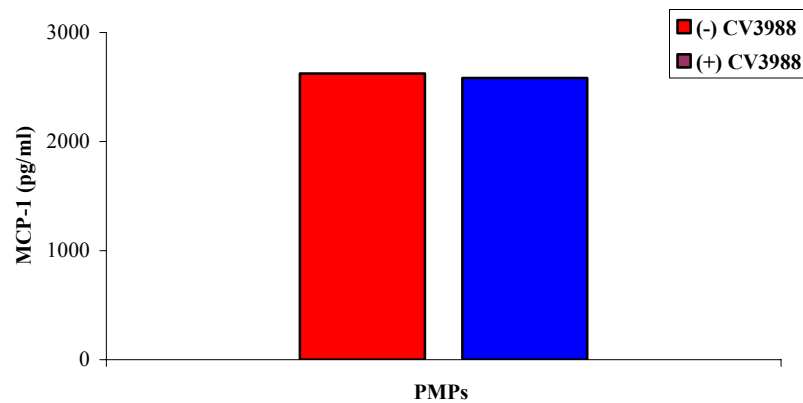
Εικόνα 7.29: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών που δείχνει την επίδραση των PMPs σε διάφορες συγκεντρώσεις στην έκκριση της MCP-1 στα HUVECs στις 5h και στις 24h.



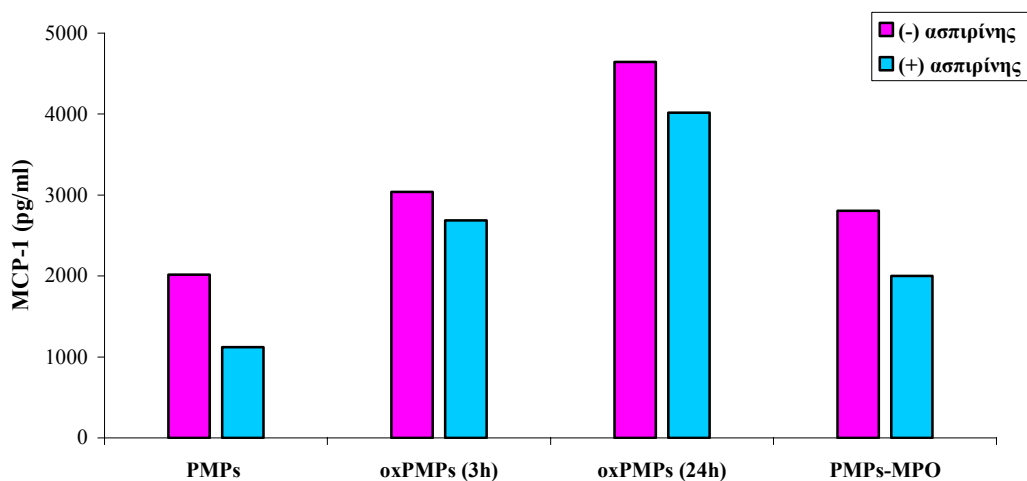
Εικόνα 7.30: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών που δείχνει την επίδραση των PMPs και των οξειδωμένων PMPs σε συγκέντρωση 25 µg/ml στην έκκριση της MCP-1 στα HUVECs στις 5h και στις 24h.



Εικόνα 7.31: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών που δείχνει την επίδραση των PMPs και των οξειδωμένων PMPs σε συγκέντρωση 5 µg/ml στην έκκριση της MCP-1 στα HUVECs στις 5h και στις 24h.



Εικόνα 7.32: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών που δείχνει την δράση των PMPs σε συγκέντρωση 25 µg/ml μετά από 24h επώαση με τα HUVECs στην έκκριση της MCP-1 παρουσία ή απουσία του αναστολέα του PAF CV3988.

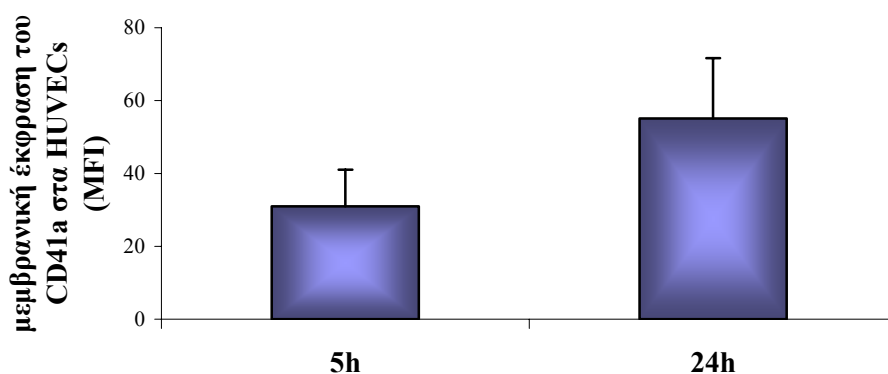


Εικόνα 7.33: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών που δείχνει την δράση των PMPs ή των οξειδωμένων PMPs σε συγκέντρωση 25 µg/ml μετά από 24h επώαση με τα HUVECs στην έκκριση της MCP-1 παρουσία ή απουσία του αναστολέα της ασπιρίνης.

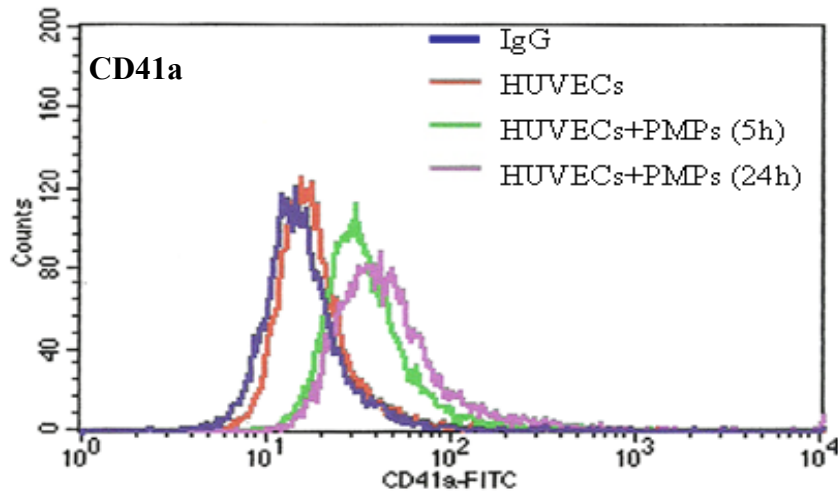
Η πρόσδεση και η εσωτερίκευση των PMPs στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορα MPs εσωτερικεύονται από άλλα κύτταρα όπως π.χ. τα μακροφάγα [159]. Γι' αυτό το λόγο διερευνήσαμε την πιθανή πρόσδεση ή εσωτερίκευση των PMPs στα HUVECs με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής και της μικροσκοπίας συνεστιασμού αντίστοιχα. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήσαμε τα επισημασμένα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD41a-FITC και anti-CD31-PE, anti-CD54-PE χαρακτηριστικά των PMPs και των HUVECs αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα PMPs προσδένονται και μεταφέρουν το CD41a που εκφράζουν στην μεμβράνη των HUVECs, σύμφωνα με τα πειράματα της κυτταρομετρίας ροής. Αναλυτικότερα, τα HUVECs επώστηκαν παρουσία ή απουσία 25 $\mu\text{g/ml}$ PMPs για 5h ή 24h. Τα ίδια τα HUVECs δεν εκφράζουν το CD41a. Μετά από 5h επώση, σύμφωνα με την MFI, η μεμβρανική έκφραση του CD41a στα HUVECs ήταν $31 \pm 10.01\%$, ενώ μετά από 24h επώση ήταν $55.1 \pm 16.61\%$ (Εικόνα 7.34 και 7.35).

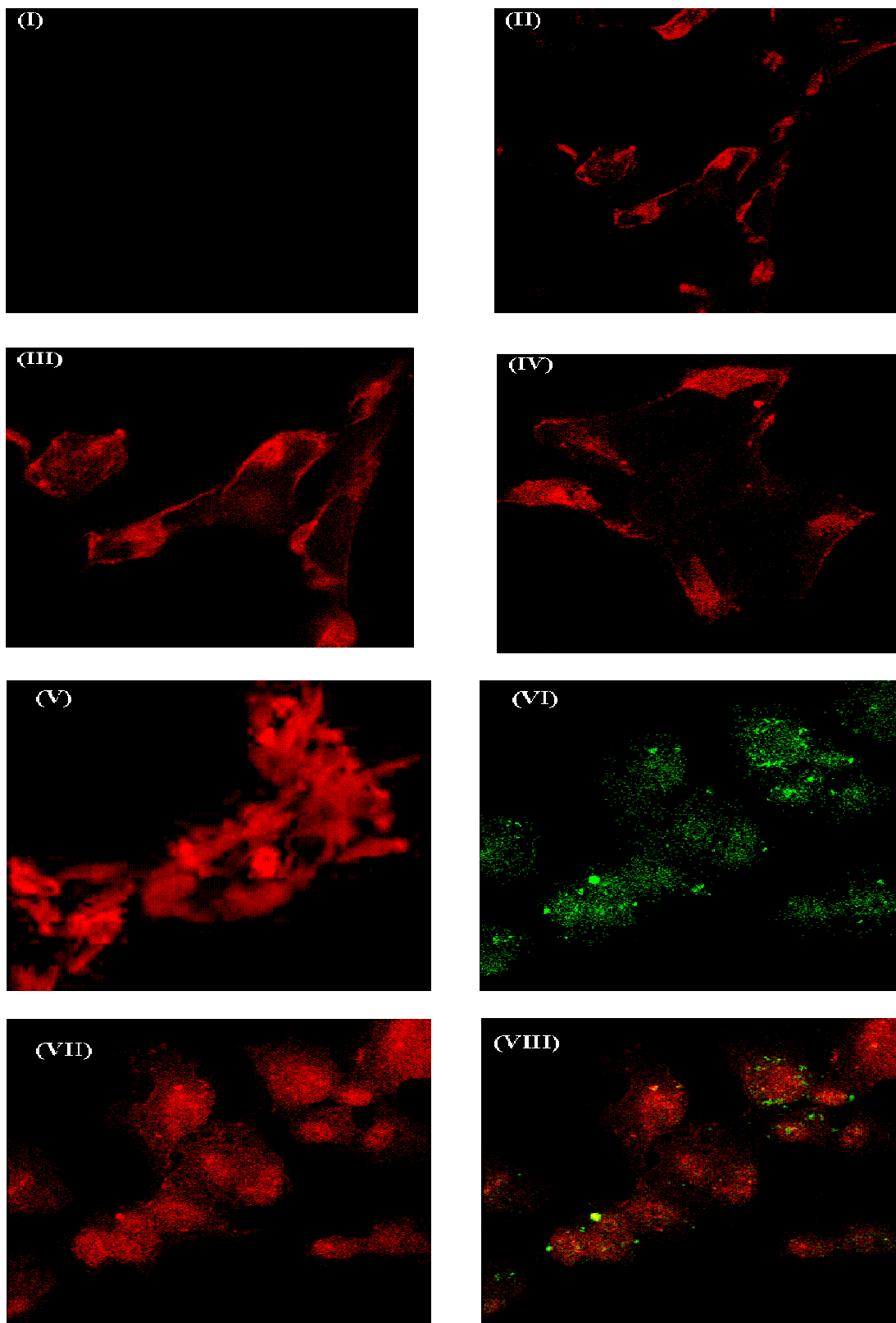


Εικόνα 7.34: Γράφημα στηλών που δείχνει τη μεμβρανική έκφραση του CD41a στα HUVECs μετά την επώασή τους με 25 μg πρωτεΐνη PMPs/ml για 5h ή 24h. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση από 3 πειράματα.



Εικόνα 7.35: Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα που δείχνει την έκφραση του CD41a στα HUVECs μετά την επώασή τους με PMPs (25 µg πρωτεΐνη/ml) για 5h ή 24h, παρουσία του IgG.

Παράλληλα με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν την χρονο-εξαρτώμενη πρόσδεση των PMPs πάνω στα HUVECs, μελετήσαμε και την πιθανή εσωτερίκευση των PMPs στα HUVECs. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή του ανοσοφθορισμού. Σύμφωνα με τα πειράματα της κυτταρομετρίας ροής, απαιτείται χρόνος για να εσωτερικευτούν τα PMPs από τα HUVECs. Γι' αυτό το λόγο επιλέξαμε ως χρόνο επώασης τις 24h. Τα αποτελέσματα που πήραμε δείχνουν ότι τα PMPs που εκφράζουν το CD41a μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα, όπως φαίνεται από το πράσινο χρώμα του FITC με το οποίο είναι επισημασμένο το CD41a, εντός των HUVECs. Στην *Εικόνα 7.36*, φαίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της εσωτερίκευσης των PMPs στα HUVECs, όπως επίσης η χρώση του θετικού δείγματος ελέγχου των HUVECs (anti-CD31-PE και anti-CD54-PE) και η χρώση των PMPs (anti-CD41a) παράλληλα με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (IgG-FITC).



Εικόνα 7.36: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού σε HUVECs παρουσία και απουσία των PMPs. Το αρνητικό control IgG-FITC (I). Το θετικό control anti-CD31-PE σε μη ενεργοποιημένα (II) και σε ενεργοποιημένα με TNF- α HUVECs (III). Το anti-CD54-PE σε μη ενεργοποιημένα (IV) και σε ενεργοποιημένα με TNF- α HUVECs (V). Το anti-CD41a-FITC (VI)

και το anti-CD54-PE σε HUVECs παρουσία 25 µg/ml PMPs (VII). Διπλή χρώση με anti-CD54-PE και anti-CD41a-FITC σε HUVECs παρουσία 25 µg/ml PMPs (VIII).

Τα PMPs επάγουν γονιδιακή έκφραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα

Ο μηχανισμός δράσης των PMPs παρά το μεγάλο αριθμό μελετών που έχουν γίνει, παραμένει σε μεγάλο ποσοστό αδιευκρίνιστος. Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστό εάν δρουν κατά ένα παρακρινικό τρόπο ή αν είναι απαραίτητη η επαφή τους με τα κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες πρότειναν μηχανισμούς σύμφωνα με τις οποίες τα PMPs μεταφέρουν πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα την χημειοκίνη RANTES [390] και άλλα ανοσοδραστικά αντιγόνα των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια των HUVECs [467]. Άλλες μελέτες προτείνουν μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς της ενδοκύττωσης που συμπεριλαμβάνουν είτε υποδοχείς εκκαθαριστές είτε υποδοχείς της PS [468].

Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι τα MPs μπορούν να μεταφέρουν το RNA τους στα HUVECs [422]. Επίσης, μελέτη έδειξε ότι τα PMPs τροποποιούν τη γονιδιακή έκφραση της μονοκυτταρικής σειράς MM6 [469]. Τα νεώτερα αυτά δεδομένα μπορεί να είναι ένας νέος μηχανισμός με τον οποίο τα PMPs επικοινωνούν με διάφορα κύτταρα στόχους, επάγοντας σε αυτά γονιδιακή έκφραση με αποτέλεσμα να τροποποιείται ο φαινότυπός τους.

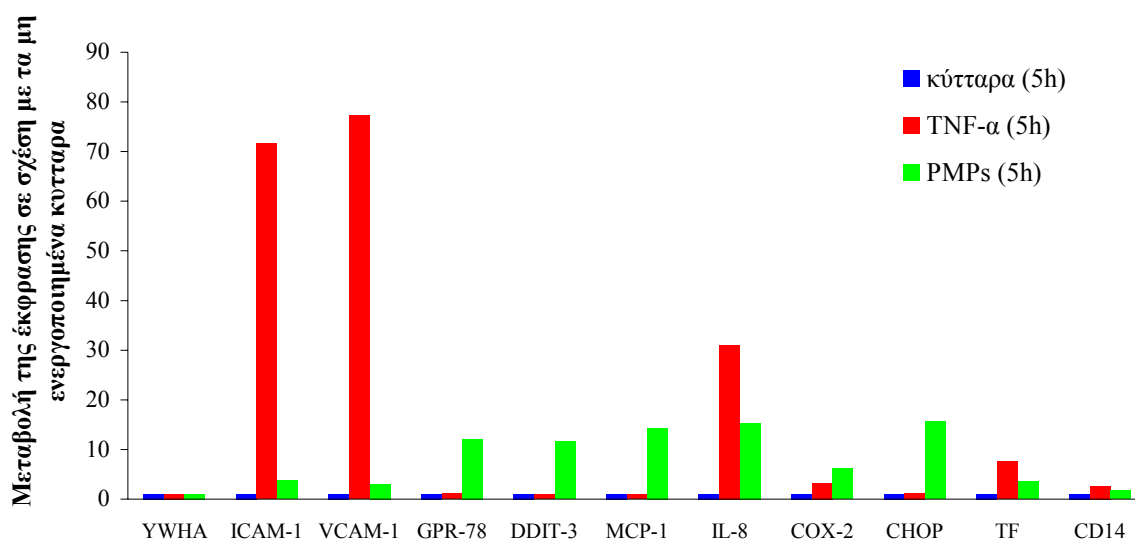
Στη συνέχεια της μελέτης μας θελήσαμε να διερευνήσουμε εάν τα PMPs συμβάλουν στην φλεγμονώδη διέγερση επάγοντας ή τροποποιώντας τη γονιδιακή έκφραση στα HUVECs. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιώντας την μέθοδο QPCR η οποία παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση του mRNA, μελετήσαμε τις αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων στα HUVECs μετά την επώασή τους είτε με την κυτοκίνη TNF-α (1 ng/ml) είτε με τα PMPs (25 µg/ml) στις 5h ή στις 24h. Στον Πίνακα 7.4, φαίνεται ο συμβολισμός των γονιδίων που μελετήθηκαν και ο ρόλος τους στον μηχανισμό της φλεγμονής και της θρόμβωσης, όπου τα PMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο.

Πίνακας 7.4: Γονίδια που εκφράζονται ή τροποποιούνται στα HUVECs μετά την επώασή τους για 5h ή 24h με 1 ng/ml TNF-α ή 25 μg/ml PMPs.

<i>Σύμβολο γονιδίου</i>	<i>Λειτουργία</i>	<i>Τάξη μορίου</i>
YWHA	Ενεργοποιεί την Tyr και την Thr, υδρολύει και ενεργοποιεί ισχυρά την PKC	Προσαρμοστικό μόριο
ICAM-1	Προσδέτης κατά τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων	Προσκολλητικό μόριο
VCAM-1	Προσδέτης κατά τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων	Προσκολλητικό μόριο
GPR-78	Σχετίζεται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου	Συνοδός πρωτεΐνη
DDIT-3	Σχετίζεται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο	Συνοδός πρωτεΐνη
MCP-1	Συμβάλει στο χημειοτακτισμό των μονοκυττάρων και στη διαφοροποίησή τους	Χημειοκίνη
IL-8	Προάγει τον χημειοτακτισμό και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων διευκολύνοντας την αποδόμηση του υπενδοθηλιακού χώρου	Χημειοκίνη
COX-2	Καταλύει την μετατροπή του AA στην PGH	Ένζυμο
CHOP	Μειώνει την έκφραση φλεγμονοδών κυτοκινών που εκκρίνουν τα μακροφάγα, εμπλέκεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο κατά την ελαττωματική λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου	Πυρηνική πρωτεΐνη
TF	Εκκινεί το μηχανισμό της πήξης	Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη

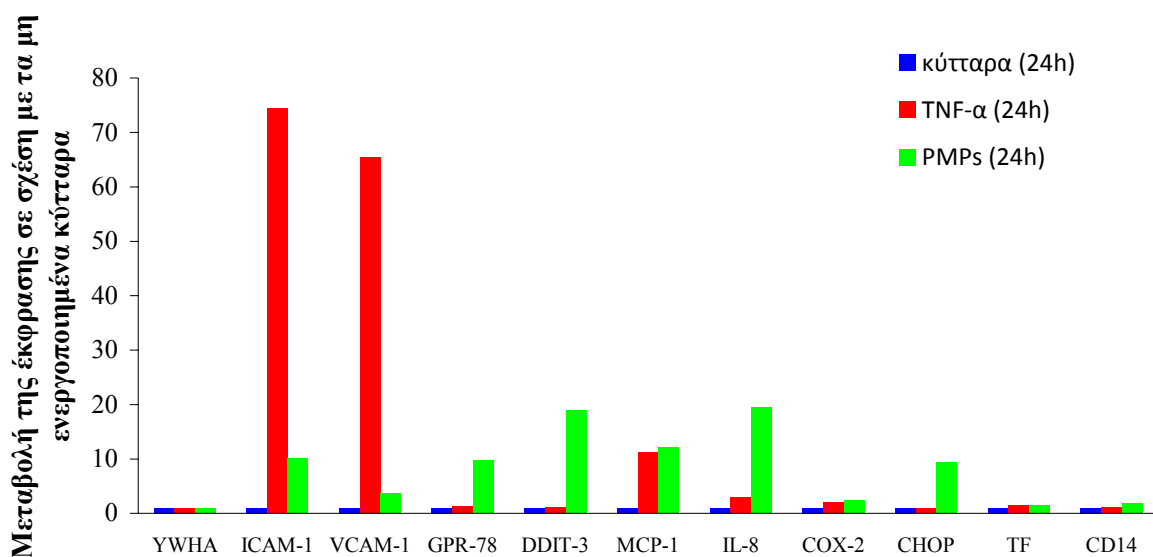
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, τόσο ο TNF- α (1 ng/ml) όσο και τα PMPs (25 μ g/ml) μεταβάλλουν την έκφραση όλων των παραπάνω γονιδίων τόσο στις 5h όσο και στις 24h επώαση. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου YWHA που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, είναι σταθερή και δεν επάγεται ούτε τροποποιείται τόσο από την κυτοκίνη όσο και από τα PMPs σε οποιαδήποτε από τις παραπάνω χρονικές στιγμές. Το σημαντικότερο κριτήριο που απαιτείται να πληρεί ένα γονίδιο αναφοράς, είναι να διατηρεί την έκφρασή του σε σταθερά επίπεδα μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων.

Επιμόλυνση των HUVECs από άλλα κύτταρα δεν είχαμε όπως φαίνεται από την αμελητέα έκφραση του γονιδίου CD14, ειδικού δείκτη των μονοκυττάρων. Στις 5h επώαση των HUVECs με τον TNF- α ή τα PMPs παρατηρήσαμε τα εξής: ο TNF- α αύξησε σημαντικά την έκφραση του γονιδίου ICAM-1, του VCAM-1, της IL-8 και του TF, ενώ η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων μεταβλήθηκε ελάχιστα. Τα PMPs στον ίδιο χρόνο αύξησαν την έκφραση όλων των παραπάνω γονιδίων, η μεγαλύτερη δε μεταβολή σε σχέση με τα HUVECs παρατηρήθηκε στο GPR-78, στο DDIT-3, στην MCP-1, στην IL-8 και στο CHOP (Εικόνα 7.37).



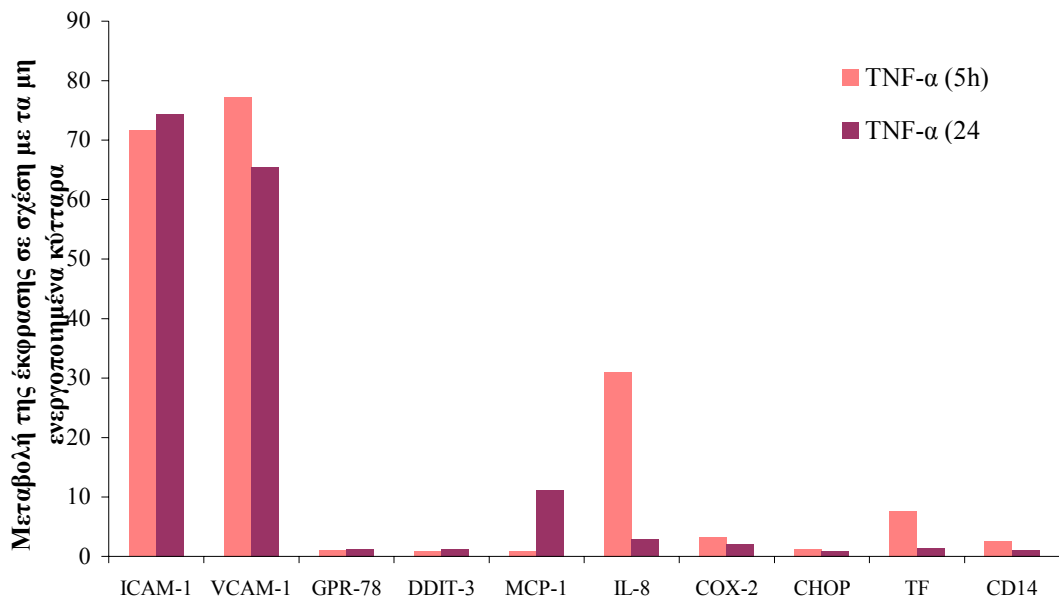
Εικόνα 7.37: Οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση των HUVECs μετά την επώασή τους για 5h με 1 ng/ml TNF- α ή 25 μ g/ml PMPs.

Στις 24h επώαση, ο TNF-α προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του ICAM-1, του VCAM-1 και της MCP-1, ενώ τα PMPs αύξησαν την έκφραση όλων των γονιδίων, η μεγαλύτερη δε μεταβολή σε σχέση με τα HUVECs παρατηρήθηκε στο ICAM-1, στο GPR-78, στο DDIT-3, στην MCP-1, στην IL-8 και στο CHOP (Εικόνα 7.38).

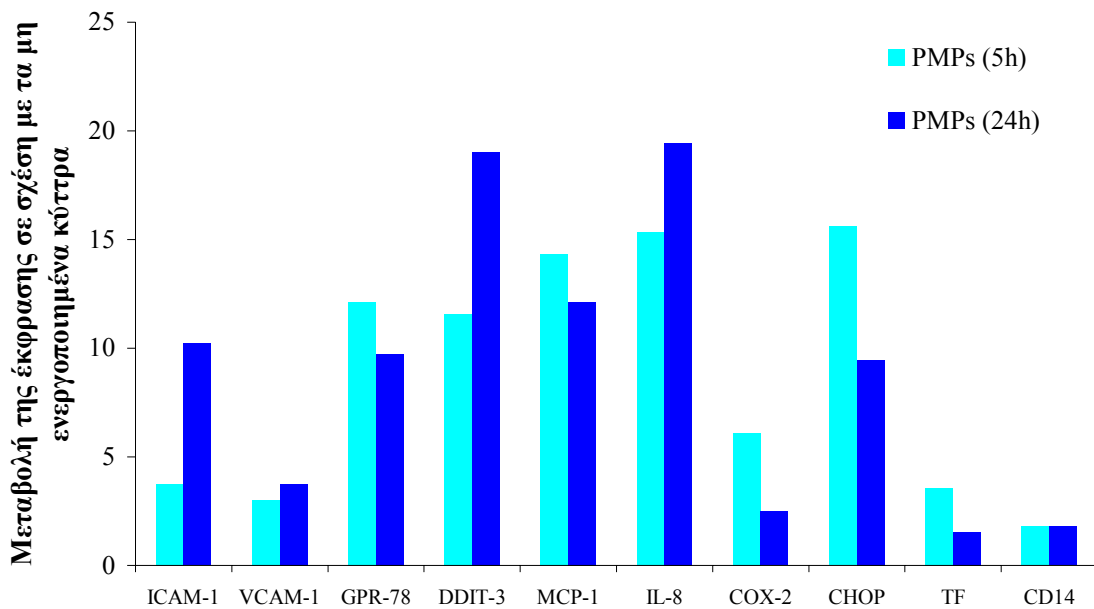


Εικόνα 7.38: Οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση των HUVECs μετά την επώασή τους για 24h με 1 ng/ml TNF-α ή 25 μg/ml PMPs.

Στις Εικόνες 7.39 και 7.40, φαίνονται οι διαφορές στη γονιδιακή έκφραση των HUVECs στις 5h ή στις 24h επώασή τους είτε με τον TNF-α είτε με τα PMPs. Παρατηρήσαμε ότι στις 24h επώαση η κυτοκίνη προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της MCP-1, αλλά μείωση του VCAM-1, της IL-8 και του TF σε σχέση με τις 5h επώαση. Επιπρόσθετα, στις 24h επώαση τα PMPs προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης του ICAM-1, του DDIT-3 και της IL-8, ενώ η έκφραση του GPR-78, της COX-2, του CHOP και του TF μειώθηκαν σε σχέση με τις 5h επώαση.



Εικόνα 7.39: Οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση των HUVECs μετά την επώασή τους για 5h ή 24h με 1 ng/ml TNF-α.

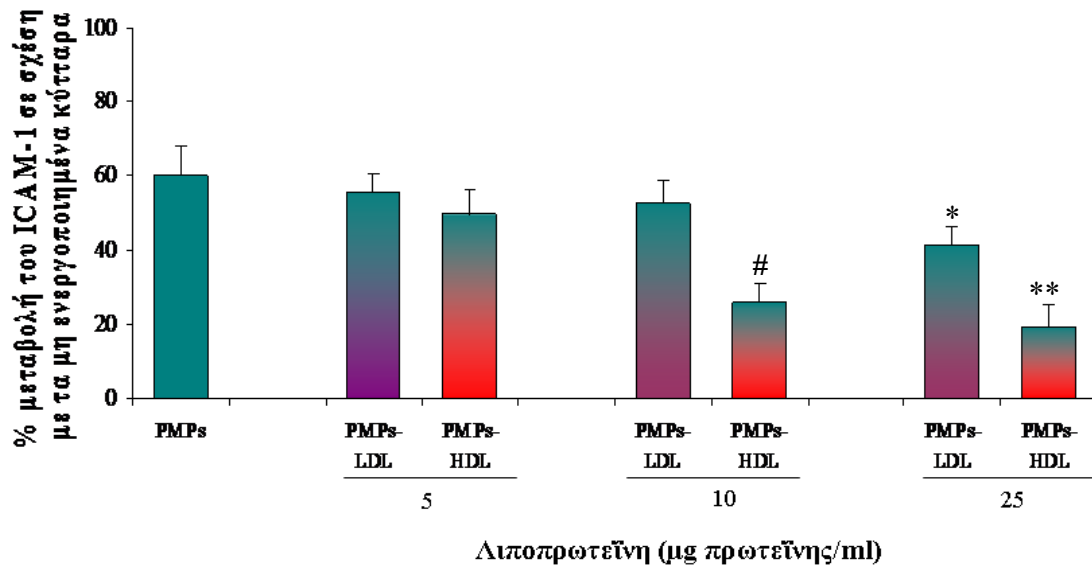


Εικόνα 7.40: Οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση των HUVECs μετά την επώασή τους για 5h ή 24h με 25 μg/ml PMPs.

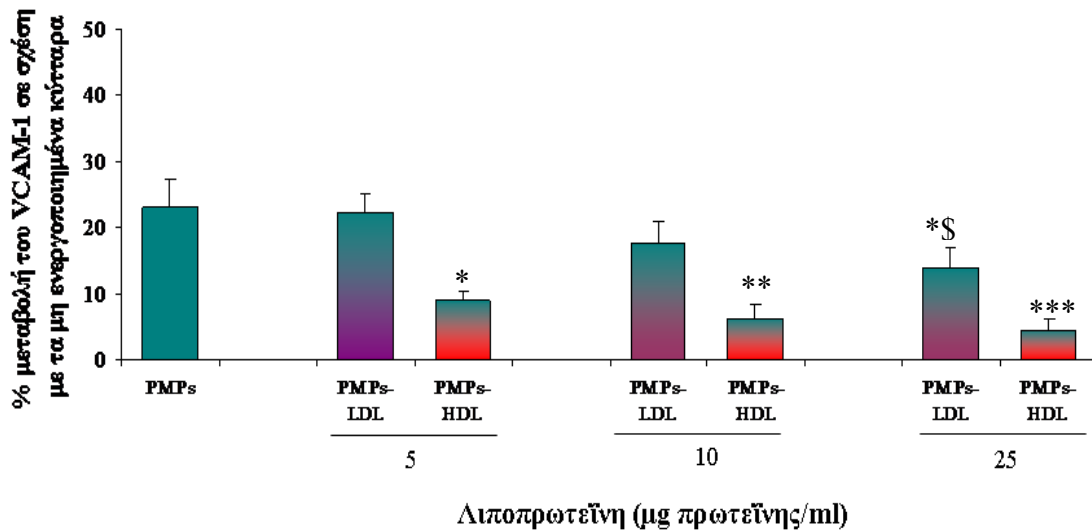
Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος στην ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα PMPs αλληλεπιδρούν με την LDL και την HDL αντίστοιχα, αλλά δεν γνωρίζουμε εάν τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις έχουν κάποιο βιολογικό ρόλο ιδιαίτερα όσον αφορά την παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης. Γι' αυτό το λόγο μελετήσαμε τον ρόλο της αλληλεπίδρασης των PMPs με τις παραπάνω λιποπρωτεΐνες στην ενεργοποίηση των HUVECs *in vitro*. Η δράση των PMPs ή των συμπλεγμάτων τους με τις λιποπρωτεΐνες μελετήθηκε ως προς την ενεργοποίηση των HUVECs στις 5h ή στις 24h επώαση με μέτρηση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 με κυτταρομετρία ροής και με μέτρηση της έκκρισης της MCP-1 με ELISA.

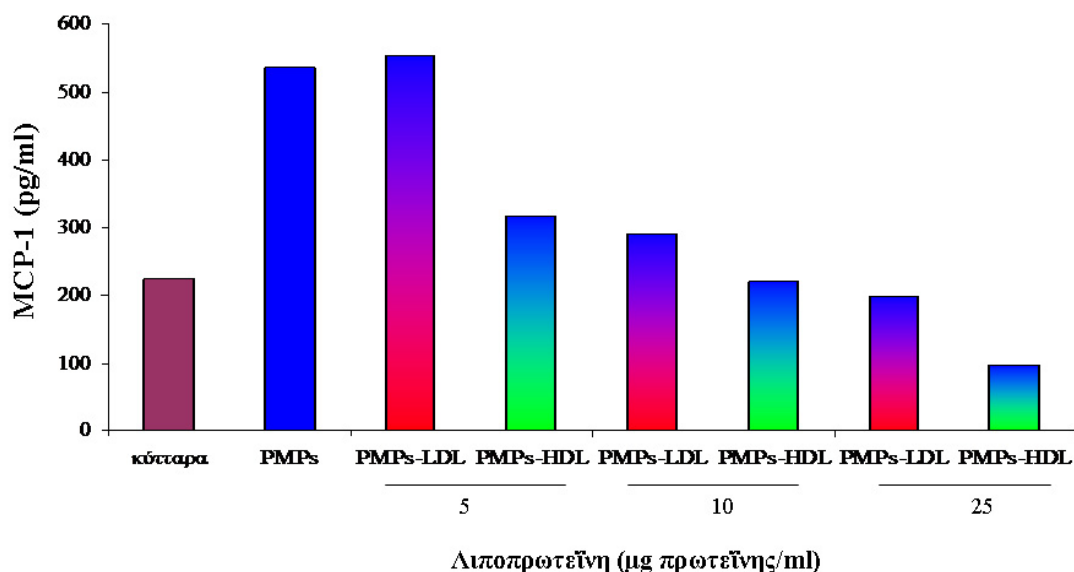
Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, οι λιποπρωτεΐνες δεν προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση των παραπάνω προσκολλητικών μορίων και στην έκκριση της MCP-1 στην περιοχή συγκεντρώσεων από 5-25 $\mu\text{g/ml}$. Η σύνδεση τόσο της LDL όσο και της HDL με τα PMPs (25 $\mu\text{g/ml}$) έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της ενεργοποιητικής τους δράσης κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στις 5h επώαση όπως φαίνεται από την μεμβρανική έκφραση των προσκολλητικών μορίων και την έκκριση της MCP-1 (Εικόνες 7.41, 7.42 και 7.43). Η HDL κατά τη σύνδεσή της με τα PMPs εμφάνισε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από ότι η LDL. Αντίθετα στις 24h επώαση, τόσο η LDL όσο και η HDL αύξησαν σημαντικά κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την ενεργοποιητική δράση των PMPs όσον αφορά την έκφραση των παραπάνω προσκολλητικών μορίων (Εικόνες 7.44 και 7.45). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των λιποπρωτεϊνών στις παραπάνω βιολογικές δράσεις κατά τη σύνδεσή τους με τα PMPs. Όσον αφορά την έκκριση της MCP-1, η LDL κατά τη σύνδεσή της με τα PMPs αύξησε την ενεργοποιητική τους δράση, ενώ αντίθετα η HDL την μείωσε κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 7.46).



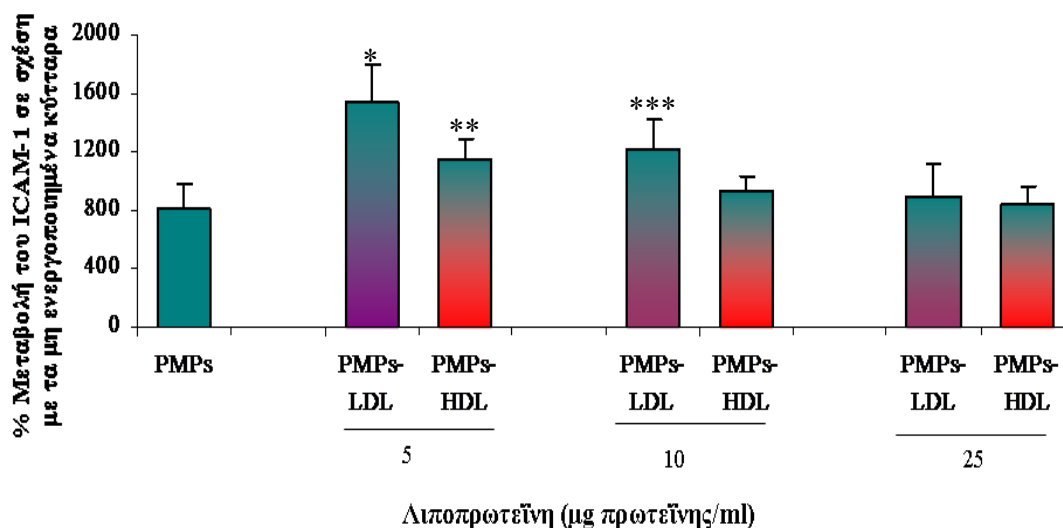
Εικόνα 7.41: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση 25 μg/ml PMPs και των συμπλεγμάτων των PMPs (25 μg/ml) με την LDL ή την HDL (σε συγκεντρώσεις 5-25 μg/ml αντίστοιχα) μετά από 5h επώαση με τα HUVECs στην έκφραση του ICAM-1. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 5 πειράματα. (*P=0.04, #P=0.02 και **P=0.008 σε σύγκριση με τα PMPs).



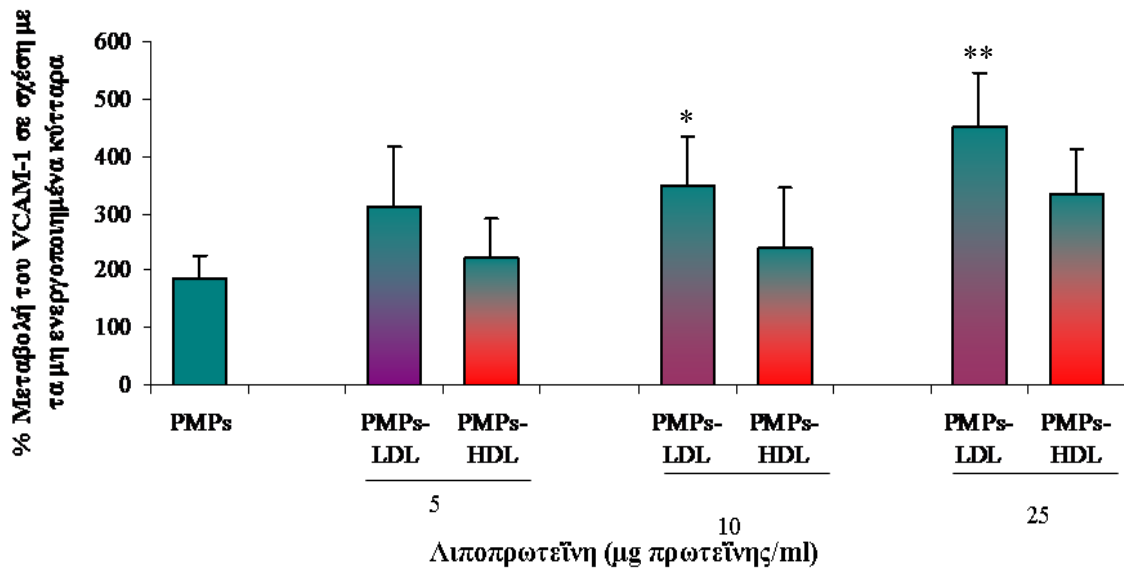
Εικόνα 7.42: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση 25 μg/ml PMPs και των συμπλεγμάτων των PMPs (25 μg/ml) με την LDL ή την HDL (σε συγκεντρώσεις 5-25 μg/ml αντίστοιχα) μετά από 5h επώαση με τα HUVECs στην έκφραση του VCAM-1. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 3 πειράματα. (*P=0.001, **P=0.0043, ***P=0.005 και *\$P=0.04 σε σύγκριση με τα PMPs).



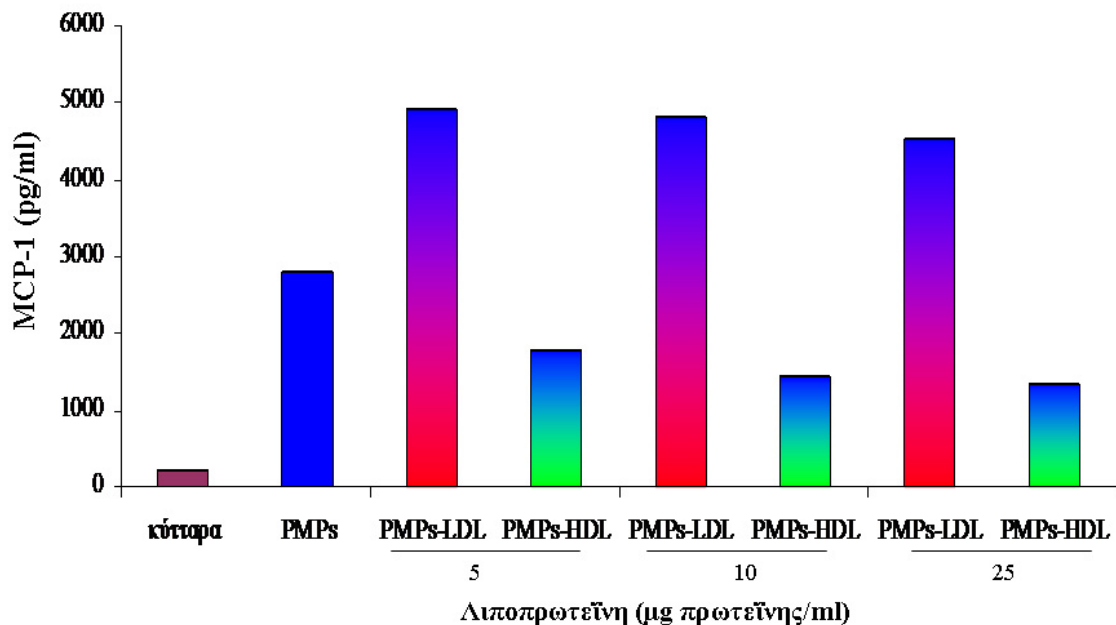
Εικόνα 7.43: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση 25 μg/ml PMPs και των συμπλεγμάτων των PMPs (25 μg/ml) με την LDL ή την HDL (σε συγκεντρώσεις 5-25 μg/ml αντίστοιχα) μετά από 5h επώαση με τα HUVECs στην έκκριση του MCP-1.



Εικόνα 7.44: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση 25 μg/ml PMPs και των συμπλεγμάτων των PMPs (25 μg/ml) με την LDL ή την HDL (σε συγκεντρώσεις 5-25 μg/ml αντίστοιχα) μετά από 24h επώαση με τα HUVECs στην έκφραση του ICAM-1. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 3 πειράματα. (*P=0.03, **P=0.005 και ***P=0.04 σε σύγκριση με τα PMPs).



Εικόνα 7.45: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση 25 μg/ml PMPs και των συμπλεγμάτων των PMPs (25 μg/ml) με την LDL ή την HDL (σε συγκεντρώσεις 5-25 μg/ml αντίστοιχα) μετά από 24h επώαση με τα HUVECs στην έκφραση του VCAM-1. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 3 πειράματα. (*P=0.03 και **P=0.04 σε σύγκριση με τα PMPs).

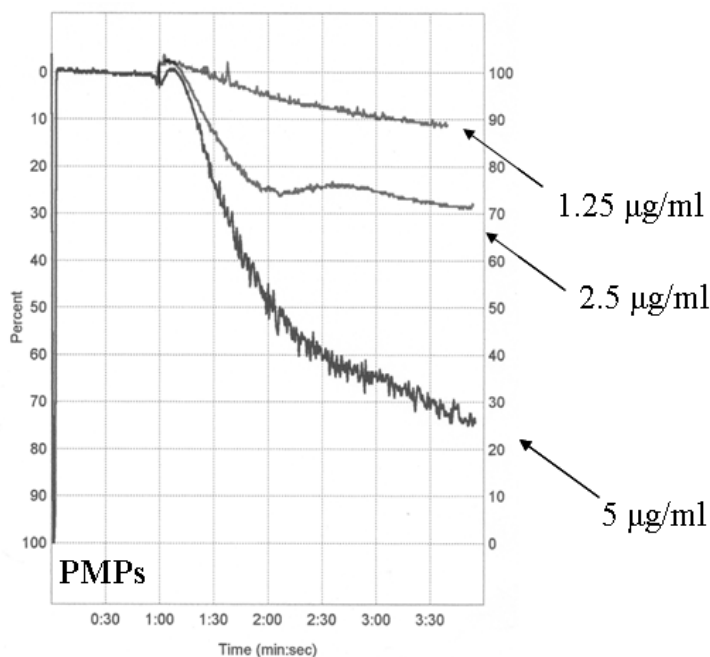


Εικόνα 7.46: Αντιπροσωπευτικό γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση 25 μg/ml PMPs και των συμπλεγμάτων των PMPs (25 μg/ml) με την LDL ή την HDL (σε συγκεντρώσεις 5-25 μg/ml αντίστοιχα) μετά από 24h επώαση με τα HUVECs στην έκκριση του MCP-1.

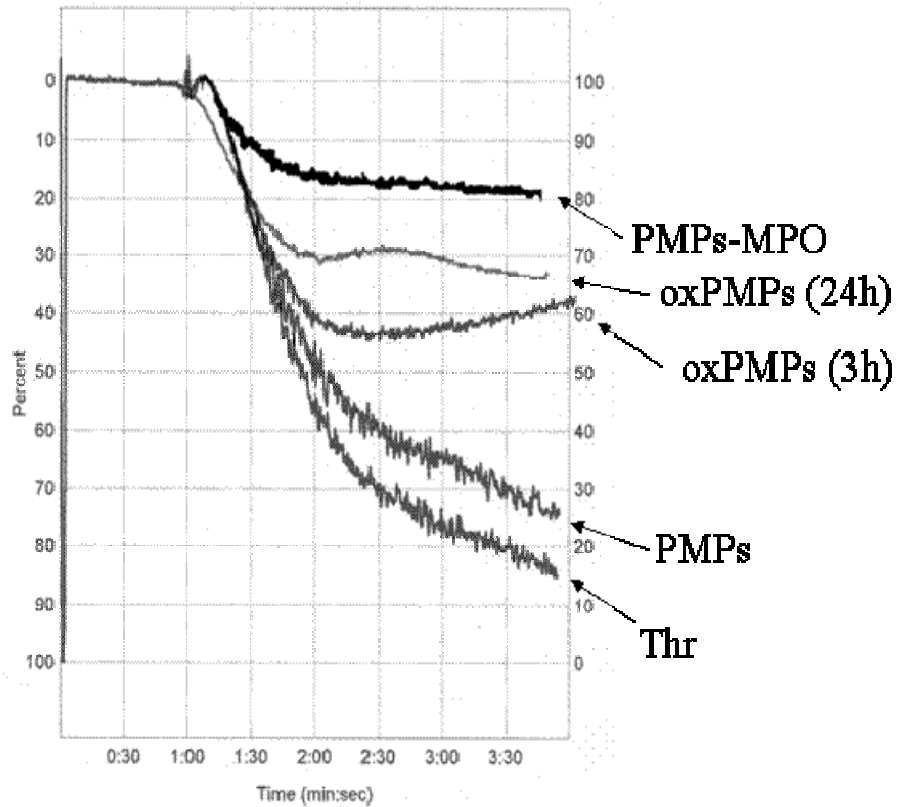
Μελέτη της επίδρασης των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Στις προηγούμενες παραγράφους είδαμε ότι τα PMPs είναι ευαίσθητα στην επίδραση του οξειδωτικού στρες και ότι αυτό επηρεάζει το πρωτεϊνικό και λιπιδιακό περιεχόμενο των PMPs, καθώς και τη βιολογική τους δράση στην ενεργοποίηση των HUVECs, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Στη συνέχεια της μελέτης μας διερευνήσαμε την επίδραση των PMPs και των οξειδωμένων PMPs στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ένα στάδιο που κατέχει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της αθηροθρόβωσης.

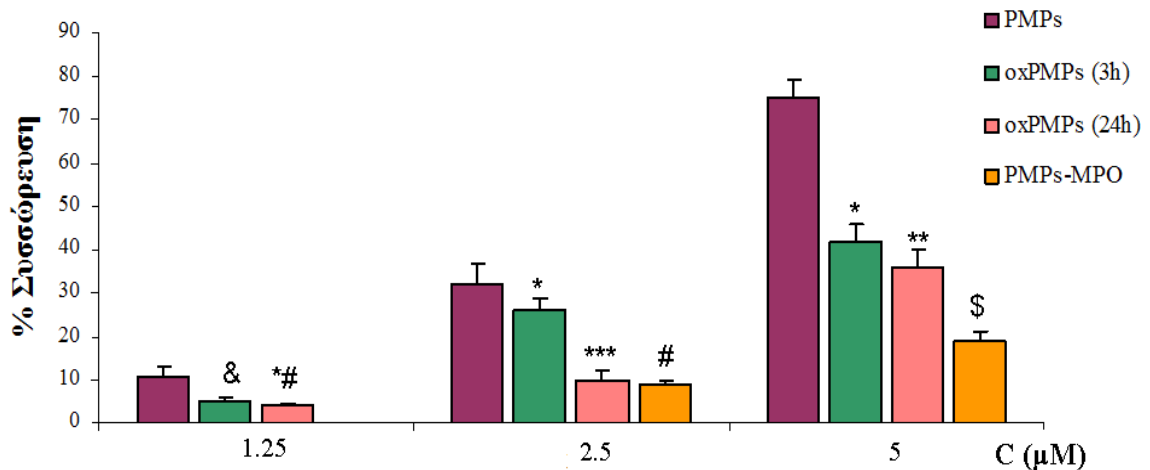
Η επίδραση των PMPs ή των οξειδωμένων PMPs στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκε σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα PMPs εμφάνισαν μια δοσο-εξαρτώμενη (στην περιοχή συγκεντρώσεων από 1.25-5 $\mu\text{g/ml}$) συσσωρευτική δράση στα πλυμένα αιμοπετάλια (Εικόνα 7.47). Η οξειδωτική τροποποίησή τους, τόσο με τον χαλκό όσο και με την MPO, έχει ως συνέπεια τη μείωση της συσσωρευτικής τους δράσης στα πλυμένα αιμοπετάλια κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνες 7.48 και 7.49).



Εικόνα 7.47: Αντιπροσωπευτική καμπύλη συσσωρευομετρίας όπου φαίνεται η δοσο-εξαρτώμενη συσσωρευτική δράση των PMPs σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου.

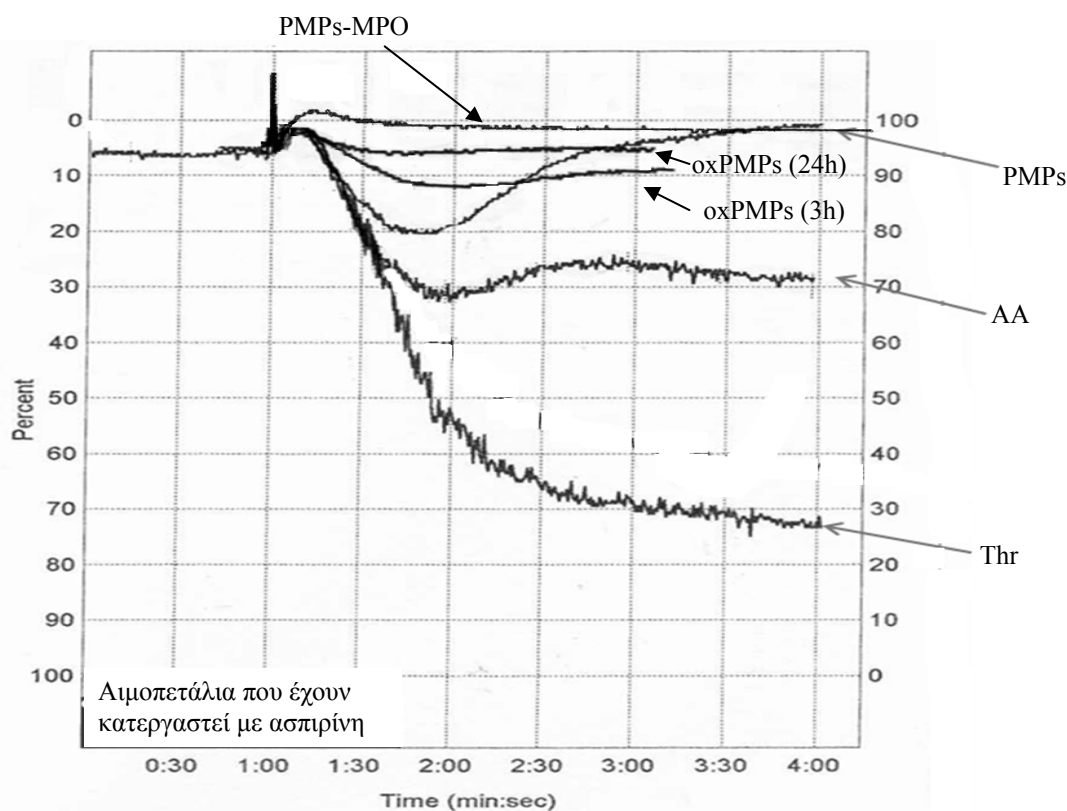


Εικόνα 7.48: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η συσσωρευτική δράση των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών τους σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, παράλληλα με τη δράση 0.2 U/ml θρομβίνης (Thr) σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου.



Εικόνα 7.49: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η δόσο-εξαρτώμενη συσσωρευτική δράση των PMPs και των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών τους σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση από 5 πειράματα (* $P=0.04$, ** $P=0.05$, $^{\S}P=0.000$, *** $P=0.02$, # $P=0.01$, & $P=0.019$ και *# $P=0.009$).

Κατόπιν, προχωρήσαμε στη διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs συσσωρεύουν τα αιμοπετάλια. Παρατηρήσαμε ότι η δράση τους στα αιμοπετάλια μειώνεται σημαντικά παρουσία ασπιρίνης, ένδειξη ότι αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στον μεταβολίτη του AA (π.χ. το TxA₂) το οποίο μεταφέρεται από τα PMPs. Η κατεργασία των αιμοπεταλίων με την ασπιρίνη οδήγησε σε μια μείωση κατά 71.7±7.9% (n=3) της επαγόμενης από τα PMPs συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, ενώ τα οξειδωμένα PMPs τόσο με τον χαλκό όσο και με την MPO έχασαν εντελώς τη συσσωρευτική τους δράση (Εικόνα 7.50). Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια κατεργάστηκαν και με τον ειδικό αναστολέα του PAF, το CV3988 (30 μM), το οποίο όμως απέτυχε να αποτρέψει την επαγόμενη από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

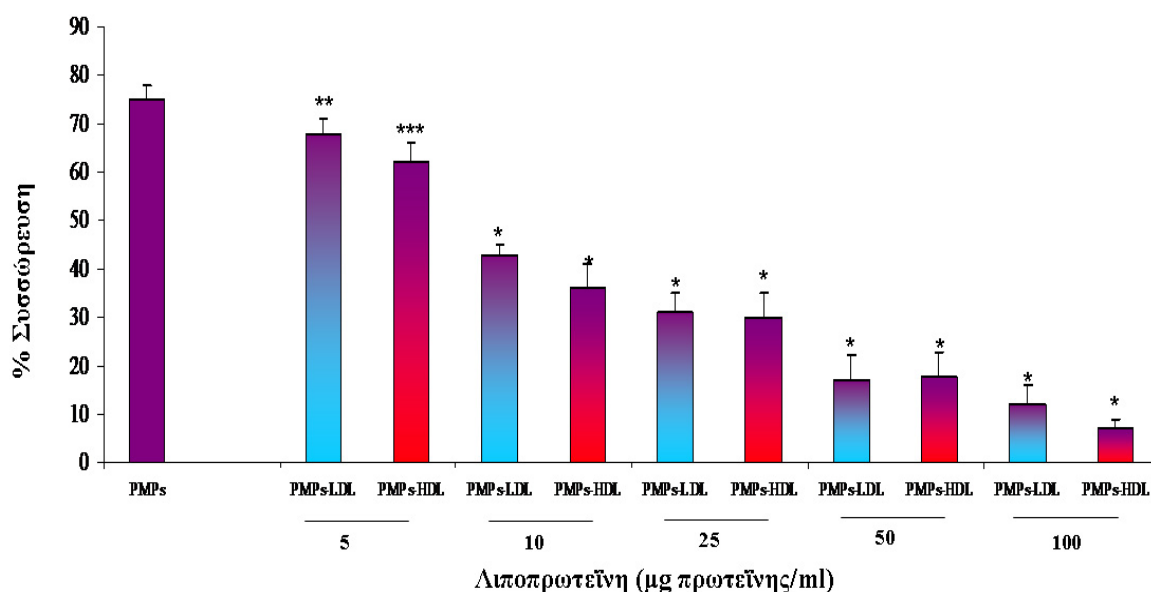


Εικόνα 7.50: Αντιπροσωπευτική καμπύλη συσσωρευομετρίας όπου φαίνεται η μειωμένη συσσωρευτική δράση του AA, των PMPs και των οξειδωμένων μορφών τους (5 μg/ml) σε σύγκριση με την επίδραση της Thr (0.2 U/ml) σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου που έχουν κατεργαστεί με ασπιρίνη.

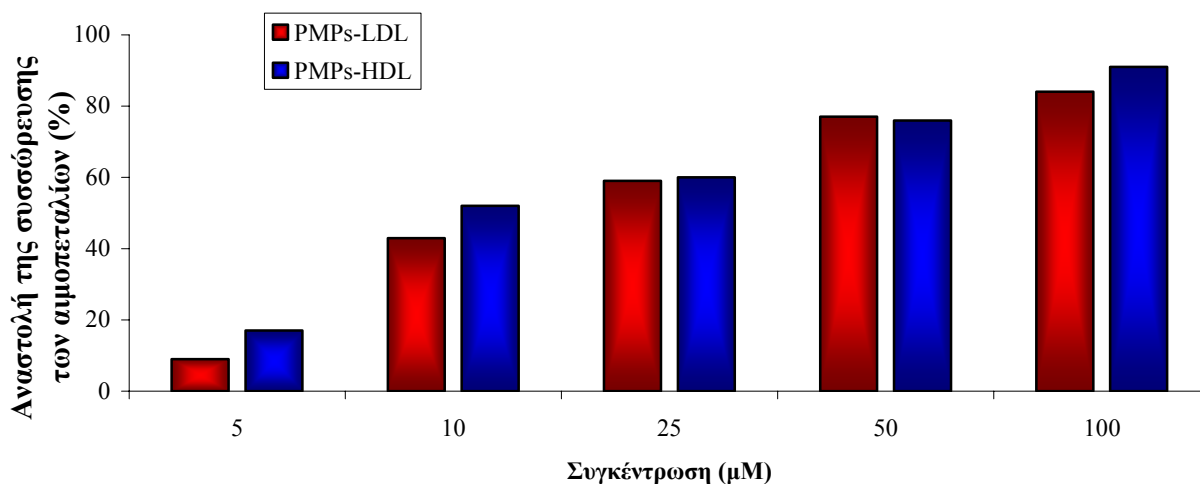
Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Μέχρι σήμερα δεν ήταν γνωστό εάν τα PMPs αλληλεπιδρούν με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος LDL και HDL αντίστοιχα και εάν τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις έχουν βιολογικό ρόλο ιδιαίτερα όσον αφορά την παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης. Σε προηγούμενες παραγράφους, είδαμε ότι οι παραπάνω λιποπρωτεΐνες συνδέονται με τα PMPs και επηρεάζουν σημαντικά την ενεργοποιητική τους δράση στα HUVECs. Στη συνέχεια μελετήσαμε τον ρόλο της και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vitro*. Συγκεκριμένα μελετήθηκε στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου.

Παρατηρήσαμε ότι η σύνδεση των λιποπρωτεϊνών σε συγκεντρώσεις από 5-100 $\mu\text{g/ml}$ με τα PMPs (5 $\mu\text{g/ml}$) μείωσε σημαντικά τη συσσωρευτική δράση των PMPs κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (*Εικόνα 7.51*). Η LDL σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$ ανέστειλε κατά 84% τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε σχέση με τη συσσώρευση που προκαλούν τα PMPs, ενώ η HDL στην ίδια συγκέντρωση κατά 91% αντίστοιχα. Στην *Εικόνα 7.52*, φαίνεται η ανασταλτική δράση των συμπλεγμάτων των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες LDL ή HDL, στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Οι ίδιες οι λιποπρωτεΐνες LDL ή HDL, δεν προκαλούν καμία δράση στα πλυμένα αιμοπετάλια στην περιοχή συγκεντρώσεων από 5-100 $\mu\text{g/ml}$.



Εικόνα 7.51: Γράφημα στηλών όπου φαίνεται η επίδραση 5 µg/ml PMPs και των συμπλεγμάτων των PMPs (5 µg/ml) με την LDL ή την HDL (σε συγκεντρώσεις 5-100 µg/ml αντίστοιχα) στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 5 πειράματα (*P=0.000, **P=0.054 και ***P=0.009).



Εικόνα 7.52: Η ανασταλτική δράση των συμπλεγμάτων των PMPs (σε συγκέντρωση 5 µg/ml) με τις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL (σε συγκεντρώσεις από 5-100 µg/ml) στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Συζήτηση

Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των PMPs που παράγονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

Τα PMPs είναι μικροσκοπικά μεμβρανικά κυστίδια που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους και εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα χαρακτηριστικά των κυττάρων προέλευσής τους. Εξαιτίας του πολύ μικρού τους μεγέθους δεν ανιχνεύονται με τις κλασσικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στα αιμοπετάλια. Στην διεθνή επιστημονική κοινότητα δεν υπάρχει ακόμα μια ειδική και ευαίσθητη μέθοδος για την ταυτοποίηση των PMPs. Χρησιμοποιούνται πολλά και διαφορετικά μεταξύ τους πρωτόκολλα για την ανίχνευση των PMPs. Από αυτά τα πιο κοινά αποδεκτά είναι με κυτταρομετρία ροής και με ανοσοενζυμικό προσδιορισμό (μέθοδος ELISA). Επιπρόσθετα, πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν διαφορετικές προσεγγίσεις σε βασικές διαδικασίες παρασκευής των PMPs, όπως είναι η μέθοδος συλλογής του αίματος, οι φυγοκεντρήσεις, η πλύση του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων ή το μέσο επαναιώρησης των PMPs, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η σύγκριση των μεταξύ τους αποτελεσμάτων. Επιπλέον, τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των PMPs είναι πολλά και διαφορετικά μεταξύ τους. Επίσης, πολλοί ερευνητές καταψύχουν τα δείγματα των πλυμένων αιμοπεταλίων πριν την παρασκευή των PMPs ή τα ίδια τα PMPs μετά την απομόνωσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (-80°C) με αποτέλεσμα να επηρεάζονται τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά τους [127, 137, 212].

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι υπάρχει ανάγκη να συσταθεί μία ειδική και ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση των PMPs. Παρόλα αυτά, έχει προταθεί ότι αν ένας μικρού μεγέθους πληθυσμός σωματιδίων (0.1-1 μm) εκφράζει θετικότητα για την Αννεξίνη-V τότε τα σωματίδια αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως μικροσωματίδια. Ως

ελάχιστο μέγεθος καθορίζεται το 0.1 μm , γιατί οι περισσότεροι κυτταρομετρητές δεν μπορούν να ξεχωρίσουν μικρότερου μεγέθους μικροσωματίδια από το background ή τα διάφορα υπολείμματα (debris). Ως μέγιστο μέγεθος καθορίζεται το 1 μm , αφού μεγαλύτερου μεγέθους μικροσωματίδια δεν μπορούν να ξεχωρίσουν από τα συσσωματώματα των μικροσωματιδίων ή τα αιμοπετάλια ή τα συσσωματώματα των μικροσωματιδίων με τα αιμοπετάλια.

Επίσης, είναι γνωστό ότι η Αννεξίνη-V είναι μια πρωτεΐνη που προέρχεται από τον πλακούντα και η οποία εμφανίζει αντιθρομβωτική δράση δεσμευόμενη με αρνητικά φωσφολιπίδια, (κυρίως την PS) διαμέσου γεφυρών Ca^{2+} . Τα PMPs που παράγονται από τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίηση με θρομβίνη ή από ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 κ.τ.λ. παράγουν PMPs τα οποία περιέχουν μεγάλη ποσότητα PS στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η επιφανειακή έκφραση της PS είναι το κύριο χαρακτηριστικό των PMPs. Η θετικότητα προς την Αννεξίνη-V όμως δεν είναι επαρκές στοιχείο ώστε να χαρακτηριστούν τα μικροσωματίδια αυτά ως PMPs. Πρέπει τα μικροσωματίδια αυτά να εκφράζουν και άλλες πρωτεΐνες χαρακτηριστικές των κυττάρων προέλευσής τους. Για παράδειγμα τα PMPs θα πρέπει να εκφράζουν πρωτεΐνες που προέρχονται από τα αιμοπετάλια όπως είναι το CD41a το οποίο αναγνωρίζει την α_{IIb} υπομονάδα της ιντεγκρίνης $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Χρησιμοποιώντας λοιπόν την Αννεξίνη-V και το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD41a ταυτοποιήσαμε τα PMPs της εκάστοτε παρασκευής μας.

Στα αρχικά μας πειράματα, χρησιμοποιήσαμε τρεις διαφορετικούς αγωνιστές: το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (χημική ενεργοποίηση), τη θρομβίνη ή το συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου (βιολογική ενεργοποίηση που προσεγγίζει τις συνθήκες *in vivo*) προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό παραγωγής των PMPs. Η χρήση των διαφόρων αγωνιστών έγινε προκειμένου να μελετήσουμε τις διάφορες πορείες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την παραγωγή των PMPs, αφού κάθε αγωνιστής είναι πιθανόν να προκαλεί και διαφορετική έκφραση των διαφόρων μεμβρανικών υποδοχέων αλλά και προσκολλητικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs. Παρατηρήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις παρόμοια θετικότητα ως προς την έκφραση του CD41a καθώς και στην πρόσδεση της Αννεξίνης-V στην χαρακτηριστική περιοχή των PMPs, ενώ το μόνο γεγονός που διαφοροποίησε τους τρεις αγωνιστές ήταν η έκφραση της P-σελεκτίνης, του CD40L αλλά και του $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ που αποτελούν χαρακτηριστικά αντιγόνα των ενεργοποιημένων

αιμοπεταλίων και δεν εκφράζονται στα ενεργοποιημένα με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 αιμοπετάλια και στη μεμβράνη των PMPs. Αντίθετα, κατόπιν ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με θρομβίνη ή το συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου η έκφραση των παραπάνω στο εναιώρημα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων ήταν σημαντική. Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, αφού η μεν ενεργοποίηση με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 έχει ως αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την παραγωγή μικροσωματιδίων, η δε ενεργοποίηση με θρομβίνη ή το συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου οδηγεί στη συσσώρευση και έκκριση του περιεχομένου των πυκνών- και α -κοκκίων. Παρόλα αυτά, στο πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο η έκφραση τους ήταν αρκετά μικρότερη, ενώ πάνω στη μεμβράνη των PMPs κατόπιν υπερφυγοκέντρωσης του εναιωρήματος ήταν αμελητέα, γεγονός που φανερώνει ότι τόσο η P-σελεκτίνη όσο και CD40L που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα με θρομβίνη ή το συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου αιμοπετάλια είναι διαλυτά και όχι συνδεδεμένα με τα PMPs. Τα αποτελέσματά μας, έρχονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες που δείχνουν ότι η περισσότερη P-σελεκτίνη που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα με κολλαγόνο αιμοπετάλια είναι διαλυτή [470] και ότι η έκφραση των διαφόρων αντιγόνων πάνω στη μεμβράνη των PMPs εξαρτάται από την μέθοδο που επιλέχθηκε για να παραχθούν [136].

Επίσης, σύμφωνα με μελέτη του εργαστηρίου μας, τα PMPs της κυκλοφορίας είναι φορείς της Lp-PLA₂ του πλάσματος [414]. Η ύπαρξη της Lp-PLA₂ στα PMPs μπορεί να έχει παθοφυσιολογική σημασία σε συνδυασμό με τους υποδοχείς και τα άλλα βιοδραστικά μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των σωματιδίων αυτών άλλα και ως προς το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά λιπίδια όπως ο PAF, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και στην αθηρογένεση [415]. Γι' αυτό το λόγο, προσδιορίστηκε η ενεργότητα της Lp-PLA₂ στα PMPs που παρήχθησαν με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, τη θρομβίνη ή το συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου, προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στην έκφρασή της. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ενεργότητα της Lp-PLA₂ στα PMPs που παρήχθησαν και με τους τρεις παραπάνω ενεργοποιητές ήταν παρόμοια.

Ο τρόπος παραγωγής των PMPs ο οποίος τελικά επιλέχθηκε για την περαιτέρω συνέχιση της μελέτης, ήταν διαμέσου της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187. Επιπρόσθετα, το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 επιλέχθηκε ως ενεργοποιητής γιατί βρίσκεται στην κορυφή της λίστας των αγωνιστών ως προς την

ικανότητα τους να επάγουν τον σχηματισμό των PMPs: ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 > C5b9-του συστήματος του συμπληρώματος > συνδυασμός θρομβίνης και κολλαγόνου > θρομβίνη ή κολλαγόνο > επινεφρίνη ή ADP [116].

Η αλληλεπίδραση των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και ο ρόλος της στην αθηροθρόμβωση

Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα PMPs έχουν την ικανότητα να συνδέονται με την LDL ή την HDL ή τις τροποποιημένες μορφές τους *in vitro* κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, δείξαμε ότι η πρόσδεση της LDL ή της HDL με τα PMPs επηρεάζει σημαντικά τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση των HUVECs όσον αφορά την έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 και την έκκριση της MCP-1.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος αλληλεπιδρούν με τα αιμοπετάλια και επηρεάζουν τη λειτουργία τους και την ενεργοποίησή τους κάτω από την επίδραση διαφόρων αγωνιστών [471, 472]. Παρόλα αυτά υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για τις θέσεις πρόσδεσης επάνω στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη και το μηχανισμό αλληλεπίδρασής τους [318]. Ένας αιμοπεταλιακός υποδοχέας που είναι δυνατόν να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με την LDL είναι ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$. Υπάρχει μια πληθώρα από μελέτες που δείχνουν ότι τόσο η α_{IIb} όσο και η β_3 υπομονάδα είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση της LDL με τα αιμοπετάλια [321, 322], ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι τόσο ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ ως σύμπλεγμα όσο και η α_{IIb} ή η β_3 υπομονάδα ξεχωριστά δεν επηρεάζουν τη σύνδεση της με τα ήρεμα αιμοπετάλια [323]. Είναι γνωστό ότι τα PMPs είναι πλούσια στον $\alpha_{IIb}\beta_3$ υποδοχέα, ο οποίος υπάρχει κυρίως στην ενεργή του διαμόρφωση [407]. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση της LDL με τα PMPs μειώνει σημαντικά την πρόσδεση του anti-CD41a στο CD41a που σημαίνει ότι τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις είναι δυνατόν να γίνονται και διαμέσου της α_{IIb} υπομονάδας του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Επίσης είναι γνωστό ότι η LDL μπορεί να αλληλεπιδράσει διαμέσου της apoB-100 με ανιοντικά τμήματα πρωτεογλυκανών [473]. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των PMPs είναι η έκφραση στην επιφάνειά τους αρνητικά

φορτισμένων φωσφολιπιδίων (κυρίως της PS). Πράγματι, κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τέτοια αρνητικά φωσφολιπίδια μεταφέρονται στην εξωτερική μεμβράνη των αιμοπεταλίων και των PMPs κατά το σχηματισμό τους [474]. Επομένως θα ήταν πιθανό η αλληλεπίδραση των PMPs με την LDL να γίνεται διαμέσου ιοντικών δεσμών μεταξύ της apoB-100 της LDL και των αρνητικών φορτισμένων φωσφολιπιδίων των PMPs. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός αυτός δεν είναι πιθανός, αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η αλληλεπίδραση της LDL με τα PMPs δεν επηρεάζει την πρόσδεση της Αννεξίνης-V, που αναγνωρίζει ανιοντικά φωσφολιπίδια των PMPs, κυρίως την PS. Έχει δειχθεί ότι υπάρχει και άλλος ένας αιμοπεταλιακός υποδοχέας για την αλληλεπίδραση με την LDL, ο apoER2, που είναι γνωστός και ως σχετιζόμενη με τον LDL υποδοχέα πρωτεΐνη-8 και είναι μέλος της οικογένειας των LDL υποδοχέων [319]. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνεια τους περιοχές που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για την LDL οι οποίες διαφέρουν ανοσολογικά από τους κλασσικούς LDL-υποδοχείς [471]. Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμα γνωστό εάν τα PMPs εκφράζουν τους παραπάνω υποδοχείς, επομένως απαιτούνται επιπλέον μελέτες για να διαπιστώσουμε τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο η LDL συνδέεται με τα PMPs.

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση της HDL με τα αιμοπετάλια υπάρχουν λιγότερα δεδομένα. Μελέτες δείχνουν ότι τα σωματίδια της HDL μέσω της apoA-I συνδέονται με τα αιμοπετάλια είτε διαμέσου του υποδοχέα τους $\alpha_{IIb}\beta_3$ [324] είτε διαμέσου του υποδοχέα εκκαθαριστή SR-BI [320]. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια διαμέσου της apoER2 είναι δυνατόν να συνδέονται με την apoE της HDL [320]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η σύνδεση της HDL με τα PMPs μειώνει σημαντικά την έκφραση του anti-CD41a, άρα τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις είναι δυνατόν να πραγματοποιούνται και διαμέσου της α_{IIb} υπομονάδας του υποδοχέα τους $\alpha_{IIb}\beta_3$. Μέχρις στιγμής όμως είναι άγνωστο εάν τα PMPs εκφράζουν τον SR-BI, ή τον apoER2. Και σε αυτή την περίπτωση απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να διασαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα PMPs δεσμεύουν την HDL.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει το γεγονός ότι η σύνδεση τόσο της LDL όσο και της HDL με τα PMPs αυξάνει σημαντικά την έκφραση του anti-CD36 που αναγνωρίζει τον υποδοχέα εκκαθαριστή CD36. Είναι γνωστό ότι ο υποδοχέας CD36 συνδέεται με την οξειδωμένη LDL αναγνωρίζοντας οξειδωμένα φωσφολιπίδια, μακριές αλυσίδες λιπαρών αλυσίδων και θρομβοσπονδίνες και εκφράζεται στα μακροφάγα, στα αιμοπετάλια και στα MPs [475, 476]. Επομένως, τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις είναι πιθανόν να επάγουν και

δομικές αλλαγές. Πράγματι, ένα ενδιαφέρον στοιχείο της βιολογίας του CD36, είναι ότι η έκφρασή του στα μακροφάγα αυξάνεται όταν τα κύτταρα αυτά εκτίθενται σε oxLDL [135]. Είναι πιθανόν, η σύνδεση των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες να τροποποιεί τη δομή τους, με αποτέλεσμα να αποκαλύπτονται περισσότερες θέσεις του CD36 και επομένως να αυξάνεται η έκφραση του στην επιφάνεια των PMPs. Πολλές *in vitro* μελέτες και πειράματα με CD36⁻ ποντίκια έδειξαν ότι το CD36 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η αθηροσκλήρωση [477], η φλεγμονή [326] και η θρόμβωση [478]. Ο ακριβής μηχανισμός και η σπουδαιότητα του παραπάνω ευρήματος στην παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης παραμένει υπό διερεύνηση.

Η αλληλεπίδραση των λιποπρωτεϊνών με τα PMPs και η ύπαρξη συμπλεγμάτων PMPs-λιποπρωτεϊνών στο ανθρώπινο πλάσμα μπορεί να έχει σημαντική παθοφυσιολογική σημασία στην αθηροσκλήρωση και την καρδιαγγειακή νόσο. Πράγματι, πέραν του καλά εδραιωμένου ρόλου της LDL και της HDL στην αθηροσκλήρωση, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα PMPs συμμετέχουν και αυτά στο μηχανισμό της αθηρωμάτωσης [479]. Ένα σημαντικό στάδιο της αθηροθρόμβωσης είναι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία όπως είναι γνωστό διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θρόμβωση και στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [312, 409, 480].

Επομένως, μελετήσαμε αρχικά την πιθανή επίδραση των συμπλεγμάτων των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vitro*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα PMPs επάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ η σύνδεση τόσο της LDL όσο και της HDL με τα PMPs μειώνει σημαντικά τη συσσωρευτική τους δράση κατά επίσης δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η HDL κατά τη σύνδεση της με τα PMPs εμφάνισε μεγαλύτερη ανασταλκτική δράση, από ότι η LDL αντίστοιχα στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Οι ίδιες οι λιποπρωτεΐνες στην περιοχή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν (από 5-100 μg πρωτεΐνη/ml), δεν προκάλεσαν καμία δράση στα πλυμένα αιμοπετάλια.

Κατόπιν, μελετήσαμε τη δράση αυτών των συμπλεγμάτων στην ενεργοποίηση των HUVECs μετά από 5h ή 24h επώαση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, οι λιποπρωτεΐνες δεν προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 και στην έκκριση της MCP-1 στην περιοχή συγκεντρώσεων που χρησιμοποιούνται (από 5-25 μg πρωτεΐνη/ml). Η σύνδεση τόσο της LDL όσο και της HDL με τα PMPs έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ενεργοποιητικής τους

δράσης κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στις 5h επώαση όπως φαίνεται από την μεμβρανική έκφραση των παραπάνω προσκολλητικών μορίων και την έκκριση της MCP-1. Η HDL κατά τη σύνδεσή της με τα PMPs εμφάνισε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από ότι η LDL. Αντίθετα στις 24h επώαση, τόσο η LDL όσο και η HDL αύξησαν σημαντικά κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την ενεργοποιητική δράση των PMPs όσον αφορά την έκφραση των ICAM-1 και VCAM-1. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των λιποπρωτεϊνών στις παραπάνω βιολογικές δράσεις κατά τη σύνδεσή τους με τα PMPs. Όσον αφορά την έκκριση της MCP-1, η LDL κατά τη σύνδεσή της με τα PMPs αύξησε την ενεργοποιητική τους δράση, ενώ αντίθετα η HDL την μείωσε κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Η εργασία αυτή δείχνει για πρώτη φορά ότι οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος συνδέονται με τα PMPs και ότι επηρεάζουν σημαντικά την ενεργοποιητική δράση των PMPs στα ανθρώπινα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα PMPs εσωτερικεύονται από διάφορα κύτταρα, με αποτέλεσμα την μεταφορά των διαφόρων πρωτεϊνών τους στα κύτταρα αυτά [136]. Στα πλαίσια αυτά, δείξαμε με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής αλλά και με ανοσοφθορισμό, ότι τα PMPs όχι μόνο προσδένονται αλλά και εσωτερικεύονται στα HUVECs αντίστοιχα. Επίσης, όπως θα αναλύσουμε σε επόμενη παράγραφο τα PMPs επάγουν γονιδιακή έκφραση στα HUVECs με αποτέλεσμα να τροποποιείται ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών. Όποτε η σημασία της πρόσδεσης των λιποπρωτεϊνών στα PMPs, μπορεί να είναι η μεταφορά δραστικών ουσιών των PMPs σε κύτταρα που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τις λιποπρωτεΐνες, ή οι λιποπρωτεΐνες να μεταφέρονται σε κύτταρα που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τα PMPs. Συνεπώς τα PMPs μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν έναν νέο μηχανισμό με τον οποίο πιθανώς τα PMPs να συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης.

Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs και ο ρόλος της στην αθηροθρόμβωση

Ένα από τα πιο διαδεδομένα θέματα στη βιολογία είναι ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στη σηματοδότηση και την παθοφυσιολογία [481]. Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [482], αφού συμμετέχει σε μια πληθώρα από βιολογικές διαδικασίες, π.χ. στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [483], σε αλλαγές στη λειτουργία των αιμοπεταλίων [484] και στην τροποποίηση των διαφόρων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων [260, 288]. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό εάν τα PMPs είναι ευαίσθητα στην επίδραση του οξειδωτικού στρες και αν αυτό επηρεάζει τη βιολογική τους δραστηριότητα. Η παρούσα διατριβή δείχνει για πρώτη φορά ότι τα PMPs είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, *in vitro* και ότι η οξειδωτική τους τροποποίηση επηρεάζει σημαντικά τη βιολογική τους δράση σε δύο συστήματα: τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση των HUVECs όπως αυτό φαίνεται από την έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 και την έκκριση της MCP-1.

Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs *in vitro*, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 3 συστήματα οξείδωσης, I) με τον χαλκό, II) με την MPO που προσεγγίζει τις συνθήκες οξείδωσης *in vivo* και III) με NaOCl. Η οξείδωση με NaOCl έγινε προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στην οξειδωτική τροποποίηση των PMPs, σε σχέση με το σύστημα της MPO, εξαιτίας περιορισμένης διαθεσιμότητας του ενζύμου ή της περιορισμένης δράσης του να καταλύσει το σχηματισμό του HOCl [460]. Ο έλεγχος της οξείδωσης των PMPs πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής, με τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου Lp-PLA₂, τη μέτρηση των καταλοίπων των λυσινών, με HPTLC καθώς και με SDS-PAGE 5-19 % προκειμένου να διερευνησουμε τυχόν διαφορές στο λιπιδιακό, στο πρωτεϊνικό και στο ενζυμικό περιεχόμενο των PMPs.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής, κατά την οξείδωση με χαλκό στις 3h, παρατηρείται μια μείωση της πρόσδεσης της Αννεξίνης-V κατά 50% στα οξειδωμένα PMPs, ενώ η έκφραση χαρακτηριστικών αντιγόνων τους παραμένει η ίδια. Αντίθετα, στις 24h επώαση μειώνεται δραστικά τόσο η έκφραση των παραπάνω αντιγόνων όσο και η πρόσδεση της Αννεξίνης-V. Η οξείδωση τόσο με το σύστημα της MPO όσο και με το NaOCl προκάλεσε τη δραστική μείωση των αντιγόνων

τους, ενώ η πρόσδεση της Αννεξίνης-V δεν μεταβλήθηκε. Επίσης, προσδιορίστηκε η ενεργότητα της Lp-PLA₂ των PMPs μετά την οξειδωση και βρέθηκε ότι η ενεργότητα των PMPs μειώνεται σημαντικά μετά από την οξειδωση και με τα τρία συστήματα οξειδωσης. Το φαινόμενο αυτό έρχεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, η Lp-PLA₂ μειώνεται προοδευτικά [485, 486], το οποίο είναι δυνατόν να αποτελεί ένα δείκτη οξειδωσης [487]. Ακόμη, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs προκάλεσε σημαντική μείωση των καταλοίπων των λυσινών τους και με τα τρία συστήματα οξειδωσης. Επιπρόσθετα, η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19% έδειξε σημαντική τροποποίηση των πρωτεϊνών το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, ενώ με τη βοήθεια της HPTLC δείξαμε ότι η οξειδωση των PMPs με χαλκό επηρεάζει το φωσφολιπιδιακό τους περιεχόμενο. Συνοψίζοντας, η οξειδωση των PMPs επηρεάζει σημαντικά τόσο το λιπιδιακό όσο και το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο.

Η επίδραση των PMPs ή των οξειδωμένων PMPs στην παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης μελετήθηκε αρχικά στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα PMPs εμφάνισαν μια δοσο-εξαρτώμενη συσσωρευτική δράση στα πλυμένα αιμοπετάλια η οποία μειώνεται σημαντικά παρουσία της ασπιρίνης, η οποία αναστέλλει μη αντιστρεπτά την COX-1, μειώνοντας επομένως την παραγωγή του TxA₂ και τη συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων [488, 489]. Επομένως, είναι δυνατόν η δράση αυτή να οφείλεται στο AA που μεταφέρεται από τα PMPs στα αιμοπετάλια. Η οξειδωτική τροποποίησή τους έχει ως συνέπεια τη μείωση της συσσωρευτικής τους δράση στα πλυμένα αιμοπετάλια, η οποία μειώνεται δραστικά κατά την προεπώαση των αιμοπεταλίων με την ασπιρίνη. Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια κατεργάστηκαν και με τον ειδικό αναστολέα του PAF, το CV3988, το οποίο όμως απέτυχε να αποτρέψει την επαγόμενη από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Άρα η δράση των PMPs στα αιμοπετάλια δεν οφείλεται στη δράση του PAF των PMPs ή σε PAF-like οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παράγονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση των PMPs. Κατόπιν, προχωρήσαμε στη μελέτη του ρόλου των PMPs ή των οξειδωμένων PMPs στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας τα PMPs εμφάνισαν μια δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη ενεργοποιητική δράση στα HUVECs όπως αυτή φαίνεται με την αύξηση της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1 και του VCAM-1 και την έκκριση της MCP-1. Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs τόσο με τον χαλκό όσο και με την MPO μείωσε την ενεργοποιητική δράση των PMPs όσον αφορά την έκφραση

των παραπάνω προσκολλητικών μορίων και την έκκριση της MCP-1 μετά από 5h επώασή τους με τα HUVECs, ενώ μετά από 24h επώαση, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs οδήγησε στην αύξηση της ενεργοποιητικής δράσης των PMPs. Συνεπώς, φαίνεται ότι υπάρχει διαφοροποίηση της δράσης τους μεταξύ των 5h και των 24h επώασης. Στη συνέχεια διερευνήσαμε το μηχανισμό με τον οποίο τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs ενεργοποιούν τα HUVECs. Γι' αυτό το λόγο τα HUVECs κατεργάστηκαν παρουσία ασπιρίνης, ώστε να αναστέλλεται η παραγωγή και η έκκριση των μεταβολιτών του AA που παράγονται από τη δράση της COX-1 (π.χ. της προστακυκλίνης). Η ασπιρίνη απέτυχε να μεταβάλλει την επαγόμενη από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs ενεργοποίηση των HUVECs όπως αυτή φαίνεται από τη μεμβρανική έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1. Αντίθετα, η έκκριση της MCP-1 μειώθηκε, ένδειξη ότι αυτή οφείλεται κατά ένα ποσοστό σε μεταβολίτες του AA το οποίο μεταφέρεται από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας CV3988, ο οποίος όμως απέτυχε να αποτρέψει την επαγόμενη από τα PMPs ή τα οξειδωμένα PMPs ενεργοποίηση των HUVECs στις παραπάνω παραμέτρους. Άρα η δράση των PMPs στα HUVECs δεν οφείλεται στη δράση του PAF των PMPs ή σε PAF-like οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παράγονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση των PMPs. Συνεπώς, οι διαφορές στο πρωτεϊνικό και λιπιδιακό περιεχόμενο των οξειδωμένων PMPs φαίνεται να επηρεάζουν τη δράση τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τους Barry et al. [132, 427], οι οποίοι έδειξαν ότι η επίδραση PMPs σε αιμοπετάλια ή ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή την έκφραση του ICAM-1 με αποτέλεσμα να ισχυροποιείται η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα HUVECs. Πιθανολογείται ότι η δράση των PMPs οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε AA και ότι πραγματοποιείται διαμέσου μιας PKC κινάσης. Ο ακριβής μηχανισμός και η σπουδαιότητα των παραπάνω ευρημάτων στην παθοφυσιολογία της φλεγμονής και της θρόμβωσης βρίσκονται υπό διερεύνηση.

Τα PMPs επάγουν γονιδιακή έκφραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου

Η λειτουργική ακεραιότητα του ενδοθηλίου, που αποτελεί την εσωτερική επένδυση των αιμοφόρων αγγείων, είναι αποφασιστικής σημασίας για τη διατήρηση της ροής του αίματος και της αντιθρομβωτικής ικανότητάς του, γιατί το ενδοθήλιο απελευθερώνει χημικούς παράγοντες που ελέγχουν τη χαλάρωση και τη συστολή, τη θρομβογένεση, την ινωδολύση και την ενεργοποίηση ή την αναστολή της ενεργοποίησης άλλων κυττάρων. Πολλές μελέτες έδειξαν, ότι τα HUVECs διεγείρονται από πολλούς παθοφυσιολογικούς ενεργοποιητές, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η γονιδιακή τους έκφραση [490]. Ένας μακροπρόθεσμος στόχος της επιστημονικής κοινότητας, είναι να αναγνωριστούν γονίδια των ενεργοποιημένων HUVECs που συμβάλουν στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης [491].

Επίσης, είναι γνωστό ότι τα HUVECs επικοινωνούν με άλλα κύτταρα του αίματος ανταλλάσσοντας πληροφορίες με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους. Αυτή η επικοινωνία μπορεί να γίνει είτε με αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες ή χημειοκίνες που εκκρίνουν είτε με άλλους μικρούς μοριακούς διαμεσολαβητές όπως είναι τα νουκλεοτίδια ή διάφορα βιοδραστικά λιπίδια είτε μέσω της στενής επαφής τους διαμέσου ειδικών προσκολλητικών μορίων. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στα MPs που παράγονται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα και είναι δυνατόν να συμμετέχουν στη μεταξύ των κυττάρων επικοινωνία [492].

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των MPs παρά το μεγάλο αριθμό μελετών που έχουν γίνει, παραμένει σε μεγάλο ποσοστό αδιευκρίνιστος. Είναι γνωστό ότι τα MPs είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά (πρωτεΐνες και λιπίδια) που προέρχονται από τα κύτταρα από τα οποία παρήχθησαν και γι' αυτό το λόγο είναι δυνατόν να εμφανίζουν πλειοτροπικές δράσεις στη διακυτταρική επικοινωνία [492]. Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστό εάν δρουν κατά ένα παρακρινικό τρόπο ή αν είναι απαραίτητη η επαφή τους με τα κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες πρότειναν μηχανισμούς σύμφωνα με τις οποίους τα PMPs μεταφέρουν πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα την χημειοκίνη RANTES [390] και άλλα βιολογικά δραστικά μόρια των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια των HUVECs [467]. Άλλες μελέτες προτείνουν μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς της ενδοκύτωσης που συμπεριλαμβάνουν είτε υποδοχείς εκκαθαριστές είτε υποδοχείς της PS [468]. Πρόσφατη

έρευνα έδειξε ότι τα MPs μπορούν να μεταφέρουν το RNA τους στα HUVECs [422]. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι τα PMPs αλληλεπιδρούν με τα HUVECs, τα μονοκύτταρα και τα αιματοποιητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η λειτουργικότητά τους [136, 357, 405]. Επίσης, μελέτη έδειξε ότι τα PMPs τροποποιούν τη γονιδιακή έκφραση της μονοκυτταρικής σειράς MM6 [469]. Τα νεότερα αυτά δεδομένα μπορεί να είναι ένας νέος μηχανισμός με τον οποίο τα MPs επικοινωνούν με διάφορα κύτταρα στόχους, επάγοντας σε αυτά γονιδιακή έκφραση με αποτέλεσμα να τροποποιείται ο φαινότυπός τους.

Γι' αυτό το λόγο στη συνέχεια της μελέτης μας διερευνήσαμε εάν τα PMPs συμβάλουν στη φλεγμονώδη διέγερση επάγοντας ή καταστέλλοντας τη γονιδιακή έκφραση στα HUVECs. Έτσι, χρησιμοποιώντας την μέθοδο QPCR η οποία παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση του mRNA, μελετήσαμε τις αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων στα HUVECs μετά την επώασή τους με τα PMPs στις 5h ή στις 24h στη δόση των 25 $\mu\text{g/ml}$, που σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής και της ELISA, προκαλεί μια ενδιάμεση δράση στην ενεργοποίηση των HUVECs. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε η κυτοκίνη TNF- α σε συγκέντρωση 1 ng/ml .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα PMPs επάγουν την έκφραση όλων των γονιδίων που μελετήσαμε στα HUVECs και μάλιστα κατά χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, σε αντίθεση με τον TNF- α που επάγει ορισμένα από αυτά. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το YWHA του οποίου η έκφραση παρέμεινε σταθερή μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, τα PMPs επάγουν την έκφραση των γονιδίων ICAM-1 και VCAM-1 που ανήκουν στη τάξη των προσκολλητικών μορίων, των MCP-1 και IL-8 που ανήκουν στις χημειοκίνες, των DDIT-3 και GPR-78 που ανήκουν στις συνοδούς πρωτεΐνες, του COX-2 που ανήκει στα ένζυμα και του TF που ανήκει στην τάξη των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών. Όλα τα παραπάνω γονίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς της φλεγμονής και της θρόμβωσης που λαμβάνουν χώρα στην αθηρογένεση [490, 493-501]. Επίσης, ο χρόνος επώασης των PMPs με τα HUVECs για 5h ή 24h, φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και επηρεάζει κατά διαφορετικό τρόπο την έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Στις 24h, αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων ICAM-1, VCAM-1, DDIT-3 και IL-8, ενώ αντίθετα μειώνεται η έκφραση όλων των υπολοίπων. Αντίθετα, η κυτοκίνη TNF- α στη δόση που χρησιμοποιήθηκε δεν μετέβαλλε την έκφραση των γονιδίων GPR-78, DDIT-3 και CHOP σε κανέναν από τους παραπάνω χρόνους επώασης.

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα PMPs σε μεταγραφικό επίπεδο τροποποιούν τη γονιδιακή έκφραση των HUVECs παραμένει αδιευκρίνιστος. Επειδή τα PMPs κατά την παρασκευή τους πλύθηκαν εκτενώς, μπορούμε να αποκλείσουμε τη δράση διαλυτών παραγόντων που απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή/και τη δράση της θρομβίνης που θα μπορούσε να παραχθεί από ίχνη ποσότητας πλάσματος που είχαν απομείνει στο παρασκεύασμα των PMPs. Επίσης, αποκλείεται και η δράση άλλων MPs π.χ. των MMPs αφού το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα δεν περιείχε λευκοκύτταρα σύμφωνα με κυτταρομετρική ανάλυση. Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου CD14 που αναγνωρίζει τα λευκοκύτταρα στα δείγματα των HUVECs ήταν αμελητέα. Επομένως, η δράση αυτή οφείλεται στην καθαυτού επαφή των PMPs με τα HUVECs. Πράγματι, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής και της μικροσκοπίας συνεστιασμού, είδαμε ότι τα PMPs προσδένονται αλλά και εσωτερικεύονται στα HUVECs. Υπάρχουν πολλοί υποδοχείς στην επιφάνεια των PMPs που διαμεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις με κύτταρα του αίματος και του αρτηριακού τοιχώματος [127, 136, 172, 405]. Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος των υποδοχέων στα PMPs και στα HUVECs, όπως επίσης και οι ενδοκυττάριοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί και οι μεταγραφικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την μέσω των PMPs επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης στα HUVECs παραμένουν υπό διερεύνηση.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα PMPs επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης στα HUVECs αντιπροσωπεύοντας έναν σημαντικό σύνδεσμο μεταξύ της αιμόστασης και της φλεγμονής. Παρόλα αυτά, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αποδειχθεί κατά πόσο η γονιδιακή έκφραση που περιγράφουμε οδηγεί σε αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση και δραστηριότητα.

Περίληπτικά, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα PMPs επάγουν γονιδιακή έκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, συνδέονται με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος LDL και HDL και είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, *in vitro* με αποτέλεσμα να επηρεάζεται σημαντικά η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η σπουδαιότητα των παραπάνω ευρημάτων στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης και της θρόμβωσης παραμένουν υπό διερεύνηση.

Περίληψη

Μελέτη του ρόλου βιοδραστικών αιμοπεταλιακών παραγόντων στην αθηρογένεση

Ανδρομάχη Α. Δημητρίου

Διδακτορική Διατριβή

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, ενώ πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι συμμετέχουν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν πολλούς βιοδραστικούς παράγοντες των οποίων ο ρόλος στην αθηρογένεση παραμένει υπό διερεύνηση. Αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίησή τους από διάφορους αγωνιστές ενσωματωμένοι σε μεμβρανικά κυστίδια γνωστά ως μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs). Τα PMPs συμμετέχουν σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή, η πήξη του αίματος αλλά και η αγγειακή λειτουργία. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, τα PMPs ίσως αποτελούν έναν μηχανισμό στοχευμένης μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών από τα αιμοπετάλια σε άλλα κύτταρα οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να αναδείξουμε νέους μηχανισμούς με τους οποίους τα PMPs, πιθανά να συμβάλουν στην αθηρογένεση. Αρχικά παρήχθησαν PMPs με διαφορετικούς αγωνιστές προκειμένου να μελετήσουμε τις διαφορές στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά τους. Κατόπιν διερευνήσαμε τον πιθανό ρόλο των PMPs στην αθηροθρόμβωση αρχίζοντας με τη μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης αυτών με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τις οξειδωμένες μορφές τους καθώς και τη σημασία αυτής της σύνδεσης στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δείξαμε στον πιθανό ρόλο του οξειδωτικού στρες στην τροποποίηση της δομής και της λειτουργικότητας των PMPs. Ειδικότερα, μελετήσαμε την επίδραση τόσο των PMPs όσο και των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των

ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, μελετήσαμε το ρόλο των PMPs στη γονιδιακή έκφραση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Αρχικά παρήχθησαν PMPs χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικούς αγωνιστές: το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, τη θρομβίνη ή το συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό παράγωγης των PMPs. Η χρήση των διαφόρων αγωνιστών έγινε προκειμένου να μελετήσουμε τις διάφορες πορείες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την παραγωγή των PMPs, αφού κάθε αγωνιστής είναι πιθανόν να προκαλεί και διαφορετική έκφραση των διαφόρων μεμβρανικών υποδοχέων αλλά και προσκολλητικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των PMPs. Παρατηρήθηκε ότι τα PMPs εκφράζουν χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων καθώς και ανιονικά φωσφολιπίδια στην εξωτερική τους μεμβράνη, όπως την Αννεξίνη-V. Με αυτό τον τρόπο χαρακτηρίσαμε τα μικροσωματίδια μας ως PMPs διότι εκφράζουν θετικότητα ως προς την Αννεξίνη-V άλλα και ως προς πρωτεΐνες που προέρχονται από τα κύτταρα προέλευσής τους που είναι τα αιμοπετάλια.

Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα PMPs έχουν την ικανότητα να συνδέονται με την LDL ή την HDL ή τις τροποποιημένες μορφές τους *in vitro* κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση τόσο της LDL όσο και της HDL με τα PMPs μειώνει σημαντικά την έκφραση του CD41a που σημαίνει ότι τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις είναι δυνατόν να γίνονται και διαμέσου της α_{IIb} υπομονάδας του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Επίσης, αυξάνεται σημαντικά η έκφραση του υποδοχέα εκκαθαριστή CD36, που εμφανίζει προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικές δράσεις. Επιπλέον, δείξαμε ότι η πρόσδεση της LDL ή της HDL με τα PMPs μειώνει σημαντικά τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στις 5h επώαση όσον αφορά την έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 και την έκκριση της MCP-1. Αντίθετα, στις 24h επώαση, τόσο η LDL όσο και η HDL αύξησαν σημαντικά κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο την ενεργοποιητική δράση των PMPs όσον αφορά την έκφραση των παραπάνω προσκολλητικών μορίων. Σχετικά με την έκκριση της MCP-1, η LDL κατά τη σύνδεσή της με τα PMPs αύξησε την ενεργοποιητική τους δράση, ενώ αντίθετα η HDL την μείωσε κατά επίσης δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Επιπρόσθετα αυτή η διατριβή δείχνει για πρώτη φορά ότι τα PMPs είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, *in vitro* και επηρεάζει το πρωτεϊνικό και λιπιδιακό τους

περιεχόμενο. Η οξειδωτική τους τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιολογικής τους δράσης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στις 5h επώαση όπως φαίνεται από την έκφραση των παραπάνω προσκολλητικών μορίων και την έκκριση της MCP-1. Στις 24h επώαση η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs οδήγησε στην αύξηση της ενεργοποιητικής δράσης των PMPs. Πιθανολογείται ότι η δράση των PMPs ή των οξειδωτικά τροποποιημένων PMPs οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε AA που μεταβολίζεται σε TxA₂ ή σε προστακυκλίνη.

Ακόμη, είδαμε ότι τα PMPs επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά χρονο-εξαρτώμενο τρόπο με αποτέλεσμα να τροποποιείται ο φαινότυπος αυτών των κυττάρων.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα PMPs επάγουν τη γονιδιακή έκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, συνδέονται με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος LDL και HDL και είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, *in vitro* με αποτέλεσμα να επηρεάζεται σημαντικά η δράση των PMPs στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η σπουδαιότητα των παραπάνω ευρημάτων στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης και της θρόμβωσης παραμένουν υπό διερεύνηση.

Summary

Studies on the role of platelet-derived bioactive factors in atherogenesis

Andromaxi A. Dimitriou

Doctoral Dissertation

Department of Chemistry, University of Ioannina

Blood platelets play a key role in hemostasis and thrombosis, while recent studies suggest that they regulate the initiation, the development and total extent of atherosclerotic lesions. These cells secrete many bioactive factors whose role in atherogenesis remains under investigation. Several of these factors secreted by platelets after their activation by various agonists, are incorporated in membrane vesicles known as platelet-derived microparticles (PMPs). PMPs are involved in a variety of pathophysiological conditions such as inflammation, coagulation cascade as well as vascular function. According to recent data, PMPs may represent a novel mechanism for targeted transport of bioactive substances from platelets to other cells, leading to their activation. The purpose of this thesis is to highlight new mechanisms by which PMPs, possibly contribute to atherogenesis. Initially PMPs were produced with different agonists in order to study the differences in their qualitative and quantitative characteristics. Then we investigated the possible role of PMPs in atherothrombosis, starting from the study of PMPs' possible interaction with plasma lipoproteins and their oxidized forms and the importance of this binding on endothelial cells and platelets activation. We also showed particular interest on the possible role of oxidative stress on changing the structure and function of PMPs. In particular, we studied the effect of both PMPs and oxidative modified PMPs on platelets and mature endothelial cells activation. To get a first idea wheather PMPs may contribute to an inflammatory response, we studied gene expression in endothelial cells using a QPCR method designed to detect changes in inflammation relevant genes.

Originally, we produced PMPs using three different agonists: the ionophore Ca^{2+} -A23187, thrombin or the combination of thrombin and collagen in order to study the mechanism of PMPs production. We used these different agonists in order to study the various pathways involved in platelets activation and production of PMPs, since each agonist is likely to rise and different expression of various membrane receptors and adhesion molecules expressed on the surface of activated platelets and PMPs. We observed that PMPs express characteristic proteins of platelets as well as anionic phospholipids on their external surface, interacting with Annexin-V. Therefore, when microparticles express both Annexin-V as well as proteins that are found on the cell of origin, in this case platelets, one then can characterize these microparticles as PMPs.

This study shows for the first time that PMPs have the ability to interact with LDL or HDL or their modified forms *in vitro* in a dose-dependent manner. Our results showed that the interaction of both LDL and HDL with PMPs significantly reduces the expression of CD41a, which means that such interactions can at least partially be mediated through α_{IIb} subunit of the integrin-receptor $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. We also observed, a significant increase in the expression of the scavenger receptor CD36, which shows proinflammatory and prothrombotic actions. Furthermore, we showed that the binding of LDL or HDL with PMPs significantly reduces washed platelets aggregation as well as endothelial cells activation, when they are incubated for 5h, regarding the expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and MCP-1 secretion. On the contrary, at 24h incubation, the binding of either LDL or HDL significantly increased in a dose-dependent manner the activating effect of PMPs on the expression of the above adhesion molecules. Regarding MCP-1 secretion, LDL binding with PMPs increased their activating action, while with HDL we observed the exact opposite.

Furthermore this thesis demonstrates for the first time that PMPs are sensitive to oxidative stress, *in vitro* and affects their protein and lipid content. Their oxidative modification has resulted to a significant reduction of their biological effect on platelet aggregation and endothelial cells activation at 5h incubation as shown by the expression of the above adhesion molecules and MCP-1 secretion. At 24h incubation, the oxidative modification of PMPs enhanced the activating action of PMPs. We speculate that either PMPs or oxidative modified PMPs effect is due to their content in AA which is metabolized to TxA_2 or prostacyclin.

Finally we demonstrated that PMPs induce the expression of genes associated with the pathophysiology of atherothrombosis in endothelial cells in a time-dependent manner leading to changes in the phenotype of these cells.

In conclusion, this study shows for the first time that PMPs induce gene expression in endothelial cells, interact with either LDL or HDL and are sensitive to oxidative stress, *in vitro*, which significantly influences the PMPs effect on platelets and endothelial cells functionality. The significance of the above findings concerning the pathophysiology of atherogenesis and thrombosis remains to be established.

Βιβλιογραφία

1. George, J.N., *Platelets*. Lancet., 2000. **355**: p. 1531-1539.
2. Frojmovic, M.M., Panjwani R., *Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies*. Biophys J., 1976. **16**: p. 1071-1089.
3. Rox, J.M., Bugert P, Müller J, Schorr A, Hanfland P, Madlener K, Klüter H, Pötzsch B., *Gene expression analysis in platelets from a single donor: evaluation of a PCR-based amplification technique*. Clin Chem., 2004. **50**: p. 2271-2278.
4. White, J., Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. Basic Principles and Clinical Practice. Anatomy and structural organization of the platelet. Hemostasis and Thrombosis. 1994.
5. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med., 2002. **8**: p. 1227-1234.
6. Ni, H., Freedman J., *Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands*. Transfus Apher Sci. , 2003. **28**: p. 257-264.
7. White, J.G., *The substructure of human platelet microtubules*. Blood., 1968: p. 638-648.
8. Behnke, O., *The morphology of blood platelet membrane systems*. Ser Haematol., 1970. **3**: p. 3-16.
9. White, J.G., Clawson CC., *Overview article: biostructure of blood platelets*. Ultrastruct Pathol., 1980. **1**: p. 538-558.
10. Collier, B.S., *Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation*. Ann N Y Acad Sci., 1983. **416**: p. 693-708.
11. Sixma, J.J., Lips PM., *Isolation of platelet membranes. A review*. Thromb Haemost., 1978. **39**: p. 328-337.
12. Collier, B.S., *The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as antithrombotic therapy*. Eur Heart J., 1995. **16**: p. 11-15.
13. Schick, P.K., Kurica KB, Chacko GK., *Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane*. J Clin Invest., 1976. **57**: p. 1221-1226.
14. Perret, B., Chap HJ, Douste-Blazy L., *Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation*. Biochim Biophys Acta., 1979. **556**: p. 434-446.
15. Bevers, E.M., Comfurius P, Zwaal RF., *Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation*. Biochim Biophys Acta., 1983. **736**: p. 57-66.
16. Comfurius, P., Senden JM, Tilly RH, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF., *Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase*. Biochim Biophys Acta., 1990. **1026**: p. 153-160.
17. Ginsberg, M.H., Xiaoping D, O'Toole TE, Loftus JC, Plow EF., *Platelet integrins*. Thromb Haemost., 1993. **70**: p. 87-93.
18. Pollard, T.D., *Actin*. Curr Opin Cell Biol. , 1990. **2**: p. 33-40.
19. Sixma, J.J., Slot JW, Geuze HJ., *Immunocytochemical localization of platelet granule proteins*. Methods Enzymol., 1989. **169**: p. 301-311.
20. Harrison, P., Savidge GF, Cramer EM., *The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins*. Br J Haematol. , 1990. **74**: p. 125-130.

21. Troxler, M., Dickinson K, Homer-Vanniasinkam S., *Platelet function and antiplatelet therapy*. Br J Surg., 2007. **94**: p. 674-682.
22. Suzuki, H., Nakamura S, Itoh Y, Tanaka T, Yamazaki H, Tanoue K., *Immunocytochemical evidence for the translocation of alpha-granule membrane glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIb beta 3) of human platelets to the surface membrane during the release reaction*. Histochemistry., 1992. **97**: p. 381-388.
23. Stenberg, P.E., McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF., *A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation*. J Cell Biol., 1985. **101**: p. 880-886.
24. Ménard, M., Meyers KM, Prieur DJ., *Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent*. Thromb Haemost., 1990. **63**: p. 127-132.
25. Stenberg, P.E., *Ultrastructural organization of maturing megakaryocytes*. Prog Clin Biol Res., 1986. **215**: p. 373-386.
26. Dangelmaier, C.A., Holmsen H., *Determination of acid hydrolases in human platelets*. Anal Biochem., 1980 **104**: p. 182-191.
27. Cutler, L., Rodan G, Feinstein MB., *Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets*. Biochim Biophys Acta., 1978. **542**: p. 357-371.
28. Τσελέπης, Α.Δ., Γουδέβενος ΙΑ., *Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στα οξεία στεφανιαία σύνδρομα. προοπτικές για αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση*. Ελλ Καρδιολ Επιθ., 1998. **39**: p. 216-229.
29. Rao, G.H.R., *Handbook of platelet physiology and pharmacology*. 1998: Kluwer Academic Publishers.
30. Litjens, P.E., Akkerman JW, van Willigen G., *Platelet integrin alphaIIbbeta3: target and generator of signalling*. Platelets. , 2000. **11**: p. 310-319.
31. Hathaway, D.R., Adelstein RS., *Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1979. **76**: p. 1653-1657.
32. Sano, K., Takai Y, Yamanishi J, Nishizuka Y., *A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions*. J Biol Chem., 1983. **258**: p. 2010-2013.
33. Abrams, C.S., *Intracellular signaling in platelets*. Curr Opin Hematol., 2005. **12**: p. 401-405.
34. Shattil, S.J., Kashiwagi H, Pampori N., *Integrin signaling: the platelet paradigm*. Blood., 1998. **91**: p. 2645-2657.
35. Jackson, S.P., Nesbitt WS, Kulkarni S., *Signaling events underlying thrombus formation*. J Thromb Haemost., 2003. **1**: p. 1602-1612.
36. Peerschke, E.I., *Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events. Insights provided by dithiothreitol-treated platelets*. Thromb Haemost., 1995. **73**: p. 862-867.
37. Nurden, A., Poujol C, Nurden P., *Different activation states of GP IIb/IIIa complexes in platelets*. Blood Coagul Fibrinolysis., 1999. **10**: p. S67-70.
38. Plow, E.F., Byzova T., *The biology of glycoprotein IIb-IIIa*. Coron Artery Dis., 1999. **10**: p. 547-551.
39. Hartwig, J.H., Kung S, Kovacovics T, Janmey PA, Cantley LC, Stossel TP, Toker A., *D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein IIb-IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate*. J Biol Chem., 1996. **271**: p. 32986-32993.

40. Yuan, Y., Dopheide SM, Ivanidis C, Salem HH, Jackson SP., *Calpain regulation of cytoskeletal signaling complexes in von Willebrand factor-stimulated platelets. Distinct roles for glycoprotein Ib-V-IX and glycoprotein IIb-IIIa (integrin alphaIIb beta3) in von Willebrand factor-induced signal transduction.* J Biol Chem., 1997. **272**: p. 21847-21854.
41. Freedman, J.E., *Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis.* Circulation., 2005. **112**: p. 2725-2734.
42. Hamilton, J.R., *Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy.* Blood Rev., 2009. **23**: p. 61-65.
43. Offermanns, S., Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G., *G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1994. **91**: p. 504-508.
44. Klages, B., Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S., *Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets.* J Cell Biol., 1999. **144**: p. 745-754.
45. Kahn, M.L., Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR., *A dual thrombin receptor system for platelet activation.* Nature., 1998. **394**: p. 690-694.
46. Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin.* J Clin Invest., 1999. **103**: p. 879-887.
47. Xu, W.F., Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1998. **95**: p. 6642-6646.
48. De Candia, E., Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R., *Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets.* J Biol Chem., 2001. **276**: p. 4692-4698.
49. Vu, T.K., Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation.* Cell., 1991. **64**: p. 1057-1068.
50. Burnham, M.R., Harte MT, Richardson A, Parsons JT, Bouton AH., *The identification of p130cas-binding proteins and their role in cellular transformation.* Oncogene., 1996. **12**: p. 2467-2472.
51. Seiler, S.M., Michel IM, Fenton JW 2nd., *Involvement of the "tethered-ligand" receptor in thrombin inhibition of platelet adenylate cyclase.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **182**: p. 1296-1302.
52. Baffy, G., Yang L, Raj S, Manning DR, Williamson JR., *G protein coupling to the thrombin receptor in Chinese hamster lung fibroblasts.* J Biol Chem., 1994. **269**: p. 8483-8487.
53. López, J.A., *The platelet glycoprotein Ib-IX complex.* Blood Coagul Fibrinolysis. **5**: p. 97-119.
54. Andrews, R.K., Berndt MC., *Platelet physiology and thrombosis.* Thromb Res., 2004. **114**: p. 447-453.
55. Andrews, R.K., Gardiner EE, Shen Y, Berndt MC., *Platelet interactions in thrombosis.* IUBMB Life., 2004. **56**: p. 13-18.
56. Angiolillo, D.J., Ueno M, Goto S., *Basic principles of platelet biology and clinical implications.* Circ J., 2010. **74**: p. 597-607.

57. Henson, P.M., *Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by antiplatelet antibody in the presence and absence of complement.* J Immunol., 1970. **104**: p. 924-934.
58. Siraganian, R.P., Osler AG., *Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate.* J Immunol., 1971. **106**: p. 1244-1251.
59. Demopoulos, C.A., Pinckard RN, Hanahan DJ., *Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators).* J Biol Chem., 1979. **254**: p. 9355-9358.
60. Imaizumi, T.A., Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA., *Platelet-activating factor: a mediator for clinicians.* J Intern Med., 1995. **238**: p. 5-20.
61. Koltai, M., Braquet PG., *Involvement of PAF in atherogenesis. Brief review.* Agents Actions Suppl. , 1992. **37**: p. 333-339.
62. Burgers, J.A., Akkerman JW., *Regulation of the receptor for platelet-activating factor on human platelets.* Biochem J., 1993. **291**: p. 157-161.
63. Chignard, M., Le Couedic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J., *The role of platelet-activating factor in platelet aggregation.* Nature. , 1979. **279**: p. 799-800.
64. Benveniste, J., Chignard M, Le Couedic JP, Vargaftig BB., *Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-ACETHER). II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-ACETHER and lyso-PAF-ACETHER from rabbit platelets.* Thromb Res., 1982. **25**: p. 375-385.
65. Blank, M.L., Lee T, Fitzgerald V, Snyder F., *A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid).* J Biol Chem., 1981. **256**: p. 175-178.
66. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors.* Circ Res., 2006. **99**: p. 1293-1304.
67. Kahner, B.N., Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP., *Nucleotide receptor signaling in platelets.* J Thromb Haemost., 2006. **4**: p. 2317-2326.
68. Savage, B., Cattaneo M, Ruggeri ZM., *Mechanisms of platelet aggregation.* Curr Opin Hematol., 2001: p. 270-276.
69. Murugappa, S., Kunapuli SP., *The role of ADP receptors in platelet function.* Front Biosci., 2006. **11**: p. 1977-1986.
70. Gachet, C., *Regulation of platelet functions by P2 receptors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol., 2006. **46**: p. 277-300.
71. Bauer, M., Retzer M, Wilde JI, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, Watson SP, Siess W., *Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets.* Blood. , 1990. **94**: p. 1665-1672.
72. Jin, J., Daniel JL, Kunapuli SP., *Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets.* J Biol Chem., 1998. **273**: p. 2030-2034.
73. Savi, P., Beauverger P, Labouret C, Delfaud M, Salel V, Kaghad M, Herbert JM., *Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation.* FEBS Lett., 1998. **422**: p. 291-295.
74. Jarvis, G.E., Humphries RG, Robertson MJ, Leff P., *ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y(1) and P(2T) receptors.* Br J Pharmacol., 2000. **129**: p. 275-282.

75. Geiger, J., Hönig-Liedl P, Schanzenbächer P, Walter U., *Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors*. Eur J Pharmacol., 1998. **351**: p. 235-246.
76. Hollopeter, G., Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB., *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. Nature., 2001. **409**: p. 202-207.
77. Kunapuli, S.P., Dorsam RT, Kim S, Quinton TM., *Platelet purinergic receptors*. Curr Opin Pharmacol., 2003. **3**: p. 175-180.
78. Gachet, C., *ADP receptors of platelets and their inhibition*. Thromb Haemost., 2001. **86**: p. 222-232.
79. Dangelmaier, C., Jin J, Smith JB, Kunapuli SP., *Potential of thromboxane A₂-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway*. Thromb Haemost., 2001. **85**: p. 341-348.
80. Jin, J., Kunapuli SP., *Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1998. **95**: p. 8070-8074.
81. Dorsam, R.T., Kim S, Jin J, Kunapuli SP., *Coordinated signaling through both G_{12/13} and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets*. J Biol Chem., 2002. **277**: p. 47588-47595.
82. Quinton, T.M., Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP., *Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation*. Biochem J., 2002. **368**: p. 535-543.
83. Zhang, F.L., Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ Jr., *ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999*. J Biol Chem., 2001. **276**: p. 8608-8615.
84. Mahaut-Smith, M.P., Ennion SJ, Rolf MG, Evans RJ., *ADP is not an agonist at P_{2X}(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets*. Br J Pharmacol., 2000. **131**: p. 108-114.
85. Rolf, M.G., Mahaut-Smith MP., *Effects of enhanced P_{2X}1 receptor Ca²⁺ influx on functional responses in human platelets*. Thromb Haemost., 2002. **88**: p. 495-502.
86. Rolf, M.G., Brearley CA, Mahaut-Smith MP., *Platelet shape change evoked by selective activation of P_{2X}1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP*. 2001. Thromb Haemost.: p. 303-308.
87. Oury, C., Toth-Zsamboki E, Vermylen J, Hoylaerts MF., *P_{2X}(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen*. Blood., 2002. **100**: p. 2499-2505.
88. Toth-Zsamboki, E., Oury C, Cornelissen H, De Vos R, Vermylen J, Hoylaerts MF., *P_{2X}1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation*. J Biol Chem. , 2003. **278**: p. 46661-46667.
89. Alberio, L., Dale GL., *Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways*. Eur J Clin Invest., 1999. **29**: p. 1066-1076.
90. Watson, S., Berlanga O, Best D, Frampton J., *Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid?* Platelets., 2000. **11**: p. 252-258.

91. Gibbins, J.M., *Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation*. J Cell Sci., 2004. **117**: p. 3415-3425.
92. Watson, S.P., Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC., *GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets*. J Thromb Haemost., 2005. **3**: p. 1752-1762.
93. Coleman, R.A., Smith WL, Narumiya S., *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes*. Pharmacol Rev., 1994. **46**: p. 205-229.
94. Ushibuki, F., Hirata M, Narumiya S., Platelet prostaglandin receptors, in In Platelets and Their Factors, Handbook of Experimental Pharmacology, e. F. von Bruchhausen and V. Walter, Editor. 1997, Heidelberg: Springer-Verlag: Berlin. p. 135-54.
95. Ushikubi, F., Hirata M, Narumiya S., *Molecular biology of prostanoid receptors; an overview*. J Lipid Mediat Cell Signal., 1995. **12**: p. 343-359.
96. Morinelli, T.A., Niewiarowski S, Daniel JL, Smith JB., *Receptor-mediated effects of a PGH2 analogue (U 46619) on human platelets*. Am J Physiol., 1987. **253**: p. H1035-H1043.
97. Brass, L.F., Shaller CC, Belmonte EJ., *Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin*. J Clin Invest., 1987. **79**: p. 1269-1275.
98. Yang, J., Wu J, Kowalska MA, Dalvi A, Prevost N, O'Brien PJ, Manning D, Poncz M, Lucki I, Blendy JA, Brass LF., *Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2000. **97**: p. 9984-9989.
99. Pozgajová, M., Sachs UJ, Hein L, Nieswandt B., *Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor*. Blood., 2006. **108**: p. 510-514.
100. Fabre, J.E., Nguyen M, Athirakul K, Coggins K, McNeish JD, Austin S, Parise LK, FitzGerald GA, Coffman TM, Koller BH., *Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation*. J Clin Invest., 2001. **107**: p. 601-610.
101. Ma, H., Hara A, Xiao CY, Okada Y, Takahata O, Nakaya K, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S, Ushikubi F., *Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3)*. Circulation., 2001. **104**: p. 1176-1180.
102. Troxler, M., Dickinson K, Homer-Vanniasinkam S., *Platelet function and antiplatelet therapy*. Br J Surg., 2007. **94**: p. 674-682.
103. Brand, K., Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D., *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*. J Clin Invest., 1996. **97**: p. 1715-1722.
104. Kroll, M.H., Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI., *von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation*. J Clin Invest., 1991. **88**: p. 1568-1573.
105. Siess, W., *Molecular mechanisms of platelet activation*. Physiol Rev., 1989. **69**: p. 58-178.
106. Jennings, L.K., *Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis*. Thromb Haemost., 2009. **102**: p. 248-257.

107. Varga-Szabo, D., Pleines I, Nieswandt B., *Cell adhesion mechanisms in platelets*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2008. **28**: p. 403-412.
108. Brass, L.F., *Thrombin and platelet activation*. Chest., 2003. **124**: p. 18S-25S.
109. Brummel, K.E., Paradis SG, Butenas S, Mann KG., *Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation*. *Blood.*, 2002. **100**: p. 148-152.
110. Mann, K.G., *Thrombin formation*. Chest., 2003. **124**: p. 4S-10S.
111. Colman, R.W., Hirsch J, Mader J, Salzman EN., ed. *Hemostasis and Thrombosis*. 1982, JB Lippincott Co: Philadelphia.
112. Edgington, T.S., Dickinson CD, Ruf W., *The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation*. *Thromb Haemost.*, 1997. **78**: p. 401-405.
113. Bevers, E.M., Comfurius P, Zwaal RF., *Mechanisms involved in platelet procoagulant response*. *Adv Exp Med Biol.*, 1993. **344**: p. 195-207.
114. McKenzie, S.B., *Textbook of hematology*. 2nd edn. 1999: Williams & Wilkins.
115. Furie, B., Furie BC., *Molecular and cellular biology of blood coagulation*. *N Engl J Med.*, 1992. **362**: p. 800-806.
116. Horstman, L.L., Ahn YS., *Platelet microparticles: a wide-angle perspective*. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 1999. **30**: p. 111-142.
117. Chargaff, E., West R., *The biological significance of the thromboplastic protein of blood*. *J Biol Chem.*, 1946. **166**: p. 189-197.
118. O'brien, J.R., *The platelet-like activity of serum*. *Br J Haematol.*, 1955. **1**: p. 223-228.
119. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. *Br J Haematol.*, 1967. **13**: p. 269-288.
120. Warren, B.A., Vales O., *The release of vesicles from platelets following adhesion to vessel walls in vitro*. *Br J Exp Pathol.*, 1972. **53**: p. 206-215.
121. Li, X., Cong H., *Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome*. *Tex Heart Inst J.*, 2009. **36**: p. 134-139.
122. Sandberg, H., Bode AP, Dombrose FA, Hoechli M, Lentz BR., *Expression of coagulant activity in human platelets: release of membranous vesicles providing platelet factor 1 and platelet factor 3*. *Thromb Res.*, 1985. **39**: p. 63-79.
123. Smalley, D.M., Root KE, Cho H, Ross MM, Ley K., *Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles*. *Thromb Haemost.*, 2007. **97**: p. 67-80.
124. Lynch, S.F., Ludlam CA., *Plasma microparticles and vascular disorders*. *Br J Haematol.*, 2007. **137**: p. 36-48.
125. Shet, A.S., Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP., *Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes*. *Blood.*, 2003. **102**: p. 2678-2683.
126. Jy, W., Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP., *Measuring circulating cell-derived microparticles*. *J Thromb Haemost.*, 2004. **2**: p. 1842-1851.
127. Diamant, M., Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R., *Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?* *Eur J Clin Invest.*, 2004. **34**: p. 392-401.
128. George, J.N., Thoi LL, McManus LM, Reimann TA., *Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum*. *Blood.*, 1982. **60**: p. 834-840.

129. Leroyer, A.S., Tedgui A, Boulanger CM., *Role of microparticles in atherothrombosis*. J Intern Med., 2008. **263**: p. 528-537.
130. Morel, O., Morel N, Freyssinet JM, Toti F., *Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses*. Platelets., 2008. **19**: p. 9-23.
131. Cauwenberghs, S., Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW., *Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton*. FEBS Lett., 2006. **580**: p. 5313-5320.
132. Barry, O.P., Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA., *Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles*. J Clin Invest., 1997. **99**: p. 118-2127.
133. Schwarz, M., Katagiri Y, Kotani M, Bassler N, Loeffler C, Bode C, Peter K., *Reversibility versus persistence of GPIIb/IIIa blocker-induced conformational change of GPIIb/IIIa (alphaIIb beta3, CD41/CD61)*. J Pharmacol Exp Ther., 2004. **308**: p. 1002-1011.
134. George, J.N., Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ., *Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery*. J Clin Invest., 1986. **78**: p. 340-348.
135. Silverstein, R.L., *Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36*. Cleve Clin J Med., 2009. **76**: p. S27-S30.
136. Baj-Krzyworzeka, M., Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reca R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ., *Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells*. Exp Hematol., 2002. **30**: p. 450-459.
137. Piccin, A., Murphy WG, Smith OP., *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications*. Blood Rev., 2007. **21**: p. 157-171.
138. Losy, J., Niezgodna A, Wender M., *Increased serum levels of soluble PECAM-1 in multiple sclerosis patients with brain gadolinium-enhancing lesions*. J Neuroimmunol., 1999. **99**: p. 169-172.
139. Iwamoto, S., Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M., *Platelet microparticles: a carrier of platelet-activating factor?* Biochem Biophys Res Commun., 1996. **218**: p. 940-944.
140. Simak, J., Gelderman MP., *Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers*. Transfus Med Rev., 2006. **20**: p. 1-26.
141. Fox, J.E., Austin CD, Boyles JK, Steffen PK., *Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane*. J Cell Biol., 1990. **111**: p. 483-493.
142. Diaz, C., Schroit AJ., *Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry*. J Membr Biol., 1996. **151**: p. 1-9.
143. Connor, J., Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ., *Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process*. J Biol Chem., 1992. **267**: p. 19412-19417.
144. McLaughlin, P.J., Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG., *Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing*. Nature., 1993. **364**: p. 685-692.

145. Beleznay, Z., Zachowski A, Devaux PF, Navazo MP, Ott P., *ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport*. *Biochemistry.*, 1993. **32**: p. 3146-3152.
146. Zwaal, R.F., Comfurius P, Bevers EM., *Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes*. *Biochem Soc Trans.*, 1993. **21**: p. 248-253.
147. Zwaal, R.F., Comfurius P, Bevers EM., *Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids*. *Biochim Biophys Acta.*, 2004. **1636**: p. 119-128.
148. Dachary-Prigent, J., Pasquet JM, Fressinaud E, Toti F, Freyssinet JM, Nurden AT., *Aminophospholipid exposure, microvesiculation and abnormal protein tyrosine phosphorylation in the platelets of a patient with Scott syndrome: a study using physiologic agonists and local anaesthetics*. *Br J Haematol.*, 1997. **99**: p. 959-967.
149. Toti, F., Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM., *Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder*. *Blood.*, 1996. **87**: p. 1409-1415.
150. Murphy, W.G., Moore JC, Kelton JG., *Calcium-dependent cysteine protease activity in the sera of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Blood.*, 1987. **70**: p. 1683-1687.
151. Kelton, J.G., Warkentin TE, Hayward CP, Murphy WG, Moore JC., *Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles*. *Blood.*, 1992. **80**: p. 2246-2251.
152. Furlan, M., Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lämmle B., *von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome*. *N Engl J Med.*, 1998. **339**: p. 1578-1584.
153. Jimenez, J.J., Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS., *Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease*. *Br J Haematol.*, 2001. **112**: p. 81-90.
154. Fox, J.E., *Shedding of adhesion receptors from the surface of activated platelets*. *Blood Coagul Fibrinolysis.*, 1994. **5**: p. 291-304.
155. Jy, W., Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Cheng P, Ahn ER, Bidot CJ, Ahn YS., *Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation*. *J Thromb Haemost.*, 2005. **3**: p. 1301-1308.
156. Wolfs, J.L., Comfurius P, Rasmussen JT, Keuren JF, Lindhout T, Zwaal RF, Bevers EM., *Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction*. *Cell Mol Life Sci.*, 2005. **62**: p. 1514-1525.
157. Dale, G.L., *Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response*. *J Thromb Haemost.*, 2005. **3**: p. 2185-2192.
158. Morel, O., Toti F, Hugel B, Freyssinet JM., *Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors*. *Curr Opin Hematol.*, 2004. **11**: p. 156-164.
159. Horstman, L.L., Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS., *New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles*. *Keio J Med.*, 2004. **53**: p. 210-230.

160. Falet, H., Chang G, Brohard-Bohn B, Rendu F, Hartwig JH., *Integrin alpha(IIb)beta3 signals lead cofilin to accelerate platelet actin dynamics.* Am J Physiol Cell Physiol., 2005. **289**: p. C819-C825.
161. Shcherbina, A., Kenney DM, Bretscher A, Remold-O'Donnell E., *Dynamic association of moesin with the membrane skeleton of thrombin- activated platelets.* Blood., 1999. **93**: p. 2128-2129.
162. Yano, Y., Kambayashi J, Shiba E, Sakon M, Oiki E, Fukuda K, Kawasaki T, Mori T., *The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane.* Biochem J., 1994. **299**: p. 303-308.
163. Zwaal, R.F., Schroit AJ., *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.* Blood., 1997. **89**: p. 1121-1132.
164. Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet JM, Martínez MC., *Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway.* J Biol Chem., 2002. **277**: p. 19876-19881.
165. Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet JM, Martínez MC., *Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca²⁺ entry: role of actin cytoskeleton.* J Biol Chem., 2001. **276**: p. 5134-5139.
166. Dervaux, T., Porro C, Kunzelmann C, Freyssinet JM, Martínez MC., *Cyclic GMP modulates store-operated calcium entry inducing phosphatidylserine translocation at the surface of megakaryocytic cells.* Biochimie., 2006. **88**: p. 1175-1182.
167. Kunzelmann, C., Freyssinet JM, Martínez MC., *Rho A participates in the regulation of phosphatidylserine-dependent procoagulant activity at the surface of megakaryocytic cells.* J Thromb Haemost., 2004. **2**: p. 644-650.
168. Wolfs, J.L., Wielders SJ, Comfurius P, Lindhout T, Giddings JC, Zwaal RF, Bevers EM., *Reversible inhibition of the platelet procoagulant response through manipulation of the Gardos channel.* Blood., 2006. **108**: p. 2223-2228.
169. Bucki, R., Giraud F, Sulpice, JC., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate domain inducers promote phospholipid transverse redistribution in biological membranes.* Biochemistry., 2000. **39**: p. 5838-5844.
170. Bucki, R., Janmey PA, Vegners R, Giraud F, Sulpice JC., *Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in phosphatidylserine exposure in platelets: use of a permeant phosphoinositide-binding peptide.* Biochemistry., 2001. **40**: p. 15752-15761.
171. O'Connell, D.J., Rozenvayn N, Flaumenhaft R., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates activation-induced platelet microparticle formation.* Biochemistry., 2005. **44**: p. 6361-6370.
172. Freyssinet, J.M., *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost., 2003. **1**: p. 1655-1662.
173. van Meer, G., *Cell biology. The different hues of lipid rafts.* Science., 2002. **296**: p. 855-857.
174. Sims, P.J., Wiedmer T., *Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling.* Thromb Haemost., 2001. **86**: p. 266-275.
175. Zhou, Q., Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ., *Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids.* J Biol Chem., 1997. **272**: p. 18240-18244.

176. Wiedmer, T., Zhou Q, Kwoh DY, Sims PJ., *Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family*. Biochim Biophys Acta., 2000. **1467**: p. 244-253.
177. Zhou, Q., Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ., *Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1*. Blood., 2002. **99**: p. 4030-4038.
178. Van Eck, M., Pennings M, Hoekstra M, Out R, Van Berkel TJ., *Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol., 2005. **16**: p. 307-315.
179. Stefkova, J., Poledne R, Hubacek JA. , *ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases*. Physiol Res., 2004. **53**: p. 235-243.
180. Lee, J.Y., Parks JS., *ATP-binding cassette transporter A1 and its role in HDL formation*. Curr Opin Lipidol., 2005. **16**: p. 19-25.
181. Knight, B.L., *ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux*. Biochem Soc Trans., 2004. **32**: p. 124-127.
182. van Helvoort, A., Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G., *MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine*. Cell., 1996. **87**: p. 507-517.
183. Young, S.G., Fielding CJ., *The ABCs of cholesterol efflux*. Nat. Genet., 1999. **22**: p. 316-318.
184. Hamon, Y., Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G., *ABCI promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine*. Nat Cell Biol., 2000. **2**: p. 399-406.
185. Shcherbina, A., Remold-O'Donnell E., *Role of caspase in a subset of human platelet activation responses*. Blood., 1999. **93**: p. 4222-4231.
186. Cohen, Z., Gonzales RF, Davis-Gorman GF, Copeland JG, McDonagh PF., *Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation*. Thromb Res., 2002. **107**: p. 217-221.
187. Dale, G.L., Friese P., *Bax activators potentiate coated-platelet formation*. J Thromb Haemost., 2006. **4**: p. 2664-2669.
188. Dale, G.L., Remenyi G, Friese P., *Quantitation of microparticles released from coated-platelets*. J Thromb Haemost., 2005. **3**: p. 2081-2088.
189. Augereau, O., Rossignol R, DeGiorgi F, Mazat JP, Letellier T, Dachary-Prigent J., *Apoptotic-like mitochondrial events associated to phosphatidylserine exposure in blood platelets induced by local anaesthetics*. Thromb Haemost., 2004. **92**: p. 104-113.
190. Nomura S, K.Y., Matsuura E, Xie GL, Katsura K, Miyake T, Miyazaki Y, Kagawa H, Koike T, Fukuhara S. , *Participation of alpha IIb beta 3 in platelet microparticle generation by collagen plus thrombin*. Haemostasis., 1996. **26**: p. 31-37.
191. Gemmell, C.H., Sefton MV, Yeo EL., *Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect*. J Biol Chem., 1993. **268**: p. 14586-14589.
192. Reverter, J.C., Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Coller BS., *Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3*

- Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis.* J Clin Invest., 1996. **98**: p. 863-874.
193. Holme, P.A., Solum NO, Brosstad F, Egberg N, Lindahl TL., *Stimulated Glanzmann's thrombasthenia platelets produced microvesicles. Microvesiculation correlates better to exposure of procoagulant surface than to activation of GPIIb-IIIa.* Thromb Haemost., 1995. **74**: p. 1533-1540.
 194. Fujimoto, T., Fujimura K, Kuramoto A., *Electrophysiological evidence that glycoprotein IIb-IIIa complex is involved in calcium channel activation on human platelet plasma membrane.* J Biol Chem., 1991. **266**: p. 16370-16375.
 195. Rybak, M.E., Renzulli LA, Bruns MJ, Cahaly DP., *Platelet glycoproteins IIb and IIIa as a calcium channel in liposomes.* Blood., 1998. **72**: p. 714-720.
 196. Nomura, S., Nagata H, Suzuki M, Iwata K, Kawakatsu T, Kido H, Fukuroi T, Yamaguchi K, Yanabu M, Soga T, Kokawa T, Yasunaga K., *Effects of ticlopidine on monoclonal anti-CD9 antibody-induced platelet aggregation and microparticle generation.* Thromb Res., 1992. **65**: p. 95-104.
 197. Weiss, H.J., Lages B., *Platelet prothrombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity--a comparison with Scott syndrome.* Blood., 1997. **89**: p. 1599-1611.
 198. Fox, J.E., Taylor RG, Taffarel M, Boyles JK, Goll DE. , *Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa.* J Cell Biol., 1993. **120**: p. 1501-1507.
 199. Van Wijk, M.J., VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R., *Microparticles in cardiovascular diseases.* Cardiovasc Res., 2003. **59**: p. 277-287.
 200. Wiedmer, T., Sims PJ., *Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles.* Blood., 1991. **78**: p. 2880-2886.
 201. Miyazaki, Y., Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S., *High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles.* Blood., 1996. **88**: p. 3456-3464.
 202. Miyoshi, H., Umeshita K, Sakon M, Imajoh-Ohmi S, Fujitani K, Gotoh M, Oiki E, Kambayashi J, Monden M., *Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury.* Gastroenterology., 1996. **110**: p. 1897-18904.
 203. Coleman, M.L., Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF., *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I.* Nat Cell Biol., 2001. **3**: p. 39-345.
 204. Mallat, Z., Tedgui A., *Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease.* Circ Res., 2001. **88**: p. 998-1003.
 205. Cotter, T.G., Lennon SV, Glynn JM, Green DR., *Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis.* Cancer Res., 1992. **52**: p. 997-1005.
 206. Mills, J.C., Stone NL, Erhardt J, Pittman RN., *Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation.* J Cell Biol., 1998. **140**: p. 627-636.
 207. Maekawa, M., Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S., *Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase.* Science., 1999. **285**: p. 895-898.

208. Théry, C., Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles*. J Immunol., 2001. **166**: p. 7309-7318.
209. Théry, C., Zitvogel L, Amigorena S., *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol., 2002. **2**: p. 569-579.
210. Heijnen, H.F., Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ., *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules*. Blood., 1999. **94**: p. 3791-3799.
211. Denzer, K., Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ., *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. J Cell Sci., 2000. **113**: p. 3365-3374.
212. Burnier, L., Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A., *Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine*. Thromb Haemost., 2009. **101**: p. 439-451.
213. Flaumenhaft, R., *Formation and fate of platelet microparticles*. Blood Cells Mol Dis., 2006. **36**: p. 182-187.
214. Rand, M.L., Wang H, Bang KW, Packham MA, Freedman J., *Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits*. J Thromb Haemost., 2006. **4**: p. 1621-1623.
215. Fourcade, O., Simon MF, Viodé C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournié B, Sarda L, Chap H., *Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells*. Cell., 1995: p. 919-927.
216. Wu, Y., Tibrewal N, Birge RB., *Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill*. Trends Cell Biol., 2006. **16**: p. 189-197.
217. Atkinson, J.P., Krych M, Nickells M, Birmingham D, Subramanian VB, Clemenza L, Alvarez J, Liszewski K., *Complement receptors and regulatory proteins: immune adherence revisited and abuse by microorganisms*. Clin Exp Immunol., 1994. **2**: p. 1-3.
218. Birmingham, D.J., Hebert LA., *CRI and CRI-like: the primate immune adherence receptors*. Immunol Rev., 2001. **180**: p. 100-111.
219. Hess, C., Schifferli JA., *Immune adherence revisited: novel players in an old game*. News Physiol Sci., 2003. **18**: p. 104-108.
220. Sahu, A., Lambris JD., *Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity*. 2001. **180**: p. 35-48.
221. Law, S.K., Dodds AW., *The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4*. Protein Sci., 1997. **6**: p. 263-274.
222. Sahu, A., Kozel TR, Pangburn MK., *Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation*. Biochem J., 1994. **302**: p. 429-436.
223. Sahu, A., Pangburn MK., *Tyrosine is a potential site for covalent attachment of activated complement component C3*. Mol Immunol., 1995. **32**: p. 711-716.
224. Esterbauer, H.J., Gebicki HJ, Puhl G., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radical Biol & Med., 1992. **13**: p. 341-390.
225. Lund-Katz, S., Phillips MC., *Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein*. Biochemistry., 1986. **25**: p. 1562-1568.

226. Sommer, A., Prenner E, Gorges R, Stütz H, Grillhofer H, Kostner GM, Paltauf F, Hermetter A., *Organization of phosphatidylcholine and sphingomyelin in the surface monolayer of low density lipoprotein and lipoprotein(a) as determined by time-resolved fluorometry.* J Biol Chem., 1992. **267**: p. 24217-24222.
227. Lalanne, F., Pruneta V, Bernard S, Ponsin G., *Distribution of diacylglycerols among plasma lipoproteins in control subjects and in patients with non-insulin-dependent diabetes.* Eur J Clin Invest., 1999. **29**: p. 139-144.
228. Schissel, S.L., Tweedie-Hardman J, Rapp JH, Graham G, Williams KJ, Tabas I., *Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins.* J Clin Invest., 1996. **98**: p. 1455-1464.
229. Ravandi, A., Kuksis A, Shaikh NA., *Glycated phosphatidylethanolamine promotes macrophage uptake of low density lipoprotein and accumulation of cholesteryl esters and triacylglycerols.* J Biol Chem., 1999. **274**: p. 16494-16500.
230. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jürgens G., *Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein.* Chem Res Toxicol., 1990. **3**: p. 77-92.
231. Badimón, L., Vilahur G, Padró T., *Lipoproteins, platelets and atherothrombosis.* Rev Esp Cardiol., 2009. **62**: p. 1161-1178.
232. Cladaras, C., Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI., *The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms.* EMBO J., 1986. **5**: p. 3495-3507.
233. Knott, T.J., Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall SC Jr, Innerarity TL, Blackhart B, Taylor WH, Marcel Y, Milne R, et al., *Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B.* Nature., 1986. **323**: p. 734-738.
234. Yang, C.Y., Chen SH, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, Li WH, Sparrow DA, DeLoof H, Rosseneu M, et al., *Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100.* Nature., 1986. **323**: p. 738-742.
235. Kane, J.P., *Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity.* Annu Rev Physiol., 1983. **45**: p. 637-650.
236. Chapman, M.J., Laplaud PM, Luc G, Forgez P, Bruckert E, Goulinet S, Lagrange D., *Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation.* J Lipid Res., 1988. **29**: p. 442-458.
237. Chen, G.C., Liu W, Duchateau P, Allaart J, Hamilton RL, Mendel CM, Lau K, Hardman DA, Frost PH, Malloy MJ, et al., *Conformational differences in human apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoproteins (LDL). Association of altered proteolytic accessibility with decreased receptor binding of LDL subspecies from hypertriglyceridemic subjects.* J Biol Chem., 1994. **269**: p. 29121-29128.
238. Nigon, F., Lesnik P, Rouis M, Chapman MJ., *Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor.* J Lipid Res., 1991. **32**: p. 1741-1753.

239. Baumstark, M.W., Kreutz W, Berg A, Frey I, Keul J., *Structure of human low-density lipoprotein subfractions, determined by X-ray small-angle scattering.* Biochim Biophys Acta., 1990. **1037**: p. 48-57.
240. Austin, M.A., Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM., *Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction.* JAMA., 1988. **260**: p. 1917-1921.
241. Jaakkola, O., Solakivi T, Tertov VV, Orekhov AN, Miettinen TA, Nikkari T., *Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from patients with coronary artery disease.* Coron Artery Dis., 1993. **4**: p. 379-385.
242. La Belle, M., Krauss RM., *Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns.* J Lipid Res., 1990. **31**: p. 1577-1588.
243. Ishida, B.Y., Frolich J, Fielding CJ., *Prebeta-migrating high density lipoprotein: quantitation in normal and hyperlipidemic plasma by solid phase radioimmunoassay following electrophoretic transfer.* J Lipid Res., 1987. **28**: p. 778-786.
244. Kunitake, S.T., Mendel CM, Hennessy LK., *Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities.* J Lipid Res., 1992. **33**: p. 1807-1816.
245. von Eckardstein, A., Huang Y, Assmann G., *Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses.* Curr Opin Lipidol., 1994. **5**: p. 404-416.
246. Yang, C.Y., Gu ZW, Chong IS, Xiong WJ, Rosseneu M, Yang HX, Lee BR, Gotto AM Jr, Chan L., *The primary structure of human apolipoprotein A-IV.* Biochim Biophys Acta., 1989. **1002**: p. 231-237.
247. Jakel, H., Nowak M, Helleboid-Chapman A, Fruchart-Najib J, Fruchart JC., *Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride-rich lipoproteins?* Ann Med., 2006. **38**: p. 2-10.
248. Jong, M.C., Hofker MH, Havekes LM., *Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3.* Arterioscler Thromb Vasc Biol., 1999. **19**: p. 472-484.
249. Navab, M., Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusis AJ, Fogelman AM, La Du BN., *Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio.* J Clin Invest., 1997. **99**: p. 2005-2019.
250. Christoffersen, C., Dahlbäck B, Nielsen LB., *Apolipoprotein M: progress in understanding its regulation and metabolic functions.* Scand J Clin Lab Invest., 2006. **66**: p. 631-637.
251. Rassart, E., Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, Milne R., *Apolipoprotein D.* Biochim Biophys Acta., 2000. **1482**: p. 185-198.
252. Kamboh, M.I., Manzi S, Mehdi H, Fitzgerald S, Sanghera DK, Kuller LH, Atson CE., *Genetic variation in apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I) affects the occurrence of antiphospholipid antibodies and apolipoprotein H concentrations in systemic lupus erythematosus.* Lupus., 1999: p. 742-750.
253. Brouillette, C.G., Anantharamaiah GM., *Structural models of human apolipoprotein A-I.* Biochim Biophys Acta., 1995. **1256**: p. V.
254. Ylä-Herttua, S., *Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo?* Curr Opin Lipidol., 1998. **9**: p. 337-344.

255. Steinberg, D., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis.* Circulation., 1997. **95**: p. 1062-1071.
256. Mertens, A., Holvoet P., *Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis.* FASEB J., 2001. **15**: p. 2073-2084.
257. Heinecke, J.W., *Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis.* Atherosclerosis., 1998. **141**: p. 1-15.
258. Berliner, J.A., Heinecke JW., *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis.* Free Radic Biol Med., 1996. **20**: p. 707-727.
259. Holvoet, P., Collen D., *Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis.* FASEB J. , 1994. **8**: p. 1279-1284.
260. Rader, D.J., Daugherty A. , *Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis.* Nature., 2008. **451**: p. 904-913.
261. Malle, E., Marsche G, Arnhold J, Davies MJ., *Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid.* Biochim Biophys Acta., 2006. **1761**: p. 392-415.
262. Klebanoff, S.J., *J Leukoc Biol.* Myeloperoxidase: friend and foe, 2005. **77**: p. 598-625.
263. Zeng, J., Fenna RE., *X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution.* J Mol Biol., 1992. **226**: p. 185-207.
264. Winterbourn, C.C., Pichorner H, Kettle AJ., *Myeloperoxidase-dependent generation of a tyrosine peroxide by neutrophils.* Arch Biochem Biophys., 1997. **338**: p. 15-21.
265. Bolscher, B.G., Wever R., *A kinetic study of the reaction between human myeloperoxidase, hydroperoxides and cyanide. Inhibition by chloride and thiocyanate.* Biochim Biophys Acta., 1984. **788**: p. 1-10.
266. Hori, H., Fenna RE, Kimura S, Ikeda-Saito M., *Aromatic substrate molecules bind at the distal heme pocket of myeloperoxidase.* J Biol Chem., 1994. **269**: p. 8388-8392.
267. Daphna, E.M., Michaela S, Eynat P, Irit A, Rimon S., *Association of myeloperoxidase with heparin: oxidative inactivation of proteins on the surface of endothelial cells by the bound enzyme.* Mol Cell Biochem., 1998. **183**: p. 55-61.
268. Carr, A.C., Myzak MC, Stocker R, McCall MR, Frei B., *Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis.* FEBS Lett., 2000. **487**: p. 176-180.
269. van Dalen, C.J., Whitehouse MW, Winterbourn CC, Kettle AJ., *Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase.* Biochem J., 1997. **327**: p. 487-492.
270. Hazell, L.J., Stocker R., *Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages.* Biochem J., 1993. **290**: p. 165-172.
271. Steinberg, D., Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.* N Engl J Med., 1989(320): p. 915-924.
272. Pattison, D.I., Hawkins CL, Davies MJ., *Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling.* Chem Res Toxicol., 2003. **16**: p. 439-449.

273. Pattison, D.I., Davies MJ., *Kinetic analysis of the role of histidine chloramines in hypochlorous acid mediated protein oxidation*. *Biochemistry.*, 2005. **44**: p. 7378-7387.
274. Peskin, A.V., Winterbourn CC., *Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate*. *Free Radic Biol Med.*, 2001. **30**: p. 572-579.
275. Peskin, A.V., Winterbourn CC., *Histamine chloramine reactivity with thiol compounds, ascorbate, and methionine and with intracellular glutathione*. *Free Radic Biol Med.*, 2003. **35**: p. 1252-1260.
276. Hazell, L.J., Davies MJ, Stocker R., *Secondary radicals derived from chloramines of apolipoprotein B-100 contribute to HOCl-induced lipid peroxidation of low-density lipoproteins*. *Biochem J.*, 1999. **339**: p. 489-495.
277. Panasenko, O.M., Arnhold J, Schiller J, Arnold K, Sergienko VI., *Peroxidation of egg yolk phosphatidylcholine liposomes by hypochlorous acid*. *Biochim Biophys Acta.*, 1994. **1215**: p. 259-266.
278. Schiller, J., Zschörnig O, Petković M, Müller M, Arnhold J, Arnold K., *Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and (31)P-NMR*. *J Lipid Res.*, 2001. **42**: p. 1501-1508.
279. Malle, E., Marsche G, Panzenboeck U, Sattler W., *Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins*. *Arch Biochem Biophys.*, 2006. **445**: p. 245-255.
280. Hazen, S.L., Hsu FF, Duffin K, Heinecke JW., *Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes converts low density lipoprotein cholesterol into a family of chlorinated sterols*. *J Biol Chem.*, 1996. **271**: p. 23080-23088.
281. Carr, A.C., van den Berg JJ, Winterbourn CC.. *Differential reactivities of hypochlorous and hypobromous acids with purified Escherichia coli phospholipid: formation of haloamines and halohydrins*. *Biochim Biophys Acta.*, 1998. **1392**: p. 254-264.
282. Wildsmith, K.R., Albert CJ, Hsu FF, Kao JL, Ford DA., *Myeloperoxidase-derived 2-chlorohexadecanal forms Schiff bases with primary amines of ethanolamine glycerophospholipids and lysine*. *Chem Phys Lipids.*, 2006. **139**: p. 157-170.
283. Hazell, L.J., Stocker R., *Alpha-tocopherol does not inhibit hypochlorite-induced oxidation of apolipoprotein B-100 of low-density lipoprotein*. *FEBS Lett.*, 1997. **414**: p. 541-544.
284. Marsche, G., Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, Malle E., *Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I, impairs high density lipoprotein-dependent selective lipid uptake and reverse cholesterol transport*. *J Biol Chem.*, 2002. **277**: p. 32172-32179.
285. Davidson, W.S., Hazlett T, Mantulin WW, Jonas A., *The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1996. **93**: p. 13605-13610.
286. Kunjathoor, V.V., Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. *J Biol Chem.*, 2002. **277**: p. 49982-49988.
287. Valiyaveetil, M., Podrez EA., *Platelet hyperreactivity, scavenger receptors and atherothrombosis*. *J Thromb Haemost.*, 2009. **7**: p. 218-221.

288. Feng, H., Li XA., *Dysfunctional high-density lipoprotein*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes., 2009. **16**: p. 156-162.
289. Schwenke, D.C., Carew TE., *Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries*. Arteriosclerosis., 1989. **9**: p. 908-918.
290. Frei, B., Stocker R, Ames BN., *Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1988. **85**: p. 9748-9752.
291. Witztum, J.L., Steinberg D., *The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?* Trends Cardiovasc Med., 2001. **11**: p. 93-102.
292. Glomset, J.A., Norum KR., *The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives form pathology*. Adv Lipid Res., 1973. **11**: p. 1-65.
293. Shao, B., Oda MN, Oram JF, Heinecke JW., *Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein*. Chem Res Toxicol., 2010. **23**: p. 447-454.
294. Klinger, M.F., *Platelets and inflammation*. Anat. Embryol., 1997. **196**: p. 1-11.
295. Weber, C., *Platelets and chemochines in atherosclerosis*. Circ.Res., 2005. **96**: p. 612-616.
296. Weyrich, A.S., Lindemann S and Zimmerman GA., *The evolving role of platelets in inflammation*. Thromb. Haemost., 2003. **1**: p. 1897-1905.
297. Davis, C., Fischer J, Ley K and Sarembock IJ., *The role of inflammation in vascular injury and repair*. Thromb Haemost., 2003. **1**: p. 1699-1709.
298. Coomber, B.L., Nyarko KA, Noyes TM and Gentry PA., *Neutrophil-platelet interactions and their relevance to bovine respiratory disease*. The Veterinary Journal., 2001. **161**: p. 41-62.
299. Deepak, L.B., Topol EJ., *Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy*. Nature. , 2003. **2**: p. 15-18.
300. Kawakami, A., Osaka M, Aikawa M, Uematsu S, Akira S, Libby P, Shimokado K, Sacks FM, Yoshida M., *Toll-like receptor 2 mediates apolipoprotein CIII-induced monocyte activation*. Circ Res., 2008. **103**: p. 1402-1409.
301. Choi, S.H., Harkewicz R, Lee JH, Boullier A, Almazan F, Li AC, Witztum JL, Bae YS, Miller YI., *Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake*. Circ Res., 2009. **104**: p. 1355-1363.
302. Beaulieu, L.M., Freedman JE., *The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes*. Thromb Res., 2010. **25**: p. 205-209.
303. Polgar, J., Matuscova J, Wagner DD., *The P-selectin, tissue factor, coagulation triad*. Thromb. Haemost., 2005. **3**: p. 1590-1596.
304. Wagner, D.D., Burger PC., *Platelets in inflammation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2003. **23**: p. 2131-2137.
305. Gawaz, M., Langer H, May AE., *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest., 2005. **115**: p. 3378-3384.
306. Gawaz, M., Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K., *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells*. Circulation., 1998. **98**: p. 1164-1171.
307. Dickfeld, T., Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, Thielen C, Langenbrink K, Gawaz M., *Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a*

- p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis.* Cardiovasc. Res., 2001. **49**: p. 189-199.
308. Langer, H.F., Gawaz M., *Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease.* Thromb Haemost., 2008. **99**: p. 480-486.
 309. Huo, Y., Ley KF., *Role of platelets in the development of atherosclerosis.* Trends Cardiovasc Med., 2004. **14**: p. 18-22.
 310. Zimmermann, G.A., McIntyre TM, Prescott SM., *Adhesion and signaling in vascular cell—cell interactions.* J Clin Invest. , 1996. **98**: p. 1699-1702.
 311. Entman, M.L., Ballantyne CM., *Association of neutrophils with platelet aggregates in unstable angina. Should we alter therapy?* Circulation., 1996. **94**: p. 1206-1208.
 312. Massberg, S., Schulz C, Gawaz M., *Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome.* Semin Vasc Med., 2003. **3**: p. 147-162.
 313. Evangelista, V., Manarini S, Dell'Elba G, Martelli N, Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet PS., *Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation.* Thromb Haemost., 2005. **94**: p. 568-577.
 314. Yang, J., Furie BC, Furie B., *The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leucocyte-endothelial and leucocyte-platelet interaction.* Thromb. Haemost., 1999. **81**: p. 1-7.
 315. Santoso, S., Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T., *The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leucocyte integrin Mac-1.* J Exp Med., 2002. **196**: p. 679-291.
 316. McGregor, L., Martin J, McGregor JL., *Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis.* Front Biosci., 2006. **11**: p. 830-837.
 317. Lindemann, S., Krämer B, Daub K, Stellos K, Gawaz M., *Curr Opin Lipidol. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis,* 2007. **18**: p. 566-573.
 318. Relou, I.A., Hackeng CM, Akkerman J, Malle E., *Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets.* Cell Mol Life Sci., 2003. **60**: p. 961-971.
 319. Hussain, M.M., *Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family.* Front Biosci., 2001. **6**: p. D417-428.
 320. Nofer, J.R., Brodde MF, Kehrel BE., *High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis.* Clin Exp Pharmacol Physiol., 2010. **37**: p. 726-735.
 321. Koller, E., Koller F, Binder BR., *Purification and identification of the lipoprotein-binding proteins from human blood platelet membrane.* J Biol Chem., 1989. **264**: p. 12412-12418.
 322. Malle, E., Ibovnik A, Stienmetz A, Kostner GM, Sattler, W., *Identification of glycoprotein IIb as the lipoprotein(a)-binding protein on platelets. Lipoprotein(a) binding is independent of an arginyl-glycyl-aspartate tripeptide located in apolipoprotein(a).* Arterioscler Thromb., 1994. **14**: p. 345-352.
 323. Pedreno, J., Fernandez R, Cullare C, Barcelo A, Elorza MA, de Castellarnau C., *Platelet integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) is not implicated in the binding of LDL to intact resting platelets.* Arterioscler Thromb Vasc Biol., 1997. **17**: p. 156-163.
 324. Ozsavci, D., Yardimci T, Demirel GY, Uras F, Hekim N, Ulutin ON., *Apo A-I binding to platelets detected by flow cytometry.* Thromb Res., 2001. **103**: p. 117-122.

325. Pedreño, J., de Castellarnau C, Masana L., *Platelet HDL(3) binding sites are not related to integrin alpha(IIb)beta(3) (GPIIb-IIIa)*. *Atherosclerosis.*, 2001. **154**: p. 23-29.
326. Febbraio, M., Hajjar DP, Silverstein RL., *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. *J Clin Invest.*, 2001. **108**: p. 785-791.
327. Hoebe, K., Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B., *CD36 is a sensor of diacylglycerides*. *Nature.*, 2005. **433**: p. 523-527.
328. Bodart, V., Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H., *CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart*. *Circ Res.*, 2002. **90**: p. 844-849.
329. Krieger, M., *Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems*. *J Clin Invest.*, 2001. **108**: p. 793-793.
330. Chen, M., Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T., *Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2001. **282**: p. 153-158.
331. Korporaal, S.J., Van Eck M, Adelmeijer J, Ijsseldijk M, Out R, Lisman T, Lenting PJ, Van Berkel TJ, Akkerman JW., *Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2007. **27**: p. 2476-2483.
332. Nofer, J.R., Herminghaus G, Brodde M, Morgenstern E, Rust S, Engel T, Sedorf U, Assmann G, Bluethmann H, Kehrel BE., *Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease)*. *J Biol Chem.*, 2004. **279**: p. 34032-34037.
333. Siegel-Axel, D., Daub K, Seizer P, Lindemann S, Gawaz M., *Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis*. *Cardiovasc Res.*, 2008. **78**: p. 8-17.
334. Stellos, K., Gawaz M., *Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine*. *Thromb Haemost.*, 2007. **98**: p. 922-929.
335. Stellos, K., Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M., *Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry?* *Pharmacol Rep.*, 2008. **60**: p. 101-108.
336. Massberg, S., Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo*. *J Exp Med.*, 2003. **197**: p. 41-49.
337. Daub, K., Langer H, Seizer P, Stellos K, May A, Goyal P, Bigalke B et al., *Platelets induce differentiation of human CD34⁺ progenitor cells into foam cells*. *FASEB J.*, 2006. **20**: p. 2559-2561.
338. De Boer, H.C., Verseyden C, Ulfman LH, Zwangiga JJ, Bot I, Biessen EA, Rabelinh TJ, et al., *Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2006. **26**: p. 1653-1659.
339. Lef, E.I., Estrov Z, Aboufatova K, Harris D, Granada JF, Alviar C, Kleiman NS et al., *Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix*. *Thromb Haemost.*, 2006. **96**: p. 498-504.
340. Massberg, S., Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit*

- bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo.* J Exp Med., 2006. **203**: p. 1221-1233.
341. Willerson, J.T., *Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques.* Prog Cardiovasc Dis., 2002. **44**: p. 469-478.
 342. von Hundelschausen, P., Weber C., *Platelets as immune cells. Bringing Inflammation and cardiovascular disease.* Circ Res., 2007. **100**: p. 27-40.
 343. Fitzgerald, J.R., Foster TJ, Cox D., *The interaction of bacterial pathogens with platelets.* Nat Rev Microbiol., 2006. **4**: p. 445-457.
 344. Shiraki, R., Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, Ejiri J, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M., *Expression of Toll-like receptors on human platelets.* Thromb Res., 2004. **113**: p. 379-385.
 345. Scheld, W.M., Valone JA, Sande MA., *Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin.* J Clin Invest., 1978. **61**: p. 1394-1404.
 346. Schwarz-Linek, U., Werner JM, Pickford AR, Gurusiddappa S, Kim JH, Pilka ES, Briggs JA, Gough TS, Höök M, Campbell ID, Potts JR., *Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper.* Nature., 2003. **423**: p. 177-181.
 347. Bodén, M.K., Flock JI., *Fibrinogen-binding protein/clumping factor from Staphylococcus aureus.* Infect Immun., 1989. **57**: p. 2358-2363.
 348. Erickson, P.R., Herzberg MC., *The Streptococcus sanguis platelet aggregation-associated protein. Identification and characterization of the minimal platelet-interactive domain.* J Biol Chem., 1993. **268**: p. 1646-1649.
 349. Loughman, A., Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, Foster TJ., *Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by Staphylococcus aureus clumping factor A.* Mol Microbiol. , 2005: p. 804-818.
 350. Fitzgerald, J.R., Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ., *Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIIa receptor.* Mol Microbiol., 2006. **59**: p. 212-230.
 351. Youssefian, T., Drouin A, Massé JM, Guichard J, Cramer EM., *Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation.* Blood., 2002. **99**: p. 4021-4029.
 352. Zucker-Franklin, D., Seremetis S, Zheng ZY., *Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retroviruses by megakaryocytes and platelets.* Blood., 1990. **75**: p. 1920-1923.
 353. Chaipan, C., Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, Geier M, Stewart EA, Eisemann J, Steinkasserer A, Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Pearce AC, Watson SP, Hoxie JA, Baribaud F, Pöhlmann S., *DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type I capture by platelets.* J Virol., 2006. **80**: p. 8951-8960.
 354. Reininger, A.J., Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM., *Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress.* Blood., 2006. **107**: p. 3537-3545.
 355. Pontiggia, L., Steiner B, Ulrichs H, Deckmyn H, Forestier M, Beer JH., *Platelet microparticle formation and thrombin generation under high shear are effectively*

- suppressed by a monoclonal antibody against GPIIb/IIIa*. *Thromb Haemost.*, 2006. **96**: p. 774-780.
356. Pereira, J., Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Pérez C, Sáez C, Panes O, Matus V, Mezzano D., *Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state*. *Thromb Haemost.*, 2006. **95**: p. 94-99.
 357. Nomura, S., Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J., *High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells*. *Atherosclerosis.*, 2001. **158**: p. 277-287.
 358. Tan, K.T., Lip GY., *The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis*. *Thromb Haemost.*, 2005. **94**: p. 488-492.
 359. Sinauridze, E.I., Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, Ataulkhanov FI., *Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets*. *Thromb Haemost.*, 2007. **97**: p. 425-434.
 360. Nomura, S., Inami N, Iwasaka T., *Differences in functional roles between activated platelets and platelet-derived microparticles*. *Thromb Haemost.*, 2007. **98**: p. 1143-1144.
 361. Beyer, C., Pisetsky DS., *The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases*. *Nat Rev Rheumatol.*, 2010. **6**: p. 21-29.
 362. Cocucci, E., Racchetti G, Meldolesi J., *Shedding microvesicles: artefacts no more*. *Trends Cell Biol.*, 2009. **19**: p. 43-51.
 363. Østerud, B., Bjørklid E., *Sources of tissue factor*. *Semin Thromb Hemost.*, 2006. **32**: p. 11-23.
 364. Giesen, P.L., Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Himer J, Riederer MA, Nemerson Y., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999. **96**: p. 2311-2315.
 365. Kushak, R.I., Nestoridi E, Lambert J, Selig MK, Ingelfinger JR, Grabowski EF., *Detached endothelial cells and microparticles as sources of tissue factor activity*. *Thromb Res.*, 2005. **116**: p. 409-419.
 366. Dignat-George, F., Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, Veit V, Combes V, Gentile S, Moal V, Sanmarco M, Sampol J., *Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome*. *Thromb Haemost.*, 2004. **91**: p. 667-673.
 367. Ettelaie, C., Collier ME, James NJ, Li C., *Induction of tissue factor expression and release as microparticles in ECV304 cell line by Chlamydia pneumoniae infection*. *Atherosclerosis.*, 2007. **190**: p. 343-351.
 368. Breitenstein, A., Tanner FC, Lüscher TF., *Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis?* *Circ J.*, 2010. **74**: p. 3-12.
 369. Østerud, B., *Tissue factor in neutrophils: no*. *J Thromb Haemost.*, 2004. **2**: p. 218-220.
 370. Nakamura, S., Imamura T, Okamoto K., *Tissue factor in neutrophils: yes*. *J Thromb Haemost.*, 2004. **2**: p. 214-217.
 371. Maugeri, N., Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, de Gaetano G, Cerletti C., *Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation*. *J Thromb Haemost.*, 2006. **4**: p. 1323-1330.

372. Kambas, K., Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, Kourtzelis I, Doumas MN, Magotti P, Deangelis RA, Lambris JD, Ritis KD., *C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome*. J Immunol., 2008. **180**: p. 7368-7375.
373. Ritis, K., Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S, Kartalis G, Sideras P, Lambris JD., *A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways*. J Immunol., 2006. **177**: p. 4794-48802.
374. de Waard, V., Hansen HR, Spronk HH, Timmerman JJ, Pannekoek H, Florquin S, Reitsma PH, ten Cate H., *Differential expression of tissue factor mRNA and protein expression in murine sepsis. The role of the granulocyte revisited*. Thromb Haemost., 2006. **95**: p. 348-353.
375. Müller, I., Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B., *Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets*. FASEB J., 2003. **17**: p. 476-478.
376. Panes, O., Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D., *Human platelets synthesize and express functional tissue factor*. Blood., 2007. **109**: p. 5242-5250.
377. Pérez-Pujol, S., Aras O, Lozano M, Cocking-Johnson D, Key NS, White JG, McCullough J, Escolar G., *Stored platelets contain residual amounts of tissue factor: evidence from studies on platelet concentrates stored for prolonged periods*. Transfusion., 2005. **45**: p. 572-579.
378. Falati, S., Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B., *Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin*. J Exp Med., 2003. **197**: p. 1585-1598.
379. Zillmann, A., Luther T, Müller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlägel U, Zahler S, Engelmann B., *Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation*. Biochem Biophys Res Commun., 2001. **281**: p. 603-609.
380. Rauch, U., Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y., *Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor*. Blood., 2000. **96**: p. 170-175.
381. Aras, O., Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS., *Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia*. Blood., 2004. **103**: p. 4554-553.
382. Camera, M., Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, Maderna P, Parolari A, Bonzi R, De Vincenti O, Tremoli E., *Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2003. **23**: p. 1690-1696.
383. Schwertz, H., Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS., *Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets*. J Exp Med., 2006. **203**: p. 2433-2440.
384. Del Conde, I., Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA., *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation*. Blood., 2005. **106**: p. 1604-1611.

385. André, P., Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD., *Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2000. **97**: p. 13835-13840.
386. del Conde, I., Nabi F, Tonda R, Thiagarajan P, López JA, Kleiman NS., *Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2005. **25**: p. 1065-1670.
387. Aukrust, P., Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Frøland SS, Gullestad L., *Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes*. Circulation., 1999. **100**: p. 614-620.
388. Freedman, J.E., *CD40-CD40L and platelet function: beyond hemostasis*. Circ Res., 2003. **92**: p. 944-946.
389. Lindmark, E., Tenno T, Siegbahn A., *Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2000. **20**: p. 2322-2328.
390. Mause, S.F., von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C., *Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2005. **25**: p. 1512-1518.
391. Holme, P.A., Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS., *Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 1997. **17**: p. 646-653.
392. Holme, P.A., Solum NO, Brosstad F, Pedersen T, Kveine M., *Microvesicles bind soluble fibrinogen, adhere to immobilized fibrinogen and coaggregate with platelets*. Thromb Haemost., 1998. **79**: p. 389-394.
393. Janiszewski, M., Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR., *Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway*. Crit Care Med., 2004. **32**: p. 818-825.
394. Munnix, I.C., Harmsma M, Giddings JC, Collins PW, Feijge MA, Comfurius P, Heemskerk JW, Bevers EM., *Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients*. Thromb Haemost., 2003(89): p. 687-695.
395. Castaman, G., Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F., *Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation*. Br J Haematol., 1997. **96**: p. 458-463.
396. Naganuma, Y., Satoh K, Yi Q, Asazuma N, Yatomi Y, Ozaki Y., *Cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in platelets exposed to high shear stress*. J Thromb Haemost., 2004. **2**: p. 1998-2008.
397. Falati, S., Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, Pixton KL, Weiler H, Cooley B, Newman DK, Newman PJ, Furie BC, Furie B, Gibbins JM., *Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo*. Blood., 2006. **107**: p. 535-541.
398. Podor, T.J., Singh D, Chindemi P, Foulon DM, McKelvie R, Weitz JI, Austin R, Boudreau G, Davies R., *Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface*. J Biol Chem., 2002. **77**: p. 7529-7539.

399. Horrevoets, A.J., *Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1): in vitro activities and clinical relevance*. Br J Haematol., 2004. **125**: p. 12-23.
400. Booth, N.A., Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR., *Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets*. Br J Haematol., 1988. **70**: p. 327-333.
401. Salonen, E.M., Vaheri A, Pöllänen J, Stephens R, Andreasen P, Mayer M, Danø K, Gailit J, Ruoslahti E., *Interaction of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with vitronectin*. J Biol Chem., 1989. **264**: p. 6339-6343.
402. Miles, L.A., Ginsberg MH, White JG, Plow EF., *Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms*. J Clin Invest., 1986. **77**: p. 2001-2009.
403. Keuren, J.F., Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW, Lindhout T, Curvers J., *Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation*. Br J Haematol., 2006. **134**: p. 307-313.
404. Nomura, S., *Function and clinical significance of platelet-derived microparticles*. Int J Hematol., 2001. **74**: p. 397-404.
405. Barry, O.P., Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles*. J Clin Invest., 1998. **102**: p. 136-144.
406. Barry, O.P., Kazanietz MG, Praticò D, FitzGerald GA., *Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway*. J Biol Chem., 1999. **274**: p. 7545-7556.
407. Merten, M., Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR., *Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism*. Circulation., 1999. **99**: p. 2577-2582.
408. Gawaz, M., Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A., *Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction*. Circulation., 1997: p. 1809-1818.
409. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J., 1999. **138**: p. S419-S20.
410. Weber, A., Köppen HO, Schrör K., *Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism*. Thromb Res., 2000. **98**: p. 461-466.
411. Huo, Y., Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nat Med., 2003. **9**: p. 61-67.
412. Burger, P.C., Wagner DD., *Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development*. Blood., 2003. **101**: p. 2661-2666.
413. Forlow, S.B., McEver RP, Nollert MU., *Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow*. Blood., 2000. **95**: p. 1317-1323.
414. Mitsios, J.V., Vini MP, Stengel D, Ninio E, Tselepis AD., *Human platelets secrete the plasma type of platelet-activating factor acetylhydrolase primarily associated with microparticles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2006. **26**: p. 1907-1913.
415. Tellis, C.C., Tselepis AD., *The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma*. Biochim Biophys Acta., 2009. **1791**: p. 327-338.
416. Ray, D.M., Spinelli SL, Pollock SJ, Murrant TI, O'Brien JJ, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP., *Peroxisome proliferator-activated receptor*

- gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles.* Thromb Haemost., 2008. **99**: p. 86-95.
417. Hansson, G.K., *N Engl J Med.* Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, 2005. **352**: p. 1685-1695.
418. Mallat, Z., Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A., *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity.* Circulation., 1999. **99**: p. 348-353.
419. Leroyer, A.S., Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM., *Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques.* J Am Coll Cardiol., 2007. **49**: p. 772-777.
420. Benameur, T., Andriantsitohaina R, Martínez MC., *Therapeutic potential of plasma membrane-derived microparticles.* Pharmacol Rep., 2009. **61**: p. 49-57.
421. Aliotta, J.M., Sanchez-Guijo FM, Dooner GJ, Johnson KW, Dooner MS, Greer KA, Greer D, Pimentel J, Kolankiewicz LM, Puente N, Faradyan S, Ferland P, Bearer EL, Passero MA, Adedi M, Colvin GA, Quesenberry PJ., *Alteration of marrow cell gene expression, protein production, and engraftment into lung by lung-derived microvesicles: a novel mechanism for phenotype modulation.* Stem Cells., 2007. **25**: p. 2245-2256.
422. Deregibus, M.C., Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G., *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA.* Blood., 2007. **110**: p. 2440-2448.
423. Mustard, J.F., Perry DW, Ardlie NG, Packham MA., *Preparation of suspensions of washed platelets from humans.* Br J Haematol., 1972. **22**: p. 193-204.
424. Molnar, J., Lorand L., *Studies on apyrases.* Arch Biochem Biophys., 1961: p. 353-363.
425. Holme, S., Sixma JJ, Wester J, Holmsen H., *ADP-induced refractory state of platelets in vitro. Functional and ultra studies on gel filtered platelets.* Scand J Haematol., 1977. **18**: p. 267-278.
426. Dimitriou, A.A., Stathopoulos P, Mitsios JV, Sakarellos-Daitsiotis M, Goudevenos J, Tsikaris V, Tselepis AD., *Inhibition of platelet activation by peptide analogs of the beta(3)-intracellular domain of platelet integrin alpha(IIb)beta(3) conjugated to the cell-penetrating peptide Tat(48-60).* Platelets., 2009. **20**: p. 539-547.
427. Barry, O.P., Fitzgerald GA., *Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles.* Thromb. Haemost., 1999. **82**: p. 794-800.
428. Pasquet, J.M., Toti F, Nurden AT, Dachery-Prigent J., *Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles.* Thromb Res. , 1996. **82**: p. 509-522.
429. Marti, G.E., *Seminars in Hematology: Introduction to Flow Cytometry.* 2001. **38**.
430. Herzenberg, L.A., *Immunology Today: Monoclonal Antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine* 2000. **21**.
431. Bonfanti, R., Furie BC, Furie B, Wagner DD., *PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells.* Blood., 1989. **73**: p. 1109-1112.
432. Stenberg, P.E., McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. , *A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation.* J Cell Biol., 1985. **106**: p. 880-886.

433. Abrams, C.S., Ruggeri ZM, Taub R, Hoxie JA, Nagaswami C, Weisel JW, Shattil SJ., *Anti-idiotypic antibodies against an antibody to the platelet glycoprotein (GP) IIb-IIIa complex mimic GP IIb-IIIa by recognizing fibrinogen.* J Biol Chem., 1992. **267**: p. 2775-2785.
434. Smith, P.K., Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem., 1985. **150**: p. 76-85.
435. Karabina, S.A., Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J, Tselepis, AD., *Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions.* Biochim Biophys Acta., 1994. **1213**: p. 34-38.
436. Smythe, C.D., Skinner VO, Bruckdorfer KR, Haskard DO, Landis RC., *The state of macrophage differentiation determines the TNF alpha response to nitrated lipoprotein uptake.* Atherosclerosis., 2003. **170**: p. 213-221.
437. Savenkova, M.I., Mueller DM, Heinecke JW., *Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein.* J Biol Chem., 1994. **269**: p. 20394-20400.
438. Tselepis, A.D., Lekka ME, Tsoukatos DC., *A PAF-acetylhydrolase activity in Tetrahymena pyriformis cells.* FEBS Lett., 1991. **288**: p. 147-150.
439. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature., 1970. **227**: p. 680-685.
440. Bligh, E.G., Dyer WJ., *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Can J Biochem Physiol., 1959. **37**: p. 911-917.
441. Weerheim, A.M., Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R., *Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography.* Anal Biochem., 2002. **302**: p. 191-198.
442. Kolarovic, L., Fournier NC., *A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources.* Anal Biochem., 1986. **156**: p. 244-250.
443. Bartlett, G.R., *Phosphorus assay in column chromatography.* J Biol Chem., 1959. **234**: p. 466-468.
444. Marinetti, G.V., *Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides.* J Lipid Res., 1962. **3**: p. 1-20.
445. Lakowicz, J.R., ed. *Principles of fluorescence spectroscopy.* Third edition. 2006, Plenum Press: New York.
446. Valeur, B., *Molecular fluorescence: Principles and applications.* 2001: Wiley-VCH.
447. Jenkins, R.E., Bhogal BS, Willstead E, et al., *Artefacts in immunofluorescence microscopy: a potent source of diagnostic confusion.* J Eur Acad Dermatol Venereol., 1992. **1**: p. 1741-1777.
448. Giloh, H., Sedat JW., *Flourescence microscopy: Reduced photobleaching of rhodamine and flourescence protein conjugates by n-propyl gallate.* Science., 1982. **217**: p. 1252-1255.
449. Gammon, N.R., Fine JD, Briggaman RA., *Immunoflourescence on split-skin for the detection and differentiation of basement membrane antibodies.* J Am Acad Dermatol., 1992. **27**: p. 79-87.
450. Pawley, J.B., ed. *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* 2006, Springer: Berlin.
451. McPherson, M.J., Moller SG., ed. *PCR.* 1st edition. 2000, BIOS Scientific Publishers: Oxford.

452. Λιανίδου, Ε.Σ., *Τεχνικές μοριακής διαγνωστικής-Σημειώσεις μαθήματος Κλινικής Χημείας του Μ.Δ.Ε "Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική"*. 2003, Αθήνα.
453. Wittwer, C.T., Kuskawa, N, Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE., ed. *Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 2006, Elsevier: Missouri.
454. Valasek, M.A., Repa JJ., *The power of real-time PCR*. Adv Physiol Educ., 2005. **29**: p. 151-159.
455. Lutfalla, G., Uze G., *Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments*. Methods Enzymol., 2006. **410**: p. 386-400.
456. Huggett, J., Dheda K, Bustin S, Zumla A., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun., 2005. **6**: p. 279-284.
457. Kubista, M., Andrade JM, Bengtsson M, et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med., 2006. **27**: p. 95-125.
458. Giulietti, A., Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C., *An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression*. Methods., 2001. **25**: p. 386-401.
459. Dachary-Prigent, J., Pasquet JM, Freyssinet JM, Nurden AT., *Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca²⁺-ATPase inhibitors*. Biochemistry., 1995. **34**: p. 11625-11634.
460. Winterbourn, C.C., *Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite*. Biochim Biophys Acta., 1985. **840**: p. 204-210.
461. Biro, E., Akkerman JW, Hoek FJ, Gorter G, Pronk LM, Sturk A, Nieuwland R., *The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions*. J Thromb Haemost., 2005. **3**: p. 2754-2763.
462. Kaplanski, G., Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, Kaplanski S, Farnarier C., *Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106)*. Blood., 1998. **92**: p. 1259-1267.
463. Rahman, A., Anwar KN, Minhajuddin M, Bijli KM, Javaid K, True AL, Malik AB., *cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in endothelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2004. **287**: p. L1017-1024.
464. Kim, I., Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY., *Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells*. J Biol Chem., 2001. **76**: p. 7614-7620.
465. Pober, J.S., Contran RS., *Cytokines and endothelial cell biology*. Physiological reviews., 1990. **70**: p. 427-451.
466. Tsakadze, N.L., Zhao Z, D'Souza SE., *Interactions of intercellular adhesion molecule-1 with fibrinogen*. Trends Cardiovasc Med., 2002. **12**: p. 101-108.
467. Majka, M., Kijowski J, Lesko E, Gozdizk J, Zupanska B, Ratajczak MZ., *Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells-implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias*. Folia Histochem Cytobiol., 2007. **45**: p. 27-32.

468. Kirsch, T., Woywodt A, Beese M, et al., *Engulfment of apoptotic cells by microvascular endothelial cells induces proinflammatory responses*. *Blood.*, 2007. **109**: p. 2854-2862.
469. Setzer, F., Oberle V, Blass M, Moller E, Russwurm S, Deigner H-P, Claus RA, Bauer M, Reinhart K, Losche W., *Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells: A DNA microarray study*. *Platelets.*, 2006. **17**: p. 572-576.
470. Scholz, T., Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W., *Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P*. *Thromb Haemost.*, 2002. **88**: p. 1033-1038.
471. Pedreño, J., de Castellarnau C, Cullaré C, Sánchez J, Gómez-Gerique J, Ordóñez-Llanos J, González-Sastre F., *LDL binding sites on platelets differ from the "classical" receptor of nucleated cells*. *Arterioscler Thromb.*, 1992. **12**: p. 1353-1362.
472. Curtiss, L.K., Plow EF., *Interaction of plasma lipoproteins with human platelets*. *Blood.*, 1984. **64**: p. 365-374.
473. Camejo, G., Olsson U, Hurt-Camejo E, Baharamian N, Bondjers G., *The extracellular matrix on atherogenesis and diabetes-associated vascular disease*. *Atheroscler Suppl.*, 2002. **3**: p. 3-9.
474. Thiagarajan, P., Tait JF., *Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles*. *J Biol Chem.*, 1991. **266**: p. 24302-24307.
475. Clemetson, K., Pfueller SL, Luscher EF, Jenkins CS., *Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography*. *Biochim Biophys Acta.*, 1977. **464**: p. 493-508.
476. Albert, M.L., et al., *Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes*. *J Exp Med.*, 1998. **188**: p. 1359-1368.
477. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. *J Clin Invest.*, 2000. **105**: p. 1049-1056.
478. Ghosh, A., Li W, Febbrino M, EspinolaRG, McCrae KR, Cockrell E, Silverstein RL., *Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice*. *J Clin Invest.*, 2008. **118**: p. 1934-1943.
479. Boulanger, C.M., Amabile N, Tedgui A., *Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease*. *Hypertension.*, 2006. **48**: p. 180-186.
480. Davi, G., Patrono C., *Platelet Activation and Atherosclerosis*. *N Engl J Med.*, 2007. **357**: p. 2482-2494.
481. Heistad, D.D., *Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff Lecture*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2005. **26**: p. 689-695.
482. Bonomini, F., Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R., *Atherosclerosis and oxidative stress*. *Histol Histopathol*, 2008. **23**: p. 381-390.
483. Higashi, Y., Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y., *Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular disease*. *Circ J.*, 2009. **73**: p. 411-418.
484. Freedman, J.E., *Oxidative stress and platelets*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2008. **28**: p. s11-s16.

485. Liapikos, T.A., Antonopoulou S, Karabina SA, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD., *Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated*. Biochim Biophys Acta., 1994. **1212**: p. 353-360.
486. Dentan, C., Lesnic P, Chapman MJ, Ninio E., *PAF-acether-degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper- and cell-mediated oxidation*. Arterioscler Thromb., 1994. **14**: p. 353-360.
487. Tselepis, A.D., Doulias P, Lourida E, Glantzounis G, Tsimoyiannis E, Galaris D., *Trimetazidine protects low-density lipoproteins from oxidation and cultured cells exposed to H₂O₂ from DNA damage*. Free Radic Biol Med., 2001. **30**: p. 1357-1364.
488. Pawar, D., Shahani S, Maroli S., *Aspirin-the novel antiplatelet drug*. HKMJ, 1998. **4**: p. 415-418.
489. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature., 2008. **451**: p. 914-918.
490. de Waard, V., van de Berg BMM, Veken J, Schultz-Heienbrok Robert, Pannekoek H, van Zonneveld AJ. , *Serial analysis of gene expression to assess the endothelial cell response to an atherogenic stimulus*. Genes., 1999. **226**: p. 1-8.
491. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature., 1993. **362**: p. 801-809.
492. Ratajczak, J., Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ., *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediator of cell-to-cell communication*. Leukemia, 2006. **20**: p. 1487-1495.
493. Tabas, I., *The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis*. Circ Res., 2010. **107**: p. 839-850.
494. Feaver, R.E., Hastings NE, Pryor A, Blackman BR., *GPR78 Upregulation by atheroprone shear stress via p38-, α 2 β 1-dependent mechanism in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2008. **28**: p. 1534-1541.
495. Sabatier, F., Roux V, ANfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F., *Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity*. Blood., 2002. **99**: p. 3962-3970.
496. Yih, L.H., Peck K, Lee TC., *Changes in gene expression profiles of human fibroblasts in response to sodium arsenite treatment*. Carcinogenesis, 2002. **23**: p. 867-876.
497. Erbay, E., Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow M, Fazio S, Wiest MM, Watkins SM, Linton MF, Hotamisligil GS., *Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis*. Nat Med., 2009. **15**: p. 1383-1391.
498. Bielinski, S.J., Pankow JS, Foster CL, Miller MB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Hixson J, Liu Y, Register T, Myers RH, Arnett DK., *Circulating soluble ICAM-1 levels shows linkage to ICAM gene cluster region on Chromosome 19: the NHLBI Family Heart Study Follow-up Examination*. Atherosclerosis., 2008. **199**: p. 172-178.
499. Carluccio, M.A., Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C, de Caterina R., *Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF- κ B and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants*. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2007. **293**: p. H2344-H2354.

500. Feinberg, M.W., Shimizu K, Lebedeva M, Haspel R, Takayama R, Chen Z, Frederick JP, Wang X-F, Simon DI, Libby P, Mitchell RN, Jain MK., *Essential Role for Smad3 in Regulating MCP-1 Expression and Vascular Inflammation*. *Circ Res.*, 2004. **94**: p. 601-608.
501. Kang, Y.J., Wingerd BA, Arakawa T, Smith WL., *Cyclooxygenase-2 Gene Transcription in a Macrophage Model of Inflammation*. *J Immunol.*, 2006. **177**: p. 8111–8122.